

# Νυκτερινή παροξυντική αιμοσφαιρινουρία Παθογενετικοί μηχανισμοί

I. ΧΡ. ΜΕΛΕΤΗΣ, Ε. ΤΕΡΠΟΣ

**Η** νυκτερινή παροξυντική αιμοσφαιρινουρία (ΝΠΑ) ή νόσος των Marchiafava-Micheli αποτελεί μια επίκτητη κλωνική διαταραχή του αρχέγονου αιμοποιητικού κυττάρου που χαρακτηρίζεται από χρόνια ενδαγγειακή αιμόλυση με αιμοσφαιρινουρία και αιμοσιδηρινουρία, διαλείποντα θρομβωτικά επεισόδια, μυελική απλασία διαφόρου βαθμού, πιθανώς αυξημένη συχνότητα λοιμώξεων και σπανιότερα εκτροπή σε οξεία λευχαιμία<sup>1,2</sup>. Σ' αυτήν εμφανίζεται πληθυσμός παθολογικών ερυθρών αιμοσφαιρίων που παρουσιάζει ιδιαίτερη ευαισθησία στη λυτική δράση του συμπληρώματος. Την ίδια διαταραχή εμφανίζουν τόσο υποπληθυσμοί των πολυμορφοπυρήνων και των μονοκυττάρων, όσο και των λεμφοκυττάρων και των αιμοπεταλίων<sup>3,4</sup>.

Η νόσος αποτελεί κλασικό αντικείμενο της Αιματολογίας μετά τις κλινικές μελέτες των Marchiafava και Nazari στις αρχές του αιώνα<sup>5</sup>, του Micheli το 19316 και τη διαγνωστική προσπέλασή της λίγα χρόνια αργότερα<sup>7,8</sup>. Η πρώτη κλινική αναφορά της ΝΠΑ φαίνεται ότι έγινε από τον Γερμανό ιατρό Schmidt, στη Λατινική γλώσσα, το 1678<sup>9</sup>. Η πρώτη τεκμηριωμένη περιγραφή έγινε αυτή τη φορά στη Γερμανική γλώσσα το 1882<sup>10</sup>. Εκείνη την εποχή εμφανιζόταν αρκετά συχνά μια κλινική οντότητα χαρακτηριζόμενη από οξεία αιμοσφαιρινουρία μετά έκθεση σε ψύχος, σχετιζόταν με τη σύφιλη και είχε την ονομασία παροξυντική αιμοσφαιρινουρία εκ ψύχους. Η κυριότερη συνεισφορά του Strubing ήταν ο διαχωρισμός της κλινικής αυτής οντότητας, που αργότερα αποδείχθηκε ότι οφειλόταν σε αιμόλυση λόγω των ερυθροκυτταρικών αντισωμάτων Donath-Landsteiner (1904), από την ΝΠΑ. Το 1911

αναγνωρίστηκε για πρώτη φορά ότι η ΝΠΑ αποτελεί μορφή αιμολυτικής αναιμίας, μετά μελέτη που απέδειξε ότι τα ερυθροκύτταρα του «παροξυσμικού ικτέρου», όπως ονομάστηκε το σύνδρομο, αιμολύονται όταν επώάζονται σε ορρό παρουσία CO<sub>2</sub><sup>11</sup>. Το 1937, οι Ham και συν. απέδειξαν ότι το συμπλήρωμα είναι απαραίτητο για την *in vitro* λύση των παθολογικών ερυθροκυττάρων το οποίο ενεργοποιείται σε οξινισθέντα ορρό. Η κλωνικότητα της νόσου προσδιορίστηκε το 1970, όταν παρατηρήθηκε ένας μόνο τύπος του ενζύμου G6PD στα πάσχοντα ερυθροκύτταρα γυναικών<sup>12</sup>.

Ο όρος νυκτερινή παροξυντική αιμοσφαιρινουρία είναι μάλλον φτωχός, καθώς περιγράφει μόνο μια κλινική διαταραχή της νόσου που εμφανίζεται σε λιγότερο από το 25% των ασθενών. Από την άλλη πλευρά η αιμοσφαιρινουρία δεν εμφανίζεται μόνο τη νύκτα, ενώ η βαρύτητα της νόσου δεν εξαρτάται μόνο από την αναλογία των ερυθρών αιμοσφαιρίων που εμφανίζουν τη διαταραχή, αλλά κυρίως από τη συχνότητα εμφάνισης και τη βαρύτητα των φλεβικών θρομβώσεων και λοιμώξεων που αποτελούν επιπλοκές της νόσου και οφείλονται σε όχι πλήρως διευκρινισμένο μηχανισμό. Ωστόσο ο όρος ΝΠΑ έχει καθιερωθεί από τη συνεχή χρήση του και πιθανώς ένας πιο ακριβής μπορεί να τύχει ευρύτερης αποδοχής καθώς η παθογένεια της νόσου γίνεται συνεχώς και πιο κατανοητή.

## 1. ΠΑΘΟΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑ

### 1.1 Ερυθρά αιμοσφαίρια

Τα ερυθρά αιμοσφαίρια των πασχόντων από ΝΠΑ είναι παθολογικά ευαίσθητα στην δράση του ενεργοποιημένου συμπληρώματος μέσω της κλασικής<sup>13</sup> ή της εναλλακτικής οδού<sup>14</sup>. Η διαταραχή αυτή είναι συνέπεια μιας αυξημένης ευαισθησίας των κυττάρων στα

Α' Παθολογική Κλινική Πανεπιστημίου Αθηνών, Νοσοκομείο "Γενικό Λαϊκό"

τελικά ενεργοποιημένα κλάσματα του συμπληρώματος<sup>15</sup>. Η διαταραχή αυτή έχει επίσης σαν αποτέλεσμα μια πολύ μεγαλύτερη καθήλωση C3, σε σχέση με τη φυσιολογική, όταν ενεργοποιηθεί το συμπλήρωμα από αντισώματα (κλασική οδός) ή από οξυνοσθέντα ορό (εναλλακτική οδός). Σε αυτές τις καταστάσεις, η καθήλωση των κλασμάτων C1, C4, C2 και του αντισώματος είναι όμοιες με εκείνες των φυσιολογικών κυττάρων ενώ υπάρχει μεγάλη περίσσεια C3b<sup>16</sup>. Ένα ποσοστό των κυττάρων συμπεριφέρεται φυσιολογικά, ενώ μερικές φορές υπάρχει και ένας τρίτος πληθυσμός ερυθρών αιμοσφαιρίων που εμφανίζει μια ενδιάμεση διαταραχή<sup>17</sup>.

Οι τρεις παραπάνω ερυθροκυτταρικοί πληθυσμοί καθορίζονται *in vitro* ανάλογα με τις δοκιμασίες λύσης τους με την παρουσία ενεργοποιημένου συμπληρώματος. Ο πληθυσμός ΝΠΑ Ι αντιδρά φυσιολογικά, ο πληθυσμός ΝΠΑ ΙΙΙ είναι 15-25 φορές πιο ευαίσθητος στη λύση και ο ενδιάμεσος πληθυσμός ΝΠΑ ΙΙ είναι 3-5 φορές πιο ευαίσθητος από τον πληθυσμό ΝΠΑ Ι. Η συχνότητα της διακύμανσης του συνδυασμού των κυτταρικών πληθυσμών από τους οποίους εξαρτάται και κλινική έκφραση της νόσου είναι οι παρακάτω: Ι+ΙΙΙ: 78%, Ι+ΙΙ και Ι+ΙΙ+ΙΙΙ: 9%, ΙΙ+ΙΙΙ: 3%, μόνο ΙΙ: 1%<sup>15</sup>. Εξάλλου τα ερυθρά τύπου ΝΠΑ ΙΙΙ είναι τα μόνα που είναι ευαίσθητα στη τελική διαδοχή C5-9<sup>18</sup>. Οι κλινικές εκδηλώσεις και η βαρύτητα της νόσου εξαρτώνται από το ποσοστό των κυττάρων τύπου ΝΠΑ ΙΙΙ. Αν η αναλογία αυτή είναι κάτω του 20%, τότε η αιμόλυση είναι ασθενής ή και απουσιάζει, αν η αναλογία είναι μεταξύ 20% και 50% η αιμόλυση είναι ενδιάμεσης βαρύτητας, ενώ αν η αναλογία είναι πάνω από το 50% η αιμόλυση είναι έντονη και συνεχής. Οι μορφές με ερυθρά τύπου ΝΠΑ ΙΙ είναι υποκλινικές και συχνά απουσιάζει η εμφάνιση αιμοσφαιρινουρίας<sup>15</sup>.

Τα παθολογικά αιμοποιητικά κύτταρα προέρχονται από έναν κλώνο κυττάρων που φέρει ένα μόνο τύπο ισοενζύμου της G6PD, όπως ανιχνεύθηκε σε μια γυναίκα που παρουσίαζε στα φυσιολογικά της ερυθρά τον ένα ή τον άλλο τύπο (Α ή Β) του ενζύμου<sup>19</sup>, ενώ η επιβίωσή τους είναι μειωμένη<sup>16</sup>. Ο ίδιος πληθυσμός είναι εκείνος στον οποίο λείπει και η αλκαλική φωσφατάση από τα πολυμορφόπρηνα<sup>20</sup>. Οι λόγοι της *in vivo* ενεργοποίησης του συμπληρώματος, που ευθύνονται για την εμφάνιση αιμόλυσης και εκείνοι της ρύθμισής του δεν είναι πάντοτε ξεκάθαροι. Η αιμόλυση είναι εμφανής στους πάσχοντες των οποίων η επιβίωση των ερυθρών ΝΠΑ είναι μειωμένη. Η αιμόλυση αφορά κυρίως τα νεαρά ερυθρά, ενώ τα φυσιολογικά ερυθρά των πασχόντων από ΝΠΑ έχουν φυσιολογικό χρόνο επιβίωσης<sup>16</sup>.

Το αρνητικό φορτίο των ερυθρών είναι αυξημένο, γεγονός που υποθέτει την ύπαρξη μιας διαταραχής των γλυκοπρωτεϊνών της μεμβράνης<sup>21</sup>. Συνηθέστατα υπάρχει ανεπάρκεια αντιγόνων των ομάδων Α1, Α, Β και Η. Τα λιπίδια της μεμβράνης είναι φυσιολογικά<sup>22</sup>, αν και από μερικούς έχει περιγραφεί ανεπάρκεια φωσφατυδιλοχολίνη και αυξημένο ποσό φωσφατυδιλοσερίνης<sup>23</sup>, ενώ άλλοι ερευνητές δεν εντόπισαν αυτή την ανεπάρκεια και έχουν παρατηρήσει περίσσεια φωσφατυδιλονοσιτόλης και κορεσμένων λιπαρών οξέων<sup>24</sup>. Τα ερυθρά που εκτίθενται σε H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> σχηματίζουν περίσσεια υπεροξειδίων των λιπιδίων και λύνονται ευκολότερα σε σύγκριση με τα φυσιολογικά ερυθρά. Η χορήγηση βιταμίνης Ε στους ασθενείς αυτούς, ενώ διορθώνει την *in vitro* διαταραχή, δεν φαίνεται να επηρεάζει την αιμόλυση<sup>25</sup>.

Ο μηχανισμός της αιμόλυσης έχει πρόσφατα πλήρως διευκρινιστεί. Τα ερυθρά της ΝΠΑ είναι παθολογικά ευαίσθητα στη λυτική δράση του συμπληρώματος επειδή ανεπαρκούν σε πρωτεΐνες της μεμβράνης τους που ρυθμίζουν φυσιολογικά αυτή τη δραστηριότητα<sup>26,27</sup>. Μία τέτοια φυσιολογική γλυκοπρωτεΐνη της μεμβράνης είναι ο DAF (decay accelerating factor-CD55), ο οποίος φυσιολογικά μπλοκάρει τις C2 και C5 κονβερτάσες και ακριβέστερα αναστέλλει το σχηματισμό της C3 κονβερτάσης<sup>28</sup> προλαμβάνοντας με αυτό τον τρόπο την ενεργοποίηση του συμπληρώματος, μέσω της κλασικής ή της εναλλακτικής οδού, και συνεπώς τη λύση των κυττάρων από το αυτοόλογο συμπλήρωμα<sup>29</sup>. Στην ΝΠΑ ανεπαρκεί ή απουσιάζει ο DAF από τις μεμβράνες μερικών ερυθρών αιμοσφαιρίων όπως και από την επιφάνεια της μεμβράνης μερικών πολυμορφοπυρήνων, μονοκυττάρων, λεμφοκυττάρων και αιμοπεταλίων<sup>28</sup>. Μεταξύ των πρωτεϊνών της μεμβράνης που ανεπαρκούν είναι επίσης ο MIRL (membrane inhibitor of reactive lysis) ή CD59 ή HRF20 (homologous restriction factor 20)<sup>30</sup> και η πρωτεΐνη που συνδέεται με το C8 (C8 binding protein) ή HRF60<sup>31</sup>. Στην πραγματικότητα, όλα τα κυκλοφορούντα κύτταρα εμφανίζουν ποικίλο βαθμό ανεπάρκειας πολλών πρωτεϊνών της μεμβράνης, που όλες χαρακτηρίζονται από τη σύνδεση τους με ένα μόριο γλυκοσυλφωσφατυδιλονοσιτόλης (GPI). Σε αντίθεση με τις περισσότερες πρωτεΐνες της μεμβράνης, αυτές δε διαπερνούν ολόκληρο το τοίχωμά της, αλλά είναι προσδεμένες από την GPI, γεγονός που τους δίνει μεγαλύτερη κινητικότητα, αλλά επίσης και ευκολότερη ενζυματική υδρόλυση<sup>32</sup>. Ανάλογα παρατηρείται επίσης ανεπάρκεια του υποδοχέα FcγIII ή CD16 (λειτουργική πρωτεΐνη του πολυμορφόπρηνου)<sup>28</sup>, του LFA-3 ή CD58 (πρωτεΐνη σημαντική για την προσκόλληση των λεμφοκυττάρων)<sup>33</sup>

και του CD14 (πρωτεΐνη της μεμβράνης του μονοκυττάρου, με μη διευκρινισμένη λειτουργία)<sup>34</sup>. Τέλος ανεπαρκούν επίσης και διάφορα άλλα ένζυμα όπως η ακετυλοχολινεστεράση των ερυθρών<sup>35</sup>, η αλκαλική φωσφατάση των πολυμορφοπυρήνων και η 5'εκτονουκλεοτιδάση των λεμφοκυττάρων (CD73)<sup>4</sup>. Όπως θα περιγράψουμε παρακάτω ο μοριακός μηχανισμός της ΝΠΑ είναι η ύπαρξη ενός ελλείμματος στην «αγκυροβόληση» (anchorage) πρωτεϊνών που συντίθενται φυσιολογικά, αλλά που συνδέονται ανεπαρκώς ή καθόλου στην GPI, λόγω σωματικής μετάλλαξης του γονιδίου PIG-A (glycosyl phosphatidylinositol complementation group A) του αρχέγονου αιμοποιητικού κυττάρου που οδηγεί σε διαταραχή της σύνθεσης της GPI<sup>27,36</sup>.

Το στάδιο στο οποίο εμφανίζεται η παραπάνω διαταραχή κατά τη διάρκεια της αιμοποιητικής διαφοροποίησης αποτέλεσε αντικείμενο αμφισβήτησεων. Για μερικούς, η αυξημένη ευαισθησία στο συμπλήρωμα δεν υπάρχει στα προγονικά κύτταρα, αλλά εμφανίζεται κατά τη διάρκεια της διαφοροποίησης<sup>37</sup>, και ακριβέστερα στο στάδιο μεταξύ των BFU-E και των CFU-E<sup>38</sup>. Για άλλους η βλάβη εμφανίζεται ήδη από το αρχέγονο αιμοποιητικό κύτταρο, αλλά σε άλλοτε άλλη αναλογία φυσιολογικών και παθολογικών κυττάρων<sup>39</sup>. Ωστόσο τα αρχέγονα αιμοποιητικά κύτταρα της ΝΠΑ δεν πολλαπλασιάζονται *in vitro*, όπως τα φυσιολογικά αρχέγονα κύτταρα<sup>40</sup>. Σε χιμαιρικά ποντίκια που το γονίδιο PIG-A είναι ανενεργό, η συχνότητα εμφάνισης των παθολογικών κυττάρων είναι μικρή κατά τη γέννηση<sup>41</sup>, ενώ είναι πολύ μεγαλύτερη στην εμβρυϊκή ζωή και ελαττώνεται όσο προχωρά η εγκυμοσύνη. Τα παραπάνω δεδομένα δείχνουν ότι τα κύτταρα που εμφανίζουν διαταραχή στην παραγωγή της GPI παρουσιάζουν μη αποτελεσματική αιμοποίηση<sup>42,43</sup>. Φαίνεται λοιπόν ότι τα αρχέγονα κύτταρα που δεν εκφράζουν τη GPI δεν εμφανίζουν πλεονέκτημα ανάπτυξης στο φυσιολογικό μικροπεριβάλλον του μυελού<sup>44</sup>. Ωστόσο είναι γνωστό ότι στη ΝΠΑ το μικροπεριβάλλον του μυελού μπορεί να μην είναι φυσιολογικό και μερικά από τα κύτταρα του στρώματος μπορεί να προέρχονται από τον παθολογικό κλώνο με αποτέλεσμα την ανεπαρκή ρύθμιση της αιμοποίησης. Αυτή η αναποτελεσματική ρύθμιση ίσως προσφέρει κάποιο πλεονέκτημα ανάπτυξης στον παθολογικό κλώνο, φαινόμενο που δεν έχει ακόμα πλήρως διευκρινιστεί<sup>44</sup>.

## 1.2 Αιμοπετάλια

Τα αιμοπετάλια ασθενών με ΝΠΑ λύνονται *in vitro* 10-30 φορές περισσότερο σε σχέση με τα φυσιολογικά

παρουσία οξυνισθέντος ορού, σε περιβάλλον χαμηλής ιοντικής ισχύος ή παρουσία αντισταθμιστικών αντισωμάτων<sup>45</sup>. Όπως συμβαίνει και με τα ερυθρά, καθιλώνεται μεγαλύτερη συγκέντρωση συμπληρώματος σε σχέση με τα αιμοπετάλια ενός φυσιολογικού ατόμου<sup>46</sup>. Τέλος η δράση ενός αντισώματος παρουσία συμπληρώματος ή η ενεργοποίηση του C3 του ορού σε όξινο pH (σε οξυνισθέντα ορό), προκαλεί απελευθέρωση σεροτονίνης και προθρομβοπλαστινικών παραγόντων<sup>46</sup>. Η απελευθέρωση αυτών των προπηκτικών παραγόντων, τόσο από τα αιμοπετάλια, όσο και από τα αιμολύμενα ερυθρά<sup>47</sup>, αλλά και διαφόρων πρωτεασών από τα λευκά<sup>48</sup>, ενοχοποιούνται για την εμφάνιση κυρίως φλεβικών θρομβώσεων στην πορεία της νόσου. Η εμφάνιση των θρομβώσεων ευοδώνεται από παράγοντες που μπορούν να κινητοποιήσουν τον μηχανισμό της αιμόλυσης, όπως κατά την κύηση, τις χειρουργικές επεμβάσεις, μετά μετάγγιση ή κατά τη διάρκεια κάποιων λοιμώξεων<sup>49</sup>. Η απελευθέρωση όλων αυτών των προπηκτικών παραγόντων εκκλύει την εμφάνιση διάχυτης ενδαγγειακής πήξης<sup>50</sup>. Η εμφάνιση των θρομβώσεων φαίνεται ότι οφείλεται σε διαταραχή της μεμβράνης των αιμοπεταλίων που έχει σαν αποτέλεσμα τη μείωση ή απουσία των πρωτεϊνών που συνδέονται με αυτή μέσω GPI, όπως ο υποδοχέας της φιβρονεκτίνης (fibronectin receptor) και κυρίως ο υποδοχέας της ουροκινάσης (u-PAR, urokinase-type plasminogen activator receptor)<sup>44</sup>, το CD59<sup>27</sup>, το CD55<sup>51</sup> κ.αλ. Εντούτοις η διαταραχή της μεμβράνης των αιμοπεταλίων δεν μπορεί να εξηγήσει την εμφανιζόμενη θρομβοπενία σ' αυτούς τους ασθενείς που φαίνεται ότι σχετίζεται περισσότερο με ανεπάρκεια παραγωγής λόγω της παρουσίας μη αποδοτικής θρομβοποίησης ή υποπλασίας των κυττάρων της μεγακαρουκυτταρικής σειράς. Εδώ θα πρέπει να σημειωθεί ότι η επιβίωση των αιμοπεταλίων στους ασθενείς με ΝΠΑ είναι φυσιολογική<sup>52</sup>. Αυτό μπορεί να εξηγηθεί εν μέρει από την παρουσία ανασταλτού του συμπληρώματος στα α κοκκία των αιμοπεταλίων (παράγοντας H) που προστατεύει τα αιμοπετάλια από τη λύση.

## 1.3 Πολυμορφοπύρηνα

Τα πολυμορφοπύρηνα ασθενών με ΝΠΑ εμφανίζουν την ίδια αυξημένη ευαισθησία, όπως και τα ερυθρά, στη λυτική δράση του ενεργοποιημένου συμπληρώματος παρουσία οξυνισθέντος ορού ή παρουσία αντισωμάτων<sup>53</sup> και την ίδια απουσία πρωτεϊνών που συνδέονται με την κυτταρική μεμβράνη μέσω GPI<sup>54</sup>, όπως ο υποδοχέας FcγIII ή CD16<sup>55</sup>, το CD55<sup>56</sup>, το

CD59<sup>4</sup> κ.αλ. Σαν αποτέλεσμα αυτής της διαταραχής εμφανίζεται μείωση της χημειοταξίας και της φαγοκυττάρωσης των πολυμορφοκυττάρων παρουσία του ενεργοποιημένου συμπληρώματος<sup>57</sup>. Τα παραπάνω μπορούν να εξηγήσουν την ευαισθησία των αρρώστων με ΝΠΑ στις λοιμώξεις, ενώ δεν εμφανίζουν ουδετεροπενία<sup>47</sup>. Αυτή η παθολογική ευθραυστότητα των πολυμορφοκυττάρων στο συμπλήρωμα εμφανίζεται σε ένα ποσοστό των κυττάρων που κυμαίνεται από 6-90%<sup>53</sup>.

Η ουδετεροπενία δε φαίνεται να έχει σχέση με τη λύση των πολυμορφοκυττάρων από το ενεργοποιημένο συμπλήρωμα. Ο χρόνος επιβίωσης των πολυμορφοκυττάρων είναι φυσιολογικός και η ουδετεροπενία μάλλον οφείλεται σε ανεπάρκεια παραγωγής λόγω υποπλασίας ή και σε υπερβολική αύξηση της περιθωριακής δεξαμενής των πολυμορφοκυττάρων<sup>46</sup> και μη αποδοτική κοκκιοποίηση<sup>53</sup>.

#### 1.4 Λεμφοκύτταρα

Ένα ποσοστό των λεμφοκυττάρων είναι επίσης παθολογικά ευαίσθητο στη δράση του συμπληρώματος, καθώς η ΝΠΑ είναι κλωνική νόσος του αρχέγονου αιμοποιητικού κυττάρου. Η έκφραση του DAF, όπως και όλων των GPI πρωτεϊνών, είναι σημαντικά μειωμένη στα Β, στα Τ λεμφοκύτταρα<sup>58</sup> και στα κύτταρα φυσικοί φονείς (NK)<sup>59</sup>. Β, Τ λεμφοκύτταρα και NK κύτταρα με έλλειψη των GPI-πρωτεϊνών ανιχνεύονται σε υψηλά ποσοστά στην ΝΠΑ (88%, 84% και 89% αντίστοιχα)<sup>60</sup>. Μια τέτοια πρωτεΐνη είναι και ο LFA-3 (lymphocyte function antigen-3) ή CD58, που παίζει σημαντικό ρόλο στη διακυτταρική επικοινωνία<sup>61</sup> και που απουσιάζει ή είναι σημαντικά μειωμένος στα Τ λεμφοκύτταρα<sup>62</sup>. Η σύνδεση του CD<sup>58</sup> και του MIRC ή CD<sup>59</sup>, που απουσιάζει επίσης από τα λεμφοκύτταρα των ασθενών με ΝΠΑ, με το CD2 επαυξάνει το βαθμό ενεργοποίησης των Τ λεμφοκυττάρων<sup>63</sup>.

Αριθμητικές διαταραχές εμφανίζουν επίσης και οι υποπληθυσμοί των λεμφοκυττάρων των ασθενών με ΝΠΑ. Μείωση παρατηρείται επίσης τόσο στον απόλυτο αριθμό των NK κυττάρων όσο και στη λειτουργία τους, ενώ είναι επίσης σημαντική η ελάττωση του απόλυτου αριθμού των Β λεμφοκυττάρων<sup>60</sup>. Οι παραπάνω παρατηρήσεις, που δείχνουν την εμφάνιση λειτουργικών και ποσοτικών διαταραχών των λεμφοκυττάρων, σε συνδυασμό με τις αντίστοιχες των πολυμορφοκυττάρων, εξηγούν τον αυξημένο αριθμό λοιμώξεων που παρατηρούνται στην ΝΠΑ.

## 2. ΣΥΝΔΕΣΗ ΜΕΤΑΞΥ ΝΠΑ ΚΑΙ ΑΝΕΠΑΡΚΕΙΑΣ GPI ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ

Αν ο DAF ήταν η μόνη γνωστή πρωτεΐνη που ανεπαρκεί στην ΝΠΑ θα ήταν λογικό να υποθέσει κανείς ότι η ΝΠΑ οφείλεται σε μια ανωμαλία στο γονίδιο που τον κωδικοποιεί. Σχεδόν 40 χρόνια νωρίτερα, εντούτοις έχει δειχτεί ότι τα ερυθρά της ΝΠΑ ανεπαρκούσαν στην ακετυλοχολινεστεράση (AChE)<sup>64</sup>. Επιπλέον παρατηρήσεις έδειξαν ότι η ανεπάρκεια των ερυθρών στην AChE δεν συμμετέχει στην μεγαλύτερη ευαισθησία τους στη λυτική δράση του συμπληρώματος. Αν και η συσχέτιση της ανεπάρκειας της AChE με την παθολογική βάση της ΝΠΑ παρέμεινε σκοτεινή για πολλά χρόνια, οι τελευταίες παρατηρήσεις ήταν ουσιαστικές για την κατανόηση της μοριακής βάσης της νόσου.

Η ανεπάρκεια τόσο του DAF όσο και της AChE οδηγούν στο συμπέρασμα ότι το έλλειμμα στην ΝΠΑ πρέπει να εντοπίζεται σε κάποια παθολογική διεργασία ενός κοινού κατασκευαστικού στοιχείου και για τα δύο μόρια. Το 1984 αναφέρθηκε ότι ο απομονωμένος DAF μπορεί να ενσωματωθεί αυτόματα στις μεμβράνες των ερυθρών και επιπλέον μπορεί να εκφράζει την ανασταλτική του δραστηριότητα στη λύση μέσω του συμπληρώματος<sup>65</sup>. Σχεδόν συγχρόνως βρέθηκε ότι και η AChE μπορεί να ενσωματώνεται αυτόματα στις κυτταρικές μεμβράνες<sup>66</sup>. Στην περίπτωση της AChE, η ικανότητά της για ενσωμάτωση αποδόθηκε στην παρουσία μιας αλυσίδας GPI<sup>66</sup>. Σύμφωνα με τα παραπάνω η AChE συμπεριλήφθη σαν ένα μέλος της νέας περιγραφόμενης οικογένειας αμφιπαθητικών πρωτεϊνών της μεμβράνης, που έχουν σαν κοινό σημείο τη σύνδεση με την επιφάνεια του κυττάρου, μέσω ενός μορίου GPI (GPI-anchored proteins)<sup>67</sup>. Οι «αγκυροβολημένες» με GPI πρωτεΐνες δεν εμφανίζουν την υδρόφοβη περιοχή σύνδεσης με την μεμβράνη, που υπάρχει στις περισσότερες ακέραιες πρωτεΐνες της μεμβράνης. Αντίθετα το καρβοξυτελικό άκρο της πρωτεΐνης συνδέεται με ένα μόριο φωσφοαιθανολαμίνης (PEA) σε μια κατασκευή γλυκάνης που με τη σειρά της συνδέεται με το μόριο φωσφατιδυλοϊννοσιτόλης που έρχεται σε επαφή με την μεμβράνη<sup>67</sup>. Οι πρωτεΐνες αυτής της τάξης είναι πάντοτε ευαίσθητες στη διάσπαση από την ειδική φωσφολιπάση C της φωσφατιδυλινοσιτόλης (PIPLC). Η ευαισθησία αυτή στην PIPLC μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τον καθορισμό πρωτεϊνών που είναι συνδεδεμένες στη μεμβράνη μέσω αλυσίδας GPI. Η σχέση, όσον αφορά την κατασκευή, μεταξύ του DAF και της AChE

έγινε από τους Davitz και συν. 1986 που έδειξαν ότι ο DAF απελευθερώνεται από τα κύτταρα μετά επεξεργασία τους με PIPLC<sup>68</sup>. Τα αποτελέσματα αυτών και άλλων παρόμοιων μελετών<sup>69,70</sup> οδήγησαν στο συμπέρασμα ότι η ΝΠΑ είναι πιθανώς αποτέλεσμα μιας σωματικής μετάλλαξης που εδράζεται στο αρχέγονο αιμοποιητικό κύτταρο. Σαν συνέπεια του βιοσυνθετικού ελλείμματος οι συνδεδεμένες με GPI πρωτεΐνες ανεπαρκούν στην ΝΠΑ<sup>2,27</sup>. Πραγματικά όλες οι πρωτεΐνες που ανεπαρκούν στα αιμοποιητικά κύτταρα της ΝΠΑ είναι συνδεδεμένες με GPI και αντίστροφα όλα τα συνδεδεμένα με GPI μόρια φαίνεται να ανεπαρκούν στην ΝΠΑ. Οι πρωτεΐνες αυτές φαίνονται στον *πίνακα 1* και οι κυριότερες περιγράφονται παρακάτω:

## 2.1 CD55 - DAF (decay accelerating factor)

Το CD55 είναι μια γλυκοπρωτεΐνη συνδεδεμένη με GPI που αποδομεί το σύμπλεγμα της «κονβερτάσης», τόσο της κλασσικής (C4b2a) όσο και της εναλλακτικής (C3bBb) οδού του συμπληρώματος<sup>71</sup>. Με αυτόν τον τρόπο αναστέλλεται η εναπόθεση των C3 κλασμάτων στην επιφάνεια του κυττάρου και ελαχιστοποιείται η καταστροφή του κυττάρου μέσω του αυτόλογου συμπληρώματος. Η γλυκοπρωτεΐνη αυτή έχει μοριακό βάρος 70 kDa και η απογλυκοζυλίωσή της έχει σαν αποτέλεσμα τη δημιουργία μιας πρωτεΐνης μ.β. 46 kDa λόγω της αφαίρεσης μιας N-γλυκάνης (μ.β. 3kDa) και πολλών O-γλυκανών.

**Πίνακας 1.** Επιφανειακές πρωτεΐνες που λείπουν από τα κύτταρα του αίματος στην ΝΠΑ.

Αντιγόνο	Τύπος έκφρασης
<i>Ένζυμα:</i> Ακετυλοχολινεστεράση (AChE) Εκτο-5'νουκλεοτιδάση (CD73) Αλκαλική φωσφατάση πολυμορφοκυττάρων (NAP)	Ερυθρά Αρκετά Β και Τ λεμφοκύτταρα Πολυμορφοπύρηνα
<i>Μόρια προσκόλλησης:</i> Blast-1/CD48 LFA-1 ή CD58 CD67 CD66	Λεμφοκύτταρα Όλα τα κύτταρα του αίματος Πολυμορφοπύρηνα, Ηωσινόφιλα Πολυμορφοπύρηνα, Ηωσινόφιλα
<i>Πρωτεΐνες επιφανείας που ρυθμίζουν το συμπλήρωμα:</i> Decay accelerating factor (DAF ή CD55) Homologous restriction factor (HRF ή C8bp) Membrane inhibitor of reactive lysis (MIRL ή CD59)	Όλα τα κύτταρα του αίματος Όλα τα κύτταρα του αίματος Όλα τα κύτταρα του αίματος
<i>Υποδοχείς:</i> Fcγ υποδοχέας III (FcγRIII ή CD16) Monocyte differentiation antigen (CD14) Urokinase-type plasminogen activator receptor (u-PAR)	Π, NK, μακροφάγα, αρκετά Τ Λεμφοκύτταρα Μονοκύτταρα, μακροφάγα, κοκκιοκύτταρα Μονοκύτταρα, κοκκιοκύτταρα
<i>Αντιγόνα ομάδων αίματος:</i> Αντιγόνα Cromer (DAF) Αντιγόνα Yt (AChE) Αντιγόνο Holley Gregory Αντιγόνο John Milton Hagen (JMΗ) Υπόλειμμα Dombrock	Ερυθρά Ερυθρά Ερυθρά Ερυθρά, Λεμφοκύτταρα Ερυθρά
<i>Αντιγόνα πολυμορφοπυρήνων:</i> NA1/NA2 (CD16) NB1/NB2	Πολυμορφοπύρηνα Πολυμορφοπύρηνα
<i>Άλλες πρωτεΐνες επιφανείας με άγνωστη λειτουργία:</i> Αντιγόνο CAMPATH-1 (CDw52) CD24	Όλα τα κύτταρα του αίματος B-T Λεμφοκύτταρα, Πολυμορφοπύρηνα, Ηωσινόφιλα

Η αλληλουχία του συμπληρωματικού DNA (cDNA) κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη από 381 αμινοξέα περιλαμβάνοντας ένα οδηγό πεπτίδιο (signal peptide) από 34 βάσεις. Ξεκινώντας από το αμινοτελικό άκρο της ώριμης πρωτεΐνης υπάρχουν 4 βραχείες «συναινετικές» επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες (short consensus repeat-SCR) από 60 αμινοξέα, που η καθμία περιέχει 4 μόρια κυστεΐνης και υπάρχουν ομολογίες με περιοχές άλλων ρυθμιστικών πρωτεϊνών του συμπληρώματος. Τα SCRs ακολουθούνται από μια αλληλουχία 70 βάσεων που είναι πλούσιες σε σερίνη και θρεονίνη και η κατασκευή της πρωτεΐνης τελειώνει με ένα υδρόφοβο τμήμα 24 αμινοξέων που δεν υπάρχει στην τελική πρωτεΐνη διότι αφαιρείται μετά τη μεταγραφή, όταν η πρωτεΐνη προσδένεται στην GPI<sup>72</sup>. Η απλή N-γλυκάνη εντοπίζεται μεταξύ των SCR1 και SCR2 και οι πολυάριθμες O-γλυκάνες εντοπίζονται στα τμήματα που είναι πλούσια σε σερίνη και θρεονίνη, όπου σχηματίζουν μια ικανού μεγέθους κατασκευή που χρησιμεύει για την παρουσίαση των SCR περιοχών σε κάποια απόσταση από τη διπλοστοιβάδα λιποειδών<sup>73</sup>. Η λειτουργία του CD55 φαίνεται να ρυθμίζεται κυρίως από το τρίτο SCR αφού το μπλοκάρισμα της λειτουργίας του γίνεται αποτελεσματικότερα με μονοκλωνικά αντισώματα που αναγνωρίζουν επίτοπους αυτής της περιοχής<sup>73</sup>. Έχει περιγραφεί επίσης και ένα εναλλακτικό cDNA που κωδικοποιεί μια διαμεμβρανική πρωτεΐνη η οποία δεν συνδέεται με GPI<sup>74</sup>. Αυτός ο τύπος φαίνεται ότι εκφράζεται στα ερυθρά αιμοσφαίρια, αφού από ασθενείς με ΝΠΑ μπορεί να απομονωθούν παθολογικά ερυθρά με παρουσία του CD55.

Το γονίδιο που κωδικοποιεί το CD55 βρίσκεται στο χρωμόσωμα 1 (1q32) και αποτελείται από 11 εξόνια<sup>75</sup>. Τα εξόνια 2-6 κωδικοποιούν τις 4 SCR περιοχές. Το πρώτο, το δεύτερο και το τέταρτο SCRs κωδικοποιούνται από εξόνια με ίδιο περίπου μέγεθος, ενώ το τρίτο SCR κωδικοποιείται από δυο διαφορετικού μεγέθους εξόνια. Το 1982 οι Daniels και συν. περιέγραψαν έναν Ιάπωνα με έναν σπάνιο φαινότυπο ομάδας αίματος (φαινότυπος Inab). Από τα ερυθρά αυτού του αρρώστου απουσίαζαν όλα τα αντιγόνα του συστήματος ομάδων αίματος Cromer<sup>76</sup>. Στη συνέχεια βρέθηκε ότι τα αντιγόνα Cromers υπάρχουν σε μια βαριά O-γλυκοζυλιωμένη πρωτεΐνη των ερυθρών με μ.β. 70 kDa η οποία απουσίαζε από τα ερυθρά του φαινότυπου Inab<sup>77</sup>. Δύο ερευνητικές ομάδες έδειξαν ανεξάρτητα ότι η γλυκοπρωτεΐνη που φέρει τα αντιγόνα Cromer ήταν στην πραγματικότητα το CD55 και έτσι ερυθρά με φαινότυπο Inab είχαν ανεπάρκεια του CD55<sup>78</sup>. Η

ανάλυση της αλληλουχίας του cDNA και του γονιδίου του Inab έδειξαν μια σημειακή μεταλλαγή ενός νουκλεοτιδίου στο εξόνιο 2, η οποία αλλάζει μία τρυπτοφάνη (Trp-53) (TGG) με ένα κωδικόνιο τερματισμού (TGA) και ερμηνεύει την απουσία του CD55 από την μεμβράνη αυτού του αρρώστου<sup>79</sup>.

Ένας άλλος σπάνιος φαινότυπος των ερυθρών, ο Dr(a-), περιγράφει από τον Levene και συν. Σ' αυτή την περίπτωση απουσιάζει από τα ερυθρά το κοινό αντιγόνο Dra της ομάδας Cromer ενώ υπάρχει και σημαντικά μειωμένη έκφραση των άλλων αντιγόνων του συστήματος ομάδων αίματος Cromer<sup>80</sup>. Επιπλέον μελέτες της γενετικής βάσης αυτού του φαινότυπου έδειξαν, ότι αυτό είναι αποτέλεσμα της αλλαγής μιας και μόνης βάσης στο εξόνιο 5 [Ser-165 (TCG) σε Leu (TTG)]. Η αλλαγή αυτή έχει σαν αποτέλεσμα τη δημιουργία δύο τύπων cDNA. Ο ένας τύπος (με την απλή αλλαγή αμινοξέος) κωδικοποιεί ένα πλήρους μήκους CD55 και το άλλο, πιο μεγάλο, cDNA εμφανίζει μια έλλειψη 44 bp που ευθύνεται για την παρουσία ενός κωδικονίου τερματισμού. Τα αποτελέσματα αυτά εξηγούν την έντονα μειωμένη παρουσία του CD55 στα Dr(a-) ερυθρά, αφού στην κυτταρική μεμβράνη θα ενσωματωθεί μόνο το πλήρους μήκους CD55<sup>79</sup>.

Η απόδειξη ότι αυτοί οι σπάνιοι κληρονομικοί φαινότυποι είναι παραδείγματα της εκλεκτικής ανεπάρκειας του CD55, παρέχουν τη δυνατότητα διευκρίνησης της λειτουργικής σημασίας του CD55 στα φυσιολογικά κύτταρα, και ιδιαίτερα, την κλινική σημασία της απουσίας του από τα κύτταρα της ΝΠΑ. Από τη στιγμή που το CD55 ρυθμίζει τη δράση της C3 κονβερτάσης στα φυσιολογικά ερυθρά, η απουσία του από τα κύτταρα της ΝΠΑ θα ευθύνεται για την αυξημένη ευαισθησία τους στο συμπλήρωμα και συνεπώς για την εμφάνιση της αιμολυτικής αναιμίας που παρατηρείται στη νόσο<sup>72</sup>. Εντούτοις τα άτομα με φαινοτύπους Inab ή Dr(a-) δεν εμφανίζουν αιμολυτική αναιμία, παρά το γεγονός της κατά περίπου 20 φορές μεγαλύτερης εναπόθεσης C3 στα Inab ερυθρά, στην δοκιμασία του οξυνοισθέντος ορού, σε σχέση με τα φυσιολογικά ερυθρά<sup>81</sup>. Τα αποτελέσματα αυτά δείχνουν σαφώς ότι η απουσία του CD55 δεν είναι ο μόνος υπεύθυνος παράγων για την αυξημένη ευαισθησία των κυττάρων της ΝΠΑ στη λύση του συμπληρώματος. Εξάλλου πειράματα σε τρανσγονιδιακά ποντίκια που δεν εκφράζουν το CD55, έδειξαν ότι η έλλειψη του από μόνη της δεν αρκεί για να προκαλέσει ομόλογη αιμόλυση. Αντίθετα, όταν ανεπαρκεί η ρύθμιση του συμπλέγματος προσβολής της μεμβράνης (membrane attack complex, MAC), όπως

συμβαίνει στην ετερόλογη ενεργοποίηση του συμπληρώματος ή στους ασθενείς με ΝΠΑ, τότε η ελαττωμένη δραστηριότητα του CD55 μπορεί να οδηγήσει σε αύξηση της αιμόλυσης<sup>82</sup>.

## 2.2 CD59 - MIRL (membrane inhibitor of reactive Lysis) ή HRF20 (Homologous restriction factor 20)

Η ευαισθησία των κυττάρων της ΝΠΑ στη λύση μέσω του συμπληρώματος συνδέθηκε αρχικά με την απουσία του CD55 αν και είχε σημειωθεί, όπως προαναφέρθηκε, ότι η απουσία μόνο του CD55 δεν ευθύνεται εξ'ολοκλήρου γι' αυτό το φαινόμενο<sup>83</sup>. Το γεγονός ότι άτομα με εκλεκτική ανεπάρκεια του CD55 δεν εμφανίζουν αιμολυτική αναιμία χρησίμευσε για να υπογραμμιστεί η ανάγκη μιας άλλης πιθανής εξήγησης. Ο καθορισμός του CD59 βοήθησε στην κατανόηση του μηχανισμού της αιμόλυσης στην ΝΠΑ.

Το CD59 είναι μια γλυκοπρωτεΐνη μ.β. 18-20 kDa που συνδέεται με την κυτταρική μεμβράνη μέσω ενός μορίου GPI<sup>30</sup>. Το cDNA κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη από 128 αμινοξέα της οποίας 25 βάσεις αποτελούν μια αμινοτελική οδηγό αλληλουχία. Οι 28 τελευταίες βάσεις αποκόπτονται από την πρωτεΐνη κατά τη σύνδεσή της με την «άγκυρα» GPI<sup>84</sup>. Η αλληλουχία του cDNA δείχνει δύο δυνητικές θέσεις N-γλυκοζυλίωσης (ASN8, ASN18) στην ώριμη γλυκοπρωτεΐνη, αλλά ενεργά γλυκοζυλιωμένη είναι μόνο η ASN18<sup>84,85</sup>. Η επεξεργασία με N-γλυκανάση μειώνει το μ.β. σε 14 kDa<sup>85</sup>. Η πρωτεΐνη είναι πλούσια σε κυστεΐνη και η διαμόρφωση της καθορίζεται από στέρεους δισουλφιδικούς δεσμούς<sup>86</sup>. Το γονίδιο για το CD59 βρίσκεται στο χρωμόσωμα 11 (11p13;14)<sup>87</sup>.

Το CD59 λειτουργεί μέσω σύνδεσης του με το C8 κλάσμα του συμπληρώματος και έτσι προλαμβάνεται η ένωση του C9 με το C5b-8 σύμπλεγμα και κατά συνέπεια εμποδίζει την είσοδο του C9 στη μεμβράνη και την επακόλουθη λύση του κυττάρου<sup>88</sup>. Έτσι το CD59 ελέγχει τα απώτερα στάδια ενεργοποίησης του συμπληρώματος και προλαμβάνει την αυτόλογη λύση με αναστολή του σχηματισμού του συμπλέγματος προσβολής της μεμβράνης (MAC). Η σημασία της ανεπάρκειας του CD59 στην λειτουργική βλάβη στην ΝΠΑ έχει φανεί από την ανεύρεση ενός Ιάπωνα με κληρονομική ανεπάρκεια του CD59. Ο άρρωστος αυτός παρουσίαζε πλήρη ανεπάρκεια του CD59 τόσο από τα ερυθρά όσο και από τα πολυμορφοπύρηνα (το CD59 απουσίαζε επίσης και από καλλιέργειες ινοβλαστών).

Η έκφραση του CD55, του CD58 και της AChE ήταν φυσιολογική. Και οι δύο γονείς, που ήταν εξαδέλφια, είχαν μειωμένα επίπεδα CD59 στα ερυθρά και στα πολυμορφοπύρηνα (30-50% του φυσιολογικού). Ο άρρωστος είχε ιστορικό αιμολυτικών επεισοδίων με αιμοσφαιρινουρία και θετική δοκιμασία οξυνοσθέντος ορού. Η αναστολή της λειτουργικότητας του με μονοκλωνικά αντισώματα, έχει σαν αποτέλεσμα την αυξημένη ευαισθησία των φυσιολογικών ερυθρών αιμοσφαιρίων στη λυτική δράση του συμπληρώματος, φαινόμενο όμοιο με αυτό που συμβαίνει στην ΝΠΑ<sup>89</sup>.

Η απουσία του CD59 και από την επιφάνεια των αιμοπεταλίων, ίσως, παίζει σημαντικό ρόλο και στην εμφανιζόμενη υπερπηκτικότητα στους ασθενείς με ΝΠΑ<sup>90</sup>. Τέλος το CD59 φαίνεται ότι συμμετέχει στην επικοινωνία μεταξύ των κυττάρων<sup>84</sup> και συνδέεται με το CD2 των T λεμφοκυττάρων με αποτέλεσμα την ενεργοποίησή τους<sup>91</sup>.

## 2.3 Ακετυλοχολινεστεράση (AChE)

Η ακετυλοχολινεστεράση είναι ένα πολύ καλά χαρακτηρισμένο ένζυμο που παίζει ένα ρόλο κλειδί στην χολινεργική νευρομεταβίβαση<sup>92</sup>. Η λειτουργία του ενζύμου στα ερυθρά και στα άλλα κύτταρα του αίματος είναι άγνωστη. Η AChE παρουσιάζει διαφορετικούς τύπους σαν αποτέλεσμα μετά-μεταγραφικών τροποποιήσεων του προϊόντος ενός απλού γονιδίου που βρίσκεται στο χρωμόσωμα 7 (7q22)<sup>93</sup>. Στα ερυθρά το ένζυμο συμπεριλαμβάνει ένα ομοδιμερές δισουλφιδικού δεσμού (μ.β. 72 kDa) που προσδένεται με τη μεμβράνη μέσω της «άγκυρας» GPI. Ήταν γνωστό από παλιά ότι η AChE ανεπαρκεί στα ερυθρά της ΝΠΑ<sup>94</sup>, αλλά η λειτουργική σημασία αυτής της ανεπάρκειας παραμένει ασαφής.

Δείχθηκε πρόσφατα ότι τα αντιγόνα για το σύστημα ομάδων αίματος Yt (Yt<sup>a</sup>, Yt<sup>b</sup>) παριστούν έναν πολυμορφισμό της AChE<sup>95</sup> και ότι αυτός ο πολυμορφισμός είναι αποτέλεσμα αλλαγής μιας απλής βάσης στην οποία η ιστιδίνη 322 (CAC), που ορίζει το Yt<sup>a</sup> αντιγόνο, αντικαθίσταται από ασπαραγινάση (AAC) όταν εκφράζεται το Yt<sup>b</sup><sup>96</sup>. Σε αναλογία με την χρυσταλλική κατασκευή της AChE, αναφέρθηκε από τους Sussman και συν. ότι ο πολυμορφισμός θα πρέπει να εντοπίζεται στην επιφάνεια μιας υποομάδας της που σχετίζεται με το ρόλο της AChE στον καθορισμό αντιγόνων ομάδων αίματος<sup>97</sup>.

Η εντόπιση του γονιδίου της AChE στο χρωμόσωμα 7q22 είναι πολύ ενδιαφέρουσα, αφού οι ανωμαλίες

στο χρωμόσωμα 7 βρίσκονται συχνά σε αρρώστους με οξεία μη λεμφοβλαστική λευχαιμία και μυελοδυσπλαστικά σύνδρομα (συχνότερα ρήξη χρωμοσωμάτων στο 7q22)<sup>98</sup>. Οι διαταραχές αυτές συνοδεύουν συχνά την έκθεση σε χημειοθεραπεία, ακτινοβολία και τοξικά χημικά προϊόντα και οι αλλαγές στο γονίδιο της AChE έχουν συνδεθεί με παθολογική μεγακαρυοποίηση<sup>99</sup>. Αυξημένη δραστηριότητα της AChE των ερυθρών βρέθηκε σταθερά στα μυελοδυσπλαστικά σύνδρομα<sup>100</sup>. Οι χολινεργικοί παράγοντες είναι πιθανοί εκκινητές της σύνθεσης DNA σε αιμοποιητικά προγονικά κύτταρα ποντικού και μπορεί να ευθύνονται για την παθολογική ανάπτυξη των προγονικών μορφών των μεγακαρυοκυττάρων σε ποντίκια<sup>101</sup>. Έτσι φαίνεται ότι η AChE έχει κάποιο πιθανό ρόλο στη φυσιολογική αιμοποίηση. Είναι γνωστό ότι οι ασθενείς με ΝΠΑ εμφανίζουν συχνά θρομβοπενία και ουδετεροπενία, ενώ μικρός αριθμός από αυτούς μπορεί να εξελιχτεί σε οξεία λευχαιμία. Η θρομβοπενία δεν είναι αποτέλεσμα της αυξημένης καταστροφής αιμοπεταλίων, αφού ο χρόνος ημίσειας ζωής των αιμοπεταλίων των αρρώστων είναι φυσιολογικός και φαίνεται να έχει σχέση με την ανεπαρκή αιμοποίηση<sup>102</sup>. Τα δεδομένα αυτά δείχνουν ότι η απουσία της AChE από την επιφάνεια των κυττάρων της ΝΠΑ, αν και δεν σχετίζεται με την αυξημένη ευαισθησία των κυττάρων στη λυτική δράση του συμπληρώματος, μπορεί να αποτελεί σημαντικό παράγοντα στην παθογένεια της νόσου.

Η έρευνα του πιθανού ρόλου της AChE των ερυθρών θα διευκολυνθεί από την ύπαρξη ατόμων με εκλεκτική ανεπάρκεια της. Υπάρχουν μερικές αναφορές μερικής ανεπάρκειας της AChE<sup>103</sup>, αλλά σε καμιά από αυτές τις περιπτώσεις δεν υπάρχει καθαρή συσχέτιση με τη δυσλειτουργία των ερυθρών. Ο φαινότυπος Υt(a-b-) των ερυθρών δεν είναι συμβατός με τη ζωή, και το φαινόμενο αυτό οδηγεί στο συμπέρασμα ότι η ανεπάρκεια της AChE από τα αιμοποιητικά κύτταρα μπορεί να έχει πολύ βαριές λειτουργικές συνέπειες.

#### 2.4 CD58 (lymphocyte function associated antigen 3, LFA-3)

Το CD58 είναι μια καλά χαρακτηρισμένη γλυκοπρωτεΐνη της μεμβράνης με μ.β. 55-70 kDa. Παρουσιάζεται υπό δύο μορφές, μια που συνδέεται με την μεμβράνη μέσω της GPI και την άλλη που αποτελεί διαμεμβρανικό πολυπεπίδιο με μια κυτταροπλασματική περιοχή. Ο τύπος της συνδεδεμένης με GPI μορφής είναι ο επικρατών τύπος στα ερυθρά<sup>104</sup>. Μετά επώαση με ενδογλυκοσιδάση F, η συνδεδεμένη με GPI μορφή

έχει μ.β. 25,5 kDa. Η αλληλουχία των αμινοξέων στο cDNA εμφανίζει πέντε δυνατές θέσεις για N-γλυκοζυλίωση. Το CD58 είναι μέλος της οικογένειας των ανοσοσφαιρινών<sup>105</sup> και αποτελεί ένα καλά χαρακτηρισμένο μόριο προσκόλλησης του κυττάρου που δρα σαν υποδοχέας για το CD2 των T λεμφοκυττάρων στην διαδικασία ανοσολογικής αναγνώρισης από τα αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα. Η λειτουργική σημασία της ανεπάρκειας του CD58 από τα ερυθρά της ΝΠΑ είναι άγνωστη. Η απουσία του συνδεδεμένου με GPI CD58 από άλλα κύτταρα του περιφερικού αίματος, σε ασθενείς με ΝΠΑ, μπορεί να εκφράζεται σε αρκετή έκταση από την παρουσία της διαμεμβρανικής μορφής της πρωτεΐνης, αφού το CD58, αν και ελαττωμένο, δεν απουσιάζει πλήρως από τα άλλα κύτταρα του περιφερικού αίματος<sup>33</sup>. Ο Rosse το 1990 υπέθεσε ότι η ανεπάρκεια του CD58 μπορεί, εν μέρει, να ευθύνεται για την υπερπλασία του μυελού που εμφανίζεται συχνά στην ΝΠΑ<sup>4</sup>. Η αλληλεπίδραση μεταξύ του CD58 στα φυσιολογικά μονοκύτταρα και του CD2 στα λεμφοκύτταρα έχει αποτέλεσμα την παραγωγή λεμφοκίνης, ενώ τούτο δε συμβαίνει στα μονοκύτταρα αρρώστων με ΝΠΑ. Επιπλέον υπάρχει η υπόθεση ότι το CD58 στα T λεμφοκύτταρα μπορεί να λαμβάνει μέρος στη διέγερση της αιμοποίησης η οποία είναι πολλές φορές μειωμένη στην ΝΠΑ.

#### 2.5 Άλλες GPI-συνδεδεμένες πρωτεΐνες που ανεπαρκούν στα ερυθρά της ΝΠΑ

Στα φυσιολογικά ερυθρά έχει περιγραφεί μία ακόμη πρωτεΐνη συνδεδεμένη με την GPI, η C8 **συνδεδεμένη πρωτεΐνη** (C8 binding protein ή HRF60 ή C8bp), που μεσολαβεί στο συμπλήρωμα και ανεπαρκεί στα ερυθρά της ΝΠΑ<sup>106</sup>. Η πρωτεΐνη αυτή έχει μ.β. 65 kDa σε συνθήκες αναγωγής και 55 kDa σε αναχθείσα κατάσταση<sup>106</sup>. Αντισώματα κατά της C8 συνδεδεμένης πρωτεΐνης προκαλούν αυξημένη ευαισθησία των φυσιολογικών ερυθρών στη λύση. Η πρωτεΐνη αυτή δεν έχει ακόμα καλά χαρακτηριστεί και δεν έχει διευκρινιστεί η σημασία της απουσίας της από τα ερυθρά της ΝΠΑ.

Έχουν καθοριστεί και άλλες πρωτεΐνες που θεωρούνται ότι συνδέονται με την GPI και απουσιάζουν από τα ερυθρά της ΝΠΑ. Οι πρωτεΐνες αυτές αρχικά καθορίστηκαν με εξέταση των ερυθρών ΝΠΑ που αντιδρούν με ανθρώπινα αντισώματα κατά κοινών ομάδων αίματος. Τα ερυθρά της ΝΠΑ δεν έχουν αντιγόνα του συστήματος ομάδων Dombrock και εμφανίζουν μείωση ή απουσία των αντιγόνων Gya, Hy και JMH<sup>78</sup>. Στη συνέχεια διαπιστώθηκε ότι τα αντιγόνα Gy και Hy



φαίνεται να βρίσκονται στην ίδια πρωτεΐνη όπως και τα αντιγόνα Dombrock (βλέπε πιο κάτω) και έτσι εντοπίστηκαν δύο νέες πρωτεΐνες άγνωστης λειτουργίας, η **πρωτεΐνη Dombrock** και η **πρωτεΐνη JMΗ** (John Milton Hagen antigen). Πειράματα με ανθρώπινο αντί-Gya και αντί-Hy έδειξαν ότι αντιδρούν με μια γλυκοπρωτεΐνη μ.β. 46-58 kDa κάτω υπό συνθήκες αναγωγής. Τα αντισώματα δεν αντιδρούν με φυσιολογικά ερυθρά μετά επεξεργασία με θρυψίνη ή χυμοθρυψίνη ή υπό συνθήκες αναγωγής. Επεξεργασία των ερυθρών με ενδογλυκοσιδάση F μείωσε το μ.β. της πρωτεΐνης σε 11 kDa δείχνοντας την παρουσία μιας ή περισσότερων N-γλυκανών<sup>107</sup>. Σ' αυτή την πρωτεΐνη βρίσκεται και ένα άλλο κοινό αντιγόνο των ερυθρών, το Joa<sup>108</sup>. Πρόσφατα, έχει βρεθεί ότι τα αντιγόνα Dombrock (Doa, Dob) δεσμεύονται στην ίδια πρωτεΐνη<sup>109</sup>. Η ένδειξη αυτή βασίζεται στην ανεπάρκεια των Gy<sup>a</sup> αρνητικών κυττάρων να αντιδρούν με αντί-Do<sup>a</sup> και αντί-Do<sup>b</sup> και στην παρατήρηση ότι Do<sup>a</sup> ενεργός πρωτεΐνη αντιδρά με αντί-Gy<sup>a</sup>. Πειράματα με ανθρώπινα, μονοκλωνικά αντί-JMΗ έδειξαν ότι το αντιγόνο φέρεται επάνω σε μία συνδεδεμένη με GPI πρωτεΐνη με μ.β. 76 kDa<sup>110</sup>. Τέλος άλλες GPI-πρωτεΐνες φαίνονται στον Πίνακα 1.

### 3. ΚΑΘΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΒΙΟΧΗΜΙΚΗΣ ΒΛΑΒΗΣ ΣΤΗ ΝΠΙΑ

Το γεγονός ότι στην ΝΠΙΑ ανεπαρκούν πολλαπλές πρωτεΐνες και τα γονιδια τους δεν βρίσκονται στο ίδιο χρωμόσωμα, απομάκρυναν την πιθανότητα η ΝΠΙΑ να οφείλεται σε μια μετάλλαξη ή μια έλλειψη κάποιου κατασκευαστικού γονιδίου που κωδικοποιεί τις διαφορετικές πρωτεΐνες. Η παρατήρηση ότι όλες οι πρωτεΐνες που ανεπαρκούν στην ΝΠΙΑ εμφανίζουν κοινή βιοχημική ιδιότητα να είναι «αγκυροβολημένες» στην κυτταρική μεμβράνη μέσω GPI, οδηγεί στο συμπέρασμα ότι πιθανόν να είναι απαραίτητη για την εμφάνιση της ΝΠΙΑ κάποια διαταραχή σε ένα γονίδιο που είναι σημαντικό για τη βιοσύνθεση της GPI.

Η GPI-άγκυρα αποτελείται από τρία τμήματα<sup>27</sup> :

1. Ένα μόριο φωσφατιδυλοϊνοσιτόλης (PI), στο οποίο μπορεί να προσδέσεται ένα μόριο λιπαρού οξέος.
2. Ένα πυρήνα γλυκάνης που αποτελείται από ένα μόριο N-γλυκοζαμίνης και μια αλυσίδα από τρία μόρια μαννόζης και
3. Ένα μόριο φωσφοαιθανολαμίνης (PEA) που προστίθεται στην τελική μαννόζη. Η πρωτεΐνη, που θα συνδεθεί με τη GPI, ενώνεται με τη PEA μέσω δεσμού

αμιδίου μεταξύ της αμινομάδας της PEA και του καρβοξυτελικού άκρου της πρωτεΐνης. Στα θηλαστικά τα μόρια PEA μπορεί να συνδέονται και με τα άλλα δύο μόρια μαννόζης, χωρίς να συμμετέχουν στη σύνδεση των πρωτεϊνών<sup>111</sup>.

Το πρώτο βήμα στη σύνθεση της GPI είναι η μεταφορά της N-ακετυλο-γλυκοζαμίνης (GlcNAc) από το UDP-GlcNAc στην PI, στην εξωτερική επιφάνεια του ενδοπλασματικού δικτύου. Σ' αυτή τη μεταφορά εμπλέκονται τα πρωτεϊνικά προϊόντα τουλάχιστον τριών γονιδίων, καθώς τα κύτταρα από τρεις διαφορετικές σειρές λεμφοκυττάρων ποντικού που δεν παράγουν την GPI (τάξεις A, C και H) δεν είναι ικανά να πραγματοποιήσουν αυτό το βήμα<sup>112</sup>. Έτσι σχηματίζεται μια N-ακετυλο-γλυκοζαμινυλ-φωσφατιδυλοϊνοσιτόλη<sup>113</sup>. Ακολουθεί αποακετυλίωση της GlcNAc και ένα μόριο παλμιτικού ή άλλου λιπαρού οξέος προστίθεται στην PI. Στη συνέχεια προστίθενται τρία μόρια μαννόζης που προέρχονται από μόρια δολιχυλ-φωσφορυλ-μαννόζης<sup>114</sup>. Η προσθήκη της PEA στην τρίτη μαννόζη ολοκληρώνει τη βιοσύνθεση της GPI<sup>113</sup>. Η πρωτεΐνη που θα συνδεθεί με την GPI, μετά την σύνθεσή της μέσα στο ενδοπλασματικό δίκτυο και ενώ παραμένει μέσα σ' αυτό, με τη βοήθεια μιας τρανσαμιδάσης ενώνεται στην PEA της GPI με το καρβοξυτελικό της άκρο, στη επονομαζόμενη θέση ω, που χαρακτηρίζεται από συγκεκριμένη αλληλουχία αμινοξέων<sup>115</sup>. Από τη στιγμή που θα γίνει η ένωση πρωτεΐνης-GPI, το σύμπλοκο μεταφέρεται στη συσκευή Golgi και στη συνέχεια εκκρίνεται στην εξωτερική επιφάνεια του κυττάρου.

Αρκετοί ερευνητές προσπάθησαν να καθορίσουν τη βλάβη στη βιοσυνθετική οδό της GPI που παρουσιάζεται στη ΝΠΙΑ. Χρησιμοποιώντας μελέτες με μεταβολική σήμανση, οι Mahoney και συν. και Hirose και συν. παρατήρησαν ότι τα πολυμορφοπύρνα της ΝΠΙΑ ανεπαρκούν να συνθέσουν ένα πλήρες μόριο GPI<sup>69,116</sup>. Οι Schubert και συν. χρησιμοποιώντας T και NK κυτταρικές σειρές από 5 αρρώστους με ΝΠΙΑ οδηγήθηκαν στο συμπέρασμα ότι η βλάβη εντοπίζεται σε ένα πρώιμο βήμα της βιοσυνθετικής οδού της GPI<sup>117</sup>. Πιο ευαίσθητες αναλυτικές τεχνικές που χρησιμοποιήθηκαν από τους Armstrong και συν. έδειξαν ότι T κυτταρικές σειρές από 5 αρρώστους με ΝΠΙΑ παρουσίαζαν την ίδια ανεπάρκεια για τη σύνθεση του πρώτου ενδιάμεσου προϊόντος της βιοσυνθετικής οδού της GPI<sup>118</sup>. Χρησιμοποιώντας B λεμφοκύτταρα από αρρώστους με ΝΠΙΑ, μετά μεταμόρφωση με EBV, οι Takahashi και συν. και οι Hillmen και συν. όπως και οι Norris και συν., έκαναν όμοιες παρατηρήσεις: Στην ΝΠΙΑ η βλάβη για τη σύνθεση της GPI-άγκυρας βρίσκεται στη μεταφορά

του GlcNAc στην PI για το σχηματισμό PI-GlcNAc<sup>119,120,121</sup>. Μεγάλο ενδιαφέρον είναι ότι σ' αυτή τη μεταφορά εμπλέκονται τα πρωτεϊνικά προϊόντα τουλάχιστον τριών γονιδίων και οι κυτταρικές σειρές A, C και H λεμφοκυττάρων ποτικού ανεπαρκούν να την ολοκληρώσουν. Τα κύτταρα της ΝΠΑ φαίνεται να έχουν το ίδιο έλλειμμα με μια από αυτές τις 3 συμπληρωματικές τάξεις. Οι μελέτες των Takahashi και συν. επιβεβαίωσαν αυτήν την υπόθεση, δείχνοντας ότι τόσο οι T όσο και οι B κυτταρικές σειρές από 7 διαφορετικούς άρρωστους με ΝΠΑ, ανεπαρκούσαν να συμπληρώσουν τις μεταλλάξεις της τάξης A<sup>119</sup>. Άλλες μελέτες έδειξαν ότι σε όλες τις περιπτώσεις τα κύτταρα της ΝΠΑ δεν συμπλήρωναν τα κύτταρα της τάξης A, ενώ συμπλήρωναν αυτά των άλλων κυτταρικών σειρών που δεν συνθέταν την GPI, δείχνοντας ότι η βλάβη στην ΝΠΑ είναι πάντα η ίδια, όπως και στα κύτταρα της τάξης A<sup>122,123,124</sup>.

Η βιοσυνθετική οδός για το σχηματισμό της «άγκυρας» GPI είναι πολύπλοκη και όπως δείχθηκε από τις μεταλλαγμένες κυτταρικές σειρές, όμοιοι φαινότυποι (π.χ. κύτταρα που είναι ανεπαρκή σε πρωτεΐνες GPI) μπορεί να προέλθουν από μεταλλάξεις που εντοπίζονται τουλάχιστον σε 6 διαφορετικά γονίδια. Έτσι το εύρημα ότι όλες οι κυτταρικές σειρές ΝΠΑ ανήκαν σε μια απλή συμπληρωματική ομάδα (τάξης A) ήταν μη αναμενόμενη. Όπως συζητείται παρακάτω, όμως, καθορίστηκε η εντόπιση του παθολογικού γονιδίου στα κύτταρα τάξης A και έτσι έγινε εμφανής η μοριακή βλάβη της ΝΠΑ.

### 3.1 Η μοριακή βλάβη στην ΝΠΑ

Το γονίδιο που ανεπαρκεί στα κύτταρα τάξης A (και φυσικά στα κύτταρα ΝΠΑ) ταυτοποιήθηκε το 1993 και φέρεται σήμερα με την ονομασία PIG-A<sup>125</sup>. Εντοπίζεται στο βραχύ σκέλος του χρωμοσώματος X (Xp22.1)<sup>125,126</sup> και αποτελείται από 6 εξόνια<sup>126,127</sup>. Το πρώτο εξόνιο είναι πολύ μικρό και δε μεταφράζεται. Το δεύτερο εξόνιο κωδικοποιεί περίπου το ήμισυ της ώριμης πρωτεΐνης και ακολουθείται από τρία μικρότερα εξόνια. Το τελευταίο εξόνιο κωδικοποιεί την υπόλοιπη πρωτεΐνης και φέρει επίσης μια μη μεταφραζόμενη αλληλουχία. Ταυτόχρονα στον άνθρωπο έχει βρεθεί και ένα γονίδιο που δεν περιέχει ιντρόνια, που είναι κατά 91% ομόλογο με το λειτουργικό γονίδιο, το οποίο δεν μεταγράφεται και εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 12 (12p21)<sup>128</sup>.

Στα φυσιολογικά κύτταρα το mRNA αποτελείται από μια κύρια αλληλουχία 3,8 kb που περιέχει την

πλήρη μεταφραζόμενη περιοχή και δύο μικρότερες περιοχές 3,3 και 2,8 kb που δεν μεταφράζονται. Υπάρχουν μεταλλάξεις του γονιδίου PIG-A που επηρεάζουν τόσο το μέγεθος όσο και τη σταθερότητα του μορίου, αν και στους περισσότερους ασθενείς με ΝΠΑ αυτά παραμένουν φυσιολογικά<sup>27</sup>. Το προϊόν του γονιδίου PIG-A είναι η πρωτεΐνη pig-A, με μ.β. 54 kDa, που περιέχει 484 αμινοξέα<sup>125</sup>. Όπως αναφέρθηκε η πρωτεΐνη αυτή απαιτείται για τη μεταφορά της GlcNAc στη PI για να σχηματιστεί η PI-GlcNAc. Διάφορες μελέτες αναφέρουν ότι η πρωτεΐνη αυτή αποτελεί τμήμα ενός εξυμικού συμπλέγματος α-1,6-N-ακετυλογλυκοζαμινυλ-PI τρoσφεράσης<sup>128,129</sup>.

Όλοι οι ασθενείς με ΝΠΑ που έχουν μέχρι σήμερα μελετηθεί, εμφανίζουν μεταλλάξεις στο γονίδιο PIG-A<sup>27</sup>. Μέχρι σήμερα έχουν αναφερθεί περισσότερες από 85 διαφορετικές μεταλλάξεις. Οι περισσότερες αφορούν μικρές ελλείψεις, μικρές προσθήκες ή ελλείψεις-προσθήκες που προκαλούν μεταφορά του πλαισίου ανάγνωσης (frameshift) και οδηγούν σε μια μη λειτουργική πρωτεΐνη pig-A (pig-Ao)<sup>227,130</sup>. Η προσθήκη ή αφαίρεση ενός ή περισσότερων νουκλεοτιδίων προκαλεί αλλαγές στην αλληλουχία των αμινοξέων και πολύ συχνά οδηγεί σε κωδικόνια τερματισμού με αποτέλεσμα τον πρόωρο τερματισμό της μεταγραφής. Έχουν περιγραφεί μόνο δύο μεγάλες ελλείψεις<sup>131,132</sup>, μια ολική έλλειψη του PIG-A<sup>130</sup> και δύο μικροί διπλασιασμοί<sup>130,132</sup>. Πρόσφατα δημοσιεύθηκε μια νέα μετάλλαξη σε έναν άρρωστο με ΝΠΑ που υποτροπίασε δέκα χρόνια μετά αλλογενή μεταμόσχευση μυελού των οστών. Ο ασθενής πριν τη μεταμόσχευση παρουσίαζε σημειακές μεταλλάξεις στα εξόνια 2 και 6. Η νέα μετάλλαξη αφορούσε το εξόνιο 6 και ήταν μία προσθήκη-διπλασιασμός που είχε σαν αποτέλεσμα μεταφορά του πλαισίου ανάγνωσης. Η υποτροπή, λοιπόν, του ασθενούς σχετιζόταν με ένα νέο κλώνο και η παρατήρηση αυτή ενισχύει την άποψη ότι το μικροπεριβάλλον του μυελού πιθανώς δημιουργεί συνθήκες εκλεκτικής ανάπτυξης των κλώνων της ΝΠΑ<sup>133</sup>.

Περίπου το ένα τρίτο των μεταλλάξεων του PIG-A είναι σημειακές μεταλλάξεις. Έχουν περιγραφεί τρεις τύποι τέτοιων μεταλλάξεων μέχρι σήμερα: (I) μεταλλάξεις που οδηγούν στην αντικατάσταση ενός αμινοξέος στην πρωτεϊνική αλληλουχία (missense) και εμποδίζουν τη φυσιολογική αναδίπλωση του πρωτεϊνικού μορίου (τριτοταγής δομή), με αποτέλεσμα την επιτάχυνση της ενδοκυττάριας αποδόμησης της πρωτεΐνης, (II) μεταλλάξεις που οδηγούν σε άμεσο κωδικόνιο τερματισμού (nonsense) και παρατηρούνται κυρίως στο εξόνιο 2<sup>130</sup> και (III) μεταλλάξεις που επηρεάζουν το

μέγεθος και τη σταθερότητα του mRNA (splice site mutations)<sup>27</sup>. Οι μεταλλάξεις που οδηγούν σε αντικατάσταση κάποιου αμινοξέος παρουσιάζουν ιδιαίτερο ενδιαφέρον επειδή παρέχουν σημαντικές πληροφορίες για τη δομή και τη λειτουργία της πρωτεΐνης *rig-A*. Τουλάχιστον μια από αυτές, C55 → T, που αλλάζει στο κωδικόνιο 19 την αργινίνη με τρυπτοφάνη, φαίνεται να παρουσιάζει πολυμορφισμό αφού δεν επηρεάζει τη λειτουργία του μορίου<sup>134</sup>.

Μείωση, αλλά όχι εξαφάνιση των πρωτεϊνών GPI, μπορεί να δημιουργηθεί και από ελλείψεις στον εκκινητή του γονιδίου. Αυτός βρέθηκε ότι δεν περιέχει περιοχές TATA, αλλά μόνο 4 περιοχές CAAT<sup>127</sup>. Διάφορες μελέτες έχουν δείξει ότι σημαντικές περιοχές ρύθμισης του εκκινητή βρίσκονται στις θέσεις -97, -473 (CAAT) και -79 (CRE και AP-2). Μία από τις μεγαλύτερες ελλείψεις νουκλεοτιδίων περιλαμβάνει τόσο τον εκκινητή όσο και το εξόνιο 1 και τμήμα του ιντρονίου 1<sup>135</sup>.

Οι μεταλλάξεις αυτές εμφανίζονται σε όλους τους τύπους των κυκλοφορούντων αιμοποιητικών κυττάρων και κατά συνέπεια συμπεραίνεται ότι η μετάλλαξη συμβαίνει στο αρχέγονο αιμοποιητικό κύτταρο και ότι όλα τα παθολογικά κύτταρα ανήκουν στον ίδιο κλώνο. Σε μερικούς αρρώστους έχουν αναφερθεί περισσότερες από μια ανεξάρτητες μεταλλάξεις γεγονός που δείχνει ότι στο ίδιο άτομο μπορεί να υπάρχουν πάνω από ένας κλώνοι ΝΠΑ με ταυτόχρονη συνύπαρξη και φυσιολογικής αιμοποίησης<sup>2,136</sup>. Το πιο αρχέγονο κύτταρο στο οποίο έχει παρατηρηθεί έλλειψη των GPI-πρωτεϊνών είναι αυτό που εμφανίζει ανοσοφαινότυπο [CD34(+), CD38(-)]<sup>137</sup>.

Το ότι το PIG-A βρίσκεται στο χρωμόσωμα X μπορεί να εξηγήσει το γιατί οι περισσότερες περιπτώσεις ΝΠΑ ανήκουν στην συμπληρωματική τάξη A. Αφού οι άνδρες έχουν μόνο ένα X χρωμόσωμα και γυναίκες είναι λειτουργικά απλοειδείς, το PIG-A μπορεί να αδρανοποιείται μόνο από μια μετάλλαξη. Όλα τα άλλα γονίδια που εμπλέκονται στην σύνθεση της «άγκυρας» GPI είναι αυτοσωματικά, και κατά συνέπεια οι λειτουργικά σημαντικές μεταλλάξεις θα πρέπει να εντοπίζονται και στα δύο αλληλία ώστε να προκαλέσουν ανεπάρκεια της παραγωγής της GPI. Το γεγονός ότι η ΝΠΑ είναι πάντα επίκτητη και ποτέ κληρονομική, οφείλεται στη μη ύπαρξη μεταλλάξεων στα γεννητικά κύτταρα, γεγονός που προφανώς θα ήταν ασύμβατο με τη ζωή<sup>127</sup>.

Το γεγονός που οδηγεί στη μετάλλαξη του γονιδίου PIG-A δεν είναι μέχρι τώρα γνωστό. Κανείς ασθενής δεν έχει αναφερθεί ότι εξετέθη σε ιονίζουσα ακτινο-

βολία ή χημειοθεραπεία<sup>138</sup> και δεν έχει ενοχοποιηθεί κανένας χημικός παράγων, εκτός από την χλωραμφενικόλη που προκάλεσε σε μερικούς ασθενείς απλαστική αναιμία, οι οποίοι στη συνέχεια παρουσίασαν ΝΠΑ<sup>139</sup>.

Για να καθοριστεί αν οι διαταραχές στο γονίδιο PIG-A ευθύνονται για την ανεπάρκεια των κυττάρων της ΝΠΑ να εκφράσουν GPI-πρωτεΐνες, οι Takeda και συν. μετέφεραν PIG-A συμπληρωματικό DNA σε B κυτταρικές σειρές από 2 αρρώστους με ΝΠΑ, αρνητικές για GPI<sup>122</sup>. Η ανάλυση με φθορισμό ενεργοποιημένων κυττάρων έδειξαν ότι η μεταφορά αποκατέστησε την έκφραση των πρωτεϊνών GPI, δείχνοντας ότι το έλλειμμα στις δυο σειρές της ΝΠΑ εντοπιζόταν στο PIG-A.

Αν η μετάλλαξη αδρανοποιεί πλήρως την πρωτεΐνη *rig-A*, τότε τα κύτταρα δε θα φέρουν στην επιφάνειά τους πρωτεΐνες που συνδέονται με την κυτταρική μεμβράνη μέσω «άγκυρας» GPI (φαινότυπος ερυθρών τύπου III), ενώ αν η μετάλλαξη προκαλεί μερική βλάβη στην πρωτεΐνη *rig-A* θα εμφανιστεί μια μικρή, ποικίλουσα, έκφραση των πρωτεϊνών GPI (φαινότυπος ερυθρών τύπου II)<sup>136</sup>. Στην τελευταία περίπτωση, που συντίθενται μικρά ποσά της «άγκυρας» GPI, εμφανίζεται ένας ανταγωνισμός μεταξύ των πρωτεϊνών που θα ενωθούν με αυτή. Οι πρωτεΐνες που διαθέτουν το καταλληλότερο αμινοξύ για τη θέση ω θα συνδεθούν ευκολότερα και συνεπώς θα ανιχνευθούν σε μεγαλύτερα ποσοστά στην επιφάνεια του κυττάρου<sup>140</sup>. Έτσι σε πολυμορφοπύρηνια με μερική έλλειψη GPI ο FcγIII υποδοχέας (CD16) εκφράζεται περισσότερο στην επιφάνεια του κυττάρου σε σχέση με τα CD55 ή CD59<sup>141</sup>.

Ο καθορισμός της μοριακής βλάβης στην ΝΠΑ εξηγεί πλήρως τον φαινότυπο των κυττάρων ΝΠΑ και αρκετά από τα συμπτώματα της νόσου, όπως την αιμόλυση, τις θρομβώσεις ή ακόμα και τις συχνές λοιμώξεις. Εντούτοις, δεν είναι απόλυτα σαφές το πώς ο κλώνος της ΝΠΑ προκαλεί σημαντική ανεπάρκεια στην αιμοποίηση. Στους περισσότερους ασθενείς με ΝΠΑ επικρατούν τα παθολογικά κύτταρα αφού πάνω από 80% των κυκλοφορούντων ερυθρών αιμοσφαιρίων και πολυμορφοκυττάρων εμφανίζουν τον φαινότυπο ΝΠΑ<sup>142,143</sup>. Η παρατήρηση αυτή ενισχύει την υπόθεση ότι οι μεταλλάξεις στο γονίδιο PIG-A παρέχουν κάποιο πλεονέκτημα για την ανάπτυξη του παθολογικού κλώνου σε σχέση με το φυσιολογικό πληθυσμό<sup>144</sup>. Ωστόσο, όπως αναφέρθηκε, πολλές μελέτες οδήγησαν στο συμπέρασμα ότι δεν υπάρχει κάποιο ενδογενές πλεονέκτημα για την ανάπτυξη των αιμοποιητικών κυττάρων που φέρουν την μετάλλαξη στο γονίδιο PIG-

A<sup>40,41</sup> και πειράματα με καλλιέργειες μακράς διάρκειας CD34+ κυττάρων με φαινότυπο ΝΠΑ έδειξαν τις ίδιες μειωμένες ικανότητες για τον σχηματισμό αποικιών με τα φυσιολογικά προγονικά κύτταρα από τον ίδιο άρρωστο, υποθέτοντας ότι πιθανόν για την ανάπτυξη του κλώνου της ΝΠΑ απαιτείται ένας δεύτερος παράγων<sup>43</sup>. Διάφορα κλινικά δεδομένα έχουν οδηγήσει στην υπόθεση ότι αυτός πιθανόν κάποιος παράγων που προκαλεί ή διατηρεί την μυελική ανεπάρκεια και παραδόξως παρέχει πλεονέκτημα ανάπτυξης ή επιβίωσης του κλώνου της ΝΠΑ. Τούτο ενισχύεται σημαντικά και από το γεγονός ότι, όπως προαναφέρθηκε, αρκετοί άρρωστοι εμφανίζουν περισσότερους από ένα κλώνους ΝΠΑ. Πιθανώς στην ΝΠΑ το μικροπεριβάλλον του μυελού καθίσταται ανώμαλο, ίσως από κάποιον παράγοντα που προκαλεί μυελική απλασία, όπως συμβαίνει στην ιδιοπαθή απλαστική αναιμία, που είναι αυτοάνοσης αρχής<sup>145</sup>. Η σχέση μεταξύ των δύο νοσημάτων είναι γνωστή από παλιά, αφού περίπου το 35% των ασθενών με απλαστική αναιμία εμφανίζουν κύτταρα με φαινότυπο ΝΠΑ<sup>1</sup>. Πολύ σημαντικό είναι το γεγονός ότι ο μυελός στη ΝΠΑ στις *in vitro* καλλιέργειες συμπεριφέρεται όπως αυτός της απλαστικής αναιμίας, ακόμη και όταν δεν είναι σαφώς υποκυτταρικός.

Όλα τα παραπάνω δεδομένα οδηγούν στην διαπίστωση ότι η ανάπτυξη της ΝΠΑ προϋποθέτει την ύπαρξη δύο παραγόντων: (α) Την εμφάνιση μιας σωματικής μετάλλαξης σε κάποιο αρχέγονο αιμοποιητικό κύτταρο του οποίου ο πληθυσμός παραμένει τόσο μικρός, λόγω μειονεκτήματος ανάπτυξης, που μπορεί και να μην ανιχνεύεται σε φυσιολογικά άτομα και (β) κάποιος παράγοντας που προκαλεί απλασία και τροποποιεί το μικροπεριβάλλον του μυελού, καταστέλλοντας τα GPI<sup>+</sup> κύτταρα σε μεγαλύτερο βαθμό από τα GPI<sup>-</sup>. Στο περιβάλλον αυτό τα GPI<sup>-</sup> κύτταρα εμφανίζουν ένα πλεονέκτημα ανάπτυξης και πολλαπλασιάζονται στο μυελό. Μπορεί να υποθεθεί ότι η ανάπτυξη αυτών των κυττάρων οφείλεται στην απουσία πρωτεϊνών GPI που αποτελούν υποδοχείς για μερικές ανασταλτικές κυτταροκίνες, όπως ο TGF-β (του οποίου ένας υποδοχέας είναι συνδεδεμένος με τη μεμβράνη μέσω GPI)<sup>44,146</sup>. Ο απλαστικός αυτός παράγων ίσως είναι ενεργοποιημένα CD8+ T λεμφοκύτταρα που αναστέλλουν την *in vitro* ανάπτυξη των αποικιών των αιμοποιητικών κυττάρων, όπως συμβαίνει στην απλαστική αναιμία<sup>147</sup>. Ωστόσο τα παραπάνω πρέπει να αποδειχτούν με πειράματα και μελέτες που θα διευκρινίσουν πλήρως την παθογένεια της νόσου.

### 3.2 Η απόπτωση στην ΝΠΑ

Η μελέτη της απόπτωσης στην ΝΠΑ τα τελευταία χρόνια βοήθησε στην κατανόηση των παθογενετικών μηχανισμών της νόσου. Πρόσφατα οι Brodsky και συν. (1997) παρατήρησαν ότι τα κύτταρα της ΝΠΑ χαρακτηρίζονται από ελαττωμένη απόπτωση και ότι η έκφραση των πρωτεϊνών GPI επηρεάζει το βαθμό της ανάπτυξής της<sup>148</sup>. Η διαπίστωση ότι η απόπτωση στην ΝΠΑ είναι ελαττωμένη επιβεβαιώθηκε και από άλλες μελέτες<sup>149</sup>. Ωστόσο αν η έκφραση των πρωτεϊνών GPI είναι σημαντική για την ανάπτυξη της αντοχής στους αποπτωτικούς μηχανισμούς, τότε οι ασθενείς με έναν επικρατούντα κλώνο ΝΠΑ θα έπρεπε να εμφάνιζαν μικρότερη απόπτωση από τους ασθενείς με μικρότερους κλώνους. Κάτι τέτοιο, όμως, αποδείχθηκε ότι δεν ισχύει καθώς ασθενείς με >90% GPI-αρνητικά πολυμορφοπύρηνια παρουσίαζαν τους ίδιους δείκτες απόπτωσης με ασθενείς που είχαν <40% GPI-αρνητικά πολυμορφοπύρηνια<sup>149</sup>. Για να διερευνηθεί αν η λειτουργικότητα του γονιδίου PIG-A επηρέαζε την απόπτωση, οι ερευνητές εισήγαγαν το γονίδιο PIG-A στην GPI-αρνητική JY5 κυτταρική σειρά και μελέτησαν την απόπτωση πριν και μετά την εισαγωγή του γονιδίου. Βρέθηκε ότι δεν υπήρξε σημαντική διαφορά μεταξύ των δύο μελετών. Αυτή η παρατήρηση οδηγεί στο συμπέρασμα ότι οι μεταλλάξεις στο γονίδιο PIG-A και η επακολουθείσα μείωση της έκφρασης των GPI-πρωτεϊνών δεν ενέχονται στους μηχανισμούς απόπτωσης στην ΝΠΑ<sup>149</sup>, οι οποίοι πιθανόν επηρεάζονται από άλλους παράγοντες, όπως τα επίπεδα των διαφόρων κυτταροκινών και άλλων διαλυτών παραγόντων<sup>150,151</sup>, η έκφραση μορίων της ομάδας bcl-2<sup>152</sup>, ανώμαλες αλληλεπιδράσεις μεταξύ των κυττάρων του μικροπεριβάλλοντος του μυελού<sup>153</sup> ή άλλες αλλαγές στη γονιδιακή ή πρωτεϊνική έκφραση<sup>154,155</sup>.

### SUMMARY

**Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria - Pathogenetic mechanisms.**

*Ch. MELETIS, E. TERPOS*

**Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria (PNH) is an acquired clonal disorder of hematopoiesis, characterized by an unusual sensitivity of abnormal red cell population(s) to complement lysis, due to decrease or lack of various surface molecules, including CD55 (de-**

cay accelerating factor, DAF), CD59 (membrane inhibitor of reactive lysis, MIRL), acetylcholinesterase (AChE) and others. These molecules are attached to the cellular membrane via a phosphatidylinositol (GPI) anchor, which show a metabolic block in an early step of the GPI-anchor biosynthesis in PNH. This block leads to deficiency of the PIG-A called protein which is encoded by an X-linked gene. Different somatic mutations of this gene lead to deficient biosynthesis of the GPI-anchor and defective expression of GPI-anchored proteins in PNH affected cells (erythrocytes, neutrophils, lymphocytes, platelets, monocytes and other haemopoietic cells).

#### ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Rosse WF. Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria as a molecular disease. *Medicine* 1997, 77: 63.
2. Luzzatto L and Bessler M. The dual pathogenesis of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Curr Opin Hematol* 1996, 3: 101.
3. Hillmen P, Lewis SM, Bessler M, et al. Natural history of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *N Engl J Med* 1995, 333: 1253.
4. Rosse WF. Phosphatidylinositol-linked proteins and paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood* 1990, 75: 1595.
5. Marchiafava E and Nazari A. Nuovo contributo allo studio degli itteri cronici emolitici. *Policlinico (Sezione Medica)* 1911, 18: 241.
6. Scott RB. The Marchiafava-Micheli syndrome of nocturnal haemoglobinuria with haemolytic anaemia. *Q J Med* 1938, 7: 95.
7. Ham T. Chronic haemolytic anaemia with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria: study of the mechanism of haemolysis in relation to acid-base equilibrium. *N Engl J Med* 1937, 217: 915.
8. Dacie JV, Israels MCG, Wilkinson JF. Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria of the Marchiafava type. *Lancet* 1938, 1: 479.
9. Voswinkler P. Der schwarze Urin. Berlin Blackwell 1993, 1-282.
10. Strubing P. Paroxysmale hamoglobinurie. *Dtsch Med Wochenschr* 1882, 8:1.
11. Hijmans van den Bergh A. Ictere hemolytique avec crises hemoglobinuriques. *Rev Med* 1911, 31: 63.
12. Oni SR, Osunkoya BO, Luzzatto L. PNH evidence for monoclonal origin of abnormal red cells. *Blood* 1970, 36: 145.
13. Yachnin S and Ruthenberg JM. The initiation and enhancement of human red cells lysis by activation of the first C component and by first complement esterase. *J Clin Invest* 1965, 44: 518.
14. Yachnin S and Ruthenberg JM. The initiation and enhancement of human red cells lysis by activation paroxysmal nocturnal hemoglobinuria (PNH). *Blood* 1976, 47: 611.
15. Roault TA, Rosse WF, Bell S, et al. Difference in the terminal steps of complement lysis of normal and PNH red cells. *Blood* 1978, 51: 325.
16. Rosse WF. The life span of complement sensitive and insensitive red cells in PNH. *Blood* 1971, 37: 556.
17. Rosse WF. Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria: present status and future prospects. *West J Med* 1980, 132: 219.
18. Najean Y, Dresch C, Ardaillou et al. L' erythrocinetique dans l' hemoglobinurie nocturne paroxystique. *Nouv Rev Fr Hematol*, 1966, 6: 611.
19. Moore JC, Frank MM, Mueller-Eberhard HJ, et al. Decay accelerating factor is present in PNH erythroid progenitors and lost during erythropoiesis in vitro. *J Exp Med* 1985, 162: 1182.
20. Kinoshita T, Medof ME, Silber R, et al. Distribution of Decay-accelerating factor in the peripheral blood of normal individuals and patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *J Exp Med* 1985, 162: 75.
21. Rosse WF, Adams JP, Thorpe AM. The population of cells in PNH of intermediate sensitivity to complement lysis. Significance and mechanism of increased immune lysis. *Br J Haematol* 1974, 26: 181.
22. Pavlic GJ and Bouroucle BA. Megaloblastic crisis in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *N Engl J Med* 1965, 273: 789.
23. Harris IM, Prankerd TA, Westerman MF. Abnormality of phospholipids in red cells of patients with paroxysmal nocturnal haemoglobinuria. *Br Med J* 1974, 11: 1276.
24. Gramont A de. Hemoglobinurie paroxystique nocturne. Etude clinique et biologique de 142 patients. *These Med* 1982, 1: 1.
25. Gomperts ED, Zail SS, Christensen D, et al. The effect of vitamine E on haemolysis in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria: in vitro and in vivo studies. *Scand J Hematol* 1975, 14: 81.
26. Nakakuma H. Mechanism of intravascular hemolysis in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria (PNH). *Am J Hematol*, 1996, 53: 22.
27. Rosse WF and Ware RE. The molecular basis of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood* 1995, 86: 3277.
28. Kawakami Z, Ninomiya H, Tomiyama J, et al. Deficiency of glycosyl-phosphatidylinositol anchored proteins on paroxysmal nocturnal haemoglobinuria

- (PNH) neutrophils and monocytes: heterogeneous deficiency of Decay accelerating factor (DAF) and CD16 on PNH neutrophils. *Br J Haematol* 1990, 74: 508.
29. Rosse WF, Logne AL, Adams J, et al. Mechanisms of immune lysis of the red cells in hereditary erythroblastic multi nuclearity with a positive acidified serum test (HEMPAS) and PNH. *J Clin Invest* 1974, 53: 31.
  30. Holguin MH, Wilcox LA, Bernshaw NJ, et al. The erythrocyte membrane inhibitor of reactive lysis: effects of Phosphatidylinositol specific phospholipase C on the isolated and cell-associated protein. *Blood* 1990, 75: 284.
  31. Hansch GM, Schonermark S, Roelcke D. Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria type III. Lack of erythrocyte membrane protein restricting the lysis of C5b-9. *J Clin Invest* 1987, 80: 7.
  32. Rosse WF: The glycolipid anchor of membrane surface proteins. *Semin Haematol*, 1993, 30: 19.
  33. Selvaraj P, Dustin ML, Silher R, et al. Deficiency of lymphocyte function associated antigen 3 (LFA-3) in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. Functional correlates and evidence for a phosphatidylinositol membrane anchor. *J Exp Med* 1987, 166: 1011.
  34. Simmons DL, Tan S, Tenen DG, Nicholson-Weller A, Seeb B. Monocyte antigen CD14 in a phospholipid anchored membrane protein. *Blood* 1989, 73: 284.
  35. Kunstling TR and Rosse WF. Erythrocyte acetyl cholinesterase deficiency in PNH. A comparison of the complement sensitive and insensitive populations. *Blood* 1969, 33: 607.
  36. Kinoshita T, Inoue N, Takeda J. Defective glycosyl phosphatidylinositol (GPI)-anchor synthesis and paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Adv Immunol* 1995, 60: 57.
  37. Rotoli B and Luzzatto L. Paroxysmal nocturnal haemoglobinuria. *Bailliere's Clin Haematol*, 1989, 2: 113.
  38. Shichishima T, Terasawa T, Uchida T, et al. Complement sensitivity of erythroblasts and erythroid precursors in paroxysmal nocturnal haemoglobinuria (PNH). *Br J Haematol* 1989, 72: 578.
  39. Okuda K, Kanamaru A, Ueda E, et al. Expression of Decay-accelerating factor on hematopoietic progenitors and their progeny cells grown in cultures with fractionated bone marrow cells from normal individuals and patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Exp Hematol* 1990, 18: 1132.
  40. Maciejewski JP, Sloand EM, Sato T, et al. Impaired hematopoiesis in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria/aplastic anemia is not associated with a selective proliferative defect in the glycosylphosphatidylinositol-anchored protein-deficient clone. *Blood* 1997, 89: 1171.
  41. Kawagoe K, Kitamura D, Okabe M, et al. Glycosyl phosphatidylinositol-anchor-deficient mice: implications for clonal dominance of mutant cells in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood* 1996, 89: 3600.
  42. Rosti V, Tremml G, Soares V, et al. Murine embryonic stem cells without pig-a gene activity are competent for hematopoiesis with the PNH phenotype but not for clonal expansion. *J Clin Invest* 1997, 100: 1028.
  43. Dunn DE, Nagarajan S, Devetten M, et al. The knock-out model of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria: pig-a (-) hematopoiesis is reconstituted following intercellular transfer of GPI-anchored proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996, 93: 7938.
  44. Rosse WF. Hematopoiesis and the defect in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *J Clin Invest* 1997, 100: 953.
  45. Dessypris EN, Clark DA, McKee LC, et al. Increased sensitivity to complement of erythroid and myeloid progenitors in PNH. *N Engl J Med* 1983, 309: 690.
  46. Dixon RH and Rosse WF. Mechanism of complement mediated activation of human blood platelets in vitro. Comparison of normal and PNH platelets. *J Clin Invest* 1977, 59: 360.
  47. Dacie JV and Lewis SM. Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria: clinical manifestations, hematology and nature of disease. *Semin Haematol* 1972, 5: 3.
  48. Zimmerman D and Bell WR. Venous thrombosis and splenic rupture in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Am J Med* 1980, 68: 275.
  49. Hartmann RC and Kolhouse JF. Viewpoints on the management of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Semin Haematol* 1972, 5: 42.
  50. Steinberg D, Carvalho AC, Chesney CM, et al. Platelet hypersensitivity and intravascular coagulation in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Am J Med* 1975, 59: 845.
  51. Devine DV, Siegel RS, Rosse WF. Interactions of the platelets in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria with complement. Relationship to defects in the regulation of complement and to platelet survival in vivo. *J Clin Invest* 1987, 79: 131.
  52. Cohen P, Gardner FH, Barnett GO. Reclassification of the thrombocytopenias by the Chrome 51 labeling method for measuring platelet life span. *N Engl J Med* 1961, 264: 1294.
  53. Stern M and Rosse WF. Two populations of granulocytes in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood* 1979, 53: 928.
  54. Plesner T, Hansen NE, Carlsen K. Estimation of PI-bound proteins on blood cells of PNH patients by quantitative flow cytometry. *Br J Haematol* 1990, 75: 585.

55. Selvaraj P, Rosse WF, Silber R, Springer TA. The major Fc receptor in blood has a phosphatidylinositol anchor and is deficient in paroxysmal nocturnal haemoglobinuria. *Nature* 1988, 333: 565.
56. Nicholson-Weller A, Spicer DB, Austen KF. Deficiency of the complement regulatory protein, «decay-accelerating factor», on membranes of granulocytes, monocytes and platelets in paroxysmal nocturnal haemoglobinuria. *N Engl J Med* 1985, 312:1091.
57. Dreyfus B. Les anémies refractaires: enzymopathies acquises multiples de la cellule souche hématopoïétique. *Nouv Rev Fr Hematol* 1968, 8: 763.
58. Tomiyama J, Ninomiya H, Abe T, et al. Enhanced complement susceptibility and dysfunction of lymphocytes in paroxysmal nocturnal haemoglobinuria (PNH). *Br J Haematol* 1990, 76: 540.
59. Schubert J, Schmidt RE, Medof ME. Regulation of glycoinositol phospholipid anchor assembly in human lymphocytes. Absent mannosyl synthesis in affected T and natural killer cell lines from paroxysmal nocturnal haemoglobinuria patients. *J Biol Chem* 1993, 268: 6281.
60. Richards SJ, Norfolk DR, Swirsky DM, Hillmen P. Lymphocyte subset analysis and glycosylphosphatidylinositol phenotype in patients with paroxysmal nocturnal haemoglobinuria. *Blood* 1998, 92: 1799.
61. Krensky AM, Sanchez-Madrid F, Robbins E, et al. The functional significance, distribution and structure of LFA-1, LFA-2 and LFA-3: Cell surface antigens associated with CTL-target interactions. *J Immunol* 1983, 131: 611.
62. Koyasy S, Lawton T, Novick D, et al. Role of interaction of CD2 molecules with lymphocyte function antigen 3 in T-cell recognition of nominal antigen. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990, 87: 2603.
63. Deckel M, Kubar J, Bernard A. CD58 and CD59 molecules exhibit potentializing effects in T-cell adhesion and activation. *J Immunol* 1992, 148: 672.
64. Auditore JV and Hartmann RC. Paroxysmal nocturnal haemoglobinuria II. Erythrocyte acetylcholinesterase defect. *Am J Med* 1959, 27: 401.
65. Medof ME, Kinoshita T, Nussenzweig V. Inhibition of complement activation on the surface of cells after incorporation of decay-accelerating factor (DAF) into their membranes. *J Exp Med* 1984, 160: 1558.
66. Futerman AH, Low MG, Michaelson DM, Silman I. Solubilization of membrane-bound acetylcholinesterase by a phosphatidylinositol-specific phospholipase C. *J Neurochem* 1985, 45: 1487.
67. Low MG. Glycosyl-phosphatidylinositol: a versatile anchor for cell surface proteins. *FASEB J* 1989, 3: 1600.
68. Davitz MA, Low MG, Nussenzweig V. Release of Decay-accelerating factor (DAF) from the cell membrane by phosphatidylinositol specific phospholipase C (PIPLC) selective modification of a complement regulatory protein. *J Exp Med* 1986, 163:1150.
69. Mahoney JF, Urakaze M, Hall S, et al. Defective glycosylphosphoinositol anchor synthesis in paroxysmal nocturnal haemoglobinuria granulocytes. *Blood* 1992, 79: 1400.
70. Low MG. Biochemistry of the glycosyl-phosphatidylinositol membrane protein anchors. *Bioch J* 1987, 244: 1.
71. Kinoshita T, Medof ME, Nussenzweig V. Endogenous association of decay accelerating factor (DAF) with C4b and C3b on cell membranes. *J Immunol* 1986, 136: 3390.
72. Lublin DM and Atkinson JP. Decay-accelerating factor: biochemistry, molecular biology and function. *An Rev Immunol* 1989, 7: 35.
73. Coyne K, Hall SE, Thompson ES, et al. Mapping of epitopes, glycosylation sites and complement regulatory domains in human decay accelerating factor. *J Immunol* 1992, 149: 2906.
74. Caras IW, Davitz MA, Rhee L, et al. Cloning of decay-accelerating factor suggests a novel use of splicing to generate two proteins. *Nature* 1987, 325: 545.
75. Post TW, Arce MA, Liszewski MK, et al. Structure of the gene for human complement protein decay accelerating factor. *J Immunol* 1990, 144: 740.
76. Daniels GL, Tohyama H, Uchikawa M. A possible null phenotype in the Cromer blood group complex. *Transfusion* 1982, 22: 362.
77. Spring FA, Judson PA, Daniels GL, et al. A human cell surface glycoprotein that carries Cromer-related blood group antigens on erythrocytes and is also expressed on leukocytes and platelets. *Immunology* 1987, 62: 307.
78. Telen MJ, Rosse WF, Parker CJ, et al. Evidence that several high-frequency human blood group antigens reside on phosphatidylinositol-linked erythrocyte membrane proteins. *Blood* 1990, 75: 1404.
79. Lublin DM, Mallinson G, Reid ME, et al. Molecular basis of reduced or absent expression of decay accelerating factor in Dr(a-) and INAB phenotypes of Cromer blood group. *Transfusion* 1992, 3: 47.
80. Levene C, Harel DJ, Bird GWG, et al. A new phenotype confirming a relationship between Cra and Tca. *Transfusion* 1984, 24: 13.
81. Holguin MH, Martin CB, Bernshaw NJ, Parker CJ. Analysis of the effects of activation of the alternative pathway of complement of erythrocytes with an isolated deficiency of decay accelerating factor. *J Immunol* 1992, 148: 498.

82. Sun X, Funk CD, Deng C, et al. Role of decay-accelerating factor in regulating complement activation on the erythrocyte surface as revealed by gene targeting. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999, 96: 628.
83. Lachmann PJ. The control of homologous lysis. *Immunology Today* 1991, 12: 312.
84. Davies A, Simmons DL, Hale G, Harrison RA. CD59, a Ly-6-like protein expressed in human lymphoid cells, regulates the action of the complement membrane attack complex on homologous cells. *J Exp Med* 1989, 170: 637.
85. Ninomiya H, Steward BH, Rollins SA, et al. Contribution of the N-linked carbohydrate of erythrocyte antigen CD59 to its complement-inhibitory activity. *J Biol Chem* 1992, 267: 8404.
86. Hadam MR. Cluster report: CD59. In Knapp W, Dorken B, Gilks WR et al. (eds) *Leucocyte Typing IV White Cell Differentiation Antigens*, Oxford, Oxford University Press, p 720.
87. Rorsberg UH, Bazil V, Stefanova I, Schroder I. Gene for human CD59 (likely Ly-6 homologue) is located on the short arm of chromosome 11. *Immunogenetics* 1989, 30: 188.
88. Meri S, Morgan BP, Davies A, et al. Human protectin (CD59), an 18000-20000 MW complement lysis restricting factor, inhibits C5b-8 catalyzed insertion of C9 into lipid bilayers. *Immunology* 1990, 71: 1.
89. Yamashina M, Ueda E, Kinoshita T, et al. Inherited complete deficiency of 20-kilodalton homologous restriction factor (CD59) as a cause of paroxysmal haemoglobinuria. *N Engl J Med* 1990, 323: 1184.
90. Wiedmer T, Hall SE, Ortel TL, et al. Complement-induced vesiculation and exposure of membrane prothrombinase sites in platelets of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood* 1993, 82: 1192.
91. Rosse WF and Parker CJ. Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Clin Hematol* 1986, 14: 105.
92. Massoulié J and Bon S. The molecular forms of cholinesterase and acetylcholinesterase in vertebrates. *An Rev Neurosci* 1985, 5: 57.
93. Getman DK, Eubanks JH, Camp S, et al. The human gene encoding acetylcholinesterase is located on the long arm of chromosome 7. *Am J Hum Genet* 1992, 51: 170.
94. Dacie JV. Paroxysmal nocturnal haemoglobinuria. In *the Haemolytic Anaemias IV*, London, Churchill, 1967, p. 1128.
95. Spring FA, Gardner B, Anstee DJ. Evidence that the antigens of the Yt blood group system are located on human erythrocyte acetylcholinesterase. *Blood* 1992, 80: 2136.
96. Bartels CF, Zelinski T, Lockridge O. Mutation at codon 322 in the human acetylcholinesterase gene (ACHE) accounts for YT blood group polymorphism. *Am J Hum Genet* 1993, 52: 928.
97. Sussman JI, Harel M, Frolon F, et al. Atomic structure of acetylcholinesterase from *Torpedo californica*. *Science* 1991, 253: 872.
98. Kere J, Ruutu T, Davies KA, et al. Chromosome 7 long arm deletion in myeloid disorders: a narrow breakpoint region in 7q22 defined by molecular mapping. *Blood* 1989, 73: 230.
99. Lapidot-Lifson Y, Prody CA, Ginzberg D, et al. Coamplification of human acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase genes in blood cells: correlation with various leukemias and abnormal megakaryopoiesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989, 86: 4715.
100. Verwilghen RL and Bougaerts MA. The myeloblastic syndrome. *Blood* 1987, 1: 34.
101. Patinkin D, Seidman S, Eckstein F, et al. Manipulation of cholinesterase gene expression modulate murine megakaryopoiesis in vitro. *Mol Cell Biol* 1990, 10: 6046.
102. Rosse WF. *Clinical Immunohaematology: Basic Concepts and Clinical Applications*, Oxford, Blackwell Scientific Publications, 1990, p. 583.
103. Shinohara K and Tanaka KR. Hereditary deficiency of erythrocyte acetylcholinesterase. *Am J Hematol* 1979, 7: 313.
104. Dustin ML, Selvaraj P, Mattaliano RJ. Anchoring mechanisms for LFA-3 adhesion glycoprotein at membrane surface. *Nature* 1987, 329: 846.
105. Williams AF and Barclay AN. The immunoglobulin superfamily-domain for cell surface recognition. *An Rev Immunol* 1988, 6: 381.
106. Watts MJ, Dankert JR, Morgan BP. Isolation and characterization of a membrane-attack-complex-inhibiting protein present in human serum and other biological fluids. *Bioch J* 1990, 265: 471.
107. Spring FA and Reid ME. Evidence that human blood group antigens Gya and Hy are carried on a novel glycosylphosphatidylinositol-linked erythrocyte membrane glycoprotein. *Vox Sang* 1991, 60: 53.
108. Spring FA. Evidence that the high incidence antigen, Joa, is carried on the glycoprotein that expresses the Gya and Hy antigens. *Trasf Med* 1991, 1(Suppl 2): 59.
109. Bancs J, Parker N, Poole J. Evidence to show that Dombrock, (Do) antigens reside on the Gya/Hy glycoprotein. *Transf Med* 1992, 2(Suppl 1): 68.
110. Bobolis K, Moulds JJ, Telen MJ. Isolation of the JMh antigen on a novel phosphatidylinositol-linked human membrane protein. *Blood* 1992, 79: 1574.



111. Kamitani T, Menon AK, Hallaq Y et al: Complexity of ethanolamine phosphate addition in the biosynthesis of glycosylphosphatidylinositol anchors in mammalian cells. *J Biol Chem*, 1992, 267: 24611.
112. Sugiyama E, DeGasperi R, Urakaze M, et al. Identification of defects in glycosylphosphatidylinositol anchor biosynthesis in the Thy-1 expression mutants. *J Biol Chem* 1991, 266: 12119.
113. Urakaze M, Kamitani T, DeGasperi R, et al. Identification of a missing link in: Glycosyl phosphatidylinositol-anchor in mammalian cells. *J Biol Chem* 1992, 267: 6459.
114. DeGasperi R, Thomas LJ, Sugiyama E, et al. Correction of a defect in mammalian GPI anchor biosynthesis by a transfected yeast gene. *Science* 1990, 250: 988.
115. Udenfriend S, Micanovic R, Kodukula K. Structural requirements of a nascent protein for processing to a PI-G anchored form: Studies in intact cells and cell-free systems. *Cell Biol Int Rep* 1991, 15: 739.
116. Hirose S, Ravi L, Prince GM et al: Synthesis of mannosyl-glucosaminylinositol phospholipids in normal but not paroxysmal nocturnal hemoglobinuria cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1992, 89: 6025.
117. Schubert J, Uciechowski P, Delany P, et al. The PIG-anchoring defect in NK lymphocytes of PNH patients. *Blood* 1990, 76: 1181.
118. Armstrong C, Schubert J, Ueda E, et al. Affected paroxysmal nocturnal hemoglobinuria T lymphocytes harbor a common defect in assembly of N-acetyl-D-glucosamine inositol phospholipid corresponding to that in class A Thy-1 murine lymphoma mutants. *J Biol Chem* 1992, 267: 25347.
119. Takahashi M, Takeda J, Hirose S, et al. Deficient biosynthesis of N-acetylglucosaminyl-phosphatidylinositol, the first intermediate of glycosylphosphatidylinositol anchor biosynthesis, in cell lines established from patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *J Exp Med* 1993, 177: 517.
120. Hillmen P, Bessler M, Mason PJ, et al. Specific defect in N-acetylglucosamine incorporation in the biosynthesis of the glycosylphosphatidylinositol anchor in cloned cell lines from patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993, 90: 5272.
121. Norris J, Hall S, Ware RE, et al. Glycosyl-phosphatidylinositol anchor synthesis in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria: Partial or complete defect in an early step. *Blood* 1994, 83: 816.
122. Takeda J, Miyata T, Kawagoe K, et al. Deficiency of the GPI anchor caused by a somatic mutation of the PIG-A gene in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Cell* 1993, 73: 703.
123. Miyata T, Yamada N, Iida Y, et al. Abnormalities of PIG-A transcripts in granulocytes from patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *N Engl J Med* 1994, 330: 249.
124. Bessler M, Mason PJ, Hillmen P, et al. Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria (PNH) is caused by somatic mutations in the PIG-A gene. *EMBO J* 1994, 13: 110.
125. Miyata T, Takeda J, Iida Y, et al. The cloning of PIG-A, a component in the early step of GPI-anchor biosynthesis. *Science* 1993, 259: 1318.
126. Ware RE, Howard TA, Kamitani T, et al. Chromosomal assignment of genes involved in glycosylphosphatidylinositol anchor biosynthesis: Implications for the pathogenesis of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood* 1994, 83: 3753.
127. Iida Y, Takeda J, Miyata T, et al. Characterization of genomic PIG-A gene: A gene for GPI-anchor biosynthesis and paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood* 1994, 83: 3126.
128. Bessler M, Hillmen P, Longo L, et al. Genomic organization of the X-linked gene (PIG-A) that is mutated in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria and of a related autosomal pseudogene mapped to 12q21. *Hum Molec Genet* 1994, 3: 751.
129. Watanabe R, Kinoshita T, Masaki R, et al. PIG-A and PIG-H, which participate in glycosylphosphatidylinositol anchor biosynthesis, form a protein complex in the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem* 1996, 271: 26868.
130. Nafa K, Bessler M, Castro-Malaspina H, et al. The spectrum of somatic mutations in the PIG-A gene in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria includes large deletions and small duplications. *Blood Cells Mol Dis* 1998, 24: 370.
131. Bessler M, Mason PJ, Hillmen P, Luzzatto L. Somatic mutations and cellular selection in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Lancet* 1994, 343: 951-953.
132. Nafa K, Mason P, Hillmen P, et al. Mutations in the PIG-A gene causing paroxysmal nocturnal hemoglobinuria (PNH) are mainly of the frameshift type. *Blood* 1995, 86: 4650.
133. Nafa K, Bessler M, Deeg HG, Luzzatto L. New somatic mutation in the PIG-A gene emerges at relapse of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood* 1998, 92: 3422.
134. Kawagoe K, Takeda J, Endo Y, Kinoshita T. Molecular cloning of murine Pig-a, a gene for GPI-anchor biosynthesis, and demonstration of interspecies conservation of its structure, function and genetic locus. *Genomics* 1994, 23: 566.

135. Endo M, Ware RE, Vreeke TM, et al. Molecular basis of the heterogeneity of expression of glycosyl phosphatidylinositol anchored proteins in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood* 1996, 87: 2546.
136. Tremml G, Karadimitris A, Luzzatto L. Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria: Learning about PNH cells from patients and from mice. *Haema* 1998, 1: 12.
137. Leon WMM, Terstappen L, Nguyen M. Defective and normal haematopoietic stem cells in paroxysmal nocturnal haemoglobinuria. *Br J Haematol* 1993, 84: 504.
138. Kyle RA. Second malignancies associated with chemotherapeutic agents. *Semin Oncol* 1982, 9: 131.
139. Quagliana JM, Carrwright GE, Wintrobe MM. Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria following drug-induced aplastic anemia. *Ann Intern Med* 1964, 61:1045.
140. Micanovic R, Gerber LD, Berger J, Udenfriend S. Selectivity of the cleavage/attachment site of phosphatidylinositol-glycan-anchored membrane proteins determined by site-specific mutagenesis at Asp-484 of placental alkaline phosphatase. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990, 87: 1.
141. Edberg JC, Salmon JE, Whitlow M, Kimberly RP. Preferential expression of human Fc gamma RIIP-MN (CD16) in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. Discordant expression of glycosyl phosphatidylinositol-linked proteins. *J Clin Invest* 1991, 87: 58.
142. Hall SE and Rosse WF. The use of monoclonal antibodies and flow cytometry in the diagnosis of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood* 1996, 87: 5332.
143. Ware RE, Rosse WF, Hall SE. Immunophenotypic analysis of reticulocytes in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood* 1995, 86: 1586.
144. Iwamoto N, Kawaguchi T, Horikawa K, et al. Preferential hematopoiesis by paroxysmal nocturnal hemoglobinuria clone engrafted in SCID mice. *Blood* 1996, 87: 4944.
145. Young NS and Maciejewski J. The pathophysiology of acquired aplastic anemia. *N Engl J Med* 1997, 336: 1365.
146. Nishimura J, Smith CA, Phillips KL, et al. Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria: molecular pathogenesis and molecular therapeutic approaches. *Hematopathol Mol Hematol* 1998, 11: 119.
147. Zombos NC, Gascon P, Djeu JY, et al. Circulating activated suppressor T lymphocytes in aplastic anemia. *N Engl J Med* 1985, 312: 257.
148. Brodsky RA, Vala MS, Barber JP, et al. Resistance to apoptosis caused by PIG-A gene mutations in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997, 94: 8756.
149. Ware RE, Nishimura J, Moody MA, et al. The PIG-A mutation and absence of glycosyl phosphatidylinositol-linked proteins do not confer resistance to apoptosis in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood* 1998, 92: 2541.
150. Rafiee P, Lee JK, Leung C-C, Raffin TA. TNF- $\alpha$  induces tyrosine phosphorylation of mitogen-activated protein kinase in adherent human neutrophils. *J Immunol* 1995, 154: 4785.
151. Cox G. Glucocorticoid treatment inhibits apoptosis in human neutrophils. *J Immunol* 1995, 154: 4719.
152. Iwai K, Miyawaki T, Takizawa T, et al. Differential expression of bcl-2 and susceptibility to anti-Fas-mediated cell death in peripheral blood lymphocytes, monocytes and neutrophils. *Blood* 1994, 84: 1201.
153. Boise LH, Minn AJ, Noel PJ, et al. CD28 costimulation can promote T cell survival by enhancing the expression of Bcl-xL. *Immunity* 1995, 3: 87.
154. Hsieh S-C, Huang M-H, Tsai C-Y, et al. The expression of genes modulating programmed cell death in normal human polymorphonuclear neutrophils. *Biochem Biophys Res Commun* 1997, 233: 700.
155. Homburg CHE, de Haas M, von dem Borne AEGK, et al. Human neutrophils lose their surface Fc $\gamma$ RIII and acquire annexin V binding sites during apoptosis in vitro. *Blood* 1995, 85: 532.