

ΑΝΑΣΚΟΠΗΣΗ REVIEW

Παθογενετικοί και παθοφυσιολογικοί μηχανισμοί για την εμφάνιση της νυκτερινής παροξυστικής αιμοσφαιρινουρίας

Η νυκτερινή παροξυστική αιμοσφαιρινουρία (ΝΠΑ) αποτελεί επίκτητη κληνική διαταραχή του αρχέγονου αιμοποιητικού κυττάρου, που χαρακτηρίζεται από την εμφάνιση ενδαγγειακής αιμόλυσης, απλασίας του μυελού των οστών, θρομβωτικών διαταραχών και σπάνια εκτροπής προς οξεία λευχαιμία. Η κύρια μοριακή βλάβη της ΝΠΑ εντοπίζεται στο γονίδιο PIG-A (phosphatidylinositol glycan group A), που βρίσκεται στο χρωμόσωμα Χ. Μεταλλάξεις του PIG-A αναστέλλουν τη σύνθεση της γλυκοσυλφωσφατιδυλοϊνοσιτόλης (GPI), που χρησιμεύει ως «άγκυρα» για την πρόσδεση στην κυτταρική μεμβράνη αρκετών πρωτεϊνών. Αποτέλεσμα των ανωτέρω είναι η ανεπάρκεια ή η πλήρης έλλειψη των πρωτεϊνών αυτών από την επιφάνεια των κυττάρων του αίματος. Τα μόρια CD55 και CD59 είναι τέτοιες πρωτεΐνες που προσδένονται στη μεμβράνη μέσω GPI και μετέχουν στη ρύθμιση του συμπληρώματος. Η απουσία τους από την επιφάνεια των ερυθρών αιμοσφαιρίων στη ΝΠΑ ευθύνεται για τη μεσολαβούμενη από το συμπλήρωμα ενδαγγειακή αιμόλυση, που αποτελεί κύριο χαρακτηριστικό της νόσου και ευθύνεται για πολλές από τις κλινικές εκδηλώσεις της. Είναι εξαιρετικά ενδιαφέρον το ότι μεταλλάξεις στο γονίδιο PIG-A μπορεί να βρεθούν και σε υγιή άτομα, γεγονός που επιβεβαιώνει ότι οι μεταλλάξεις του PIG-A στα αιμοποιητικά κύτταρα δεν είναι αρκετές για την εμφάνιση της ΝΠΑ. Προφανώς, απαιτείται μια θετική επιλογή ανάπτυξης ή ένα εσωτερικό πλεονέκτημα του PIG-A (-) κλώνου ΝΠΑ ή μια αρνητική επιλογή έναντι του PIG-A (+) κλώνου των αιμοποιητικών κυττάρων για την εκδήλωση του κλινικού συνδρόμου της ΝΠΑ. Η παρούσα ανασκόπηση περιλαμβάνει όλα τα στοιχεία που υπάρχουν μέχρι σήμερα στη βιβλιογραφία για τους παθογενετικούς μηχανισμούς οι οποίοι οδηγούν στην ανάπτυξη της ΝΠΑ στον άνθρωπο.

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η νυκτερινή παροξυστική αιμοσφαιρινουρία (ΝΠΑ) ή νόσος των Marchiafava-Micheli αποτελεί μια επίκτητη κληνική 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.¹⁻⁵ Σ' αυτήν εμφανίζεται πληθυσμός παθολογικών ερυθρών αιμοσφαιρίων που παρουσιάζει ιδιαίτερη ευαισθησία στη λυτική δράση του συμπληρώματος. Την ίδια διαταραχή εμφανίζουν υποπληθυσμοί τόσο των πολυμορφοπυρήνων

και των μονοκυττάρων, όσο και των λεμφοκυττάρων και των αιμοπεταλίων.^{4,6}

Η νόσος αποτελεί κλασικό αντικείμενο της Αιματολογίας μετά από τις κλινικές μελέτες των Marchiafava και Nazari στις αρχές του αιώνα, του Micheli το 1931 και τη διαγνωστική προσπέλασή της λίγα χρόνια αργότερα από τους Ham και Dacie τη δεκαετία του 1930. Η πρώτη κλινική αναφορά της ΝΠΑ φαίνεται ότι έγινε από το Γερμανό ιατρό Schmidt, στη λατινική γλώσσα, το 1678.⁷ Η πρώτη τεκμηριωμένη περιγραφή έγινε στη γερμανική γλώσσα το 1882.⁸ Αφορούσε σε έναν ασθενή που παρουσίαζε πρωινή αιμοσφαιρινουρία και έγινε αναφορά ότι η αιμόλυση οφειλόταν σε μια διαταραχή των ερυθρών αιμοσφαιρίων. Την εποχή εκείνη ήταν γνωστή μια κλινική

ΑΡΧΕΙΑ ΕΛΛΗΝΙΚΗΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ 2009, 26(2):206-229
ARCHIVES OF HELLENIC MEDICINE 2009, 26(2):206-229

Γ.Χ. Μελέτης,¹
Α. Σαραντόπουλος,¹
Ι.Β. Ασημακόπουλος,¹
Ε. Τέρπος²

¹Α΄ Παθολογική Κλινική, Πανεπιστήμιο Αθηνών

²Τμήμα Ιατρικής Έρευνας, 251 Γενικό Νοσοκομείο Αεροπορίας, Αθήνα

Pathogenetic and pathophysiological mechanisms of the paroxysmal nocturnal hemoglobinuria

Abstract at the end of the article

Λέξεις ευρετηρίου

Άγκυρα GPI
CD55
CD59
DAF
MIRL
Νυκτερινή παροξυστική αιμοσφαιρινουρία

Υποβλήθηκε 28.1.2008
Εγκρίθηκε 3.6.2008

οντότητα χαρακτηριζόμενη από οξεία αιμοσφαιρινουρία μετά από έκθεση σε ψύχος που σχετιζόταν με τη σύφιλη και είχε την ονομασία παροξυντική αιμοσφαιρινουρία εκ ψύχους. Η κυριότερη συνεισφορά του Strubing ήταν ο διαχωρισμός της κλινικής αυτής οντότητας, η οποία αργότερα αποδείχθηκε ότι οφειλόταν σε αιμόλυση λόγω των ερυθροκυτταρικών αντισωμάτων Donath-Landsteiner, από τη ΝΠΑ. Το 1911 αναγνωρίστηκε, για πρώτη φορά, ότι η ΝΠΑ αποτελεί μορφή αιμολυτικής αναιμίας, μετά από μελέτη που απέδειξε ότι τα ερυθροκύτταρα του «παροξυσμικού ικτέρου», όπως ονομάστηκε το σύνδρομο, αιμόλυνονται όταν επάγονται σε ορό παρουσία CO₂.⁹ Τη δεκαετία του 1930 δειχθηκε ότι η αιμόλυση που συνόδευε τη ΝΠΑ είχε εξάρτηση από το συμπλήρωμα και το pH, ενώ ο μεγαλύτερος βαθμός αιμόλυσης εμφανιζόταν σε οξινισθέντα ορό. Το 1937, οι Ham et al απέδειξαν ότι το συμπλήρωμα είναι απαραίτητο για την *in vitro* λύση των παθολογικών ερυθροκυττάρων, το οποίο ενεργοποιείται σε οξινισθέντα ορό. Η δοκιμασία του οξινισθέντος ορού, γνωστή και ως δοκιμασία Ham, έγινε η πλέον χρήσιμη δοκιμασία για τη διάγνωση της ΝΠΑ μέχρι την εφαρμογή της κυτταρομετρίας ροής.¹⁰ Ο Dacie απέδειξε την ύπαρξη παρατεταμένης απλασίας και ΝΠΑ σε περίπτωση αναιμίας Fanconi, ενώ η νόσος χαρακτηρίστηκε ως κλωνική και αποτέλεσμα μιας επίκτητης διαταραχής του αιμοποιητικού κυττάρου.¹¹ Η κλωνικότητα της νόσου προσδιορίστηκε το 1970, όταν παρατηρήθηκε ένας μόνο τύπος του ενζύμου G6PD στα πάσχοντα ερυθροκύτταρα γυναικών.¹²

Με τη συνεχιζόμενη έρευνα φάνηκε ότι στην επιφάνεια των κυττάρων του παθολογικού κλώνου ανεπαρκούσαν ή απουσίαζαν διάφορες μεμβρανικές πρωτεΐνες σύνδεσης που ήταν προσκολλημένες στην επιφάνεια των κυττάρων με μια «άγκυρα» γλυκολιπιδίων (GPI anchor). Αργότερα, διαπιστώθηκε ότι η μοριακή βλάβη στη ΝΠΑ ήταν κάποια γενετική μετάλλαξη που διαταράσσει τη βιοσύνθεση της «άγκυρας» της γλυκοσυλοφωσφατιδυλοϊνοσιτόλης (GPI).

Η ΝΠΑ είναι αποτέλεσμα μίας ή περισσοτέρων σωματικών μεταλλάξεων του γονιδίου PIG-A (phosphatidylinositol glycan group A), που εδράζεται στο βραχύ σκέλος του χρωμοσώματος X (Xp22.1) και αποτελείται από 6 εξόνια. Υπάρχει ένα απλό γονίδιο PIG-A σε κάθε διπλοειδικό κύτταρο, ακόμα και στις γυναίκες, λόγω της αδρανοποίησης του χρωμοσώματος X. Το προϊόν του γονιδίου έχει μέγεθος 54 kDa και αποτελείται από 484 αμινοξέα.¹³ Έχουν περιγραφεί >175 σωματικές μεταλλάξεις, που εδράζονται σε όλη την περιοχή όπου κωδικοποιείται το γονίδιο.¹⁴ Οι περισσότερες είναι διαγραφές ή παρεμβολές, οι οποίες έχουν ως αποτέλεσμα την αλλαγή της αλληλουχίας των αμινοξέων, που τελικά οδηγούν σε δημιουργία κωδικονίου πρόωρου τερματισμού.¹⁵ Οι άλλοι τύποι μεταλλάξεων του

PIG-A είναι σημειακές μεταλλάξεις [μεταλλάξεις που οδηγούν σε άμεσο κωδικόνιο τερματισμού (nonsense), μεταλλάξεις που οδηγούν στην αντικατάσταση ενός αμινοξέος στην πρωτεϊνική αλληλουχία (missense) και μεταλλάξεις που επηρεάζουν το μέγεθος και τη σταθερότητα του mRNA (splice site)], οι οποίες επηρεάζουν το μέγεθος και τη σταθερότητα του mRNA.¹⁵ Οι μεταλλάξεις που οδηγούν στην αντικατάσταση ενός αμινοξέος στην πρωτεϊνική αλληλουχία του γονιδίου PIG-A επηρεάζουν σημαντικά την κατασκευή και τη λειτουργία του τελικού προϊόντος του γονιδίου, που είναι η άγκυρα GPI. Οι μεταλλάξεις αυτές ευθύνονται για τους δύο φαινότυπους των κυττάρων ΝΠΑ που συνυπάρχουν στους ασθενείς. Οι μεταλλάξεις μεταβολής του αναγνωστικού πλαισίου (frameshift) προκαλούν αναστολή της παραγωγής των GPI πρωτεϊνών και τα ερυθρά αιμοσφαίρια που παράγονται έχουν πλήρη έλλειψη των πρωτεϊνών αυτών, ενώ είναι γνωστά ως ερυθρά αιμοσφαίρια PNH τύπου III. Τα ερυθρά αυτά είναι πολύ ευαίσθητα στο ενεργοποιημένο συμπλήρωμα σε σύγκριση με τα φυσιολογικά ερυθρά. Τα ερυθρά PNH τύπου II εμφανίζουν μερική απουσία ή ανεπάρκεια των πρωτεϊνών της GPI άγκυρας και έτσι επιδεικνύουν μια ενδιάμεση ευαισθησία στο συμπλήρωμα σε σχέση με τα φυσιολογικά ερυθρά.¹⁶ Και στις δύο περιπτώσεις έχουν βρεθεί σημειακές μεταλλάξεις. Το μέγεθος και ο τύπος του κλώνου ΝΠΑ καθορίζει και το βαθμό της αιμόλυσης και σχετίζεται με τη βαρύτητα των κλινικών εκδηλώσεων των ασθενών. Η αρχική μεταλλαξιγόνο αιτία στο γονίδιο PIG-A είναι άγνωστη, όπως επίσης και η συχνότητα της μετάλλαξης σε άλλα σωματικά κύτταρα. Το παθολογικό γονίδιο εμφανίζεται στα σωματικά κύτταρα και ιδιαίτερα στα αιμοποιητικά αρχέγονα κύτταρα και δεν έχει ανιχνευτεί σε γεννητικά κύτταρα, γεγονός που καθιστά τη νόσο σαφή επίκτητη διαταραχή. Δεν είναι μέχρι σήμερα αποσαφηνισμένο αν οι μεταλλάξεις αυτές εμφανίζονται και εκτός του αιμοποιητικού συστήματος.

Η μετάλλαξη στο γονίδιο PIG-A έχει ως αποτέλεσμα την απώλεια ενός λειτουργικού αλληλίου. Στο αιμοποιητικό σύστημα, το προγονικό κύτταρο εκφράζει φαινότυπο PNH GPI (-) όταν η μετάλλαξη εμφανιστεί στο λειτουργικά δραστητικό αλληλίο. Η συχνότητα εμφάνισης της ΝΠΑ δεν είναι καλά καθορισμένη, αλλά η νόσος φαίνεται ότι εμφανίζεται με την ίδια συχνότητα σε άνδρες και γυναίκες. Όπως αναφέρθηκε, το γονίδιο PIG-A εντοπίζεται στο χρωμόσωμα X και έτσι η τυχαία αδρανοποίηση του χρωμοσώματος στις γυναίκες έχει ως αποτέλεσμα βλάβη του γονιδίου, ενώ έτσι εξαλείφει την έκφρασή του.

Ο όρος νυκτερινή παροξυντική αιμοσφαιρινουρία είναι μάλλον πτωχός, καθώς περιγράφει μόνο μία κλινική διαταραχή της νόσου, που εμφανίζεται σε <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 παρουσιάζουν τη διαταραχή, αλλά κυρίως από τη συχνότητα εμφάνισης και τη βαρύτητα των φλεβικών θρομβώσεων και των 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 περισσότερο κατανοητή.

2. ΠΡΩΤΕΪΝΕΣ ΤΗΣ «ΑΓΚΥΡΑΣ» GPI

Στα φυσιολογικά κύτταρα είναι γνωστό ότι περίπου

20–30 διαφορετικές πρωτεΐνες της μεμβράνης συνδέονται με την κυτταρική μεμβράνη μέσω της «άγκυρας» GPI (πίν. 1). Αυτές οι πρωτεΐνες είναι διάφοροι υποδοχείς, αντιγόνα, μόρια προσκόλλησης, ένζυμα, ενεργοποιητές της μεταγραφικής διαδικασίας και ρυθμιστικές πρωτεΐνες του συμπληρώματος. Οι ακριβείς λειτουργίες της «άγκυρας» GPI δεν είναι απόλυτα γνωστές στα κύτταρα των θηλαστικών. Η εμφάνιση σωματικής μετάλλαξης του γονιδίου PIG-A στα προσβεβλημένα αιμοποιητικά κύτταρα έχει ως αποτέλεσμα την αδυναμία των κυττάρων του αίματος να καθηλώσουν στα κύτταρα ρυθμιστικές πρωτεΐνες του συμπληρώματος με τη μεσολάβηση της «άγκυρας» GPI. Στα κύτταρα των ασθενών με ΝΠΑ έχει δειχθεί ότι απουσιάζουν ή ανεπαρκούν δύο τέτοιες πρωτεΐνες: Ο DAF (decay-accelerating factor) ή CD55 και ο MIRL (membrane inhibitor of reactive

Πίνακας 1. Επιφανειακές πρωτεΐνες που λείπουν από τα κύτταρα του αίματος στη νυκτερινή παροξυντική αιμοσφαιρινουρία.

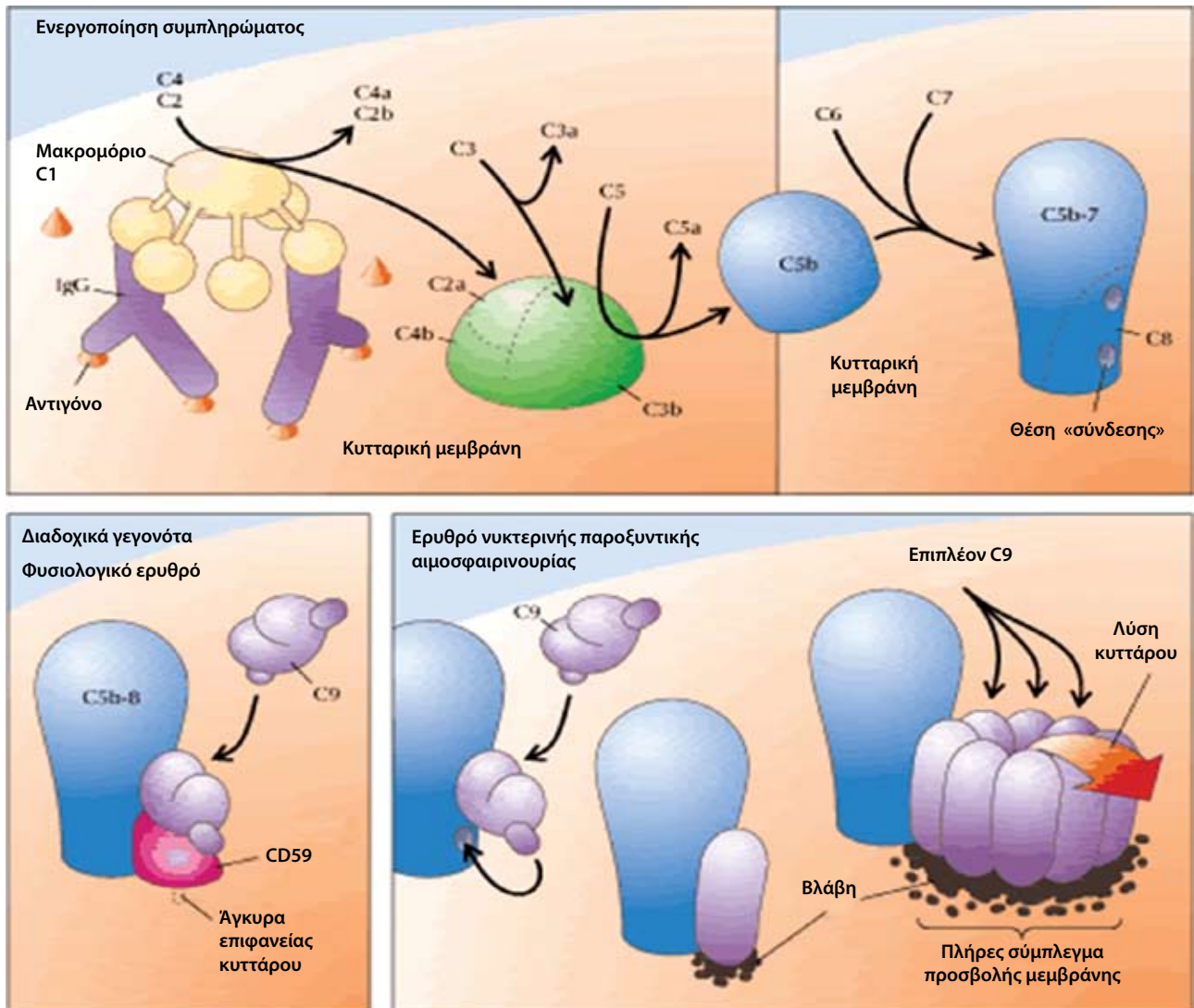
Αντιγόνο	Τύπος έκφρασης
<i>Ένζυμα</i>	
Ακετυλοχολινεστεράση (AChE)	Ερυθρά
Εκτο-5' νουκλεοτιδάση (CD73)	Αρκετά B- και T-λεμφοκύτταρα
Αλκαλική φωσφατάση πολυμορφοκυττάρων (NAP)	Πολυμορφοσπύρηνα
<i>Μόρια προσκόλλησης</i>	
Blast-1/CD48	Λεμφοκύτταρα
LFA-1 ή CD58	Όλα τα κύτταρα του αίματος
CD67	Πολυμορφοσπύρηνα,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

lysis) ή CD59.^{14,17-19} Η απουσία αυτή έχει ως αποτέλεσμα υπερευαίσθησία των ερυθρών αιμοσφαιρίων και των αιμοπεταλίων στη δράση του αυτόλογου συμπληρώματος (εικ. 1). Ο DAF ρυθμίζει την πρώιμη φάση της ενεργοποίησης του συμπληρώματος μέσω της ρύθμισης της κομβερτάσης του C3-C5 συμπλέγματος, του C4b2a της κλασικής οδού και του C3bBb της εναλλακτικής οδού. Η αναστολή αυτή στο συγκεκριμένο επίπεδο δεν φαίνεται να είναι πολύ σημαντική για τον έλεγχο της αιμόλυσης. Το CD59 προλαμβάνει την ενσωμάτωση του C9 στο σύμπλεγμα C5-C8, που έχει σημαντικό ρυθμιστικό ρόλο και προλαμβάνει την αιμόλυση μέσω μη δημιουργίας του MAC (membrane attack complex). Η απουσία του CD59 από τα κύτταρα του αίματος των ασθενών με ΝΠΑ παίζει έτσι σημαντικό ρόλο

στην εμφάνιση αιμόλυσης και συμμετέχει πιθανότατα στην ανάπτυξη θρομβώσεων.^{18,19}

Ερυθρά αιμοσφαίρια με ανεπάρκεια του CD55 (DAF) (φαινότυπος Inab), τα οποία έχουν ακόμη την ικανότητα να εκφράζουν φυσιολογικά επίπεδα CD59, δεν εμφανίζουν κάποιο κλινικό σύμπτωμα ΝΠΑ, όπως θρόμβωση ή ενδαγγειακή αιμόλυση, ενώ οι ασθενείς με ανεπάρκεια του CD59 (MIRL) αλλά με φυσιολογικά επίπεδα CD55 εκφράζουν τα χαρακτηριστικά κλινικά συμπτώματα.^{18,19}

Σε *in vitro* μελέτες έχει δειχθεί ότι τα ερυθρά με ανεπάρκεια CD55 είναι ανθεκτικά στη λύση μέσω συμπληρώματος διαμέσου της εναλλακτικής οδού.²⁰ Τα ερυθρά αιμοσφαίρια με πλήρη έλλειψη του CD59 (τύπου III) είναι πολύ ευαίσθητα



Εικόνα 1. Δράση του CD59: Επάνω απεικονίζεται η «κλασική» οδός ενεργοποίησης του συμπληρώματος, με αποτέλεσμα τη δημιουργία του συμπλέγματος C5b-8. Κάτω αριστερά, φαίνεται η δράση του CD59 στα φυσιολογικά κύτταρα, που εμποδίζει την είσοδο του C9 στην κυτταρική μεμβράνη. Αντίθετα, η απουσία του από το κύτταρο της νυκτερινής παροξυντικής αιμοσφαιρινουρίας έχει ως αποτέλεσμα την καταστροφή του από το σύμπλεγμα C5b-9 (κάτω δεξιά).

στη λύση μέσω του συμπλέγματος C5-C9 του συμπληρώματος και ευθύνονται για την εμφάνιση αιμολυτικής αναιμίας, που αποτελεί χαρακτηριστικό του συνδρόμου της ΝΠΑ. Η ενσωμάτωση του CD59 σε αυτόν τον πληθυσμό ερυθρών αιμοσφαιρίων φαίνεται ότι τα προστατεύει από τη λυτική δράση του συμπληρώματος.^{19,21}

Ευθύνεται η έλλειψη των GPI-συνδεδεμένων πρωτεϊνών για την εμφάνιση θρομβωτικών επεισοδίων; Η θρομβωτική διάθεση αποτελεί μια σοβαρή και συχνά θανατηφόρα επιπλοκή, που παρατηρείται στο 30% περίπου των ασθενών με ΝΠΑ. Οι μηχανισμοί εμφάνισής της δεν είναι πλήρως διευκρινισμένοι. Η φλεβική θρόμβωση αφορά συχνά σε ασυνήθεις θέσεις και κυρίως ενδοκοιλιακά (μεσεντέριες, ηπατικές φλέβες) ή στον εγκέφαλο. Η θρόμβωση υποτροπιάζει συχνά, είναι ανθεκτική στη θεραπεία και αποτελεί την κύρια αιτία κακής πρόγνωσης των ασθενών. Όσον αφορά στο μηχανισμό της θρόμβωσης, αρκετές μελέτες δείχνουν ότι το CD59 προστατεύει τα αιμοπετάλια (ΑΜΠ) όπως και τα ερυθρά από τη δράση του συμπληρώματος, ενώ η απουσία του παίζει σημαντικό ρόλο για την εμφάνιση θρομβώσεων στη ΝΠΑ. Φαίνεται ότι τα ΑΜΠ με ανεπάρκεια CD59 ενεργοποιούνται ευκολότερα από το συμπλήρωμα σε σχέση με τα φυσιολογικά ΑΜΠ, με αποτέλεσμα μεγαλύτερη προπηκτική δραστηριότητα και δημιουργία θρόμβου. Μικροσωματίδια από τη μεμβράνη θεωρείται ότι αποτελούν μια καταλυτική επιφάνεια για τη συναρμολόγηση της προθρομβινάσης και τενάσης.²² Τα νεοσχηματιζόμενα συμπλέγματα C9 στη μεμβράνη των ΑΜΠ απομακρύνονται κατά μικρά κυστίδια με ένα μηχανισμό αποβολής κυστιδίων. Αυτά τα κυστίδια δεν μπορούν να διατηρήσουν τα όξινα φωσφολιπίδια στην εσωτερική επιφάνεια της μεμβράνης, με αποτέλεσμα η εξωτερική επιφάνεια να γίνεται ευνοϊκή θέση για την καθήλωση συμπλεγμάτων προθρομβινάσης.¹³

Η απουσία του CD59 επιτρέπει το σχηματισμό αρκετών συμπλεγμάτων C9 και έτσι δημιουργούνται πολυάριθμα τέτοια κυστίδια ως απάντηση της ενεργοποίησης του συμπληρώματος.^{22,23} Τα μικροτμήματα των ΑΜΠ που απελευθερώνονται μετά από την ενεργοποίηση του συμπληρώματος περιέχουν ένα μεμβρανικό υποδοχέα για τον παράγοντα Va της πήξης.²² Επίσης, στη φλεβική θρόμβωση φαίνεται ότι μπορεί να παίζει ρόλο και κάποια διαταραχή του ινωδολυτικού συστήματος λόγω απουσίας ενός υποδοχέα ουροκινάσης (urokinase plasminogen activator receptor, UPAR) στα μονοκύτταρα της ΝΠΑ, που έχει ως αποτέλεσμα σταθεροποίηση του σχηματισθέντος θρόμβου.^{13,16} Οι ασθενείς με ΝΠΑ δεν εμφανίζουν διαταραχή των προπηκτικών πρωτεϊνών, όπως η πρωτεΐνη C, η πρωτεΐνη S, ο παράγοντας V Leiden και η αντιθρομβίνη III.²⁴ Ο κίνδυνος θρόμβωσης σχετίζεται άμεσα με το μέγεθος

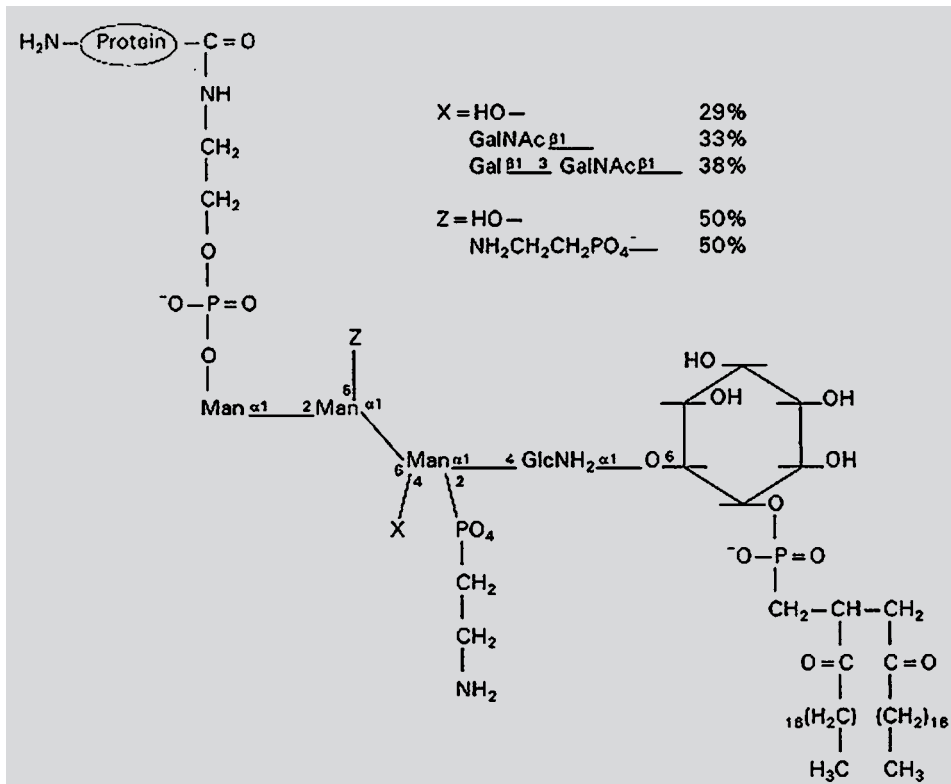
του κλώνου ΝΠΑ στα πολυμορφοπύρρηνα και αποτελεί σημαντικό κριτήριο για χορήγηση προφυλακτικής θεραπείας με βαρφαρίνη.^{16,25}

3. ΒΙΟΣΥΝΘΕΣΗ ΤΗΣ «ΑΓΚΥΡΑΣ» GPI

Πειραματικές μελέτες σε τρυπανοσώματα, όπου η επιφάνειά τους αγκιστρώνεται με μηχανισμούς που εξαρτώνται από την «άγκυρα» GPI, βοήθησαν σημαντικά για τον καθορισμό της κατασκευής και της βιοσύνθεσης αυτής της «άγκυρας». Φαίνεται ότι η κατασκευή της είναι παρόμοια σε όλα τα είδη, με πολύ μικρές μόνο διαφορές. Γενικά, οι μεμβρανικές πρωτεΐνες προσκολλώνται με μια διαμεμβρανική υδρόφοβη ομάδα, που παρέχει μια σταθερότητα αλληλεπίδρασης με τις λιπιδικές κατασκευές της μεμβράνης. Η ύπαρξη και ενός άλλου μηχανισμού της προσκόλλησης πρωτεϊνών της μεμβράνης δείχθηκε με αφαίρεση της αλκαλικής φωσφατάσης με ένα ένζυμο βακτηριδίων που διαταράσσει τη γέφυρα μεταξύ φωσφορικών και της φωσφατιδυλοϊνοσιτόλης.¹³ Η κατασκευή της γλυκοσυλοφωσφατιδυλοϊνοσιτόλης (GPI) αποτελείται από τρία μέρη (εικ. 2): (α) ένα μόριο φωσφατιδυλοϊνοσιτόλης, (β) ένα σώμα γλυκάνης και (γ) μια φωσφοαιθανολαμίνη.⁸ Η «άγκυρα» GPI συντίθεται στο ενδοπλασματικό δίκτυο, μεταφερόμενη από την εξωτερική επιφάνεια του κυττάρου στα κυστίδια του ενδοπλασματικού δικτύου κατά τη διάρκεια της βιοσύνθεσης (εικ. 3).¹³ Τα πρόδρομα στάδια του σχηματισμού της «άγκυρας» GPI εξαρτώνται από 10 ένζυμα περίπου, καθένα από τα οποία κωδικοποιείται από >20 γονίδια (πίν. 2). Ο βιοχημικός δρόμος παραγωγής της GPI και το βιοχημικό έλλειμμα στη ΝΠΑ περιγράφονται παρακάτω.

4. ΠΑΘΟΓΕΝΕΙΑ

Η ΝΠΑ είναι χαρακτηριστική νόσος, με κλινικές εκδηλώσεις επίκτητης αιμολυτικής αναιμίας οφειλόμενης σε ενδαγγειακή αιμόλυση λόγω ενδοερυθροκυτταρικού ελλείμματος. Η ακριβής κατανόηση της παθογένειάς της δεν είναι ακόμη πλήρης. Αρχικές μελέτες των Rotoli και Luzzatto έδειξαν ότι για την ανάπτυξη της απαιτούνται δύο παράγοντες: (α) μια σωματική μετάλλαξη του γονιδίου PIG-A στο αιμοποιητικό αρχέγονο κύτταρο και (β) μυελική απλασία που χαρακτηρίζεται από υποπλασία του μικροπεριβάλλοντος του μυελού των οστών καθώς και πιθανό πλεονέκτημα επιβίωσης του PIG-A (-) κλώνου ΝΠΑ σε σχέση με τον παραμένοντα αιμοποιητικό κλώνο,²⁶ με τελικό αποτέλεσμα ο παθολογικός κλώνος ΝΠΑ να επικρατεί σε σχέση με τα φυσιολογικά κύτταρα. Αυτή η διαδικασία θεωρείται ως «η διπλή θεωρία» (dual theory) για



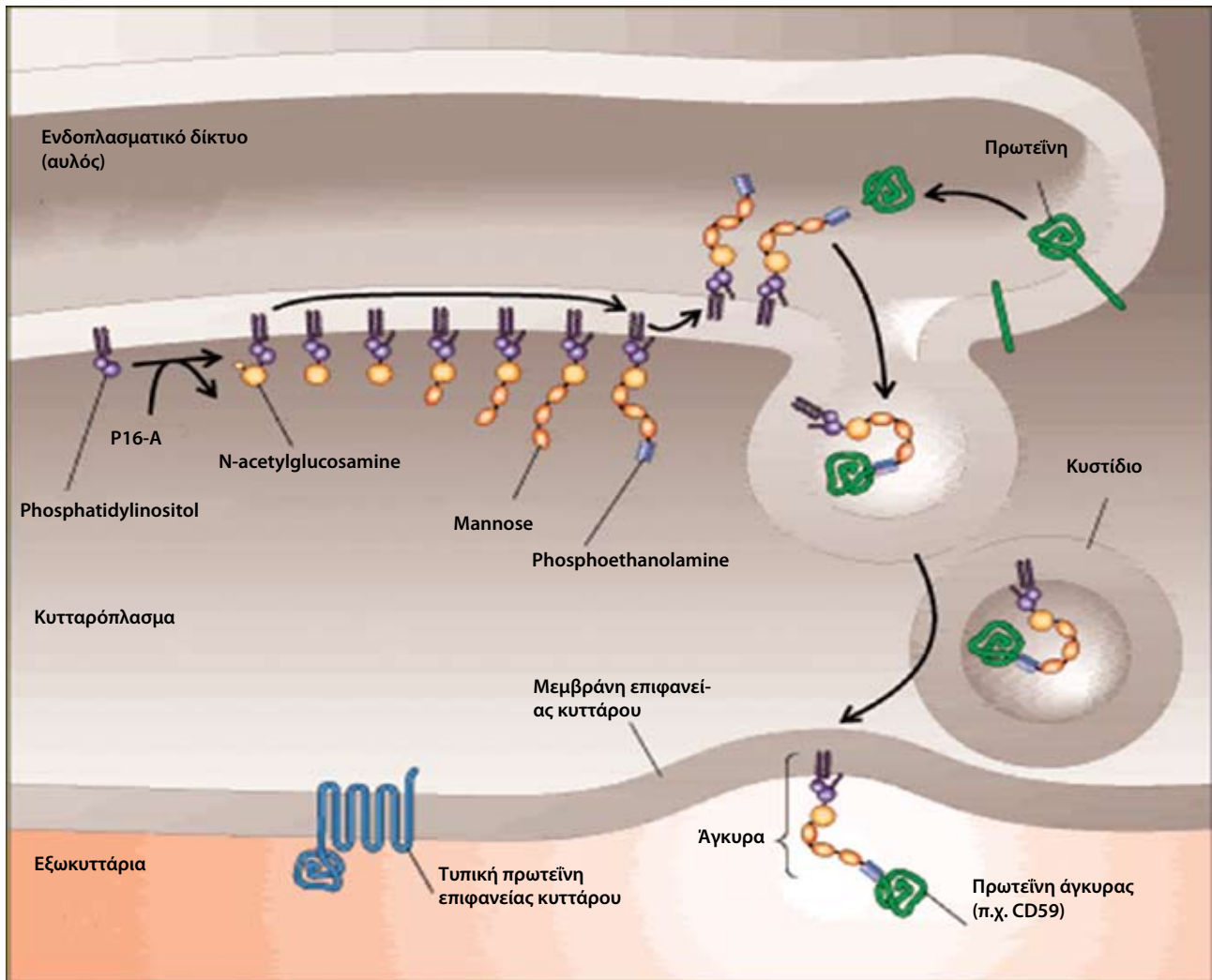
την παθογένεια της νόσου. Δεν είναι ακόμα διευκρινισμένο αν υπάρχει μια θετική επιλογή ανάπτυξης ή ένα εσωτερικό πλεονέκτημα του PIG-A (-) κλώνου ΝΠΑ ή μια αρνητική επιλογή έναντι του PIG-A (+) κλώνου των αιμοποιητικών κυττάρων. Πρώιμες μελέτες ενισχύουν την άποψη του πλεονεκτήματος ανάπτυξης για το προγονικό κύτταρο της ΝΠΑ²⁷ (μεταμόσχευση CD34+ κυττάρων από ΝΠΑ σε SCID ποντίκια διατήρησε την αιμοποίηση χωρίς χρήση κυτταροκινών),^{24,26} αν και υπάρχουν και αντικρουόμενα αποτελέσματα άλλων μελετών, όπου ο φαινοτυπικά PIG-A (-) κλώνος δεν πολλαπλασιαζόταν όπως στη λευχαιμία, αλλά παρέμενε σταθερός και με φυσιολογική διαφοροποίηση για διάστημα 1–6 ετών.²⁴ Στο μυελό των ασθενών με ΝΠΑ συνυπάρχουν αιμοποιητικά αρχέγονα κύτταρα με φυσιολογικό GPI (+) και παθολογικό GPI (-) φαινότυπο, που συμμετέχουν και τα δύο στην αιμοποίηση και αποτελούν μια μοναδική εκδήλωση της νόσου. Έχει δείχθει ότι οι δύο πληθυσμοί εμφανίζουν διαφορετικό ρυθμό πολλαπλασιασμού και τα GPI (+) αρχέγονα κύτταρα παρέχουν 20–140 φορές λιγότερα αρχέγονα κύτταρα σε σύγκριση με τα φυσιολογικά, ενώ τα GPI (-) έχουν τον ίδιο ρυθμό πολλαπλασιασμού με τα φυσιολογικά αρχέγονα κύτταρα, δείχνοντας ότι τα PIG-A (+) GPI (+) αρχέγονα κύτταρα των ασθενών με ΝΠΑ έχουν μειωμένη ανάπτυξη.²⁴

Στις διάφορες μελέτες, η ανάλυση του μυελού και του αίματος ασθενών με ΝΠΑ έχει αναδείξει αρκετούς

ευδιάκριτους πληθυσμούς των κλώνων ΝΠΑ. Σε μοριακό επίπεδο, οι κλώνοι ΝΠΑ τύπου III εμφανίζουν πλήρη ανεπάρκεια των πρωτεϊνών «άγκυρας» GPI, οι κλώνοι τύπου II εμφανίζουν μερική ανεπάρκεια, ενώ σε όλες τις περιπτώσεις εμφανίζονται και φυσιολογικά κύτταρα. Έτσι, η ΝΠΑ είναι μια κλωνική νόσος που οφείλεται σε μια σωματική μετάλλαξη αλλά συνυπάρχουν διάφοροι κλώνοι στο μυελό, υποδηλώνοντας ότι η νόσος δεν είναι μονοκλωνική διαταραχή.

Φυσιολογικά, στο μυελό των οστών υπάρχουν πολύ σπάνια GPI (-) αρχέγονα κύτταρα με μεταλλάξεις του γονιδίου PIG-A, τα οποία όμως δεν πολλαπλασιάζονται. Σε φυσιολογικά άτομα έχουν βρεθεί μικροί αριθμοί πολυμορφοκυττάρων και ερυθρών με ανεπάρκεια GPI, ενώ σε ασθενείς με λέμφωμα και θεραπεία με Campath-1H^{28,29} έχουν ανευρεθεί λεμφοκύτταρα με την ίδια ανεπάρκεια λόγω άμεσης δράσης στην πρωτεΐνη CD52, που και αυτή συνδέεται με την «άγκυρα» GPI.³⁰

Για την παθογένεια της νόσου φαίνεται ότι είναι απαραίτητη η διαταραχή της ανάπτυξης ή η αρνητική επιλογή των φυσιολογικών GPI (+) αρχέγονων κυττάρων και η κλωνική ανάπτυξη του παθολογικού GPI (-) κλώνου των αρχέγονων κυττάρων, μολονότι οι ακριβείς μηχανισμοί παραμένουν ακόμη όχι πλήρως διευκρινισμένοι. Οι περισσότεροι ασθενείς με ΝΠΑ εμφανίζουν >1 κλώνους ΝΠΑ, ενώ η επικράτηση του ελλειμματικού κλώνου στο



Εικόνα 3. Βιοσύνθεση άγκυρας GPI.

μικροπεριβάλλον του μυελού καθώς και η ικανότητά του για αιμοποίηση φαίνεται να σχετίζονται με αρκετές κυτταρικές λειτουργίες.³¹

Είναι γνωστό ότι η αντίσταση στην απόπτωση είναι σταθερή κατά τη διαφοροποίηση των CD34+ αρχέγονων κυττάρων προς ώριμα κύτταρα της κοκκιδώδους σειράς, ενώ η ανάπτυξη ΝΠΑ μπορεί να είναι το αποτέλεσμα αντίστασης των κλώνων ΝΠΑ στην απόπτωση, που έτσι οδηγεί σε ένα πλεονέκτημα επιβίωσης και κλωνική επικράτηση των κυττάρων ΝΠΑ στα πρώιμα στάδια της βλάβης του μυελού.^{32,33}

5. ΠΑΘΟΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑ

5.1. Ερυθρά αιμοσφαίρια

Τα ερυθρά αιμοσφαίρια των πασχόντων από ΝΠΑ είναι

παθολογικά ευαίσθητα στη δράση του ενεργοποιημένου συμπληρώματος μέσω της κλασικής ή της εναλλακτικής οδού.^{34,35} Η διαταραχή αυτή είναι συνέπεια μιας αυξημένης ευαισθησίας των κυττάρων στα τελικά ενεργοποιημένα κλάσματα του συμπληρώματος³⁶ και έχει ως αποτέλεσμα μια πολύ μεγαλύτερη καθήλωση C3, σε σχέση με τη φυσιολογική, όταν ενεργοποιηθεί το συμπλήρωμα από αντισώματα (κλασική οδός) ή από οξινισθέντα 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. Ένα ποσοστό των κυττάρων συμπεριφέρεται φυσιολογικά, ενώ μερικές φορές υπάρχει και ένας τρίτος πληθυσμός ερυθρών αιμοσφαιρίων που εμφανίζει μια ενδιάμεση διαταραχή.^{3,36-38}

Οι τρεις παραπάνω ερυθροκυτταρικοί πληθυσμοί καθορίζονται *in vitro* ανάλογα με τις δοκιμασίες λύσης τους

Πίνακας 2. Γονίδια που λαμβάνουν μέρος στη βιοσύνθεση της «άγκυρας» GPI.

Στάδιο μετατροπής UDP-GlcNAc→GlcNAc-PI	
Όνομα γονιδίου	Εντόπιση
PIG-A	Xp22.1
PIG-C	1q23.3
PIG-H	14q11-q24
PIG-P	21q22.2
GPI1 (PIG-Q)	16.p13.3
DPM2	9q33
PIG-Y	4q21
<i>Ενδιάμεσα στάδια</i>	
PIG-L	17p12
PIG-M	1q22
PIG-N	18q21
PIG-B	15q21-p21
PIG-F	2q16-p21
PIG-O	9
DPM1	20q13.1
DPM3	1q21.2
SL15 (MPDU1)	17p13.1
PIG-V	1p36.11
PIG-W	17p12
PIG-X	3q29
<i>Στάδιο τρανσαμίνωσης</i>	
GPI8 (PIG-K)	1p22.2-p22.3
GAA1 (GPAA1)	8q24.3
PIG-S	17
PIG-T	20q12-q13
PIG-U	20q11

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 η κλινική έκφραση της νόσου είναι η παρακάτω: Ι+ΙΙΙ: 77%, Ι+ΙΙ και Ι+ΙΙ+ΙΙΙ: 9%, ΙΙ+ΙΙΙ: 3%, μόνο ΙΙ: 1%.^{36,38} Εξάλλου, τα ερυθρά τύπου ΝΠΑ ΙΙΙ είναι τα μόνα ευαίσθητα στην τελική διαδοχή C5-9.³⁹ Οι κλινικές εκδηλώσεις και η βαρύτητα της νόσου εξαρτώνται από το ποσοστό των κυττάρων τύπου ΝΠΑ ΙΙΙ. Αν η αναλογία αυτή είναι <20%, τότε η αιμόλυση είναι ασθενής ή και απουσιάζει, αν η αναλογία κυμαίνεται από 20–50% η αιμόλυση είναι ενδιάμεσης βαρύτητας, ενώ αν η αναλογία είναι >50% η αιμόλυση είναι έντονη και συνεχής. Οι μορφές με ερυθρά

τύπου ΝΠΑ ΙΙ είναι υποκλινικές και συχνά απουσιάζει η εμφάνιση αιμοσφαιριουρίας.³⁸

Τα παθολογικά αιμοποιητικά κύτταρα προέρχονται από έναν κλώνο κυττάρων που φέρει ένα μόνο τύπο ισοενζύμου της G6PD, όπως ανιχνεύτηκε σε μια γυναίκα που παρουσίαζε στα φυσιολογικά της ερυθρά τον έναν ή τον άλλο τύπο (Α ή Β) του ενζύμου,⁴⁰ ενώ η επιβίωσή τους είναι μειωμένη.³⁸ Ο ίδιος πληθυσμός είναι εκείνος στον οποίο λείπει και η αλκαλική φωσφατάση από τα πολυμορφοπύρηνα.⁴¹ 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 στα νεαρά ερυθρά, ενώ τα φυσιολογικά ερυθρά των πασχόντων από ΝΠΑ έχουν φυσιολογικό χρόνο επιβίωσης.³⁸

Το αρνητικό φορτίο των ερυθρών είναι αυξημένο, γεγονός που υποθέτει την ύπαρξη μιας διαταραχής των γλυκοπρωτεϊνών της μεμβράνης.^{3,42} Συνηθέστατα, υπάρχει ανεπάρκεια αντιγόνων των ομάδων Α1, Α, Β και Η. Τα λιπίδια της μεμβράνης είναι φυσιολογικά,⁴³ αν και από μερικούς έχει περιγραφεί ανεπάρκεια φωσφατιδυλοχολίνης και αυξημένο ποσό φωσφατιδυλοσερίνης,⁴⁴ ενώ άλλοι ερευνητές δεν εντόπισαν τη συγκεκριμένη ανεπάρκεια και έχουν παρατηρήσει περίσσεια φωσφατιδυλοϊνσοσιτόλης και κορεσμένων λιπαρών οξέων.⁴⁵ Τα ερυθρά που εκτίθενται σε H₂O₂ 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.⁴⁶

Ο μηχανισμός της αιμόλυσης έχει διευκρινιστεί πρόσφατα. 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.^{47,48} Μια τέτοια φυσιολογική γλυκοπρωτεΐνη της μεμβράνης είναι ο DAF (decay accelerating factor, CD55), ο οποίος φυσιολογικά εμποδίζει τις C2 και C5 κονβερτάσες και ακριβέστερα αναστέλλει το σχηματισμό της C3 κονβερτάσης,⁴⁹ προλαμβάνοντας με αυτόν τον τρόπο την ενεργοποίηση του συμπληρώματος, μέσω της κλασικής ή της εναλλακτικής οδού, και συνεπώς τη λύση των κυττάρων από το αυτόλογο συμπλήρωμα.⁴² Στη ΝΠΑ ανεπαρκεί ή απουσιάζει ο DAF από τις μεμβράνες μερικών ερυθρών αιμοσφαιρίων,^{49,50} καθώς επίσης από την επιφάνεια της μεμβράνης μερικών πολυμορφοπυρήνων, μονοκυττάρων, λεμφοκυττάρων και αιμοπεταλίων.⁴⁹ Μεταξύ των πρωτεϊνών της μεμβράνης

που ανεπαρκούν είναι επίσης ο MIRL (membrane inhibitor of reactive lysis) ή CD59 ή HRF20 (homologous restriction factor 20)^{51,52} και η πρωτεΐνη που συνδέεται με το C8 (C8 binding protein) ή HRF60⁵³ (πίν. 1). Στην πραγματικότητα, όλα τα κυκλοφορούντα κύτταρα εμφανίζουν ποικίλο βαθμό ανεπάρκειας πολλών πρωτεϊνών της μεμβράνης, όπου όλες χαρακτηρίζονται από τη σύνδεσή τους με ένα μόριο γλυκοσυλφωσφατιδυλοϊνοσιτόλης (GPI). Σε αντίθεση με τις περισσότερες πρωτεΐνες της μεμβράνης, αυτές δεν διαπερνούν ολόκληρο το τοίχωμά της, αλλά είναι προσδεμένες από την GPI, γεγονός που τους δίνει μεγαλύτερη κινητικότητα, αλλά επίσης και ευκολότερη ενζυμική υδρόλυση.^{54,55} Ανάλογα, επίσης, παρατηρείται ανεπάρκεια του υποδοχέα FcγIII ή CD16 (λειτουργική πρωτεΐνη του πολυμορφοπυρήνου), του LFA-3 ή CD58 (πρωτεΐνη σημαντική για την προσκόλληση των λεμφοκυττάρων)^{49,56,57} και του CD14 (πρωτεΐνη της μεμβράνης του μονοκυττάρου, με μη διευκρινισμένη λειτουργία). Τέλος, ανεπαρκούν και διάφορα άλλα ένζυμα, όπως η ακετυλοχολινεστεράση των ερυθρών, η αλκαλική φωσφατάση των πολυμορφοπυρήνων και η 5' εκτονουκλεοτιδάση των λεμφοκυττάρων (CD73).^{55,58} Όπως περιγράφεται παρακάτω, ο μοριακός μηχανισμός της ΝΠΑ είναι η ύπαρξη ενός ελλείμματος στην «αγκυροβόληση» πρωτεϊνών, που συντίθενται φυσιολογικά αλλά συνδέονται ανεπαρκώς ή καθόλου στην GPI, λόγω σωματικής μετάλλαξης του γονιδίου PIG-A του αρχέγονου αιμοποιητικού κυττάρου, το οποίο οδηγεί σε διαταραχή της σύνθεσης της GPI.^{47,55,59}

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,^{40,60} και ακριβέστερα στο στάδιο μεταξύ των BFU-E και των CFU-E.⁶¹ Για άλλους, η βλάβη εμφανίζεται ήδη από το αρχέγονο αιμοποιητικό κύτταρο, αλλά σε άλλοτε άλλη αναλογία φυσιολογικών και παθολογικών κυττάρων.⁶² Ωστόσο, τα αρχέγονα αιμοποιητικά κύτταρα της ΝΠΑ δεν πολλαπλασιάζονται *in vitro*, όπως τα φυσιολογικά αρχέγονα κύτταρα.⁶³ Σε χιμαιρικά ποντίκια όπου το γονίδιο PIG-A είναι ανενεργό, η συχνότητα εμφάνισης των παθολογικών κυττάρων είναι μικρή κατά τη γέννηση,⁶⁴ ενώ είναι πολύ μεγαλύτερη στην εμβρυϊκή ζωή και ελαττώνεται με την πρόοδο της εγκυμοσύνης. Τα παραπάνω δεδομένα δείχνουν ότι τα κύτταρα που εμφανίζουν διαταραχή στην παραγωγή της GPI παρουσιάζουν μη αποτελεσματική αιμοποίηση.⁶⁵ Φαίνεται λοιπόν ότι τα αρχέγονα κύτταρα που δεν εκφράζουν την GPI δεν εμφανίζουν πλεονέκτημα ανάπτυξης στο φυσιολογικό μικροπεριβάλλον του μυελού. Ωστόσο, είναι γνωστό ότι στη ΝΠΑ το μικροπεριβάλλον του

μυελού μπορεί να μην είναι φυσιολογικό και μερικά από τα κύτταρα του στρώματος ενδεχομένως 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 ακόμη διευκρινιστεί πλήρως.⁵

5.2. Πολυμορφοπύρηνα

Τα πολυμορφοπύρηνα ασθενών με ΝΠΑ εμφανίζουν την ίδια αυξημένη ευαισθησία, όπως και τα ερυθρά, στη λυτική δράση του ενεργοποιημένου συμπληρώματος παρουσία οξινισθέντος ορού ή παρουσία αντισωμάτων^{66,67} και την ίδια απουσία πρωτεϊνών που συνδέονται με την κυτταρική μεμβράνη μέσω GPI^{68,69} (πίν. 1), όπως ο υποδοχέας FcγIII ή CD16,⁷⁰ το CD55,^{71,72} το CD59⁵⁵ κ.ά. Ως αποτέλεσμα αυτής της διαταραχής εμφανίζεται μείωση της χημειοταξίας και της φαγοκυττάρωσης των πολυμορφοπυρήνων παρουσία του ενεργοποιημένου συμπληρώματος.⁷³ Τα παραπάνω μπορούν να εξηγήσουν την ευαισθησία των ασθενών με ΝΠΑ στις λοιμώξεις, ενώ δεν εμφανίζουν ουδετεροπενία.⁷ Αυτή η παθολογική ευθραυστότητα των πολυμορφοπυρήνων στο συμπλήρωμα εμφανίζεται σε ένα ποσοστό των κυττάρων που κυμαίνεται από 6–90%.⁶⁷

Η ουδετεροπενία δεν φαίνεται να έχει σχέση με τη λύση των πολυμορφοπυρήνων από το ενεργοποιημένο συμπλήρωμα. Ο χρόνος επιβίωσης των πολυμορφοπυρήνων είναι φυσιολογικός, ενώ η ουδετεροπενία μάλλον οφείλεται σε ανεπάρκεια παραγωγής λόγω υποπλασίας ή και σε υπερβολική αύξηση της περιθωριακής δεξαμενής των πολυμορφοπυρήνων⁷⁴ και μη αποδοτική κοκκιοποίηση.⁶⁷

5.3. 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, καθώς και όλων των GPI πρωτεϊνών, είναι σημαντικά μειωμένα στα B-, στα T-λεμφοκύτταρα⁷⁵ και στα κύτταρα φυσικούς φονείς (NK).⁷⁶ B-, T-λεμφοκύτταρα και NK-κύτταρα με έλλειψη των GPI-πρωτεϊνών ανιχνεύονται σε υψηλά ποσοστά στη ΝΠΑ (88%, 84% και 89%, αντίστοιχα).⁷⁷ Μια τέτοια πρωτεΐνη είναι το LFA-3 (lymphocyte function antigen-3) ή CD58, το οποίο παίζει σημαντικό ρόλο στη διακυτταρική επικοινωνία⁷⁸ και απουσιάζει ή είναι σημαντικά μειωμένο στα T-λεμφοκύτταρα.⁷⁹ Η σύνδεση του CD58 και του MIRL ή CD59, που απουσιάζει επίσης από τα λεμφοκύτταρα

των ασθενών με ΝΠΑ, με το CD2 επαυξάνει το βαθμό ενεργοποίησης των Τ-λεμφοκυττάρων.⁸⁰

Αριθμητικές διαταραχές εμφανίζουν επίσης και οι υποπληθυσμοί των λεμφοκυττάρων των ασθενών με ΝΠΑ. Επιπλέον, μείωση παρατηρείται τόσο στον απόλυτο αριθμό των ΝΚ-κυττάρων όσο και στη λειτουργία τους, ενώ επίσης σημαντική είναι η ελάττωση του απόλυτου αριθμού των Β-λεμφοκυττάρων.⁷⁷ Οι παραπάνω παρατηρήσεις, οι οποίες δείχνουν την ύπαρξη λειτουργικών και ποσοτικών διαταραχών των λεμφοκυττάρων, σε συνδυασμό με τις αντίστοιχες των πολυμορφοπυρήνων, εξηγούν τον αυξημένο αριθμό λοιμώξεων που παρατηρείται στη ΝΠΑ.

5.4. Αιμοπετάλια

Τα αιμοπετάλια ασθενών με ΝΠΑ λύνονται *in vitro* 10–30 φορές περισσότερο σε σχέση με τα φυσιολογικά παρουσία οξινισθέντος ορού, σε περιβάλλον χαμηλής ιοντικής ισχύος ή παρουσία αντιαιμοπεταλιακών αντισωμάτων.⁸¹ Όπως συμβαίνει και με τα ερυθρά, καθλώνεται μεγαλύτερη συγκέντρωση συμπληρώματος σε σχέση με τα αιμοπετάλια ενός φυσιολογικού ατόμου.⁷⁴ Τέλος, η δράση ενός αντισώματος παρουσία συμπληρώματος ή η ενεργοποίηση του C3 του ορού σε όξινο pH (σε οξινισθέντα ορό) προκαλεί απελευθέρωση σεροτονίνης και προθρομβοπλαστικών παραγόντων.⁷⁴ Η απελευθέρωση αυτών των προπηκτικών παραγόντων, τόσο από τα αιμοπετάλια όσο και από τα αιμολυόμενα ερυθρά,¹ αλλά και διαφόρων πρωτεασών από τα λευκά,⁸² ενοχοποιείται για την ανάπτυξη κυρίως φλεβικών θρομβώσεων στην πορεία της νόσου. Η εμφάνιση των θρομβώσεων ευοδώνεται από παράγοντες που μπορούν να κινητοποιήσουν το μηχανισμό της αιμόλυσης, όπως κατά την κύηση, τις χειρουργικές επεμβάσεις, μετά από μετάγγιση ή κατά τη διάρκεια κάποιας λοίμωξης.⁸³ Η απελευθέρωση όλων αυτών των προπηκτικών παραγόντων εκκλείει την εμφάνιση διάχυτης ενδαγγειακής πήξης.⁸⁴ Η ανάπτυξη των θρομβώσεων φαίνεται ότι οφείλεται σε διαταραχή της μεμβράνης των αιμοπεταλίων, που έχει ως αποτέλεσμα τη μείωση ή την 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), το CD59, το CD55^{5,47,85} κ.ά. (πίν. 1). Εντούτοις, η διαταραχή της μεμβράνης των αιμοπεταλίων δεν μπορεί να εξηγήσει την εμφανιζόμενη θρομβοπενία σε αυτούς τους ασθενείς, που φαίνεται ότι σχετίζεται περισσότερο με ανεπάρκεια παραγωγής λόγω της παρουσίας μη αποδοτικής θρομβοποίησης ή υποπλασίας των κυττάρων της μεγακαρυοκυτταρικής σειράς. Εδώ θα πρέπει να σημειωθεί ότι η επιβίωση των αιμοπεταλίων

στους ασθενείς με ΝΠΑ είναι φυσιολογική.⁸⁶ Αυτό μπορεί να εξηγηθεί εν μέρει από την παρουσία ανασταλτή του συμπληρώματος στα α-κοκκία των αιμοπεταλίων (παράγοντας Η), που προστατεύει τα αιμοπετάλια από τη λύση.

6. ΣΥΝΔΕΣΗ ΜΕΤΑΞΥ ΝΥΚΤΕΡΙΝΗΣ ΠΑΡΟΥΣΤΙΚΗΣ ΑΙΜΟΣΦΑΙΡΙΝΟΥΡΙΑΣ ΚΑΙ ΑΝΕΠΑΡΚΕΙΑΣ GPI ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ

Αν ο DAF ήταν η μόνη γνωστή πρωτεΐνη που ανεπαρκεί στη ΝΠΑ, θα ήταν λογικό να υποθέσει κάποιος ότι η ΝΠΑ οφείλεται σε μια ανωμαλία στο γονίδιο που τον κωδικοποιεί. Σχεδόν 40 χρόνια νωρίτερα, εντούτοις, έχει δειχθεί ότι τα ερυθρά της ΝΠΑ ανεπαρκούσαν στην ακετυλοχολινεστεράση (AChE).⁸⁷ Επιπλέον, παρατηρήσεις έδειξαν ότι η ανεπάρκεια των ερυθρών στην AChE δεν συμμετέχει στη μεγαλύτερη ευαισθησία τους στη λυτική δράση του συμπληρώματος. Αν και η συσχέτιση της ανεπάρκειας της AChE με την παθοφυσιολογική 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 στη 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.⁸⁸ Σχεδόν συγχρόνως βρέθηκε ότι και η AChE μπορεί να ενσωματώνεται αυτόματα στις κυτταρικές μεμβράνες. Στην περίπτωση της AChE, η ικανότητά της για ενσωμάτωση αποδόθηκε στην παρουσία μιας αλυσίδας GPI.^{89,90} Σύμφωνα με τα παραπάνω, η AChE αποτέλεσε μέλος της νέας περιγραφόμενης οικογένειας αμφιπαθητικών πρωτεϊνών της μεμβράνης, που έχουν ως κοινό σημείο τη σύνδεση με την επιφάνεια του κυττάρου, μέσω ενός μορίου GPI (GPI-anchored proteins).^{91,92} Οι «αγκυροβολημένες» με GPI πρωτεΐνες δεν εμφανίζουν την υδρόφοβη περιοχή σύνδεσης με τη 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 φωσφατιδυλοϊνσοσιτόλης που έρχεται σε επαφή με τη μεμβράνη.⁴⁷ Οι πρωτεΐνες αυτής της τάξης είναι πάντοτε ευαίσθητες στη διάσπαση από την ειδική φωσφολιπάση C της φωσφατιδυλοϊνσοσιτόλης (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 στην κατασκευή μεταξύ του DAF και της AChE έδειξε ότι ο DAF απελευθερώνεται από τα κύτταρα μετά από επεξεργασία τους με PIPLC.⁹³ Τα αποτελέσματα αυτών και άλλων παρόμοιων μελετών^{91,92,94} οδήγησαν στο συμπέρασμα ότι η ΝΠΑ είναι πιθανώς αποτέλεσμα μιας σωματικής μετάλλαξης που εδράζεται στο αρχέγονο αιμοποιητικό κύτταρο. Ως συνέπεια του βιοσυνθετικού ελλείμματος, οι συνδεδεμένες με GPI πρωτεΐνες ανεπαρκούν στη ΝΠΑ.^{213,47} 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 εμφανίζουν ανεπάρκεια στη ΝΠΑ. Οι πρωτεΐνες αυτές φαίνονται στον πίνακα 1, ενώ οι κυριότερες περιγράφονται παρακάτω.

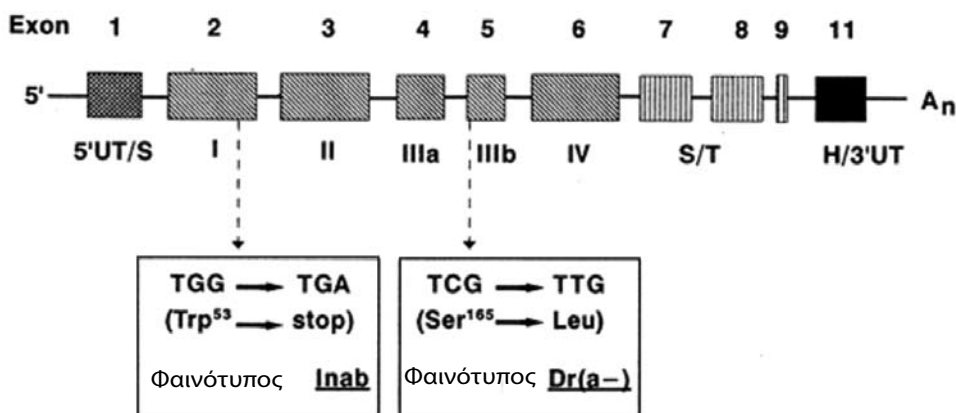
6.1. CD55-DAF (decay accelerating factor)

Το CD55 είναι μια γλυκοπρωτεΐνη συνδεδεμένη με GPI, που αποδομεί το σύμπλεγμα της «κονβεργάσης», τόσο της κλασικής (C4b2a) όσο και της εναλλακτικής (C3bBb) οδού του συμπληρώματος.⁹⁵ 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 ως αποτέλεσμα τη δημιουργία μιας πρωτεΐνης μοριακού βάρους 46 kDa λόγω της αφαίρεσης μιας N-γλυκάνης (μοριακό βάρος 3 kDa) και πολλών O-γλυκανών.

Η αλληλουχία του συμπληρωματικού DNA (cDNA) κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη από 381 αμινοξέα, περιλαμβάνοντας ένα οδηγό πεπτιδίο (signal peptide) από 34 βάσεις. Αρχίζοντας από το αμινοτελικό άκρο της ώριμης πρωτεΐνης, υπάρχουν 4 βραχείες «συναρτητικές» επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες (short consensus repeat, SCR) από 60 αμινοξέα, όπου η καθεμία 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 επειδή αφαιρείται μετά από τη μεταγραφή, όταν η πρωτεΐνη προσδέεται στην GPI.⁹⁶ Η απλή N-γλυκάνη εντοπίζεται μεταξύ των SCR1 και SCR2, ενώ οι πολυάριθμες O-γλυκάνες εντοπίζονται στα τμήματα που είναι πλούσια σε σερίνη και θρεονίνη, όπου σχηματίζουν μια ικανού μεγέθους κατασκευή, η οποία χρησιμεύει για την παρουσίαση των SCR περιοχών σε κάποια απόσταση από τη διπλοστιβάδα λιποειδών.⁹⁷ Η λειτουργία του CD55 φαίνεται να ρυθμίζεται κυρίως από το τρίτο SCR, αφού η παρεμπόδιση της λειτουργίας του γίνεται αποτελεσματικότερα με μονοκλωνικά αντισώματα που αναγνωρίζουν επίτοπους αυτής της περιοχής.⁹⁷ Επίσης, έχει περιγραφεί και ένα εναλλακτικό cDNA που κωδικοποιεί μια διαμεμβρανική πρωτεΐνη η οποία δεν συνδέεται με GPI.⁹⁸ 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 (εικ. 4).⁹⁹ Τα εξόνια 2–6 κωδικοποιούν τις τέσσερις SCR περιοχές. Το πρώτο, το δεύτερο και το τέταρτο SCR κωδικοποιούνται από εξόνια με ίδιο περίπου μέγεθος, ενώ το τρίτο SCR κωδικοποιείται από δύο διαφορετικού μεγέθους εξόνια. Το 1982, οι Daniels et al περιέγραψαν ένα σπάνιο φαινότυπο ομάδας αίματος (φαινότυπος Inab), όπου από τα ερυθρά ασθενούς απουσίαζαν όλα τα αντιγόνα του συστήματος ομάδων αίματος Cromer.¹⁰⁰ Στη συνέχεια, βρέθηκε ότι τα αντιγόνα Cromer υπάρχουν σε μια βαριά O-γλυκοζυλιωμένη πρωτεΐνη των ερυθρών με μοριακό βάρος 70 kDa, η οποία απουσίαζε από τα ερυθρά του φαινότυπου Inab.¹⁰¹ Δύο ερευνητικές ομάδες έδειξαν, ανεξάρτητα, ότι η γλυκοπρωτεΐνη που φέρει τα αντιγόνα Cromer, στην πραγματικότητα,



Εικόνα 4. Το γονίδιο του DAF (CD55).

ήταν το CD55 και έτσι ερυθρά με φαινότυπο Inab είχαν ανεπάρκεια του CD55.¹⁰² Η ανάλυση της αλληλουχίας του cDNA και του γονιδίου του Inab έδειξε 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 τη μεμβράνη αυτού του ασθενούς.¹⁰³

Ένας άλλος σπάνιος φαινότυπος των ερυθρών, ο Dr(a-), περιγράφηκε, όπου απουσιάζει από τα ερυθρά το κοινό αντιγόνο Dr^a της ομάδας Cromer, ενώ υπάρχει και σημαντικά μειωμένη έκφραση των άλλων αντιγόνων του συστήματος ομάδων αίματος Cromer.¹⁰⁴ Επιπλέον, μελέτες της γενετικής βάσης του ανωτέρω φαινότυπου έδειξαν ότι αυτό είναι αποτέλεσμα της αλλαγής μίας και μόνης βάσης στο εξόνιο 5 [Ser-165 (TCG) σε Leu (TTG)]. Η αλλαγή αυτή έχει ως 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 CD55.¹⁰³

Η απόδειξη ότι αυτοί οι σπάνιοι κληρονομικοί φαινότυποι είναι παραδείγματα της εκλεκτικής ανεπάρκειας του CD55 παρέχουν τη δυνατότητα διευκρίνισης 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.⁹⁶ Εντούτοις, τα άτομα με φαινότυπους Inab ή Dr(a-) δεν εμφανίζουν αιμολυτική αναιμία, παρά το γεγονός της κατά 20 φορές περίπου μεγαλύτερης εναπόθεσης C3 στα Inab ερυθρά, στη δοκιμασία του οξινισθέντος ορού, σε σχέση με τα φυσιολογικά ερυθρά.¹⁰⁴ Τα αποτελέσματα αυτά δείχνουν σαφώς ότι η απουσία του CD55 δεν είναι ο μόνος υπεύθυνος παράγοντας 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 έλλειψή 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.^{105,106}

6.2. 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.¹⁰⁷ 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 στη ΝΠΑ.

Το CD59 είναι μια γλυκοπρωτεΐνη μοριακού βάρους 18–20 kDa, που συνδέεται με την κυτταρική μεμβράνη μέσω ενός μορίου GPI.⁵¹ 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.¹⁰⁸ Η αλληλουχία του cDNA δείχνει δύο δυνητικές θέσεις N-γλυκοζυλίωσης (ASN8, ASN18) στην ώριμη γλυκοπρωτεΐνη, αλλά ενεργά γλυκοζυλιωμένη είναι μόνο η ASN18.^{108,109} Η επεξεργασία με N-γλυκανάση μειώνει το μοριακό βάρος σε 14 kDa. Η πρωτεΐνη είναι πλούσια σε κυστεΐνη και η διαμόρφωσή της καθορίζεται από στέρεους δισουλφιδικούς δεσμούς.¹¹⁰ Το γονίδιο για το CD59 βρίσκεται στο χρωμόσωμα 11 (11p13;14).¹¹¹

Το CD59 λειτουργεί μέσω σύνδεσής του με το C8 κλάσμα του συμπληρώματος και έτσι προλαμβάνεται η ένωση του C9 με το C5b-8 σύμπλεγμα και κατά συνέπεια εμποδίζεται η είσοδος του C9 στη μεμβράνη και η επακόλουθη λύση του κυττάρου.^{112,113} 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) (εικ. 1). Η σημασία της ανεπάρκειας του CD59 στη λειτουργική βλάβη στη ΝΠΑ έχει φανεί από την ανεύρεση ενός λάπωνα με κληρονομική ανεπάρκεια του CD59.¹¹⁴ Ο ασθενής αυτός παρουσίαζε πλήρη ανεπάρκεια του CD59 τόσο από τα ερυθρά όσο και από τα πολυμορφοπύρρηνα (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 πολυμορφοπύρρηνα (30–50% του φυσιολογικού). Ο ασθενής είχε ιστορικό αιμολυτικών επεισοδίων με αιμοσφαιρινουρία και θετική δοκιμασία οξινισθέντος ορού. Η αναστολή της λειτουργικότητας του CD59 με μονοκλωνικά αντισώματα έχει ως αποτέλεσμα την αυξημένη ευαισθησία των φυσιολογικών ερυθρών αιμοσφαιρίων στη λυτική δράση του συμπληρώματος, φαινόμενο όμοιο με αυτό που συμβαίνει

στη ΝΠΑ.^{114,115}

Η απουσία του CD59 και από την επιφάνεια των αιμοπεταλίων ίσως παίζει σημαντικό ρόλο και στην εμφανιζόμενη υπερπηκτικότητα στους ασθενείς με ΝΠΑ.¹¹⁶ Τέλος, το CD59 φαίνεται ότι συμμετέχει στην επικοινωνία μεταξύ των κυττάρων¹⁰⁸ και συνδέεται με το CD2 των Τ-λεμφοκυττάρων, με αποτέλεσμα την ενεργοποίησή τους.⁵⁰

6.3. Ακετυλοχολινεστεράση (AChE)

Η ακετυλοχολινεστεράση είναι ένα πολύ καλά χαρακτηρισμένο ένζυμο, που παίζει ένα ρόλο-κλειδί στη χολινεργική νευρομεταβίβαση.¹¹⁷ Η λειτουργία του ενζύμου στα ερυθρά και στα άλλα κύτταρα του αίματος είναι άγνωστη. Η AChE παρουσιάζει διαφορετικούς τύπους, ως αποτέλεσμα μετα-μεταγραφικών τροποποιήσεων του προϊόντος ενός απλού γονιδίου που βρίσκεται στο χρωμόσωμα 7 (7q22).¹¹⁸ Στα ερυθρά, το ένζυμο συμπεριλαμβάνει ένα ομοδιμερές δισουλφιδικού δεσμού (μοριακό βάρος 72 kDa), που προσδένεται με τη μεμβράνη μέσω της «άγκυρας» GPI. Ήταν γνωστό από παλιά ότι η AChE ανεπαρκεί στα ερυθρά της ΝΠΑ, αλλά η λειτουργική σημασία αυτής της ανεπάρκειας παραμένει ασαφής.

Δείχθηκε πρόσφατα ότι τα αντιγόνα για το σύστημα ομάδων αίματος YT (Yt^a, Yt^b) παριστούν έναν πολυμορφισμό της AChE¹¹⁹ και ότι αυτός ο πολυμορφισμός είναι αποτέλεσμα αλλαγής μιας απλής βάσης στην οποία η ιστιδίνη 322 (CAC), που ορίζει το Yt^a αντιγόνο, αντικαθίσταται από ασπαραγινάση (AAC) όταν εκφράζεται το Yt^b. Σε αναλογία με την κρυσταλλική κατασκευή της AChE, αναφέρθηκε από τους Sussman et al ότι ο πολυμορφισμός πρέπει να εντοπίζεται στην επιφάνεια μιας υποομάδας της που σχετίζεται με το ρόλο της AChE στον καθορισμό αντιγόνων ομάδων αίματος.¹²⁰

Η εντόπιση του γονιδίου της AChE στο χρωμόσωμα 7q22 είναι πολύ ενδιαφέρουσα, αφού οι ανωμαλίες στο χρωμόσωμα 7 ανευρίσκονται συχνά σε ασθενείς με οξεία μη λεμφοβλαστική λευχαιμία και μυελοδυσπλαστικά σύνδρομα (συχνότερα ρήξη χρωμοσωμάτων στο 7q22).¹²¹ Οι διαταραχές αυτές συχνά συνοδεύουν την έκθεση σε χημειοθεραπεία, ακτινοβολία και τοξικά χημικά προϊόντα, ενώ οι αλλαγές στο γονίδιο της AChE έχουν συνδεθεί με παθολογική μεγακαρυοποίηση.¹²² Αυξημένη δραστηριότητα της AChE των ερυθρών βρέθηκε σταθερά στα μυελοδυσπλαστικά σύνδρομα. Οι χολινεργικοί παράγοντες είναι πιθανοί εκκινητές της σύνθεσης DNA σε αιμοποιητικά προγονικά κύτταρα ποντικού¹²³ και μπορεί να ευθύνονται για την παθολογική ανάπτυξη των προγονικών μορφών των μεγακαρυοκυττάρων σε ποντίκια. Έτσι, φαίνεται

ότι η AChE έχει κάποιον πιθανό ρόλο στη φυσιολογική αιμοποίηση. Είναι γνωστό ότι οι ασθενείς με ΝΠΑ συχνά εμφανίζουν θρομβοπενία και ουδετεροπενία, ενώ μικρός αριθμός από αυτούς μπορεί να εξελιχθεί σε οξεία λευχαιμία. Η θρομβοπενία δεν είναι αποτέλεσμα της αυξημένης καταστροφής αιμοπεταλίων, αφού ο χρόνος ημίσειας ζωής των αιμοπεταλίων των ασθενών είναι φυσιολογικός, και φαίνεται να έχει σχέση με την ανεπαρκή αιμοποίηση.⁵⁵ 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 ανεπάρκειά της. Υπάρχουν ορισμένες αναφορές μερικής ανεπάρκειας της AChE, αλλά σε καμιά από αυτές τις περιπτώσεις δεν υπάρχει σαφής συσχέτιση με τη δυσλειτουργία των ερυθρών. Ο φαινότυπος Yt(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 σοβαρές λειτουργικές συνέπειες.¹²⁴

6.4. CD58 (lymphocyte function associated antigen 3, LFA-3)

Το CD58 είναι μια καλά χαρακτηρισμένη γλυκοπρωτεΐνη της μεμβράνης με μοριακό βάρος 55–70 kDa. Παρουσιάζεται υπό δύο μορφές, μια που συνδέεται με τη μεμβράνη μέσω της GPI και μια άλλη που αποτελεί διαμεμβρανικό πολυπεπτίδιο με μια κυτταροπλασματική περιοχή. Ο τύπος της συνδεδεμένης με GPI μορφής είναι ο τύπος που επικρατεί στα ερυθρά.¹²⁵ Μετά από επώαση με ενδογλυκοσιδάση F, η συνδεδεμένη με GPI μορφή έχει μοριακό βάρος 25,5 kDa. Η αλληλουχία των αμινοξέων στο cDNA εμφανίζει πέντε δυνατές θέσεις για N-γλυκοζυλίωση. Το CD58 είναι μέλος της οικογένειας των ανοσοσφαιρινών¹²⁶ και αποτελεί ένα καλά χαρακτηρισμένο μόριο προσκόλλησης του κυττάρου, που δρα ως υποδοχέας για το CD2 των Τ-λεμφοκυττάρων στη διαδικασία ανοσιακής 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.⁷⁰ Η ανεπάρκεια του CD58 μπορεί, εν μέρει, να ευθύνεται για

την υπερπλασία του μυελού που εμφανίζεται συχνά στη ΝΠΑ.⁵⁵ Η αλληλεπίδραση μεταξύ του CD58 στα φυσιολογικά μονοκύτταρα και του CD2 στα λεμφοκύτταρα έχει ως αποτέλεσμα την παραγωγή λεμφοκίνης, ενώ αυτό δεν συμβαίνει στα μονοκύτταρα ασθενών με ΝΠΑ. Επιπλέον, έχει διατυπωθεί η υπόθεση ότι το CD58 στα T-λεμφοκύτταρα μπορεί να λαμβάνει μέρος στη διέγερση της αιμοποίησης, η οποία είναι πολλές φορές μειωμένη στη ΝΠΑ.

6.5. Άλλες GPI-συνδεδεμένες πρωτεΐνες που ανεπαρκούν στα ερυθρά της νυκτερινής παροξυντικής αιμοσφαιρινουρίας

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. Η πρωτεΐνη αυτή έχει μοριακό βάρος 65 kDa σε συνθήκες αναγωγής και 55 kDa σε αναχθείσα κατάσταση.¹²⁷ Αντισώματα κατά της C8 συνδεδεμένης πρωτεΐνης προκαλούν αυξημένη ευαισθησία των φυσιολογικών ερυθρών στη λύση. Η πρωτεΐνη αυτή δεν έχει ακόμη χαρακτηριστεί καλά και δεν έχει διευκρινιστεί η σημασία της απουσίας της από τα ερυθρά της ΝΠΑ.

Έχουν καθοριστεί και άλλες πρωτεΐνες που θεωρείται 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 Gy^a, Hy και JMΗ.¹²⁸ Στη συνέχεια, διαπιστώθηκε ότι τα αντιγόνα Gy και Hy φαίνεται να βρίσκονται στην ίδια πρωτεΐνη όπως και τα αντιγόνα Dombrock και έτσι εντοπίστηκαν δύο νέες πρωτεΐνες άγνωστης λειτουργίας, η πρωτεΐνη Dombrock και η πρωτεΐνη JMΗ (John Milton Hagen antigen). Πειράματα με ανθρώπινο αντι-Gy^a και αντι-Hy έδειξαν ότι αντιδρούν με μια γλυκοπρωτεΐνη μοριακού βάρους 46–58 kDa κάτω από συνθήκες αναγωγής. Τα αντισώματα δεν αντιδρούν με φυσιολογικά ερυθρά μετά από επεξεργασία με θρυψίνη ή χυμοθρυψίνη ή υπό συνθήκες αναγωγής. Επεξεργασία των ερυθρών με ενδογλυκοσιδάση F μείωσε το μοριακό βάρος της πρωτεΐνης σε 11 kDa, δείχνοντας την παρουσία μίας ή περισσοτέρων N-γλυκανών. Σε αυτή την πρωτεΐνη βρίσκεται και ένα άλλο κοινό αντιγόνο των ερυθρών, το Jo^a.¹²⁹ Πρόσφατα, έχει βρεθεί ότι τα αντιγόνα Dombrock (Do^a, Do^b) δεσμεύονται στην ίδια πρωτεΐνη.¹³⁰ Η ένδειξη αυτή βασίζεται στην ανεπάρκεια των Gy^a αρνητικών κυττάρων να αντιδρούν με αντι-Do^a και αντι-Do^b και στην παρατήρηση ότι Do^a ενεργός πρωτεΐνη αντιδρά με

αντι-Gy^a. Πειράματα με ανθρώπινα μονοκλωνικά αντι-JMΗ έδειξαν ότι το αντιγόνο φέρεται επάνω σε μια συνδεδεμένη με GPI πρωτεΐνη με μοριακό βάρος 76 kDa.¹³¹ Τέλος, άλλες GPI-πρωτεΐνες φαίνονται στον πίνακα 1.

7. ΚΑΘΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΒΙΟΧΗΜΙΚΗΣ ΒΛΑΒΗΣ ΣΤΗ ΝΥΚΤΕΡΙΝΗ ΠΑΡΟΞΥΝΤΙΚΗ ΑΙΜΟΣΦΑΙΡΙΝΟΥΡΙΑ

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

Η GPI-άγκυρα αποτελείται από τρία τμήματα, όπως προαναφέρθηκε⁴⁷ (εικ. 2):

- Ένα μόριο φωσφατιδυλοϊνοσιτόλης (PI), στο οποίο μπορεί να προσδέεται ένα μόριο λιπαρού οξέος
- Έναν πυρήνα γλυκάνης, που αποτελείται από ένα μόριο N-γλυκοζαμίνης και μια αλυσίδα από τρία μόρια μαννόζης
- Ένα μόριο φωσφοαιθανολαμίνης (PEA), που προστίθεται στην τελική μαννόζη. Η πρωτεΐνη που θα συνδεθεί με την GPI ενώνεται με την 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.¹³²

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 (εικ. 3). Σε 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.¹³³ Έτσι, σχηματίζεται μια N-ακετυλο-γλυκοζαμινυλ-φωσφατιδυλοϊνοσιτόλη. 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.¹³⁴ Η προσθήκη της PEA στην τρίτη μαννόζη

ολοκληρώνει τη βιοσύνθεση της GPI. Η πρωτεΐνη που θα συνδεθεί με την GPI, μετά από τη σύνθεσή της μέσα στο ενδοπλασματικό δίκτυο και ενώ παραμένει μέσα σ' αυτό, με τη βοήθεια μιας τρανσαμιδάσης ενώνεται στην ΡΕΑ της GPI με το καρβοξυτελικό της άκρο, στην επονομαζόμενη θέση ω, που χαρακτηρίζεται από συγκεκριμένη αλληλουχία αμινοξέων. 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.^{135,136}

Αρκετοί ερευνητές προσπάθησαν να καθορίσουν τη βλάβη στη βιοσυνθετική οδό της GPI που παρουσιάζεται στη ΝΠΑ. Χρησιμοποιώντας μελέτες με μεταβολική σήμανση, οι Mahoney et al και Hirose et al παρατήρησαν ότι τα πολυμορφοπύρηνια της ΝΠΑ ανεπαρκούν να συνθέσουν ένα πλήρες μόριο GPI.⁹⁴ Οι Schubert et al, χρησιμοποιώντας T και NK κυτταρικές σειρές από 5 ασθενείς με ΝΠΑ, οδηγήθηκαν στο συμπέρασμα ότι η βλάβη εντοπίζεται σε ένα πρώιμο βήμα της βιοσυνθετικής οδού της GPI.¹³⁷ Πιο ευαίσθητες αναλυτικές τεχνικές έδειξαν ότι T κυτταρικές σειρές από 5 ασθενείς με ΝΠΑ παρουσίαζαν την ίδια ανεπάρκεια για τη σύνθεση του πρώτου ενδιάμεσου προϊόντος της βιοσυνθετικής οδού της GPI.¹³⁸ Όμοιες παρατηρήσεις έγιναν χρησιμοποιώντας Β-λεμφοκύτταρα από ασθενείς με ΝΠΑ, μετά από μεταμόρφωση με EBV. Στη ΝΠΑ, η βλάβη για τη σύνθεση της GPI-άγκυρας βρίσκεται στη μεταφορά του GlcNAc στην PI για το σχηματισμό PI-GlcNAc.^{139,140} Μεγάλο ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι σε αυτή τη μεταφορά εμπλέκονται τα πρωτεϊνικά προϊόντα τουλάχιστον τριών γονιδίων, ενώ οι κυτταρικές σειρές Α, C και Η λεμφοκυττάρων ποντικού ανεπαρκούν να την ολοκληρώσουν. Τα κύτταρα της ΝΠΑ φαίνεται να έχουν το ίδιο έλλειμμα με μία από αυτές τις τρεις συμπληρωματικές τάξεις. Αυτή η υπόθεση επιβεβαιώθηκε από το γεγονός ότι τόσο οι T όσο και οι Β κυτταρικές σειρές από 7 διαφορετικούς ασθενείς με ΝΠΑ ανεπαρκούσαν να συμπληρώσουν τις μεταλλάξεις της τάξης Α.¹³⁹ Άλλες μελέτες έδειξαν ότι σε όλες τις περιπτώσεις τα κύτταρα της ΝΠΑ δεν συμπλήρωναν τα κύτταρα της τάξης Α, ενώ συμπλήρωναν αυτά των άλλων κυτταρικών σειρών που δεν συνέθεταν την GPI, δείχνοντας ότι η βλάβη στη ΝΠΑ είναι πάντα η ίδια, όπως και στα κύτταρα της τάξης Α.¹⁴¹⁻¹⁴³

Η βιοσυνθετική οδός για το σχηματισμό της «άγκυρας» GPI είναι πολύπλοκη και, όπως καταδείχθηκε 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 Α) ήταν μη αναμενόμενη.

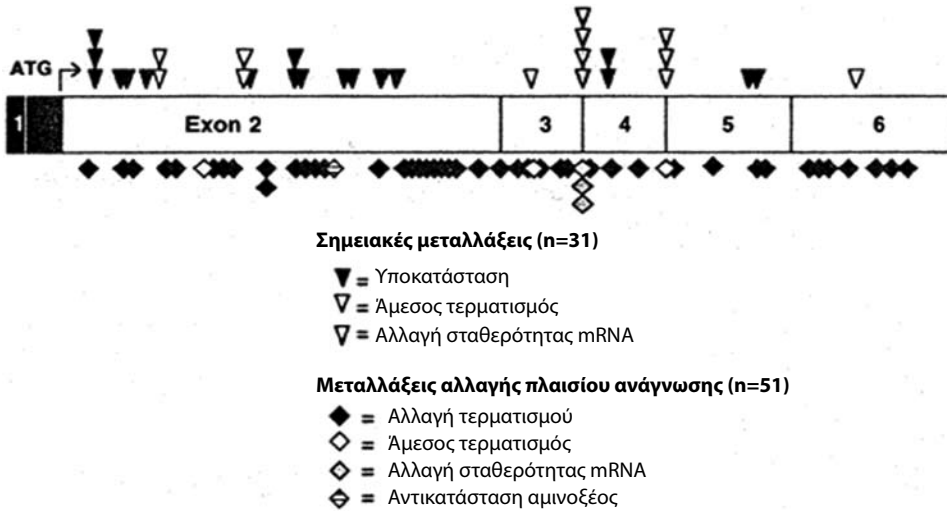
Όπως συζητείται παρακάτω, όμως, καθορίστηκε η εντόπιση του παθολογικού γονιδίου στα κύτταρα τάξης Α και έτσι έγινε εμφανής η μοριακή βλάβη της ΝΠΑ.

8. Η ΜΟΡΙΑΚΗ ΒΛΑΒΗ ΣΤΗ ΝΥΚΤΕΡΙΝΗ ΠΑΡΟΥΝΤΙΚΗ ΑΙΜΟΣΦΑΙΡΙΝΟΥΡΙΑ

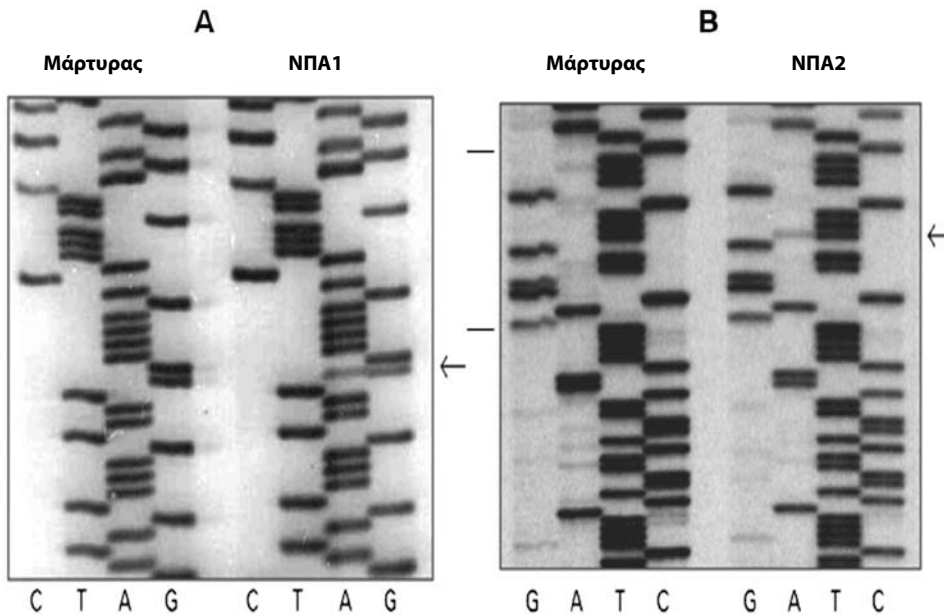
Το γονίδιο που ανεπαρκεί στα κύτταρα τάξης Α –και φυσικά στα κύτταρα ΝΠΑ– ταυτοποιήθηκε το 1993 και φέρεται σήμερα με την ονομασία PIG-A 1.¹⁴² Εντοπίζεται στο βραχύ σκέλος του χρωμοσώματος Χ (Χρ22.1) και αποτελείται από 6 εξόνια.^{142,144-146} Το πρώτο εξόνιο είναι πολύ μικρό και δεν μεταφράζεται. Το δεύτερο εξόνιο κωδικοποιεί περίπου το ήμισυ της ώριμης πρωτεΐνης και ακολουθείται από τρία μικρότερα εξόνια. Το τελευταίο εξόνιο κωδικοποιεί την υπόλοιπη πρωτεΐνη και φέρει επίσης μια μη μεταφραζόμενη αλληλουχία. Ταυτόχρονα, στον άνθρωπο έχει βρεθεί και ένα γονίδιο το οποίο δεν περιέχει ιντρόνια, που είναι κατά 91% ομόλογο με το λειτουργικό γονίδιο, το οποίο δεν μεταγράφεται και εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 12 (12p21).¹⁴⁴

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.⁴⁷ Το προϊόν του γονιδίου PIG-A είναι η πρωτεΐνη pig-A, με μοριακό βάρος 54 kDa, που περιέχει 484 αμινοξέα.¹⁴² Όπως αναφέρθηκε, η πρωτεΐνη αυτή απαιτείται για τη μεταφορά της GlcNAc στην PI προκειμένου να σχηματιστεί η PI-GlcNAc. Διάφορες μελέτες αναφέρουν ότι η πρωτεΐνη αυτή αποτελεί τμήμα ενός ενζυμικού συμπλέγματος α-1,6-N-ακετυλογλυκοζαμινυλ-PI τρανσφεράσης.^{144,147}

Όλοι οι ασθενείς με ΝΠΑ, οι οποίοι έχουν μελετηθεί μέχρι σήμερα, εμφανίζουν μεταλλάξεις στο γονίδιο PIG-A⁴⁷ (εικόνες 4, 5, 6). Μέχρι σήμερα, έχουν αναφερθεί >85 διαφορετικές μεταλλάξεις. Οι περισσότερες αφορούν σε μικρές ελλείψεις, μικρές προσθήκες ή ελλείψεις-προσθήκες που προκαλούν μεταφορά του πλαισίου ανάγνωσης και οδηγούν σε μια μη λειτουργική πρωτεΐνη pig-A (pig-Ao).^{2,47,145,148-154} Η προσθήκη ή η 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,^{143-145,151} μια ολική έλλειψη του PIG-A¹⁵² και δύο μικροί διπλασιασμοί.^{151,152} Πρόσφατα, δημοσιεύτηκε μια νέα μετάλλαξη σε έναν ασθενή με ΝΠΑ που υποτροπίασε 10 χρόνια μετά από



Εικόνα 5. Μεταλλάξεις του γονιδίου PIG-A στη νυκτερινή παροξυντική αιμοσφαιρινουρία.



Κύτταρα μυελού των οστών ασθενών με ΝΠΑ.

A. Αλληλουχία νουκλεοτιδίων του κλάσματος 2B με υποκατάσταση G→A στην 5' θέση (βέλος) του δεύτερου ιντρονίου.

B. Αλληλουχία νουκλεοτιδίων του κλάσματος 6A με υποκατάσταση T→A στη δεύτερη βάση του κωδικονίου Leu430 (βέλος).

Εικόνα 6. Μεταλλάξεις του γονιδίου PIG-A σε ασθενείς μας με νυκτερινή παροξυντική αιμοσφαιρινουρία (ΝΠΑ). (Από Franco de Carvalho et al. *Braz J Med Biol Res* 2001, 34: 763 τροποποιημένο).

αλλογενή μεταμόσχευση μυελού των οστών. Ο ασθενής πριν από τη μεταμόσχευση παρουσίαζε σημειακές μεταλλάξεις στα εξόνια 2 και 6. Η νέα μετάλλαξη αφορούσε στο εξόνιο 6 και ήταν μια προσθήκη-διπλασιασμός που είχε ως 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.¹⁵³

Περίπου το ένα τρίτο των μεταλλάξεων του PIG-A είναι σημειακές μεταλλάξεις. Μέχρι σήμερα, έχουν περιγραφεί τρεις τύποι τέτοιων μεταλλάξεων: (α) 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, (β) μεταλλάξεις που οδηγούν σε άμεσο κωδικόνιο τερματισμού (nonsense) και παρατηρούνται κυρίως στο εξόνιο 2¹⁵² και (γ) μεταλλάξεις που επηρεάζουν

το μέγεθος και τη σταθερότητα του mRNA (splice site mutations).⁴⁷ 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 μία από αυτές, C55 → T, που αλλάζει στο κωδικόνιο 19 την αργινίνη με τρυπτοφάνη, φαίνεται να παρουσιάζει πολυμορφισμό αφού δεν επηρεάζει τη λειτουργία του μορίου.¹⁵⁵

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.¹⁵⁶ Διάφορες μελέτες έχουν δείξει ότι σημαντικές περιοχές ρύθμισης του εκκινητή βρίσκονται στις θέσεις ~-97, ~-473 (CAAT) και -79 (CRE και AP-2). Μια από τις μεγαλύτερες ελλείψεις νουκλεοτιδίων περιλαμβάνει τόσο τον εκκινητή όσο και το εξόνιο 1 και τμήμα του ιντρονίου 1.¹⁵⁷

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 ασθενείς έχουν αναφερθεί περισσότερες από μία ανεξάρτητες μεταλλάξεις, γεγονός που δείχνει ότι στο ίδιο άτομο μπορεί να υπάρχουν περισσότεροι από ένας κλώνοι ΝΠΑ με ταυτόχρονη συνύπαρξη και φυσιολογικής αιμοποίησης.^{2,158} Το πλέον αρχέγονο κύτταρο στο οποίο έχει παρατηρηθεί έλλειψη των GPI-πρωτεϊνών είναι αυτό που εμφανίζει ανοσοφαινότυπο [CD34(+), CD38(-)].¹⁵⁹

Το γεγονός ότι το PIG-A βρίσκεται στο χρωμόσωμα X μπορεί να εξηγήσει το γιατί οι περισσότερες περιπτώσεις ΝΠΑ ανήκουν στη συμπληρωματική τάξη A. Αφού οι άνδρες έχουν μόνο ένα X χρωμόσωμα και οι γυναίκες είναι λειτουργικά απλοειδείς, το PIG-A μπορεί να αδρανοποιείται μόνο από μία μετάλλαξη. Όλα τα άλλα γονίδια που εμπλέκονται στη σύνθεση της «άγκυρας» GPI είναι αυτοσωματικά, και κατά συνέπεια οι λειτουργικά σημαντικές μεταλλάξεις 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.^{47,156}

Το γεγονός που οδηγεί στη μετάλλαξη του γονιδίου PIG-A δεν είναι μέχρι τώρα γνωστό. Δεν έχει αναφερθεί ότι κάποιος ασθενής εκτέθηκε σε ιονίζουσα ακτινοβολία ή χημειοθεραπεία¹⁶⁰ και δεν έχει ενοχοποιηθεί κάποιος χημικός παράγοντας, εκτός από τη χλωραμφαινικόλη, που προκάλεσε σε μερικούς ασθενείς απλαστική αναιμία, οι

οποίοι στη συνέχεια παρουσίασαν ΝΠΑ.¹⁶¹

Για να καθοριστεί αν οι διαταραχές στο γονίδιο PIG-A ευθύνονται για την ανεπάρκεια των κυττάρων της ΝΠΑ να εκφράσουν GPI-πρωτεΐνες, οι Takeda et al μετέφεραν PIG-A συμπληρωματικό DNA σε B κυτταρικές σειρές από 2 ασθενείς με ΝΠΑ, αρνητικές για GPI.¹⁴¹ Η ανάλυση με φθορισμό ενεργοποιημένων κυττάρων έδειξε ότι η μεταφορά αποκατέστησε την έκφραση των πρωτεϊνών GPI, υποδεικνύοντας ότι το έλλειμμα στις δύο σειρές της ΝΠΑ εντοπιζόταν στο PIG-A.

Αν η μετάλλαξη αδρανοποιεί πλήρως την πρωτεΐνη rig-A, τότε τα κύτταρα δεν 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).¹⁵⁸ Στην τελευταία περίπτωση, όπου 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 ανιχνευτούν σε μεγαλύτερα ποσοστά στην επιφάνεια του κυττάρου. Έτσι, σε πολυμορφοπύρνηνα με μερική έλλειψη GPI ο FcγIII υποδοχέας (CD16) εκφράζεται περισσότερο στην επιφάνεια του κυττάρου σε σχέση με τα CD55 ή CD59.¹⁶²

Ο καθορισμός της μοριακής βλάβης στη ΝΠΑ εξηγεί πλήρως το 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 >80% των κυκλοφορούντων ερυθρών αιμοσφαιρίων και πολυμορφοπυρήνων εμφανίζουν το φαινότυπο ΝΠΑ.^{149,163} 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.¹⁶⁴ Ωστόσο, όπως αναφέρθηκε, πολλές μελέτες οδήγησαν στο συμπέρασμα ότι δεν υπάρχει κάποιο ενδογενές πλεονέκτημα για την ανάπτυξη των αιμοποιητικών κυττάρων που φέρουν τη μετάλλαξη στο γονίδιο PIG-A.^{63,64,165} και πειράματα με καλλιέργειες μακράς διάρκειας CD34+ κυττάρων με φαινότυπο ΝΠΑ έδειξαν τις ίδιες μειωμένες ικανότητες για το σχηματισμό αποικιών με τα φυσιολογικά προγονικά κύτταρα από τον ίδιο ασθενή, υποθέτοντας ότι ενδεχομένως για την ανάπτυξη του κλώνου της ΝΠΑ απαιτείται ένας δεύτερος παράγοντας. Διάφορα κλινικά δεδομένα έχουν οδηγήσει στην υπόθεση

ότι αυτός είναι πιθανόν κάποιος παράγοντας που προκαλεί ή διατηρεί τη μυελική ανεπάρκεια και παραδόξως παρέχει πλεονέκτημα ανάπτυξης ή επιβίωσης του κλώνου της ΝΠΑ. Αυτό ενισχύεται σημαντικά και από το γεγονός ότι, όπως προαναφέρθηκε, αρκετοί ασθενείς εμφανίζουν περισσότερους από έναν κλώνους ΝΠΑ. Πιθανώς στη 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.¹⁶⁶ Η σχέση μεταξύ των δύο νοσημάτων είναι γνωστή από παλιά, αφού περίπου το 35% των ασθενών με απλαστική αναιμία εμφανίζουν κύτταρα με φαινότυπο ΝΠΑ.⁴ 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 στη 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) την ύπαρξη κάποιου παράγοντα που προκαλεί απλασία και τροποποιεί το μικροπεριβάλλον του μυελού, καταστέλλοντας τα GPI(+) κύτταρα σε μεγαλύτερο βαθμό από τα GPI(-). Στο περιβάλλον αυτό, τα GPI(-) 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).^{5,167} Ο απλαστικός αυτός παράγοντας ίσως είναι ενεργοποιημένα CD8+ T-λεμφοκύτταρα, που αναστέλλουν την *in vitro* ανάπτυξη των αποικιών των αιμοποιητικών κυττάρων, όπως συμβαίνει στην απλαστική αναιμία.¹⁶⁸ Ωστόσο, τα παραπάνω πρέπει να αποδειχθούν με πειράματα και μελέτες που θα διευκρινίσουν πλήρως την παθογένεια της νόσου.

9. Η ΑΠΟΠΤΩΣΗ ΣΤΗ ΝΥΚΤΕΡΙΝΗ ΠΑΡΟΞΥΝΤΙΚΗ ΑΙΜΟΣΦΑΙΡΙΝΟΥΡΙΑ

Τα τελευταία χρόνια, η μελέτη της απόπτωσης στη ΝΠΑ βοήθησε στην κατανόηση των παθογενετικών μηχανισμών της νόσου. Πρόσφατα, παρατηρήθηκε ότι τα κύτταρα της ΝΠΑ χαρακτηρίζονται από ελαττωμένη απόπτωση και ότι

η έκφραση των πρωτεϊνών GPI επηρεάζει το βαθμό της ανάπτυξής της.¹⁶⁹ Η διαπίστωση ότι η απόπτωση στη ΝΠΑ είναι ελαττωμένη επιβεβαιώθηκε και από άλλες μελέτες.¹⁴⁶ Ωστόσο, αν η έκφραση των πρωτεϊνών GPI είναι σημαντική για την ανάπτυξη της ανοχής 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(-) πολυμορφοπύρρηνα παρουσίαζαν τους ίδιους δείκτες απόπτωσης με ασθενείς που είχαν <40% GPI(-) πολυμορφοπύρρηνα.¹⁴⁶ Για να διερευνηθεί αν η λειτουργικότητα του γονιδίου PIG-A επηρέαζε την απόπτωση, οι ερευνητές εισήγαγαν το γονίδιο PIG-A στην GPI(-) JY5 κυτταρική σειρά και μελέτησαν την απόπτωση πριν και μετά από την εισαγωγή του γονιδίου. Βρέθηκε ότι δεν υπήρξε σημαντική διαφορά μεταξύ των δύο μελετών. Η παρατήρηση αυτή οδηγεί στο συμπέρασμα ότι οι μεταλλάξεις στο γονίδιο PIG-A και η επακολουθούσα μείωση της έκφρασης των GPI-πρωτεϊνών δεν ενέχονται στους μηχανισμούς απόπτωσης στη ΝΠΑ,¹⁴⁶ οι οποίοι πιθανόν επηρεάζονται από άλλους παράγοντες, όπως τα επίπεδα των διαφόρων κυτταροκινών και άλλων διαλυτών παραγόντων, η έκφραση μορίων της ομάδας bcl-2, ανώμαλες αλληλεπιδράσεις μεταξύ των κυττάρων του μικροπεριβάλλοντος του μυελού¹⁷⁰ ή άλλες αλλαγές στη γονιδιακή ή την πρωτεϊνική έκφραση.¹⁷¹

10. Η ΣΥΜΜΕΤΟΧΗ ΤΟΥ ΝΟ

Το ΝΟ είναι σημαντικός ρυθμιστής της φυσιολογίας των αγγείων και αρκετές από τις κλινικές εκδηλώσεις της ΝΠΑ μπορεί να εξηγηθούν από τη μείωσή του στους ιστούς.¹⁷² Φυσιολογικά στο ενδοθήλιο, το οξυγόνο και η αργινίνη αντιδρούν με τη ΝΟ-συνθετάση για την παραγωγή ΝΟ και κιτροουλίνης. Το παραγόμενο ΝΟ διατηρεί φυσιολογικό τον αγγειακό τόνο και περιορίζει την ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων. Η παρουσία ελεύθερης αιμοσφαιρίνης στο πλάσμα έχει σημαντική συγγένεια με το ΝΟ, με αποτέλεσμα έκπλυσή του. Στη ΝΠΑ, η έντονη αιμοσφαιριναιμία και η απελευθέρωση αργινάσης από τα ερυθρά μειώνει σημαντικά τόσο την αργινίνη (υπόστρωμα) όσο και το ΝΟ. Τα παραπάνω επιτείνονται, αφού λόγω της ενδαγγειακής αιμόλυσης μειώνονται οι αποσφαιρίνες και δεν δεσμεύεται η αιμοσφαιρίνη του πλάσματος. Η μείωση του ΝΟ από τους ιστούς εκδηλώνεται με αίσθημα κόπωσης, κοιλιακή άλγη, σπασμό οισοφάγου, διαταραχές της στύσης και πιθανότατα θρομβώσεις, που αποτελούν συχνές εκδηλώσεις των ασθενών με ΝΠΑ.¹⁷³

ABSTRACT

Pathogenetic and pathophysiological mechanisms of the paroxysmal nocturnal hemoglobinuria

J. MELETIS,¹ A. SARANTOPOULOS,¹ J.V. ASIMAKOPOULOS,¹ E. TERPOS²¹First Department of Internal Medicine, National and Kapodistrian University of Athens, School of Medicine, "Laiko" General Hospital, ²Department of Medical Research, 251 General Air Force Hospital, Athens, Greece*Archives of Hellenic Medicine* 2009, 26(2):206–229

Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria (PNH) is an acquired stem cell disorder characterized by the unique triad of intravascular hemolysis, bone marrow failure and thrombosis. The hallmark of PNH at the cellular level is a deficiency in cell surface glycosylphosphatidylinositol (GPI) anchored proteins, due to somatic mutations in an X-linked gene, termed PIG-A (phosphatidyl inositol glycan group A). The reduction or absence of GPI-anchor biosynthesis results in a deficiency or absence of all GPI-anchored proteins on the cell surface. CD55 and CD59 are GPI-anchored complement regulatory proteins. Their absence on PNH red cells is responsible for the complement-mediated intravascular hemolysis, which is one of the main characteristics of the disease. However, rare PIG-A mutations can be found in virtually all healthy control subjects, leading to speculation that the presence of PIG-A mutation alone does not induce the expansion of the affected cell. Thus PNH only develops in patients who have a predisposition to such an expansion, in whom there is either a positive selection of the PIG-A gene mutant cells or a negative selection against the non-mutated cells ("dual pathogenesis" theory of PNH development). This review aims to summarize all available data to-date for the pathogenetic mechanisms that lead to the development of PNH.

Key words: CD55, CD59, DAF, Decay accelerating factor, GPI anchor, Membrane inhibitor of reactive lysis, MIRL, Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria

Βιβλιογραφία

- DACIE JV, LEWIS SM. Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria: Clinical manifestations, hematology and nature of disease. *Ser Haematol* 1972, 5:3–23
- LUZZATTO L, BESSLER M. The dual pathogenesis of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Curr Opin Hematol* 1996, 3:101–110
- 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, 26:181–190
- BRODSKY RA. Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. In: Hoffman R, Benz EJ Jr, Shattil SJ, Furie B, Cohen HJ (eds) *Hematology: Basic principles and practice*. Elsevier, Philadelphia, 2005:419–427
- ROSSE WF. Hematopoiesis and the defect in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *J Clin Invest* 1997, 100:953–954
- HILLMEN P, LEWIS SM, BESSLER M, LUZZATTO L, DACIE JV. Natural history of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *N Engl J Med* 1995, 333:1253–1258
- VOSWINKLER P. *Der schwarze Urin*. Blackwell, Berlin, 1993:1–282
- JOHNSON RJ, HILLMAN P. Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria: Nature's gene therapy? *Mol Pathol* 2002, 55:145–252
- HIJMANS VAN DEN BERGH A. Ictere hemolytique avec crises hemoglobinuriques. *Rev Med* 1911, 31:63–68
- WILLIAMS WJ, BEUTLER E, ERSLEV AJ, RUNDLES RW. *Hematology*. 2nd ed. McGraw-Hill Book Co, New York, 1977:563
- DACIE JV. Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Pro R Soc Med* 1963, 56:587–596
- ONI SB, OSUNKOYA BO, LUZZATTO L. PNH evidence for monoclonal origin of abnormal red cells. *Blood* 1970, 36:145–152
- KINOSHITA T, INOUE N. Dissecting and manipulation the pathway for glycosylphosphatidylinositol-anchor biosynthesis. *Curr Opin Chem Biol* 2006, 4:1233–1243
- YOUNG NS, ABKOWITZ JL, LUZZATTO L. New insights into the pathophysiology of acquired cytopenias. *Hematology* 2000, 1:18–38
- LUZZATTO L, JAJA K. Genetics of PNH. In: Young NS, Moss J (eds) *Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria and the GPI-linked proteins*. Academic Press, New York, 2000:21–47
- BRODSKY RA. Advances in the diagnosis and therapy of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood Rev* 2007, 22:65–74
- VARMA N, VARMA S, VOHRA H, MALIK K, GAREWAL G. Flow cytometric detection of PNH defect and response to therapy in aplastic anemia patients. *Methods Cell Sci* 2002, 24:77–78
- KAI T, SHICHISHIMAT, NOJI H, YAMAMOTO T, OKAMOTO M, IKEDA K ET AL. Phenotypes and phosphatidylinositol glycan-class A gene abnormalities during cell differentiation and maturation from precursor cells to mature granulocytes in patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood* 2002, 100:3812–3818
- ROTHER RP, ROLLINS SA, MENNONE J, CHODERA A, FIDEL SA, BESSLER M ET AL. Expression of recombinant transmembrane CD59 in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria B cells confers resist-

- ance to human complement. *Blood* 1994, 84:2604–2611
20. HOLGIUN MH, MARTIN CB, BERNSHAW NJ, PARKER CJ. Analysis of the effects of activation of the alternative pathway of complement on erythrocytes with an isolated deficiency of decay accelerating factor. *J Immunol* 1992, 148:498–502
 21. OKADA N, HARADA R, OKADA H. Erythrocytes of patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria acquire resistance to complement attack by purified 20-kd homologous restriction factor. *Clin Exp Immunol* 1990, 80:109–113
 22. HUGEL B, SOCIE G, VU T, TOTI F, GLUCKMAN E, FREYSSINET JM ET AL. Elevated levels of circulating procoagulant microparticles in patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria and aplastic anemia. *Blood* 1999, 93:3451–3456
 23. WIEDMERT T, HALL SE, ORTEL TL, KANEWS, ROSSE WF, SIMS PJ. Complement-induced vesiculation and exposure of membrane prothombinase sites in platelets of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood* 1993, 83:1192–1196
 24. MELETIS J, TERPOS E. Recent insights into pathophysiology of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Med Sci Monit* 2003, 9:161–172
 25. HALL C, RICHARDS S, HILLMAM R. Primary prophylaxis with warfarin prevents thrombosis in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood* 2003, 102:3587–3591
 26. ROTOLI B, LUZZATTO L. Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Semin Hematol* 1989, 26:201–207
 27. IWAMOTO N, KAWAGUCHI T, HORIKAWA K, NAGAKURA S, KAGIMOTO T, SUDAT ET AL. Preferential hematopoiesis by PNH clone engrafted in SCID mice. *Blood* 1996, 87:4944–4948
 28. MELETIS J, TERPOS E, SAMARKOS M, MELETIS C, APOSTOLIDOU E, KOMNINAKA V ET AL. Detection of CD55- and/or CD59-deficient red cell populations in patients with lymphoproliferative syndromes. *Hematol J* 2001, 2:33–37
 29. YOUNG NS, MACIEJEWSKI JP. Genetic and environmental effects in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria: Little PIG-A goes “why, why, why?”. *J Clin Invest* 2000, 106:637–641
 30. HILLMAN P, RICHARDS SJ. Implication of recent insights into pathophysiology of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Br J Haematol* 2000, 108:470–479
 31. NISHIMURA JJ, HIROTA T, KANAKURA Y, MACHII T, KAGEYAMA T, DOI S ET AL. Long-term support of hematopoiesis by a single stem cell clone in patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood* 2002, 99:2748–2751
 32. HORIKAWA K, NAKAKUMA H, KAWAGUCHI T, IWAMOTO N, NAGAKURA S, KAGIMOTO T ET AL. Apoptosis resistance of blood cells from patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria, aplastic anemia and myelodysplastic syndrome. *Blood* 1997, 90:2716–2722
 33. JARVA H, MERI S. Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria: The disease and a hypothesis for a new treatment. *Scand J Immunol* 1999, 49:119–125
 34. YACHNIN S, 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, 44:518–534
 35. YACHNIN S, RUTHENBERG JM. The initiation and enhancement of human red cells lysis by activation paroxysmal nocturnal hemoglobinuria (PNH). *Blood* 1976, 47:611–614
 36. ROUAULT TA, ROSSE WF, BELL S, SHELBURNE J. Difference in the terminal steps of complement lysis of normal and PNH red cells. *Blood* 1978, 51:325–330
 37. ROSSE WF, DACIE JV. Immune lysis of normal and PNH red cells to lysis by complement and specific antibody. The sensitivity of PNH red cells to lysis by complement and specific antibody. *J Clin Invest* 1966, 45:736–748
 38. ROSSE WF. The life span of complement sensitive and insensitive red cells in PNH. *Blood* 1971, 37:556–562
 39. NAJEAN Y, DRESCH C, ARDAILLOU N, BERNARD J. L'erythrocinetique dans l'hemoglobinurie nocturne paroxystique. *Nouv Rev Fr Hematol* 1966, 6:611–622
 40. MOORE JG, FRANK MM, MUELLER-EBERHARD HJ, YOUNG NC. Decay accelerating factor is present in PNH erythroid progenitors and lost during erythropoiesis *in vitro*. *J Exp Med* 1985, 162:1182–1192
 41. KINOSHITA T, MEDOF ME, SILBER R, NUSSENZWEIG V. Distribution of decay accelerating factor in the peripheral blood of normal individuals and patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *J Exp Med* 1985, 162:75–92
 42. ROSSE WF, LOGUE GL, ADAMS J, CROOKSTON JH. 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, 53:31–43
 43. PAVLIC GJ, BOURONCLE BA. Megaloblastic crisis in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *N Engl J Med* 1965, 273:789–792
 44. HARRIS IM, PRANKERD TA, WESTERMAN MF. Abnormality of phospholipids in red cells of patients with paroxysmal nocturnal haemoglobinuria. *Br Med J* 1974, 11:1276–1281
 45. De GRAMONT A. Hemoglobinurie paroxystique nocturne. Etude clinique et biologique de 142 patients. These Med, Paris, 1982
 46. GOMPERS ED, ZAIL SS, CHRISTENSEN D, METZ J. The effect of vitamin E on haemolysis in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria: *In vitro* and *in vivo* studies. *Scand J Hematol* 1975, 14:81–85
 47. ROSSE WF, WARE RE. The molecular basis of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood* 1995, 86:3277–3286
 48. NAKAKUMA H. Mechanism of intravascular hemolysis in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria (PNH). *Am J Hematol* 1996, 53:22–29
 49. KAWAKAMI Z, NINOMIYA H, TOMIYAMA J, ABE T. Deficiency of glycosyl-phosphatidylinositol anchored proteins on paroxysmal nocturnal hemoglobinuria (PNH) neutrophils and monocytes: Heterogeneous deficiency of decay accelerating factor (DAF) and CD16 on PNH neutrophils. *Br J Haematol* 1990, 74:508–513
 50. ROSSE WF, PARKER CJ. Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Clin Haematol* 1986, 14:105–112
 51. HOLGUIN MH, WILCOX LA, BERNSHAW NJ, ROSSE WF, PARKER CJ. The erythrocyte membrane inhibitor of reactive lysis: Effects of phosphatidylinositol specific phospholipase C on the isolated and cell-associated protein. *Blood* 1990, 75:284–289
 52. OKADA N, HARADA R, OKADA H. Erythrocytes of patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria acquire resistance to complement attack by purified 20 kd homologous restriction factor. *Clin Exp Immunol* 1990, 80:109–113
 53. ZALMAN LS, WOOD LM, FRANK MM, MULLER-EBERHARD HJ. Deficiency of the homologous restriction factor in paroxysmal

- nocturnal hemoglobinuria. *J Exp Med* 1987, 165:572–577
54. ROSSE WF. The glycolipid anchor of membrane surface proteins. *Semin Hematol* 1993, 30:219–231
 55. ROSSE WF. Phosphatidylinositol-linked proteins and paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood* 1990, 75:1595–1601
 56. SELVARAJ P, ROSSE WF, SILBER R, SPRINGER TA. The major Fc receptor in blood has a phosphatidylinositol anchor and is deficient in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Nature* 1988, 333:565–567
 57. TSENG JE, HALL SE, HOWARD TA, WARE RE. Phenotypic and functional analysis of lymphocytes in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Am J Hematol* 1995, 50:244–253
 58. KUNSTLING TR, ROSSE WF. Erythrocyte acetyl cholinesterase deficiency in PNH. A comparison of the complement sensitive and insensitive populations. *Blood* 1969, 33:607–616
 59. KINOSHITA T, INOUE N, TAKEDA J. Defective glycosyl phosphatidylinositol (GPI)-anchor synthesis and paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Adv Immunol* 1995, 60:57–103
 60. ROTOLI B, LUZZATTO L. Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Bailliere's Clin Hematol* 1989, 2:113–138
 61. SHICHISHIMA T, TERASAWA T, UCHIDA T, KARIYOINE S. Complement sensitivity of erythroblasts and erythroid precursors in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria (PNH). *Br J Haematol* 1989, 72:578–583
 62. OKUDA K, KANAMARU A, UEDA E, KITANI T, OKADA N, OKADA H 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, 18:1132–1136
 63. MACIEJEWSKI JP, SLOAND EM, SATO T, ANDERSON S, YOUNG NS. 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, 89:1173–1181
 64. KAWAGOE K, KITAMURA D, OKABE M, TANIUCHI I, IKAWA M, WATANABE T ET AL. Glycosyl phosphatidylinositol-anchor-deficient mice: Implications for clonal dominance of mutant cells in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood* 1996, 89:3600–3606
 65. ROSTIV, TREMML G, SOARES V, PANDOLFI PP, LUZZATTO L, BESSLER M. 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, 100:1028–1036
 66. BRUBAKER LH, ESSIG LJ, MENGEL CE. Neutrophil life span in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood* 1977, 50:657–662
 67. STERN M, ROSSE WF. Two populations of granulocytes in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood* 1979, 53:928–934
 68. PLESNERT, HANSEN NE, CARLSEN K. Estimation of PI-bound proteins on blood cells of PNH patients by quantitative flow cytometry. *Br J Haematol* 1990, 75:585–590
 69. VAN DER SCHOOT CE, HUIZINGA TW, VAN'T VEER-KORTHOFF ET, WITJMANS R, PINKSTER J, VON DEM BORNE AM. Deficiency of glycosyl-phosphatidylinositol-linked membrane glycoproteins of leucocytes in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria, description of a new diagnosis cytofluorometric assay. *Blood* 1990, 76:1853–1859
 70. SELVARAJ P, DUSTIN ML, SILBER R, LOW MG, SPRINGER TA. 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, 166:1011–1025
 71. NICHOLSON-WELLER A, MARCH JP, ROSENFELD SI, AUSTEN KF. Affected erythrocytes of patients with PNH are deficient in the complement regulatory protein decay accelerating factor. *Proc Natl Acad Sci USA* 1983, 80:5066–5070
 72. 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 hemoglobinuria. *N Engl J Med* 1985, 312:1091–1097
 73. DREYFUS B. Les anemies refractaires: Enzymopathies acquises multiples de la cellule souche hematopoietique. *Nouv Rev Fr Hematol* 1968, 8:763–768
 74. DIXON RH, ROSSE WF. Mechanism of complement mediated activation of human blood platelets *in vitro*. Comparison of normal and PNH platelets. *J Clin Invest* 1977, 59:360–368
 75. TOMIYAMA J, NINOMIYA H, ABET. Enhanced complement susceptibility and dysfunction of lymphocytes in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria (PNH). *Br J Haematol* 1990, 76:540–544
 76. SCHUBERT J, SCHMIDT RE, MEDOF ME. Regulation of glycosylphospholipid anchor assembly in human lymphocytes. Absent mannosyl synthesis in affected T and natural killer cell lines from paroxysmal nocturnal hemoglobinuria patients. *J Biol Chem* 1993, 268:6281–6287
 77. RICHARDS SJ, NORFOLK DR, SWIRSKY DM, HILLMEN P. Lymphocyte subset analysis and glycosylphosphatidylinositol phenotype in patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood* 1998, 92:1799–1806
 78. KRENSKY AM, SANCHEZ-MADRID F, ROBBINS E, NAGY JA, SPRINGER TA, BURAKOFF SJ. 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, 131:611–616
 79. KOYASU S, LAWTON T, NOVICK D, RECNY MA, SILICIANO RF, WALLNER BP 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, 87:2603–2607
 80. DECKERT M, KUBAR J, BERNARD A. CD58 and CD59 molecules exhibit potentializing effects in T-cell adhesion and activation. *J Immunol* 1992, 148:672–677
 81. DESSYPRIS EN, CLARK DA, MCKEE LC Jr, KRANTZ SB. Increased sensitivity to complement of erythroid and myeloid progenitors in PNH. *N Engl J Med* 1983, 309:690–693
 82. ZIMMERMAN D, BELL WR. Venous thrombosis and splenic rupture in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Am J Med* 1980, 68:275–279
 83. HARTMANN RC, KOLHOUSE JF. Viewpoints on the management of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Ser Haematol* 1972, 5:42–60
 84. STEINBERG D, CARVALHO AC, CHESNEY CM, COLMAN RW. Platelet hypersensitivity and intravascular coagulation in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Am J Med* 1975, 59:845–850
 85. 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, 79:131–137

86. COHEN P, GARDNER FH, BARNETT GO. Reclassification of the thrombocytopenias by the chrome 51 labelling method for measuring platelet life span. *N Engl J Med* 1961, 264:1294–1299
87. AUDITORE JV, HARTMANN RC. Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria II. Erythrocyte acetylcholinesterase defect. *Am J Med* 1959, 27:401–410
88. 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, 160:1558–1578
89. FUTERMAN AH, LOW MG, MICHAELSON DM, SILMAN I. Solubilization of membrane-bound acetylcholinesterase by a phosphatidylinositol-specific phospholipase C. *J Neurochem* 1985, 45:1487–1484
90. ROBERTS WL, ROSENBERRY TL. Identification of covalently attached fatty acids in the hydrophobic membrane-binding domain of human erythrocyte acetylcholinesterase. *Biochem Biophys Res Commun* 1985, 133:621–627
91. FERGUSON MA, WILLIAMS AF. Cell-surface anchoring of proteins via glycosylphosphatidylinositol structures. *Annu Rev Biochem* 1988, 57:285–320
92. LOW MG. Glycosyl-phosphatidylinositol: A versatile anchor for cell surface proteins. *FASEB J* 1989, 3:1600–1608
93. 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, 163:1150–1161
94. MAHONEY JF, URAKAZE M, HALL S, De GASPERI R, CHANG HM, SUGIYAMA E ET AL. Defective glycosylphosphoinositol anchor synthesis in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria granulocytes. *Blood* 1992, 79:1400–1403
95. KINOSHITA T, MEDOF ME, NUSSENZWEIG V. Endogenous association of decay accelerating factor (DAF) with C4b and C3b on cell membranes. *J Immunol* 1986, 136:3390–3395
96. LUBLIN DM, ATKINSON JP. Decay accelerating factor: Biochemistry, molecular biology and function. *Annu Rev Immunol* 1989, 7:35–58
97. COYNE K, HALL SE, THOMPSON ES, ARCE MA, KINOSHITA T, FUJITA T ET AL. Mapping of epitopes, glycosylation sites and complement regulatory domains in human decay accelerating factor. *J Immunol* 1992, 149:2906–2913
98. CARAS IW, DAVITZ MA, RHEE L, WEDDELL G, MARTIN DW Jr, NUSSENZWEIG V. Cloning of decay accelerating factor suggests a novel use of splicing to generate two proteins. *Nature* 1987, 325:545–549
99. POST TW, ARCE MA, LISZEWSKI MK, THOMSON ES, ATKINSON JP, LUBLIN DM. Structure of the gene for human complement protein decay accelerating factor. *J Immunol* 1990, 144:740–744
100. DANIELS GL, TOHYAMA H, UCHIKAWA M. A possible null phenotype in the Cromer blood group complex. *Transfusion* 1982, 22:362–363
101. SPRING FA, JUDSON PA, DANIELS GL, MALLINSON G, ANSTEE DJ. A human cell surface glycoprotein that carries Cromer-related blood group antigens on erythrocytes and is also expressed on leukocytes and platelets. *Immunology* 1987, 62:307–313
102. TELEN MJ, ROSSE WF, PARKER CJ, MOULDS MK, MOULDS JJ. Evidence that several high-frequency human blood group antigens reside on phosphatidylinositol-linked erythrocyte membrane proteins. *Blood* 1990, 75:1404–1407
103. LUBLIN DM, MALLINSON G, PODE J, REID ME, THOMPSON ES, FERDMAN BR ET AL. Molecular basis of reduced or absent expression of decay-accelerating factor in Cromer blood phenotypes. *Blood* 1994, 84:1276–1282
104. LEVENE C, HAREL N, LAVIE G, GREENBERG S, LAIRD-FRYER B, DANIELS GL. A new phenotype confirming a relationship between Cra and Tca. *Transfusion* 1984, 24:13–15
105. 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, 148:498–502
106. SUN X, FUNK CD, DENG C, SAHU A, LAMBRIS JD, SONG WC. Role of decay accelerating factor in regulating complement activation on the erythrocyte surface as revealed by gene targeting. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999, 96:628–633
107. LACHMANN PJ. The control of homologous lysis. *Immunol Today* 1991, 12:312–315
108. DAVIES A, SIMMONS DL, HALE G, HARRISON RA, TIGHE H, LACHMANN PJ ET AL. 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, 170:637–654
109. NINOMIYA H, STEWARD BH, ROLLINS SA, ZHAO J, ROTHWELL AL, SIMS PJ. Contribution of the N-linked carbohydrate of erythrocyte antigen CD59 to its complement-inhibitory activity. *J Biol Chem* 1992, 267:8404–8410
110. HADAM MR. Cluster report: CD59. In: Knapp W, Dorken B, Gilks WR et al (eds) *Leucocyte typing IV white cell differentiation antigens*. Oxford University Press, Oxford, 1989:720
111. FORSBERG 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, 30:188–193
112. MERI S, MORGAN BP, DAVIES A, DANIELS RH, OLAVESSEN MG, WALDMANN H ET AL. Human protectin (CD59), an 18,000–20,000 MW complement lysis restricting factor, inhibits C5b-8 catalyzed insertion of C9 into lipid bilayers. *Immunology* 1990, 71:1–9
113. ROLLINS SA, SIMS PJ. The complement-inhibitory activity of CD59 resides in its capacity to block incorporation of C9 into membrane C5b-9. *J Immunol* 1990, 144:3478–3483
114. YAMASHINA M, UEDA E, KINOSHITA T, TAKAMI T, OJIMA A, ONO H ET AL. Inherited complete deficiency of 20-kilodalton homologous restriction factor (CD59) as a cause of paroxysmal hemoglobinuria. *N Engl J Med* 1990, 323:1184–1189
115. HOLGUIN MH, WILCOX LA, BERNSHAW NJ, ROSSE WF, PARKER CJ. Relationship between the membrane inhibitor of reactive lysis and the erythrocyte phenotypes of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *J Clin Invest* 1989, 84:1387–1394
116. WIEDMER T, HALL SE, ORTEL TL, KANE WH, ROSSE WF, SIMS PG. Complement-induced vesiculation and exposure of membrane prothrombinase sites in platelets of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood* 1993, 82:1192–1196
117. MASSOULIE J, BON S. The molecular forms of cholinesterase and acetylcholinesterase in vertebrates. *Annu Rev Neuros-*

- ci 1985, 5:57–61
118. GETMAN DK, EUBANKS JH, CAMP S, EVANS GA, TAYLOR P. The human gene encoding acetylcholinesterase is located on the long arm of chromosome 7. *Am J Hum Genet* 1992, 51:170–177
 119. SPRING FA, GARDNER B, ANSTEE DJ. Evidence that the antigens of the Yt blood group system are located on human erythrocyte acetylcholinesterase. *Blood* 1992, 80:2136–2141
 120. SUSSMAN JL, HAREL M, FROLOW F, OEFNER C, GOLDMAN A, TOKER L ET AL. Atomic structure of acetylcholinesterase from *Torpedo californica*: A prototypic acetylcholine-binding protein. *Science* 1991, 253:872–879
 121. KERE J, RUUTU T, DAVIES KA, RONINSON IB, WATKINS PC, WINQVIST R ET AL. Chromosome 7 long arm deletion in myeloid disorders: A narrow breakpoint region in 7q22 defined by molecular mapping. *Blood* 1989, 73:230–234
 122. LAPIDOT-LIFSON Y, PRODY CA, GINZBERG D, MEYTES D, ZAKUT H, SOREQ H. Coamplification of human acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase genes in blood cells: Correlation with various leukemias and abnormal megakaryopoiesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989, 86:4715–4719
 123. BRYON JW. Drug receptors and the haemopoietic stem cell. *Nature New Biol* 1973, 241:152–154
 124. SHINOHARA K, TANAKA KR. Hereditary deficiency of erythrocyte acetylcholinesterase. *Am J Hematol* 1979, 7:313–321
 125. DUSTIN ML, SELVARAJ P, MATTALIANO RJ, SPRINGER TA. Anchoring mechanisms for LFA-3 adhesion glycoprotein at membrane surface. *Nature* 1987, 329:846–848
 126. WILLIAMS AF, BARCLAY AN. The immunoglobulin superfamily-domain for cell surface recognition. *Annu Rev Immunol* 1988, 6:381–405
 127. WATTS MJ, DANKERT JR, MORGAN BP. Isolation and characterization of a membrane-attack-complex-inhibiting protein present in human serum and other biological fluids. *Biochem J* 1990, 265:471–477
 128. TELEN MJ, HALL SE, GREEN AM, MOULTZ JJ, ROSSE WF. Identification of human erythrocyte blood group antigens on decay accelerating factor (DAF) and an erythrocyte phenotype negative for DAF. *J Exp Med* 1988, 167:1993–1998
 129. SPRING FA, REID ME. Evidence that human blood group antigens Gya and Hy are carried on a novel glycosylphosphatidylinositol-linked erythrocyte membrane glycoprotein. *Vox Sang* 1991, 60:53–59
 130. BANCS J, PARKER N, POOLE J. Evidence to show that Dombrock (Do) antigens reside on the Gya/Hy glycoprotein. *Transfus Med* 1992, 2(Suppl 1):68
 131. BOBOLIS K, MOULDS JJ, TELEN MJ. Isolation of the JMH antigen on a novel phosphatidylinositol-linked human membrane protein. *Blood* 1992, 79:1574–1581
 132. KAMITANI T, MENON AK, HALLAQ Y, WARREN CD, YEH ET. Complexity of ethanolamine phosphate addition in the biosynthesis of glycosylphosphatidylinositol anchors in mammalian cells. *J Biol Chem* 1992, 267:24611–24619
 133. SUGIYAMA E, De GASPERI R, URAKAZE M, CHANG HM, THOMAS LJ, HYMAN R ET AL. Identification of defects in glycosylphosphatidylinositol anchor biosynthesis in the Thy-1 expression mutants. *J Biol Chem* 1991, 266:12119–12122
 134. MENON AK, MAYOR S, SCHWARZ RT. Biosynthesis of glycosylphosphatidylinositol lipids in *Trypanosoma brucei*: Involvement of mannosyl-phosphoryldolichol as the mannose donor. *EMBO J* 1990, 9:4249–4258
 135. 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* 1991, 15:739–759
 136. URAKAZE M, KAMITANI T, De GASPERI R, SUGIYAMA E, CHANG HM, WARREN CD ET AL. Identification of a missing link in glycosyl phosphatidylinositol-anchor in mammalian cells. *J Biol Chem* 1992, 267:6459–6452
 137. SCHUBERT J, UCIECHOWSKI P, DELANY P, TISCHLER HJ, KOLANUS W, SCHMIDT RE. The PIG-anchoring defect in NK lymphocytes of PNH patients. *Blood* 1990, 76:1181–1187
 138. ARMSTRONG C, SCHUBERT J, UEDA E, KNEZ JJ, GELPERIN D, HIROSE S 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, 267:25347–25351
 139. TAKAHASHI M, TAKEDA J, HIROSE S, HYMAN R, INOUE N, MIYATA T ET AL. Deficient biosynthesis of N-acetylglucosaminylphosphatidylinositol, the first intermediate of glycosylphosphatidylinositol anchor biosynthesis, in cell lines established from patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *J Exp Med* 1993, 177:517–521
 140. TAKEDA J, MIYATA T, KAWAGOE K, IIDA Y, ENDO Y, FUGITA T ET AL. Deficiency of the GPI anchor caused by a somatic mutation of the PIG-A gene in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Cell* 1993, 73:703–711
 141. MIYATA T, YAMADA N, IIDA Y, NISHIMURA J, TAKEDA J, KITANI T ET AL. Abnormalities of PIG-A transcripts in granulocytes from patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *N Engl J Med* 1994, 330:249–255
 142. MIYATA T, TAKEDA J, IIDA Y, YAMADA N, INOUE N, TAKAHASHI M ET AL. The cloning of PIG-A, a component in the early step of GPI-anchor biosynthesis. *Science* 1993, 259:1318–1320
 143. BESSLER M, MASON PJ, HILLMEN P, MIYATA T, YAMADA N, TAKEIDA J ET AL. Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria (PNH) is caused by somatic mutations in the PIG-A gene. *EMBO J* 1994, 13:110–117
 144. BESSLER M, HILLMEN P, LONGO L, LUZZATTO L, MASON PJ. 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 Mol Genet* 1994, 3:751–757
 145. BESSLER M, MASON PJ, HILLMEN P, LUZZATTO L. Somatic mutations and cellular selection in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Lancet* 1994, 343:951–953
 146. WARE RE, NISHIMURA J, MOODY MA, SMITH C, ROSSE WF, HOWARD TA. The PIG-A mutation and absence of glycosyl phosphatidylinositol-linked proteins do not confer resistance to apoptosis in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood* 1998, 92:2541–2550
 147. WATANABE R, KINOSHITA T, MASAKI R, YAMAMOTO A, TAKEDA J, INOUE N. PIG-A and PIG-H, which participate in glycosylphosphatidylinositol anchor biosynthesis, form a protein complex in the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem* 1996,

- 271:26868–26875
148. WARE RE, ROSSE WF, HOWARD TA. Mutations within the PIG-A gene in patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood* 1994, 83:2418–2422
 149. WARE RE, ROSSE WF, HALL SE. Immunophenotypic analysis of reticulocytes in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood* 1995, 86:1586–1589
 150. WARE RE, HOWARD TA, KAMITANI T, CHANGE HM, YEH HT, SELDIN MF. Chromosomal assignment of genes involved in glycosylphosphatidylinositol anchor biosynthesis: Implications for the pathogenesis of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood* 1994, 83:3753–3757
 151. NAFA K, MASON P, HILLMEN P, LUZZATTO L, BESSLER M. Mutations in the PIG-A gene causing paroxysmal nocturnal hemoglobinuria (PNH) are mainly of the frame shift type. *Blood* 1995, 86:4650–4655
 152. NAFA K, BESSLER M, CASTRO-MALASPINA H, JHANVAR S, LUZZATTO L. 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, 24:370–384
 153. 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, 92:3422–3427
 154. NAFA K, BESSLER M, MASON P, VULLIAMY T, HILLMEN P, CASTRO-MALASPINA H ET AL. Factor V Leiden mutation investigated by amplification created restriction enzyme site (ACRES) in PNH patients with and without thrombosis. *Haematologica* 1996, 81:540–542
 155. 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, 23:566–574
 156. IIDA Y, TAKEDA J, MIYATA T, INOUE N, NISHIMURA J, KITANI T ET AL. Characterization of genomic PIG-A gene: A gene for GPI-anchor biosynthesis and paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood* 1994, 83:3126–3131
 157. ENDO M, WARE RE, VREEKE TM, SINGH SP, HOWARD TA, TOMITA A ET AL. Molecular basis of the heterogeneity of expression of glycosyl phosphatidylinositol anchored proteins in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood* 1996, 87:2546–2557
 158. TREMML G, KARADIMITRIS A, LUZZATTO L. Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria: Learning about PNH cells from patients and from mice. *Haema* 1998, 1:12–20
 159. TERSTAPPEN LW, NGUYEN M, HUANG S, LAZARUS HM, MEDOF ME. Defective and normal haematopoietic stem cells in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Br J Haematol* 1993, 84:504–514
 160. KYLER A. Second malignancies associated with chemotherapeutic agents. *Semin Oncol* 1982, 9:131–142
 161. QUAGLIANA JM, CARRTWRIGHT GE, WINTROBE MM. Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria following drug-induced aplastic anemia. *Ann Intern Med* 1964, 61:1045–1052
 162. EDBERG JC, SALMON JE, WHITLOW M, KIMBERLY RP. Preferential expression of human Fc gamma RIIPMN (CD16) in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. Discordant expression of glycosyl phosphatidylinositol-linked proteins. *J Clin Invest* 1991, 87:58–67
 163. HALL SE, ROSSE WF. The use of monoclonal antibodies and flow cytometry in the diagnosis of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood* 1996, 87:5335–5340
 164. IWAMOTO N, KAWAGUCHI T, HORIKAWA K, NAGAKURA S, KAGIMOTO T, SUDA T ET AL. Preferential hematopoiesis by paroxysmal nocturnal hemoglobinuria clone engrafted in SCID mice. *Blood* 1996, 87:4944–4948
 165. NISHIMURA T, KANAMARU A, KAKISHITA E, NAGAI K. Flow cytometric analysis of homologous restriction factor 20 kd (HRF 20) expression on progeny cells during differentiation from haemopoietic progenitors in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Br J Haematol* 1995, 90:293–299
 166. YOUNG NS, MACIEJEWSKI J. The pathophysiology of acquired aplastic anemia. *N Engl J Med* 1997, 336:1365–1372
 167. NISHIMURA J, SMITH CA, PHILLIPS KL, WARE RA, ROSSE WF. Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria: Molecular pathogenesis and molecular therapeutic approaches. *Hematopathol Mol Hematol* 1998, 11:119–146
 168. ZOUMBOS NC, GASCON P, DJEU JY, TROST SR, YOUNG NS. Circulating activated suppressor T lymphocytes in aplastic anemia. *N Engl J Med* 1985, 312:257–265
 169. BRODSKY RA, VALA MS, BARBER JP, MEDOF ME, JONES RJ. Resistance to apoptosis caused by PIG-A gene mutations in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997, 94:8756–8760
 170. GRIBBEN JG, FREEMAN GJ, BOUSSIOTIS VA, RENNERT P, JELLIS CN, GREENFIELD E ET AL. CTLA4 mediates antigen-specific apoptosis of human T cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995, 92:811–815
 171. HOMBURG CH, De HAAS M, VON DEM BORNE AE, VERHOEVEN AJ, REUTELINGSPERGER CP, ROOS D. Human neutrophils lose their surface FcγRIII and acquire annexin V binding sites during apoptosis *in vitro*. *Blood* 1995, 85:532–540
 172. ROTHER CD, BELL L, HILLMEN P, GLADWIN MT. The clinical sequelae of intravascular hemolysis and extravascular plasma hemoglobin: A novel mechanism of human disease. *JAMA* 2005, 293:1653–1662
 173. MOYOVM, MUKHINA GL, GARRETT ES, BRODSKY RA. Natural history of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria using modern diagnostic assays. *Br J Haematol* 2004, 126:133–138
- Corresponding author:*
- J. Meletis, National and Kapodistrian University of Athens, School of Medicine, First Department of Internal Medicine, Laiko General Hospital, Athens, Greece
e-mail: imeletis@cc.uoa.gr