

## ΑΝΑΣΚΟΠΗΣΗ REVIEW

# Παθοφυσιολογικοί μηχανισμοί και νεότερες εξελίξεις στην παθογένεση της μυελικής ανεπάρκειας στη νυκτερινή παροξυστική αιμοσφαιρινουρία

Η νυκτερινή παροξυστική αιμοσφαιρινουρία (ΝΠΑ) ή νόσος των Marchiafava-Micheli αποτελεί το πρώτο και ίσως μοναδικό παράδειγμα επίκτητης αυτοάνοσης αιμολυτικής αναιμίας με αρνητική αντίδραση Coombs λόγω διαταραχής της ερυθροκυτταρικής μεμβράνης, χωρίς να υπάρχει διαταραχή της μορφολογίας των ερυθρών. Η έλλειψη του CD55 και του CD59 από την επιφάνεια των ερυθρών αιμοσφαιρίων, ρυθμιστικών πρωτεϊνών του συμπληρώματος, τα οποία συνδέονται μέσω της «άγκυρας» της γλυκοσυλ-φωσφατιδύλ-ινουσιτόλης που απουσιάζει, ερμηνεύει άριστα τη χρόνια ενδαγγειακή αιμόλυση με τη συνοδό αιμοσιδηρινουρία της νόσου. Ακόμη πιο πρόσφατα δεδομένα αναδεικνύουν επίσης τη σημασία της απουσίας της εν λόγω «άγκυρας» –και των συνδεόμενων μέσω αυτής στην κυτταρική μεμβράνη πρωτεϊνών– στην εμφάνιση των χαρακτηριστικών θρομβοεμβολικών διαταραχών της νόσου. Ωστόσο, η ΝΠΑ συνίσταται ουσιαστικά σε μια σπάνια νόσο του πολυδύναμου αρχέγονου αιμοποιητικού κυττάρου, μια καλοήγη ολιγοκλωνική μυελοπάθεια όπου η διαταραχή της αιμοποίησης, καθολικά παρούσα σε ποικίλο βαθμό σε όλους τους ασθενείς, δεν μπορεί να ερμηνευτεί αποκλειστικά από το γενετικό έλλειμμα του γονιδίου *PIG-A* και κατ' επέκταση το βιοχημικό έλλειμμα της «άγκυρας» που κωδικοποιεί. Η παρούσα ανασκόπηση προσπαθεί να περιγράψει τους παθοφυσιολογικούς μηχανισμούς που εμπλέκονται στην παθογένεση της μυελικής ανεπάρκειας στη ΝΠΑ, όπως αυτοί αναφέρονται μέχρι σήμερα στη διεθνή βιβλιογραφία, καθώς και να αποτυπώσει, τελικά, ένα πιθανό παθογενετικό μοντέλο για την επικράτηση του παθολογικού κλώνου στην αιμοποίηση των ασθενών με ΝΠΑ.

ΑΡΧΕΙΑ ΕΛΛΗΝΙΚΗΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ 2015, 32(6):679–700  
ARCHIVES OF HELLENIC MEDICINE 2015, 32(6):679–700

Ι.Β. Ασημακόπουλος,<sup>1</sup>  
Ο. Καμπουροπούλου,<sup>2</sup>  
Λ. Παπαγεωργίου,<sup>1</sup>  
Μ. Σαμάρκος,<sup>2</sup>  
Ε. Βαριάμη,<sup>2</sup>  
Θ.Π. Βασιλακόπουλος,<sup>1</sup>  
Μ.Κ. Αγγελοπούλου,<sup>1</sup>  
Π. Τσαφταρίδης,<sup>1</sup>  
Ε. Πλατά,<sup>1</sup>  
Ε. Τέρπος,<sup>3</sup>  
Κ. Κωνσταντόπουλος,<sup>1</sup>  
Γ.Χ. Μελέτης<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Αιματολογική Κλινική και Μονάδα Μεταμόσχευσης Μυελού των Οστών, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Ιατρική Σχολή, Γενικό Νοσοκομείο Αθηνών «Λαϊκό», Αθήνα

<sup>2</sup>Α΄ Παθολογική Κλινική, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Ιατρική Σχολή, Γενικό Νοσοκομείο Αθηνών «Λαϊκό», Αθήνα

<sup>3</sup>Θεραπευτική Κλινική, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Ιατρική Σχολή, Γενικό Νοσοκομείο Αθηνών «Αλεξάνδρα», Αθήνα

The pathophysiological mechanisms of the pathogenesis of bone marrow failure in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria, and new insights

Abstract at the end of the article

### Λέξεις ευρητηρίου

Αιμολυτική αναιμία  
CD55  
CD59  
DAF  
GPI  
MIRL  
Μυελική ανεπάρκεια  
Νυκτερινή παροξυστική αιμοσφαιρινουρία

Υποβλήθηκε 2.4.2015  
Εγκρίθηκε 24.4.2015

## 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η νυκτερινή παροξυντική αιμοσφαινουρία (ΝΠΑ) ή αναιμία/νόσος των Marchiafava-Micheli αποτελεί μια σπάνια, επίκτητη, μη κακοήθη κλωνική διαταραχή του πολυδύναμου αρχέγονου αιμοποιητικού κυττάρου (multipotent hematopoietic stem cell, mHSC).<sup>1</sup> Η συντριπτική πλειοψηφία των περιπτώσεων ΝΠΑ είναι αποτέλεσμα μιας σωματικής μετάλλαξης του γονιδίου *PIG-A* (phosphatidylinositol glycan class A), που εδράζεται στο βραχύ σκέλος του χρωμοσώματος Χ (Χρ22.1), σε ένα mHSC. Έτσι, αποτελεί το μοναδικό γνωστό παράδειγμα επίκτητης γενετικής Χ-συνδεόμενης διαταραχής, η οποία χαρακτηρίζεται βιοχημικά από ανεπαρκή έκφραση ή πλήρη έλλειψη από τη μεμβράνη των κυττάρων του αιμοποιητικού όλων εκείνων των πρωτεϊνών που χρησιμοποιούν την «άγκυρα» GPI ως μηχανισμό πρόσδεσης στην κυτταρική μεμβράνη (GPI-anchored proteins, GPI-AP).<sup>1</sup> Η χαρακτηριστική κλινική τριάδα της χρόνιας ενδαγγειακής αιμόλυσης με αιμοσιδηρινουρία και παροξυσμικά επεισόδια αιμοσφαινουρίας, των θρομβοεμβολικών επεισοδίων και της ποικίλου βαθμού μυελικής ανεπάρκειας<sup>1</sup> την αναδεικνύουν σε ένα ξεχωριστό κλινικό σύνδρομο.

Αν και ορθά ταξινομείται ως η μοναδική μορφή αιμολυτικής αναιμίας που οφείλεται σε επίκτητη παθολογική διαταραχή της μεμβράνης του ερυθρού αιμοσφαιρίου,<sup>2</sup> ουσιαστικά πρόκειται για μια καλοήγη ολιγοκλωνική μυελοπάθεια.<sup>3</sup> Λόγω της ποικιλίας των συμπτωμάτων που παρατηρούνται τόσο κατά την αρχική εμφάνιση της νόσου όσο και την κλινική της πορεία, η ΝΠΑ θεωρείται ως ο «μεγάλος υποδύμενος» ανάμεσα στα διάφορα νοσήματα του αιμοποιητικού συστήματος. Επιπλέον, η νόσος μπορεί να

διαδράμει για αρκετά χρόνια χωρίς να έχει τεθεί η διάγνωση. Έτσι, η ανάπτυξη ευαίσθητων τεχνικών διάγνωσης της ΝΠΑ, όπως η κυτταρομετρία ροής υψηλής ευαισθησίας, επέτρεψε την ανίχνευση πολύ μικρών κλώνων ΝΠΑ (<1%),<sup>4</sup> οι οποίοι διαφορετικά δεν θα εντοπίζονταν. Μάλιστα, τα αποτελέσματα αυτής της δοκιμασίας, σε συνδυασμό με την ύπαρξη και το βαθμό της ενδαγγειακής αιμόλυσης, καθώς και τα ευρήματα από το μυελό των οστών, επιτρέπουν, σχηματικά, την ταξινόμηση της ΝΠΑ σε τρεις βασικές κλινικές μορφές (International PNH Interest Group): (α) Την «κλασική» ή «αιμολυτική» ΝΠΑ ή *de novo* ΝΠΑ, (β) τη «ΝΠΑ-σύνδρομο μυελικής ανεπάρκειας» και (γ) την «υποκλινική» ΝΠΑ<sup>4</sup> (πίν. 1). Αν και ο αδρός αυτός διαχωρισμός είναι σχηματικός, εφόσον η φυσική ιστορία της νόσου χαρακτηρίζεται από πολύ μεγαλύτερη κλινική ετερογένεια, ωστόσο αποδεικνύεται θεμελιώδης στην επιλογή της καταλληλότερης θεραπευτικής προσέγγισης<sup>5</sup> (αντι-C5 μονοκλωνικό αντίσωμα, ανοσοκατασταλτική αγωγή, μεταμόσχευση μυελού των οστών κ.ά.).

Συχνά, στο ίδιο άτομο απαντώνται περισσότεροι από ένας κλώνοι ΝΠΑ με διαφορετικές μεταλλάξεις του γονιδίου *PIG-A*, κι έτσι η νόσος χαρακτηρίζεται από γονοτυπικό και, κατ' επέκταση, φαινοτυπικό μωσαϊκισμό.<sup>3</sup> Παρ' όλο που η παρουσία και ο βαθμός του βιοχημικού ελλείμματος, με τις συνοδές κυτταρικές διαταραχές, ερμηνεύουν και καθορίζουν σε μεγάλο βαθμό κλινικές εκδηλώσεις, όπως η αιμόλυση, οι θρομβώσεις και οι λοιμώξεις, οι παθοφυσιολογικοί μηχανισμοί που διέπουν τη μυελική απλασία δεν έχουν διαλευκανθεί πλήρως. Μάλιστα, η σπάνια παρουσία *PIG-A(-)* κλώνων στα κύτταρα, τόσο του περιφερικού αίματος όσο και του μυελού των οστών, σε υγιή άτομα<sup>6,7</sup> δημιουργεί ερωτήματα για το κατά πόσο η μοριακή βλάβη

**Πίνακας 1.** Ταξινόμηση της νυκτερινής παροξυντικής αιμοσφαινουρίας (ΝΠΑ) (International PNH Interest Group).

Ευρήματα/κατηγορία	Ρυθμός ενδαγγειακής αιμόλυσης*	Μυελός των οστών (ΜΟ)	Κυτταρομετρία ροής (ΚΡ)	Όφελος από θεραπεία με εκουλιζουμάμπη
«Κλασική» ΝΠΑ	Σοβαρή αιμόλυση (αρκετά αυξημένη LDH, συχνά με επεισόδια μακροσκοπικής αιματουρίας)	Νορμο- ή υπερ-κυτταρικός ΜΟ με κατά φύση ή σχεδόν κατά φύση μορφολογία**	Μεγάλος πληθυσμός ΝΠΑ (>50%) GPI(-) πολυμορφοκυττάρων	Υπάρχει
«ΝΠΑ-σύνδρομο μυελικής ανεπάρκειας»	Ήπια (συχνά με ελάχιστες διαταραχές στους βιοχημικούς δείκτες της αιμόλυσης)	Στοιχεία συνυπάρχοντος συνδρόμου μυελικής ανεπάρκειας (AA ή MDS)	Αν και ποικίλλει, το ποσοστό των GPI(-) πολυμορφοκυττάρων είναι συνήθως σχετικά χαμηλό (<10%)	Τυπικά όχι, αλλά ίσως ένα μικρό ποσοστό (<10%), που έχουν μεγάλους κλώνους και κλινικά σημαντική αιμόλυση
«Υποκλινική ΝΠΑ»	Χωρίς κλινικά ή εργαστηριακά ευρήματα αιμόλυσης	Στοιχεία συνυπάρχοντος συνδρόμου μυελικής ανεπάρκειας (AA ή MDS)	Πολύ μικρός (<1%) πληθυσμός GPI(-) πολυμορφοκυττάρων (υψηλής ευαισθησίας ΚΡ)	Δεν υπάρχει

\*Βασίζομενος στη μακροσκοπική αιματουρία, την LDH ορού και τα δικτυοερυθροκύτταρα (ΔΕΚ) περιφερικού αίματος, \*\*Οι καρυοτυπικές ανωμαλίες απαντώνται σπάνια AA: Απλαστική αναιμία, MDS: Myelodysplastic syndrome (μυελοδυσπλαστικό σύνδρομο)

επαρκεί από μόνη της για την επιλογή, την επέκταση και την επικράτηση των παθολογικών κλώνων. Σύμφωνα με το μοντέλο της «διπλής παθογένεσης» των Rotoli και Luzzatto,<sup>8</sup> εκτός από τη σωματική μετάλλαξη του γονιδίου *PIG-A*, ένα περιβάλλον ανοσολογικά μεσολαβούμενης μυελικής ανεπάρκειας, όπου ο GPI(-) κλώνος έχει σχετικό πλεονέκτημα επιβίωσης έναντι της φυσιολογικής αιμοποίησης στο μυελό των οστών, συμπληρώνει αδρά το μοτίβο της παθογένεσης της νόσου.<sup>1,9</sup> Πρόσφατα δεδομένα από πειραματικά μοντέλα αναδεικνύουν το θεμελιώδη ρόλο T-κυτταροτοξικών και ρυθμιστικών κυττάρων και της αλληλεπίδρασής τους με τα mHSC μέσω των μορίων του συμπλέγματος μείζονος ιστοσυμβατότητας (major histocompatibility complex, MHC), αποπτωτικών μορίων και αντι-αποπτωτικών μονοπατιών, καθώς και ανασταλτικών κυτταροκινών στην αιμοποίηση της ΝΠΑ.<sup>10</sup> Με αυτόν τον τρόπο, η παθοφυσιολογία της μυελικής ανεπάρκειας είναι στενά συνυφασμένη με την παθογένεση της νόσου, η περιγραφή της οποίας θα γίνει στις επόμενες παραγράφους.

## 2. ΜΥΕΛΙΚΗ ΥΠΟΠΛΑΣΙΑ ΚΑΙ ΣΥΝΔΡΟΜΑ ΜΥΕΛΙΚΗΣ ΑΝΕΠΑΡΚΕΙΑΣ

Η κυτταροβρίθεια του μυελού των οστών στους ασθενείς με ΝΠΑ τοποθετείται μέσα σε ένα ευρύ φάσμα, τα άκρα του οποίου κυμαίνονται από την πλήρη απλασία έως την έντονη κυτταροβρίθεια με υπερπλασία της ερυθράς σειράς.<sup>11</sup> Οι ασθενείς με ΝΠΑ επιδεικνύουν ποικίλους βαθμούς αναιμίας, ουδετεροπενίας και θρομβοπενίας στη διάγνωση. Η επίπτωση της αναιμίας κυμαίνεται από 88–94%, της λευκοπενίας από 41–72% και της θρομβοπενίας από 51–80%.<sup>12–14</sup> Εκτός από την περιφερική καταστροφή των ερυθρών αιμοσφαιρίων λόγω αιμόλυσης, οι κυτταροπενίες προκαλούνται πρωταρχικά από τη μυελική ανεπάρκεια, παρά από την περιφερική καταστροφή, εφ' όσον ο χρόνος ζωής των πολυμορφοπυρήνων και των αιμοπεταλίων είναι σχεδόν φυσιολογικός.<sup>15–17</sup> Ακόμη και επί απουσίας εμφανούς κυτταροπενίας στο περιφερικό αίμα και στο μυελό των οστών, ο αριθμός των προγονικών αιμοποιητικών κυττάρων, όπως τα CD34(+) και τα προγονικά κύτταρα που σχηματίζουν αποικίες (colony-forming cells, CFC), είναι μειωμένα, όπως στην απλαστική αναιμία (AA).<sup>18–20</sup>

Παρατηρώντας τη βιολογία της νόσου σε βάθος, αν και οι περισσότερες κλινικές εκδηλώσεις της ΝΠΑ απορρέουν από τη μοριακή βλάβη του γονιδίου *PIG-A* και από τη συνεπακόλουθη λειτουργική ανεπάρκεια των διαφόρων αιμοποιητικών σειρών, η διαταραχή της αιμοποίησης, καθολικά παρούσα σε ποικίλο βαθμό σε όλους τους ασθενείς με ΝΠΑ, δεν μπορεί να ερμηνευτεί αποκλειστικά από το γενετικό αυτό έλλειμμα.<sup>21,22</sup> Άλλωστε, μεταλλάξεις του γονι-

δίου *PIG-A* έχουν ανιχνευτεί στα κύτταρα του περιφερικού αίματος φυσιολογικών αιμοδοτών.<sup>7,23</sup> Η πλειονότητα των πειραματικών και των κλινικών ευρημάτων υποστηρίζει την παρουσία μιας ανοσολογικής επίθεσης έναντι της φυσιολογικής αιμοποίησης, αν και οι ακριβείς παθοφυσιολογικοί μηχανισμοί δεν έχουν διευκρινιστεί πλήρως. Πράγματι, μικρού και μεσαίου μεγέθους κλώνοι ΝΠΑ ανευρίσκονται έως και στο 70% των ασθενών με AA.<sup>1,6,24–29</sup> Ανοσολογικοί μηχανισμοί κατέχουν σημαντικό ρόλο στη βλάβη του αιμοποιητικού ιστού, οδηγώντας σε εξάντληση της δεξαμενής των mHSC ή σε λειτουργική ανεπάρκειά τους και συνοδό πανκυτταροπενία, αντικατοπτρίζοντας έτσι την παθοφυσιολογική σύνδεση των δύο διαταραχών. Τυπικά, έως και 20% GPI(-) πολυμορφοπύρηνα ανιχνεύονται στο περιφερικό αίμα ασθενών με AA κατά τη χρονική στιγμή της διάγνωσης, ενώ ορισμένοι παρουσιάζονται με μεγάλο μεγέθους κλώνους (έως 70%). Η κυτταρογενετική ανάλυση των συγκεκριμένων κυττάρων αναδεικνύει την παρουσία κλωνικών μεταλλάξεων του *PIG-A*. Επί πλέον, πολλοί από αυτούς τους ασθενείς παρουσιάζουν επέκταση του *PIG-A* μεταλλαγμένου κλώνου, ενδεχομένως λόγω της επιλεκτικής ανοσολογικής επίθεσης έναντι της φυσιολογικής αιμοποίησης, από την οποία διαφεύγει. Πράγματι, οι εν λόγω ασθενείς εκδηλώνουν τυπικά κλινικά συμπτώματα της νόσου (π.χ. αιμοσφαιρινουρία).<sup>1,27–29</sup>

Μικροί πληθυσμοί «τύπου ΝΠΑ» ανευρίσκονται έως στο 50% των ασθενών με μυελοδυσπλαστικό σύνδρομο (myelodysplastic syndrome, MDS).<sup>1,24,27–29</sup> Σπάνια, ωστόσο, έχει επιβεβαιωθεί η κλωνικότητά τους, μέσω της μοριακής ανίχνευσης της υποκείμενης μετάλλαξης του γονιδίου *PIG-A*.<sup>30,31</sup> Μάλιστα, οι ασθενείς αυτοί εμφανίζουν συγκεκριμένα χαρακτηριστικά. Ταξινομούνται ως ανθεκτική αναιμία-μυελοδυσπλαστικό σύνδρομο (refractory anemia, RA-MDS) και εμφανίζουν τα ακόλουθα χαρακτηριστικά: Υποκυτταρικός μυελός, HLA-DR15 θετικότητα, φυσιολογική κυτταρογενετική ανάλυση, μέτρια προς σοβαρή θρομβοπενία, και υψηλότερη πιθανότητα ανταπόκρισης στην ανοσοκατασταλτική θεραπεία.<sup>1,26,27</sup> Ωστόσο, σε αντίθεση με την AA, φαίνεται ότι οι ασθενείς με MDS σπανιότερα αναπτύσσουν κλινική ΝΠΑ, ενώ η παρουσία τους, σύμφωνα με πλέον πρόσφατα δεδομένα, πιθανόν να μη σχετίζεται, τελικά, με καλύτερη ανταπόκριση στην ανοσοκατασταλτική θεραπεία ή με καλύτερη πρόγνωση.<sup>31</sup> Τα αποκλίνοντα αυτά συμπεράσματα ενδέχεται εν μέρει να απορρέουν από τη δυσκολία απόλυτης διάκρισης ανάμεσα στην AA και στο υποκυτταρικό MDS, όπου η ποσοτική ανάλυση των CD34(+) κυττάρων στο μυελό των οστών αποδεικνύεται εξαιρετικά χρήσιμη για το διαχωρισμό των δύο αυτών οντοτήτων.<sup>32,33</sup> Τέλος, φαίνεται ότι η βλάβη στην AA, όπως και στη ΝΠΑ, εντοπίζεται σε ένα πιο πρώιμο αρχέγονο

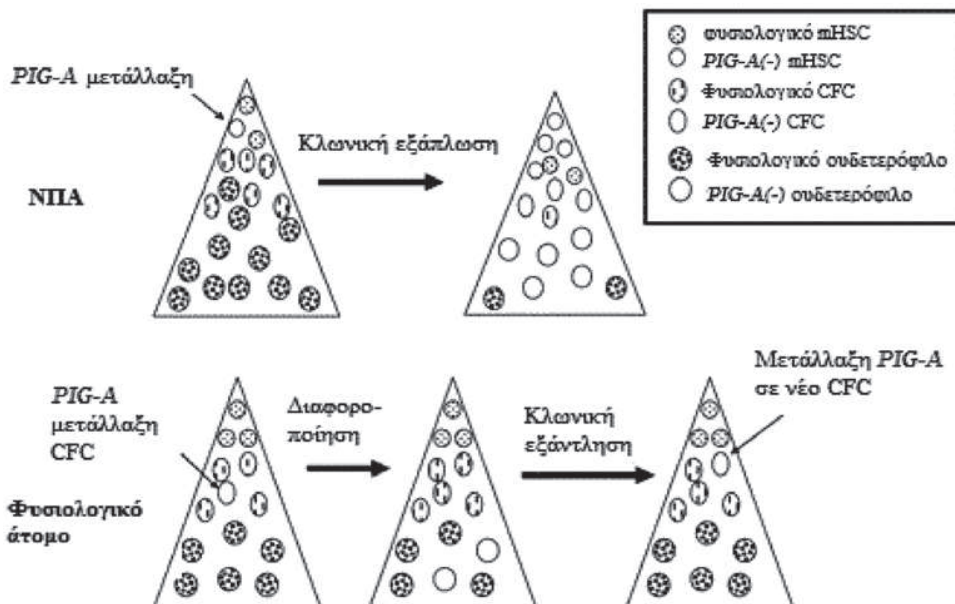
κύτταρο σε σύγκριση με άλλα κλωνικά νοσήματα, όπως η χρόνια μυελογενής λευχαιμία, τα MDS και η οξεία λευχαιμία. Στις τελευταίες περιπτώσεις, τα Β-λεμφοκύτταρα πιθανόν να προέρχονται από το λευχαιμικό κλώνο, αλλά τα Τ-λεμφοκύτταρα συμμετέχουν σπάνια. Οι μικροί GPI(-) πληθυσμοί προέρχονται από CFC που είναι δεσμευμένα, όπως συμβαίνει και σε φυσιολογικούς αιμοδότες.<sup>31</sup>

Παράλληλα, στη διαμόρφωση της μυελικής ανεπάρκειας καθοριστικός αναδεικνύεται ο ρόλος συγκεκριμένων υπότυπων ολιγοκλωνικών λεμφοκυττάρων, ανασταλτικών κυτταροκινών της αιμοποίησης και αποπτωτικών μηχανισμών.<sup>34</sup> Άλλωστε, έχει αποδειχθεί η στενή σύνδεση των διαφόρων μορφών της ΝΠΑ με συγκεκριμένα αντιγόνα MHC, αντανακλώντας ότι οι GPI(-) κλώνοι είναι αποτέλεσμα μιας ανοσολογικά μεσολαβούμενης διαδικασίας, όπως συμβαίνει και με άλλα αυτοάνοσα νοσήματα.<sup>35</sup>

### 3. ΜΕΤΑΛΛΑΞΕΙΣ ΤΟΥ *PIG-A* ΚΑΙ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΗ ΑΙΜΟΠΟΙΗΣΗ

Η ΝΠΑ είναι μια εξαιρετικά σπάνια νόσος. Η επίπτωσή της εκτιμάται σε 1–5 περιπτώσεις ανά εκατομμύριο πληθυσμού ανά έτος,<sup>36</sup> ανεξάρτητα από την εθνικότητα. Ωστόσο, μεταλλάξεις του *PIG-A* ανιχνεύονται στα κύτταρα του περιφερικού αίματος φυσιολογικών αιμοδοτών, χωρίς όμως να αναπτύσσονται τελικά τη νόσο. Μάλιστα, έχει αναφερθεί

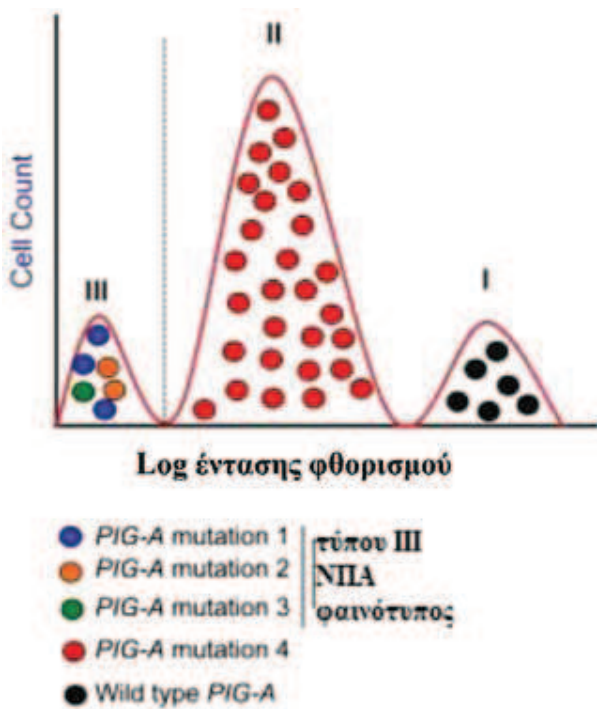
η περίπτωση υγιούς ατόμου, όπου έχουν ταυτοποιηθεί 15 διαφορετικές μεταλλάξεις του *PIG-A*.<sup>7,23,37</sup> Πράγματι, οι Araten et al ανέδειξαν μια συχνότητα της τάξης των 10–51 GPI(-) πολυμορφοπύρηνων ανά 10<sup>6</sup> κύτταρα (κατά μέσο όρο 22 ανά 10<sup>6</sup> κύτταρα), που ταυτοποιήθηκε με τη μέθοδο PCR (polymerase chain reaction) ότι έφεραν τη μετάλλαξη του γονιδίου *PIG-A*.<sup>7</sup> Περαιτέρω πειραματικές μελέτες σε CD34(+) προγονικά κύτταρα σε φυσιολογικά άτομα και σε ασθενείς με ΝΠΑ κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι, σε αντίθεση με τους ασθενείς, ενδεχομένως η παρουσία μεταλλάξεων σε φυσιολογικά άτομα να συμβαίνει κατά κύριο λόγο σε πιο διαφοροποιημένα προγονικά κύτταρα από το mHSC, όπως τα CFC, ως συνέπεια της διαδικασίας της φυσιολογικής διαφοροποίησης,<sup>38</sup> και να είναι πολυκλωνικές, ενώ το πλέον πρώιμο κύτταρο το οποίο εμπλέκεται ίσως είναι το CFU-GEMM (colony forming units-granulocyte, erythrocyte, monocyte, megakaryocyte).<sup>37</sup> Σε αντίθεση με τα mHSC, τα CFC δεν έχουν τη δυνατότητα αυτοανανέωσης και έτσι η γενετική βλάβη δεν μπορεί να εδραιωθεί, προκειμένου να εκδηλωθεί κλινικά η νόσος (εικ. 1). Τα σχετικά ευρήματα έχουν ιδιαίτερη κλινική σημασία κατά την ερμηνεία της κυτταρομετρίας ροής για την ανίχνευση μικρών «τύπου ΝΠΑ» πληθυσμών στο περιφερικό αίμα. Καθώς οι υγιείς έχουν κατά κανόνα έως 0,002% μη κλωνικά «τύπου ΝΠΑ» κύτταρα,<sup>23</sup> θετικά ευρήματα σε ποσοστό <0,01% θεωρείται απίθανο να είναι κλωνικά ή τουλάχιστον κλινικώς σημαντικά.<sup>39</sup>



**Εικόνα 1.** Μεταλλάξεις του γονιδίου *PIG-A* σε υγιείς και στη νυκτερινή παροξυστική αιμοσφαινουρία (ΝΠΑ). Στη ΝΠΑ, οι μεταλλάξεις του *PIG-A* στο πολυδύναμο αρχέγονο αιμοποιητικό κύτταρο (multipotent hematoroietic stem cell, mHSC) οδηγούν –κυρίως μέσω ανοσολογικών μηχανισμών– σε κλωνική επικράτηση και διαφοροποίηση, με αποτέλεσμα την κλινική εκδήλωση της νόσου. Στους υγιείς, οι περισσότερες –αν όχι όλες– μεταλλάξεις εμφανίζονται στα κύτταρα τα οποία σχηματίζουν αποικίες (colony-forming cells, CFCs), που έχουν την ικανότητα να διαφοροποιούνται, αλλά όχι να αυτο-ανανεώνονται. Έτσι, κλινικά δεν προκαλείται νόσος (από Brodsky, τροποποιημένο).<sup>30</sup>

**4. ΚΑΛΟΗΘΗΣ ΟΛΙΓΟΚΛΩΝΙΚΗ ΜΥΕΛΟΠΑΘΕΙΑ**

Προκειμένου να εκδηλωθεί κλινικά η νόσος, τα mHSC τα οποία φέρουν τη μετάλλαξη του *PIG-A* θα πρέπει να εξαπλωθούν, ώστε επαρκή ΝΠΑ προγονικά κύτταρα να επικρατήσουν στο μυελό των οστών και να προκαλέσουν τη συμπτωματολογία της νόσου. Όπως περιγράφηκε σε παραπάνω ενότητα, οι μελέτες των Endo et al εισήγαγαν τρεις βασικές αρχές στους παθογενετικούς μηχανισμούς της νόσου, δηλαδή τις έννοιες της «κλωνικής επιλογής», της «κλωνικής επέκτασης» και της «κλωνικής επικράτησης», όταν σε έναν ασθενή με παρουσία τεσσάρων μοριακά ετερογενών κλώνων παρατήρησαν ότι η συμμετοχή του κάθε κλώνου στην αιμοποίηση δεν είναι ομοιόμορφη<sup>40</sup> (εικ. 2). Έτσι, σε αντίθεση με την οξεία λευχαιμία, η νόσος λαμβάνει την υπόσταση καλοήθους ολιγοκλωνικής μυελοπάθειας,



**Εικόνα 2.** Τα κύτταρα της νυκτερινής παροξυντικής αιμοσφαιρινουρίας (ΝΠΑ) χαρακτηρίζονται από γονοτυπικό μωσαϊκισμό. Ο γονότυπος *PIG-A* καθορίζει το φαινότυπο ΝΠΑ. Στο ιστόγραμμα της κυτταρομετρίας ροής του ασθενούς με τις τέσσερις μεταλλάξεις ΝΠΑ, σχεδόν το 75% της ολικής αιμοποίησης προέρχεται από τον κλώνο με την παρερμηνεύσιμη (missense) μετάλλαξη, που παράγει τον τύπου II ΝΠΑ φαινότυπο. Τρεις διακριτές μεταλλάξεις *PIG-A* παράγουν τύπου III ΝΠΑ φαινότυπο (ή μηδενικό φαινότυπο, null phenotype). Και οι τρεις μαζί διακριτοί κλώνοι συμβάλουν στο 11% της φυσιολογικής αιμοποίησης. Στη συγκεκριμένη περίπτωση, ο τύπου II ΝΠΑ κυτταρικός κλώνος έχει επικρατήσει έναντι των υπολοίπων στην αιμοποίηση του ασθενούς. Το υπόλοιπο 14% της αιμοποίησης προέρχεται από τη φυσιολογική αιμοποίηση (wild-type *PIG-A*). Το ιστόγραμμα του εν λόγω ασθενούς έχει παραμείνει αμετάβλητο για 15 συναπτά έτη, ενισχύοντας τη θεωρία ότι η ΝΠΑ είναι μια καλοήθης κλωνική μυελοπάθεια (από Parker, τροποποιημένο).<sup>3</sup>

η φύση της οποίας επιβεβαιώνεται από τα εξής διακριτά χαρακτηριστικά. Εκτός από το γεγονός ότι το περιφερικό αίμα των συγκεκριμένων ασθενών είναι ένα σταθερό στο χρόνο μωσαϊκό παθολογικών και φυσιολογικών κυττάρων, τα παθολογικά κύτταρα δεν εξαπλώνονται εκτός του αιμοποιητικού συστήματος, αλλά κυριαρχούν μόνο εντός αυτού. Επί πλέον, τα παθολογικά κύτταρα αποκρίνονται φυσιολογικά σε «σήματα» της φυσιολογικής αιμοποίησης, χωρίς να λειτουργούν αυτόνομα, ενώ η εκτροπή σε οξεία λευχαιμία γίνεται σπάνια.

Ωστόσο, όπως έχει ήδη προαναφερθεί, ο επικρατών παθολογικός κλώνος μπορεί να μεταβάλλεται κατά τη φυσική εξέλιξη της νόσου, ενώ σε περιπτώσεις υποτροπής της νόσου, ακόμη και ύστερα από αλλογενή μεταμόσχευση, ο παθολογικός κλώνος ήταν μοριακά διαφορετικός. Η θεωρία της «διπλής παθογένεσης» (dual theory) των Rotoli και Luzzatto<sup>8</sup> αποτελεί το θεμέλιο λίθο στην αναζήτηση των παθοφυσιολογικών μηχανισμών εκείνων που οδηγούν στο σχετικό πλεονέκτημα επιβίωσης του παθολογικού κλώνου έναντι της φυσιολογικής αιμοποίησης, καθώς και στην επιλογή του αιμοποιητικά επικρατούντος, ανάμεσα σε φαινοτυπικά όμοιους, αλλά μοριακά ετερογενείς κλώνους.

**5. ΕΙΣΑΓΩΓΗ ΣΤΟ ΜΟΝΤΕΛΟ ΤΗΣ «ΔΙΠΛΗΣ ΘΕΩΡΙΑΣ»**

Όπως έχει ήδη αποτυπωθεί στις παραπάνω γραμμές, ο καθορισμός της μοριακής βλάβης στη ΝΠΑ εξηγεί πλήρως το φαινότυπο των κυττάρων ΝΠΑ και τα συμπτώματα της νόσου, με πλέον αντιπροσωπευτικό την αυξημένη ευαισθησία τους στο συμπλήρωμα και τη συνεπακόλουθη ενδαγγειακή αιμόλυση, αλλά και τις θρομβώσεις και τις συχνές λοιμώξεις. Ωστόσο, το πλέον αξιοσημείωτο χαρακτηριστικό της νόσου, το σχετικό πλεονέκτημα επιβίωσης και επικράτησής τους σε ένα περιβάλλον μυελικής ανεπάρκειας, παρέμεινε για αρκετά χρόνια σχεδόν αδιευκρίνιστο. Στοιχεία από κάποιες πρώιμες μελέτες των Rotoli και Luzzatto ανέδειξαν δύο αναγκαίους παράγοντες για την ανάπτυξη της ΝΠΑ. Ο πρώτος συνίσταται σε μια σωματική μετάλλαξη του γονιδίου *PIG-A* σε ένα mHSC, ενώ ο δεύτερος αφορά στη μυελική απλασία, χαρακτηριζόμενη από ένα υποπλαστικό μυελικό περιβάλλον, όπου ο *PIG-A(-)* κλώνος έχει σχετικό πλεονέκτημα επιβίωσης έναντι του φυσιολογικού αιμοποιητικού ιστού.

Ο «άγνωστος» παράγοντας που προκαλεί τη μυελική ανεπάρκεια τροφοδοτεί παράλληλα και ένα μηχανισμό θετικής επιλογής υπέρ των παθολογικών κυττάρων (που φέρουν τη μετάλλαξη του *PIG-A*) ή αρνητικής επιλογής κατά των φυσιολογικών κυττάρων (χωρίς μετάλλαξη του *PIG-A*), με τελικό αποτέλεσμα τη σχετική επικράτηση του παθολογικού κλώνου στο μυελό των οστών, έναντι της

φυσιολογικής αιμοποίησης. Αυτό είναι το μοντέλο της «διπλής θεωρίας» (dual theory) για την παθογένεση της ΝΠΑ, όπως διατυπώθηκε πριν από 25 έτη περίπου από τους Rotoli και Luzzatto.

Συνοπτικά, η μετάλλαξη του *PIG-A* αποτελεί αναγκαία, αλλά όχι και ικανή από μόνη της συνθήκη, για την κλινική εκδήλωση της νόσου, όπως υποδηλώνει το γεγονός ότι παθολογικά ΝΠΑ κύτταρα, στα οποία έχει ανιχνευτεί μετάλλαξη του *PIG-A*, κυκλοφορούν στο περιφερικό αίμα φυσιολογικών ατόμων χωρίς την εκδήλωση της νόσου.<sup>7</sup> Ο φυσιολογικός μυελός δεν παρέχει κάποιο πλεονέκτημα επιβίωσης στον κλώνο ΝΠΑ, ώστε να επικρατήσει στη διεργασία της αιμοποίησης. Τέλος, η εξάπλωση του παθολογικού κλώνου που παρατηρείται στη ΝΠΑ δεν μπορεί να επαληθευτεί σε διάφορα πειραματικά μοντέλα σε ποντικούς με στόχο την αναπαραγωγή της νόσου, ούτε ακόμη όταν χρησιμοποιήθηκαν ανθρώπινα προγονικά εμβρυϊκά κύτταρα.<sup>41,42</sup> Έτσι, σε αυτές τις μελέτες, ο κλώνος ΝΠΑ δεν φαίνεται να έχει εσωτερικό πλεονέκτημα επιβίωσης και επικράτησης έναντι της φυσιολογικής αιμοποίησης. Για παράδειγμα, σε χιμαιρικούς ποντικούς, με στοχοποιημένη απενεργοποίηση του γονιδίου *PIG-A*, ο πληθυσμός «τύπου ΝΠΑ» όχι μόνο δεν πολλαπλασιάζεται, αλλά συχνά εξαφανίζεται.<sup>43-45</sup> Μάλιστα, τα παραπάνω ευρήματα επιβεβαιώθηκαν και από τις *in vitro* καλλιέργειες ανθρώπινων ΝΠΑ και φυσιολογικών αιμοποιητικών προγονικών κυττάρων.

Άλλωστε, η στενή σχέση της ΝΠΑ με την ΑΑ υποδηλώνει ότι ο υποκυτταρικός μυελός της ΑΑ προσφέρει στον «παθολογικό» κλώνο το πλεονέκτημα επιβίωσης, μέσω ενός ανοσολογικού μηχανισμού, με αποτέλεσμα τον πολλαπλασιασμό και την επικράτησή του. Στην ΑΑ, η κυτταρική ανοσία πυροδοτούμενη από κάποιο αυτο-αντιγόνο οδηγεί στην επικράτηση αυτο-αντιδραστικών Τ-λεμφοκυττάρων, τα οποία οδηγούν στην καταστολή των προγονικών κυττάρων. Παρόμοια παρουσία τέτοιων ολιγοκλωνικών CD8+ Τ-κυτταροτοξικών λεμφοκυττάρων (cytotoxic T lymphocytes, CTL), με υψηλή ομολογία στη γονιδιακή αλληλουχία του Τ-κυτταρικού υποδοχέα β (T-cell receptor β), έχει ανιχνευτεί ανάμεσα στους ασθενείς με ΝΠΑ, αντανάκλωντας ότι η υποκείμενη ανοσολογική διεργασία στους εν λόγω ασθενείς έχει κοινό ή παρόμοιο αντιγόνο-στόχο, το οποίο θα μπορούσε να είναι είτε κάποια πρωτεΐνη GPI-AP, είτε η ίδια η GPI ή κάποιο συστατικό της. Επί πλέον, και στα δύο νοσήματα τα φυσιολογικά αιμοποιητικά κύτταρα είναι μειωμένα σε απόλυτο αριθμό.<sup>22</sup>

Ένα άλλο εύρημα, το οποίο υποδεικνύει το ανοσοποιητικό σύστημα ως τελεστή της κλωνικής επιλογής και επικράτησης, είναι το γεγονός ότι GPI(-) λεμφοκύτταρα έχουν ανιχνευθεί σε ασθενείς με χρόνια λεμφοκυτταρική

λευχαιμία (chronic lymphocytic leukemia, CLL) και ρευματοειδή αρθρίτιδα (rheumatoid arthritis, RA) μετά από θεραπεία με το μονοκλωνικό αντίσωμα anti-CD52 (alemtuzimab, Campath-1H). Μάλιστα, οι πληθυσμοί αυτοί υποχωρούν μετά τη διακοπή της θεραπείας. Το εν λόγω αντίσωμα αναγνωρίζει το αντιγόνο επιφανείας CD52, το οποίο συνδέεται μέσω της «άγκυρας» GPI στην κυτταρική μεμβράνη. Έτσι, το Campath-1H δίνει πλεονέκτημα επιβίωσης στους PIG-A(-) κλώνους σε ασθενείς χωρίς ΝΠΑ.<sup>46-48</sup> Παράλληλα, η σύνδεση σε διάφορες μελέτες της ΝΠΑ με συγκεκριμένους πολυμορφισμούς του γονιδίου των *MHC* αντιγόνων αντανάκλα το θεμελιώδη ρόλο που διαδραματίζουν στην αιμοποίηση των ασθενών με ΝΠΑ τα αντιγόνα *MHC* τάξης I και II.<sup>10</sup> Με αυτόν τον τρόπο, όμως, αναδεικνύεται και η σημασία του ρόλου που διαδραματίζει στην αιμοποίηση των ασθενών αυτών η ανοσοπαρουσίαση ειδικών για τον αιμοποιητικό ιστό αντιγονικών επιτόπων με κοινή προέλευση, είτε την ίδια την GPI, είτε κάποια GPI-AP. Τα εν λόγω ευρήματα επαληθεύουν την υπόθεση ότι, αν και τέτοιες μεταλλάξεις συμβαίνουν συχνά σε φυσιολογικά άτομα, δεν είναι η μόνη προϋπόθεση για την κλινική εμφάνιση της νόσου.

Όσον αφορά στην αιμοποίηση στη ΝΠΑ, είναι κατ' αρχάς κλωνική, αλλά όχι απαραίτητα μονοκλωνική, όπως αντανάκλαται στην ευρεία διακύμανση της ευαισθησίας των ερυθροκυτταρικών πληθυσμών στη λυτική δράση του συμπληρώματος,<sup>49,50</sup> καθώς και στα αποτελέσματα της κυτταρομετρίας ροής.<sup>51</sup> Η μετάλλαξη του *PIG-A* δεν επαρκεί ως ερμηνεία. Αν και η ανάλυση της αλληλουχίας του γονιδίου *PIG-A* επιβεβαίωσε την ολιγοκλωνικότητα,<sup>40</sup> το βασικό ερώτημα που τίθεται πλέον είναι για τις υποκείμενες παθοφυσιολογικές διεργασίες οι οποίες μεσολαβούν την επιλογή του αιμοποιητικού κυριαρχούντος ανάμεσα στους φαινοτυπικά όμοιους, αλλά μοριακά ετερογενείς κλώνους, ΝΠΑ κλώνους. Το γεγονός ότι σε υποτροπή της νόσου ο παθολογικός κλώνος είναι μοριακά διαφορετικός,<sup>52</sup> ενώ πολλές φορές ο επικρατών παθολογικός κλώνος μεταβάλλεται κατά την εξέλιξη της νόσου, οδηγεί στο συμπέρασμα ότι δεν είναι τυχαία η διαδικασία επιλογής του.<sup>53</sup> Επίσης, έχει περιγραφεί αυτόματη κλινική υποστροφή της ΝΠΑ, ενώ σε ορισμένες περιπτώσεις ο κλώνος παραμένει ανιχνεύσιμος σε χαμηλά επίπεδα αρκετά έτη μετά την υποστροφή.<sup>49</sup>

Η θεωρία των Rotoli και Luzzatto δεν τεκμηριώνει αν όντως υπάρχει μια θετική επιλογή ανάπτυξης έναντι του *PIG-A* μεταλλαγμένου κλώνου ή η κυριαρχία του στο μυελό των οστών των ασθενών με ΝΠΑ ήταν αποτέλεσμα αρνητικής επιλογής έναντι της φυσιολογικής αιμοποίησης. Όταν σε μια πρώιμη μελέτη τα CD34(+) κύτταρα ασθενών με ΝΠΑ μεταμοσχεύτηκαν σε ποντικούς με SCID (severe combined immunodeficiency), τότε αυτοί διατήρησαν την αιμοποίηση χωρίς τη χρήση κυτταροκινών.<sup>54</sup> Αντίθετα, στα μοσχεύματα

ελέγχου από φυσιολογικά άτομα απαιτήθηκε η χρήση κυτταροκινών για την έναρξη της αιμοποίησης, υποστηρίζοντας την άποψη του πλεονεκτήματος ανάπτυξης του παθολογικού κλώνου.<sup>55</sup> Ωστόσο, εφόσον τα φυσιολογικά κύτταρα των εν λόγω ασθενών είχαν διαταραχθεί σοβαρά, η μυελική αυτή βλάβη προσέδιδε το σχετικό πλεονέκτημα επιβίωσης.

### 5.1. Βασικές υποθέσεις για την επικράτηση του παθολογικού κλώνου

Το ερώτημα, λοιπόν, που προσπάθησαν να απαντήσουν αρχικά οι Rotoli και Luzzatto, και το οποίο έως πρόσφατα δεν είχε διαλευκανθεί, είναι πώς ο παθολογικός κλώνος, θεωρητικά με πιο δυσμενή χαρακτηριστικά συγκριτικά με το φυσιολογικό αιμοποιητικό ιστό, έχει τη δυνατότητα να κυριαρχεί στο μυελό των οστών. Τέσσερις είναι οι υποθέσεις για την ερμηνεία της παθογένεσης της ΝΠΑ. Τα παθολογικά mHSC εμφανίζουν κάποιο «ενδογενές πλεονέκτημα» επιβίωσης και πολλαπλασιασμού (γενετική αστάθεια). Ένα δεύτερο επιγενετικό γεγονός προσδίδει στον παθολογικό κλώνο ανθεκτικότητα στην απόπτωση. Ο κλώνος ΝΠΑ εμφανίζει μεγαλύτερη ανθεκτικότητα έναντι του προ-αποπτωτικού stress. Τα ΝΠΑ mHSC διαφεύγουν μιας T-μεσολαβούμενης ανοσολογικής επίθεσης, της οποίας αντιγόνο-στόχος είναι είτε κάποια GPI-AP, είτε η ίδια GPI, είτε κάποιο συστατικό της.

Οι σχετικές υποθέσεις προσπαθούν να αναδείξουν τις παθοφυσιολογικές διεργασίες της κλωνικής επιλογής του ΝΠΑ αρχέγονου αιμοποιητικού κυττάρου, καθώς και την επικράτηση και την εξάπλωση του παθολογικού κλώνου, έναντι της υπόλοιπης αιμοποίησης, που οδηγεί στην κλινική εκδήλωση της ΝΠΑ, χωρίς να σημαίνει απαραίτητα ότι αλληλοαναιρούνται μεταξύ τους.

### 5.2. «Ενδογενές πλεονέκτημα» των νυκτερινών παροξυντικών αιμοσφαιρινουριών mHSC και γενετική αστάθεια

Το γεγονός ότι GPI(-) κύτταρα απαντώνται συχνότερα σε ασθενείς με ΝΠΑ, καθώς και με AA ή MDS, σε σύγκριση με φυσιολογικά άτομα, υποδηλώνει ότι ίσως υπάρχει γενετική αστάθεια στους ασθενείς αυτούς, δηλαδή αυξημένος ρυθμός μετάλλαξης του γονιδίου *PIG-A*.<sup>1,7</sup> Η υπόθεση ότι οι εν λόγω μεταλλάξεις οφείλονται σε γενετική αστάθεια<sup>40,56-58</sup> (η προδιάθεση για αυξημένο αριθμό μεταλλάξεων σε όλο το γονιδίωμα, που οδηγεί συνήθως αλλά όχι απαραίτητα σε κακοήθεια) δεν επιβεβαιώθηκε από μετέπειτα πειραματικά δεδομένα.<sup>59</sup> Άλλωστε, ασθενείς με κληρονομικές καταστάσεις γενετικής αστάθειας, όπως το σύνδρομο αταξίας-τηλεαγγειεκτασίας και η αναιμία Fanconi, δεν έχουν μεγαλύτερη επίπτωση της ΝΠΑ.<sup>60</sup>

Πράγματι, ευρήματα από μελέτες της συχνότητας των GPI(-) μυελικών CD34(+) CFCs στο μυελό και κινητοποιημένων αντίστοιχων κυττάρων στο περιφερικό αίμα ανέδειξε 2-3 τάξεις μεγέθους υψηλότερο μεταλλαξιγόνο ρυθμό του *PIG-A* (mutational frequency,  $M_f$ ) ( $14,7 \pm 4,0 \times 10^{-6}$  μεταλλάξεις/κυτταρική διαίρεση, και  $57 \pm 6,7 \times 10^{-6}$  μεταλλάξεις/κυτταρική διαίρεση, αντίστοιχα) σε σύγκριση με το βασικό ρυθμό μετάλλαξης στα ανθρώπινα κύτταρα ( $1,0 \times 10^{-8}$  μεταλλάξεις/γονίδιο/κυτταρική διαίρεση έως  $1,0 \times 10^{-7}$  μεταλλάξεις/γονίδιο/κυτταρική διαίρεση), συχνότητα που συμφωνούσε με αντίστοιχες μελέτες σε πολυμορφοπύρρηνα και T-λεμφοκύτταρα.<sup>7,23,37</sup> Ωστόσο, η λεπτομερέστερη ανάλυση του  $M_f$  του *PIG-A* σε B-λεμφοκύτταρα από ασθενείς με ΝΠΑ με μεγάλους κλώνους και ολιγοκλωνικότητα, στοιχεία που συνηγορούν κατ'εξοχήν υπέρ της παρουσίας γενετικής αστάθειας και κατά συνέπεια της υπερμεταλλαξιόγνου υπόθεσης του γονιδίου *PIG-A* στη ΝΠΑ, έδειξε ότι είναι εντός των ορίων του βασικού ρυθμού μετάλλαξης στα ανθρώπινα κύτταρα.

Έτσι, αν και ο αυξημένος αριθμός διαιρέσεων μπορεί να οδηγήσει σε αυξημένη συχνότητα μεταλλάξεων, ο αυξημένος ρυθμός μεταλλάξεων του *PIG-A* δεν είναι ούτε ικανή ούτε αναγκαία συνθήκη για την ανάπτυξη ΝΠΑ, εφόσον, για παράδειγμα, οι κλώνοι ΝΠΑ δεν εξαπλώνονται κατά την αναγέννηση του μυελού μετά από χημειοθεραπευτικά προκαλούμενη βλάβη.<sup>60</sup>

Όπως έχει προαναφερθεί, στη ΝΠΑ, αν όχι η απόλυτη, η μεγάλη πλειοψηφία των παθολογικών κλώνων προέρχεται από κάποιο mHSC, ενώ τα GPI(-) κύτταρα σε φυσιολογικά άτομα από το CFC.<sup>37,38</sup> Ωστόσο, δεν είναι σαφές αν οι μεταλλάξεις *PIG-A* που συμβαίνουν σε ένα mHSC είναι επαρκείς για να προκαλέσουν τη νόσο. Αν και η υπόθεση ότι οι μεταλλάξεις στο γονίδιο *PIG-A* παρέχουν κάποιο «ενδογενές πλεονέκτημα» για την ανάπτυξη του παθολογικού κλώνου<sup>19</sup> (όπως, για παράδειγμα, συμβαίνει σε περιπτώσεις μεταλλάξεων σε πρωτο-ογκογονίδια) μοιάζει ελκυστική, εντούτοις τα αποτελέσματα αρκετών μελετών δεν τεκμηρίωσαν τη συγκεκριμένη άποψη.<sup>22,43,61</sup> Μελέτες πάνω σε καλλιέργειες μακράς διάρκειας CD34(+) προγονικών κυττάρων με φαινότυπο ΝΠΑ ανέδειξαν τις ίδιες μειωμένες ικανότητες για το σχηματισμό αποικιών σε σύγκριση με τα φυσιολογικά προγονικά κύτταρα του ασθενούς,<sup>62</sup> υποδηλώνοντας ότι πιθανόν απαιτείται ένας δεύτερος παράγοντας για την ανάπτυξη του κλώνου της ΝΠΑ. Εξ άλλου, στους ασθενείς με ΝΠΑ, ο *PIG-A*(-) κλώνος δεν πολλαπλασιάζεται όπως στη λευχαιμία, αλλά παραμένει σταθερός, συνήθως 1-6 έτη.<sup>1</sup>

5.3. Ένα δεύτερο επιγενετικό γεγονός προσδίδει πλεονέκτημα εξάπλωσης στον παθολογικό κλώνο  
Σε υποστήριξη της υπόθεσης ότι μια δεύτερη μετάλλαξη,

που προσδίδει ανθεκτικότητα στην απόπτωση, συμβαίνει στον κλώνο ΝΠΑ, έχουν αναφερθεί δύο περιπτώσεις ασθενών με ΝΠΑ, οι οποίοι παρουσίαζαν έκτοπη έκφραση του HMGA2.<sup>63,64</sup> Και οι δύο ασθενείς εμφάνιζαν επίκτητη αναδιάρθρωση του χρωμοσώματος 12, der(12) [ενδοχρωμοσωμιακή μετατόπιση t(12;12)(q13q15) και t(p13q13;q15)] στα GPI(-) κύτταρα αλλά όχι στα GPI(+) κύτταρα.<sup>65</sup> Αν και η μοριακή βλάβη ήταν διαφορετική, το αποτέλεσμα της χρωμοσωμικής αναδιάρθρωσης ήταν όμοιο, αφού σε κάθε ασθενή το γονίδιο του HMGA2 διακοπτόταν στην 3'-αμετάφραστη περιοχή του εξονίου 5,<sup>65</sup> η οποία ρυθμίζει αρνητικά την έκφραση του γονιδίου.<sup>66</sup> Έτσι, το μεταγραφικό προϊόν, δηλαδή το m-RNA, του γονιδίου αυτού βρέθηκε αυξημένο στα παθολογικά ΝΠΑ κύτταρα των ασθενών αυτών.

Ο HMGA2 ανήκει στην οικογένεια των υψηλής κινητικότητας πρωτεϊνών (high mobility group, HMG), οι οποίες διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο ως ρυθμιστικές πρωτεΐνες της μεταγραφής, ενσωματωμένες στο ενισχυόσωμα (enhanceosome).<sup>67-69</sup> Αν και οι αναδιάρθρωσεις του έχουν συσχετιστεί πρωτοπαθώς με καλοήθεις μεσεγχυματικούς όγκους (λειομυώματα, αμαρτώματα, ινοαδενώματα και λιπώματα),<sup>68</sup> έχει παρατηρηθεί συσχέτιση και με αιματολογικές κακοήθειες, όπως σύνδρομο Richter,<sup>70</sup> οξεία λεμφοβλαστική λευχαιμία,<sup>71</sup> μυελοϊνώση με μυελοειδή μεταπλασία,<sup>72</sup> αληθή πολυκυτταραιμία ομόζυγη για τη μετάλλαξη JAK-2 V617F<sup>73</sup> και σε νεοπλασίες της μυελικής σειράς με δυσπλαστικά χαρακτηριστικά.<sup>74</sup> Η ταυτοποίηση ασθενών με ΝΠΑ, λοιπόν, όπου οι παθολογικοί κλώνοι φέρουν μια ανεξάρτητη κυτταρογενετική ανωμαλία, την αναδιάρθρωση του HMGA2,<sup>65</sup> ενισχύει την ιδέα ότι τουλάχιστον σε ορισμένες περιπτώσεις η καλοήθης κλωνική αιμοποίηση της ΝΠΑ είναι αποτέλεσμα της εξάπλωσης των παθολογικών κλώνων, όπου οι συνέπειες της μετάλλαξης του *PIG-A* πολλαπλασιάζονται από την ενεργοποίηση άλλων πολλαπλασιαστικών –αλλά όχι εξαλλακτικών– γονιδίων, μέσω γονιδιακής αναδιάρθρωσης, νέας σωματικής μετάλλαξης ή άλλων επιγενετικών διεργασιών. Ωστόσο, ακόλουθη μελέτη στην οποία συμμετείχαν 42 ασθενείς με ΝΠΑ δεν επιβεβαίωσε την αύξηση του HMGA2 mRNA, αντικατοπτρίζοντας ότι η διαταραχή της μεταγραφικής ρύθμισης του HMGA2 δεν αποτελεί θεμελιώδη παράγοντα στην παθοφυσιολογία της ΝΠΑ.<sup>75</sup>

#### 5.4. Μεγαλύτερη ανθεκτικότητα των νυκτερινών παροξυντικών αιμοσφαιρινουριών mHSC στο προ-αποπτωτικό stress

Πρώιμες μελέτες της ρύθμισης των αποπτωτικών μονοπατιών στη ΝΠΑ συνεισέφεραν στην κατανόηση των παθογενετικών μηχανισμών της νόσου. Αρχικά, υποστηρίχθηκε ότι τα κύτταρα της ΝΠΑ χαρακτηρίζονται από

ελαττωμένους ρυθμούς απόπτωσης και ότι η μεταβολή της μεμβρανικής έκφρασης των πρωτεϊνών GPI επηρεάζει το βαθμό της ενεργοποίησής της.<sup>76</sup> Παρά την ύπαρξη ενδείξεων ότι δεν υφίσταται πλεονέκτημα επιβίωσης του κλώνου ΝΠΑ σε ορισμένα πειραματικά μοντέλα ποντικού,<sup>77</sup> υπήρξαν άλλες μελέτες που ανέδειξαν ότι τα GPI(-) μυελικά κύτταρα στους ασθενείς με ΝΠΑ είναι σχετικά ανθεκτικά στο προ-αποπτωτικό stress.<sup>78-81</sup> Αν η απουσία της έκφρασης των GPI-APs ήταν σημαντική για την ανάπτυξη της ανθεκτικότητας στους αποπτωτικούς μηχανισμούς, τότε οι ασθενείς με ένα μόνο επικρατούντα κλώνο ΝΠΑ θα έπρεπε να εμφάνιζαν μεγαλύτερους ρυθμούς απόπτωσης συγκριτικά με τους ασθενείς που παρουσίαζαν περισσότερους κλώνους. Κάτι τέτοιο, όμως, δεν αποδείχθηκε, καθώς ασθενείς με >90% GPI(-) πολυμορφοπύρρηνα παρουσίαζαν τους ίδιους δείκτες απόπτωσης με ασθενείς που είχαν <40% GPI(-) πολυμορφοπύρρηνα.<sup>79</sup> Έτσι, δύο από τις σχετικές μελέτες κατέληξαν ότι, εφόσον ο βαθμός της ανθεκτικότητας δεν ήταν ανάλογος του μεγέθους του κλώνου, η ανθεκτικότητα στην απόπτωση μάλλον πρέπει να είναι ανεξάρτητη της μετάλλαξης του *PIG-A*.<sup>78,79</sup> Επειδή τα GPI(-)CD34(+) προγονικά κύτταρα παρουσίαζαν παρόμοιο γονιδιακό πρότυπο έκφρασης, καθώς και ρυθμούς πολλαπλασιασμού και επιβίωσης με τα CD34(+) προγονικά κύτταρα από υγιή άτομα, οι μελέτες αυτές κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι το πλεονέκτημα επιβίωσης των GPI(-) κυττάρων προέκυπε από μειωμένη επιβίωση των GPI(+) αρχέγονων κυττάρων σε ένα «εχθρικό» μυελικό μικροπεριβάλλον στη ΝΠΑ, όπου τόσο τα ΝΠΑ όσο και τα φυσιολογικά mHSC βρίσκονται υπό προ-αποπτωτικό stress.<sup>80-82</sup> Πράγματι, πιο πρόσφατες μελέτες έδειξαν ότι τα GPI(+) κύτταρα στο μυελό των ασθενών με ΝΠΑ εκφράζουν αυξημένα επίπεδα υποδοχέα Fas (Fas receptor, CD95, FasR), παρουσιάζοντας έτσι κι αυτά υψηλότερους ρυθμούς απόπτωσης. Αντίθετα, ο ρυθμός απόπτωσης των GPI(-)CD34(+) κυττάρων στη ΝΠΑ δεν διαφέρει από τον αντίστοιχο κυττάρων φυσιολογικών ατόμων.<sup>80</sup> Πιο συγκεκριμένα, οι Chen et al έδειξαν ότι τα GPI(+)CD34(+) κύτταρα ασθενών με ΝΠΑ παρήγαγαν 20–140 φορές λιγότερα σε αριθμό κύτταρα σε σχέση με τα αντίστοιχα φυσιολογικά. Από την άλλη πλευρά, τα εν λόγω κύτταρα εξέφραζαν αυξημένα επίπεδα του υποδοχέα FasR, και κατά συνέπεια παρουσίαζαν υψηλότερους ρυθμούς απόπτωσης, υποδηλώνοντας έτσι ότι η επικράτηση των GPI(-) κυττάρων οφείλεται στην ουσία σε μειονέκτημα ανάπτυξης των GPI(+) mHSCs, όπου συμμετέχει εν μέρει και η αυξημένη ευαισθησία στο προ-αποπτωτικό stress. Άλλωστε, ο ρυθμός απόπτωσης των GPI(-)CD34(+) κυττάρων στη ΝΠΑ είναι όμοιος με τα αντίστοιχα κύτταρα των φυσιολογικών ατόμων.<sup>80</sup> Ωστόσο, δεν αποκλείεται τα GPI(-) προγονικά κύτταρα να παρουσιάζουν ένα εσωτερικό πλεονέκτημα επιβίωσης, λόγω αυξημένης ανθεκτικότητας



στην απόπτωση, το οποίο καθίσταται εμφανές έναντι των φυσιολογικών κυττάρων σε καταστάσεις ανοσολογικής διέγερσης στο μυελό. Έτσι, η ανθεκτικότητα στην απόπτωση μπορεί να λειτουργεί συνεργικά, ως παράγοντας επιλογής και κλωνικής επικράτησης στα πρώιμα στάδια της μυελικής βλάβης.<sup>78</sup> Ακόμη πιο πρόσφατα, δεδομένα *in vitro* πειραματικών μοντέλων ΝΠΑ ανέδειξαν ότι οι μεταλλάξεις του γονιδίου *PIG-A* συμβάλλουν στην κλωνική εξάπλωση μέσω του πλεονεκτήματος επιβίωσης που προσδίδουν στα αιμοποιητικά προγονικά κύτταρα, σε καταστάσεις προ-αποπτωτικού stress.<sup>83</sup>

Προκειμένου 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 συγκεκριμένη παρατήρηση οδήγησε στο συμπέρασμα ότι οι μεταλλάξεις στο γονίδιο *PIG-A* και η επακολουθούσα μείωση της έκφρασης των GPI-AP δεν ενέχονται στους μηχανισμούς ρύθμισης της απόπτωσης στη ΝΠΑ,<sup>79</sup> στους οποίους φαίνεται να συμμετέχουν και άλλοι παράγοντες, όπως τα επίπεδα των διαφόρων κυτταροκινών και άλλων διαλυτών παραγόντων, η έκφραση μορίων της ομάδας bcl-2, οι ανώμαλες αλληλεπιδράσεις μεταξύ των κυττάρων του μικροπεριβάλλοντος του μυελού<sup>84</sup> ή άλλες αλλαγές στη γονιδιακή ή στην πρωτεϊνική έκφραση.<sup>85</sup> Πράγματι, στο μυελό των ασθενών με ΝΠΑ τα πειραματικά δεδομένα δείχνουν ότι η ρύθμιση της αιμοποίησης τόσο σε κυτταρικό επίπεδο όσο και σε επίπεδο κυτταροκινών οδηγεί σε καταστολή της ανάπτυξης, καθώς και σε απόπτωση, όπως αντικατοπτρίζεται από τη μειωμένη παραγωγή IL-2,<sup>86</sup> τα αυξημένα επίπεδα IFN- $\gamma$ <sup>87</sup> και την ευόδωση της έκφρασης αποπτωτικών γονιδίων στα CD34(+) κύτταρα.<sup>88</sup>

Ωστόσο, πρόσφατα πειραματικά δεδομένα από μελέτες της συσχέτισης των διαφόρων κλινικών μορφών της ΝΠΑ με συγκεκριμένους απλοτύπους HLA (human leucocyte antigens) έρχονται να διαλευκάνουν περισσότερο τη συμμετοχή της απόπτωσης στις παθοφυσιολογικές διεργασίες της επιλογής και της εξάπλωσης του παθολογικού κλώνου.<sup>89</sup> Πράγματι, σύμφωνα με τους Nowak et al, ο κύριος μηχανισμός ρύθμισης της απόπτωσης στη ΝΠΑ πυροδοτείται από τη διακοπή της βιοσύνθεσης της GPI στα παθολογικά mHSC, λόγω της μετάλλαξης του γονιδίου *PIG-A*, οδηγώντας στη συσσώρευση ενδιάμεσων μεταβολικών προϊόντων, όπως τα φωσφοϊνοσιτίδια (phosphoinositides, PIs), φωσφορυλιωμένες μορφές της PI. Τα τελευταία μεταφέρονται στην κυτταρική μεμβράνη των GPI(-) κυττάρων μέσω της «πρωτεΐνης μεταφοράς της φωσφατιδυλ-ινοσιτόλης» (phosphatidylinositol transfer protein), μεταβάλλοντας έτσι τη φυσιολογική ισορροπία, όσον αφορά στην περιεκτικότητα

τα της μεμβράνης σε PIs, σε βάρος της φωσφατιδυλοχολίνης (phosphatidyl-choline, PC). Φυσιολογικά, η αναλογία των δύο στη μεμβράνη των φυσιολογικών πολυμορφοκυττάρων είναι δύο φορές σε μέγεθος μεγαλύτερη υπέρ της PC. Η εν λόγω διαταραχή οδηγεί στην ενεργοποίηση της φωσφατιδυλ-ινοσιτόλης ειδικής φωσφολιπάσης D (phosphatidylinositol-specific phospholipase D, PIPLD), της κινάσης της φωσφατιδυλ-ινοσιτόλης 3 (phosphatidylinositol 3-kinase, PI3K) και του εξαρτώμενου από την πρωτεϊνική κινάση B (protein kinase B, PKB ή Akt) μονοπατιού (Akt-dependent pathway), που έχουν σημαντική αντι-αποπτωτική δράση. Μάλιστα, το Akt-μονοπάτι αναστέλλει τους μεταγραφικούς παράγοντες Foxo, η φυσιολογική λειτουργία των οποίων συνίσταται στην ευόδωση του κυτταρικού θανάτου.<sup>10</sup> Έτσι, η φωσφορυλίωση και η αποφωσφορυλίωση των PIs είναι ισχυρά λειτουργικά μονοπάτια στη ρύθμιση της κυτταρικής επιβίωσης και της απόπτωσης,<sup>90</sup> αναδεικνύοντας ότι οι εν λόγω μηχανισμοί διαφέρουν ποικιλοτρόπως ανάμεσα σε ΝΠΑ και φυσιολογικά mHSC.<sup>91</sup>

Μάλιστα, η ανοσοεπικρατής παρουσίαση του επιτόπου της PIPLD από το MHC τάξης I B\*18:01 μόριο, που αντανακλά την αυξημένη ενδοκυττάρια περιεκτικότητα και την ενεργοποίηση του αντι-αποπτωτικού αυτού ενζύμου,<sup>92</sup> ερμηνεύει τον αυξημένο κίνδυνο ΝΠΑ σε άτομα που φέρουν το B\*18:01 αλληλίο, όπως αναφέρθηκε παραπάνω. Παρομοίως, η παρουσία του A\*24:02 αλληλίου προσδίδει προστασία στους φορείς του έναντι της ΝΠΑ, εφόσον υπάρχει ανοσοεπικρατής έκφραση αντιγονικών επιτόπων της πρωτεϊνικής φωσφατάσης σερίνης/θρεονίνης, η οποία έχει συνδεθεί με αυξημένη ενδοκυττάρια περιεκτικότητα του ενζύμου το οποίο επάγει τον κυτταρικό θάνατο.<sup>93</sup> Εν τούτοις, είναι αξιοσημείωτο ότι και οι δύο αυτές πρωτεΐνες με την αντίθετη αποπτωτική ρυθμιστική λειτουργία εξαρτώνται από την ενεργοποίηση της PIPLD από τα PI της μεμβράνης.

Έτσι, είναι σημαντικό να τονιστεί ότι τα μονοπάτια αυτά αλληλεπιδρούν μεταξύ τους, μέσω ευδοτικών ή κατασταλικών, πολύπλοκων όμως μηχανισμών. Σε ένα άλλο παράδειγμα, η πρωτεϊνική φωσφατάση σερίνης/θρεονίνης ενεργοποιείται από την PI3K, η οποία ενεργοποιείται με τη σειρά της από την PIPLD μέσω της ενεργοποίησης του υποδοχέα Edg-3, αναστέλλοντας έτσι την αντι-αποπτωτική δραστηριότητα. Ωστόσο, μέσω του ίδιου μονοπατιού ενεργοποιείται και η PKB, η οποία αυξάνει την ανθεκτικότητα στην απόπτωση.<sup>10</sup>

Κλείνοντας το κεφάλαιο αυτό, έχει γίνει πλέον αντιληπτό ότι ο ρόλος των αποπτωτικών μηχανισμών στη ΝΠΑ είναι συνεργικός, όσον αφορά στην εξάπλωση του παθολογικού κλώνου. Τα πειραματικά δεδομένα δείχνουν ότι τόσο τα φυσιολογικά mHSC όσο και τα παθολογικά mHSC στο μυελό

των ασθενών με ΝΠΑ δέχονται προ-αποπτωτικό stress, με τα δεύτερα να εμφανίζουν μεγαλύτερη ανθεκτικότητα, λόγω κυρίως της αυξημένης δραστηριότητας της PIPLD, εξ αιτίας της συσσώρευσης PIs στην κυτταρική μεμβράνη του PIG-A(-) mHSC. Η ρύθμιση των αποπτωτικών και των αντι-αποπτωτικών αυτών μονοπατιών πραγματοποιείται σε πολλαπλά επίπεδα, με την ύπαρξη μεταξύ τους αλληλεπιδράσεων.

#### 5.5. Η μεμβρανική ανεπάρκεια των GPI-AP ευοδώνει το πλεονέκτημα επιβίωσης του PIG-A(-) mHSC

Με τη μέθοδο της υψηλής ευαισθησίας κυτταρομετρίας ροής, η οποία επιτρέπει την ανίχνευση έως και 0,003% GPI(-) ερυθροκυττάρων ή πολυμορφοπυρήνων στο περιφερικό αίμα, το 70% σχεδόν των ασθενών με AA παρουσιάζει κλώνους ΝΠΑ κατά τη διάγνωση της νόσου.<sup>1,26,28,94,95</sup> Περίπου το 20% των ασθενών που ταξινομούνται ως RA-MDS παρουσιάζουν επίσης «υποκλινική» ΝΠΑ. Οι συγκεκριμένες παρατηρήσεις υποδηλώνουν ότι κάποιοι παθοφυσιολογικοί μηχανισμοί σε κυτταρικό και σε μοριακό επίπεδο, στην παθογένεση της AA και κάποιων περιπτώσεων RA-MDS, ευνοούν την ανάπτυξη των παθολογικών GPI(-) κλώνων. Η υψηλή ανταπόκριση των εν λόγω ασθενών στην ανοσοκατασταλτική θεραπεία (π.χ. συνδυασμός αντιθυμοκυτταρικής σφαιρίνης και κυκλοσπορίνης) υποδηλώνει ότι η «επιλογή» για την ανάπτυξη των κλώνων ΝΠΑ είναι ανοσολογικής φύσης.<sup>1,26,95,96</sup> Αυτές οι παρατηρήσεις αποκτούν και κλινική σημασία, καθώς η παρουσία μικρού πληθυσμού GPI(-) κυττάρων μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως δείκτης ανοσολογικά μεσολαβούμενης μυελικής βλάβης.<sup>25</sup> Ωστόσο, μόνο το 10–15% των εν λόγω ασθενών αναπτύσσει κλινικά ΝΠΑ, αναδεικνύοντας έτσι ότι σε μια μικρή μειοψηφία των ασθενών ο κλώνος του PIG-A(-) mHSC θα μπορέσει να εκπτυχθεί επαρκώς, ώστε να εκδηλωθεί η νόσος κλινικά.

Οι παραπάνω παρατηρήσεις υποδεικνύουν ότι η αιμοποίηση στη ΝΠΑ ρυθμίζεται τουλάχιστον σε δύο βήματα. Κατά το πρώτο βήμα, την «κλωνική επιλογή», η ανεπάρκεια μίας ή περισσότερων GPI-APs, ή ακόμη η ίδια απουσία της GPI από την κυτταρική μεμβράνη, προσδίδει πλεονέκτημα ανάπτυξης ή επιβίωσης σε ένα μικροπεριβάλλον «ειδικού τύπου» μυελικής βλάβης, όπου ανεπαρκεί η φυσιολογική αιμοποίηση. Πρόκειται για μια ανοσολογικά-μεσολαβούμενη διεργασία, όπου σημαντικό ρόλο φαίνεται να διαδραματίζει ο φαινότυπος του mHSC. Το μέγεθος του ελλείμματος στη μεμβράνη του mHSC καθορίζει το πλεονέκτημα επιβίωσής του και το βαθμό συμμετοχής του στην αιμοποίηση.<sup>40,97</sup> Η ύπαρξη «τύπου II» ΝΠΑ κυττάρων σε σχετικά μεγάλο αριθμό ασθενών<sup>98</sup> υποδηλώνει ότι ακόμη και η έκφραση του 10% περίπου των GPI-APs στην κυτταρική μεμβράνη του mHSC

είναι επαρκής συνθήκη για το πλεονέκτημα ανάπτυξης του παθολογικού κλώνου.

Κατά το δεύτερο βήμα, την «κλωνική επέκταση», ένα δεύτερο γενετικό συμβάν προσδίδει πλεονέκτημα επιβίωσης και ανάπτυξης στο παθολογικό mHSC, συνεργικά με την ανεπάρκεια των GPI-AP. Η κλωνική επέκταση συμβαίνει σχετικά αργά στην εξελικτική διεργασία της μετατροπής του «συνδρόμου AA-ΝΠΑ» σε κλινική νόσο. Παρά την επιλογή στο πρώτο βήμα, δεν σημαίνει ότι οι παθολογικοί κλώνοι θα γίνουν και κλινικά εμφανείς. Αντίθετα, η άρση της επιλεκτικής δύναμης οδηγεί στη συρρίκνωση ή στην «εξαφάνιση» του παθολογικού κλώνου, πριν από τη μετατροπή αυτών σε πρωτοπαθή καλοήγη ολιγοκλωνική μυελοπάθεια. Όπως έχει ήδη αναφερθεί, η στενή σύνδεση ανάμεσα στη ΝΠΑ και στην AA στοχοποιεί το ανοσοποιητικό σύστημα ως θεμελιώδη ρυθμιστή των διεργασιών της κλωνικής επιλογής και επικράτησης,<sup>99</sup> όπως αναδεικνύεται από τους αυτοάνοσους παθοφυσιολογικούς μηχανισμούς της απλαστικής αναιμίας.<sup>100</sup>

Πράγματι, σε ένα υποκυτταρικό μυελικό περιβάλλον, CTL εμπλέκονται στη θετική επιλογή του GPI(-) κλώνου.<sup>101</sup> Ωστόσο, έως σήμερα δεν έχει ενοχοποιηθεί κάποια GPI-AP ως πρωτεύων στόχος της ανοσολογικής επίθεσης, ούτε στην παθογένεση της AA ούτε σε αυτή της ΝΠΑ. Παρά τη διαταραχή στη βιοσύνθεση της GPI στα ΝΠΑ mHSC, η μετάφραση των GPI-AP διατηρείται, ενώ, στη συνέχεια, αποσυντίθενται ενδοκυττάρια.<sup>102</sup> Έτσι, αντιγονικοί επίτοποι της κάθε GPI-AP εκτίθενται εξωκυττάρια από τα μόρια MHC, διατηρώντας την ανοσογονικότητά τους, ακόμη κι αν η πρωτεΐνη δεν βρίσκεται ακέραια στην κυτταρική μεμβράνη. Από την άλλη πλευρά, η αναστολή του βιοσυνθετικού μονοπατιού της GPI στα ΝΠΑ κύτταρα μεταβάλλει το ρυθμό ανανέωσης (“turnover rate”) των φωσφορυλιωμένων μορφών της PI στις κυτταρικές μεμβράνες, επιδρώντας στην κυτταρική επιβίωση και στο ρυθμό της απόπτωσης των κυττάρων.<sup>10</sup>

Εναλλακτικά, η GPI-AP θα μπορούσε να έχει ρυθμιστικό ρόλο (π.χ. ως συνδιεγερτικό/συνεπικουρικό μόριο), με την απουσία της να προστατεύει τον PIG-A(-) κλώνο από την ανοσολογική επίθεση.<sup>99,103–105</sup> Αρχικά, ο «εμφανής» υπεύθυνος παράγοντας στην υπόθεση αυτή ήταν η απουσία του GPI-συνδεόμενου LFA-3 από την κυτταρική μεμβράνη των ΝΠΑ mHSC συνδετικού μορίου της γλυκοπρωτεΐνης CD2 των CTL,<sup>106,107</sup> με αποτέλεσμα τα τελευταία να αδυνατούν να συνδεθούν στα κύτταρα-στόχους και ο παθολογικός κλώνος να διαφεύγει της κυτταροτοξικής τους δράσης. Ένα άλλο αυτο-αντιγόνο στόχος, το οποίο έχει ενοχοποιηθεί για τη μυελική απλασία σε ασθενείς με AA και με παρουσία πληθυσμών ΝΠΑ, είναι η diazepam-binding inhibitor-related protein 1 (DRS-1).<sup>106</sup> Πράγματι, αν το αντιγόνο-στόχος της

κυτταρικής<sup>99</sup> ή της χυμικής ανοσίας<sup>108</sup> ήταν κάποια GPI-AP, τα PIG-A(-) mHSCs θα μπορούσαν να αποκτήσουν πλεονέκτημα επιβίωσης. Ωστόσο, διαφεύγοντας της ανοσολογικής επίθεσης ο PIG-A(-) κλώνος, αν δεν εξαπλωθεί και δεν επικρατήσει στο μυελό, η κλωνική φύση της νόσου δεν θα εκδηλωθεί κλινικά.

Συμπληρωματικά, οι Hanaoka et al πρότειναν παρόμοιους παθογενετικούς μηχανισμούς προκειμένου να ερμηνεύσουν την επιλεκτική επιβίωση του κλώνου ΝΠΑ στην ΑΑ, αποδίδοντάς την στην απουσία GPI-συνδεδεμένων μορίων, τα οποία εκφράζονται όταν τα κύτταρα βρίσκονται σε καταστάσεις stress, και τα οποία λειτουργούν ως υποδοχείς για τον T- και NK-μεσολαβούμενο κυτταρικό θάνατο.<sup>103-105</sup> Οι πρωτεΐνες αυτές ονομάζονται ULBPs (ULBP1, ULBP2, ULBP3) και χρησιμεύουν –μεταξύ άλλων– ως υποδοχείς της γλυκοπρωτεΐνης UL 16 του ανθρώπινου στελέχους του κυτταρομεγαλοϊού (human cytomegalovirus UL 16 glycoprotein). Ανήκουν στην ομάδα των stress-inducible NK group 2 member D (NKG2D) συνδεδετικών μορίων. Η επιβίωση ανθρώπινων K562 λευχαιμικών κυττάρων έναντι της δράσης των NK κυττάρων, μετά από απόκτηση μεταλλάξεων του PIG-A *in vitro*,<sup>109</sup> καθώς και η ανοσοεπιλογή των GPI(-) κυττάρων ποντικού σε ένα ανάλογο πειραματικό μοντέλο, με CTLs, ενισχύουν σημαντικά τη σχετική υπόθεση.<sup>99</sup> Μάλιστα, μελέτες έχουν αναδείξει το κοινό πρότυπο έκφρασης των NKG2D συνδεδετικών μορίων στα πολυμορφοπύρρηνα και στα μυελικά κύτταρα των ασθενών με ΝΠΑ, ΑΑ και MDS. Παράλληλα, η χρήση αντισωμάτων κατά του υποδοχέα NKG2D βελτίωσε σημαντικά το σχηματισμό αιμοποιητικών αποικιών *in vitro*, υποδηλώνοντας εμμέσως ότι στη δράση των αυτόλογων λεμφοκυττάρων έναντι των mHSC συμμετέχουν μεταξύ άλλων και τα μόρια NKG2D. Επιπλέον, η κλινική πορεία των ασθενών με ΝΠΑ και ΑΑ ανέδειξε στενή θετική συσχέτιση ανάμεσα στην έκφραση των συγκεκριμένων συνδεδετικών μορίων και την ανταπόκριση στην ανοσοκατασταλτική θεραπεία, αναδεικνύοντας τη NKG2D-μεσολαβούμενη ανοσία ως συνιστώσα διεργασία στη μυελική ανεπάρκεια της ΝΠΑ, καθώς και των σχετιζόμενων με αυτή μυελοπαθειών. Ωστόσο, παραμένει αδιευκρίνιστος ο λόγος της ανθεκτικότητας πολλών περιπτώσεων ΝΠΑ στην ανοσοκατασταλτική θεραπεία, υποδεικνύοντας τη συμμετοχή και άλλων υποκείμενων μηχανισμών, μη ανοσολογικών (όπως π.χ. αποπτωτικών).

Περαιτέρω, μελέτες έδειξαν ότι κάποιες από τις GPI-AP έχουν αρνητικό ρυθμιστικό ρόλο στην κυτταρική αύξηση, δρώντας, είτε άμεσα είτε έμμεσα, ανασταλτικά στη διαδικασία της φυσιολογικής αιμοποίησης. Χαρακτηριστικό παράδειγμα είναι η γλυπικάνη 3 (glypican 3), μέλος μιας μεγάλης οικογένειας GPI-AP (glypican family of heparin sulfate proteoglycans). Οι πρωτεΐνες αυτές, που απαντώνται

σε όλους τους ιστούς, περιλαμβάνονται και του μυελού των οστών,<sup>110,111</sup> ελέγχουν την κυτταρική αύξηση και τη διαφοροποίηση.<sup>112-114</sup> Οι γλυπικάνες, μαζί με άλλες GPI-AP,<sup>113,115,116</sup> ρυθμίζουν τη δράση του TGF-β (transforming growth factor beta)<sup>117</sup> και άλλων ανασταλτικών κυτταροκινών της αιμοποίησης, όπως η IFN-γ, η φλεγμονώδης πρωτεΐνη των μακροφάγων 1α (macrophage inflammatory protein-1α) και ο TNF-α, μόρια που έχουν σημαντικό ρόλο στην παθοφυσιολογία της ΑΑ.<sup>118,119</sup> Μάλιστα, σε *in vitro* μελέτες σε μυελικά CFC ασθενών με ΝΠΑ αναδείχθηκε ότι τα κύτταρα του παθολογικού κλώνου είναι λιγότερο ευαίσθητα στη δράση των εν λόγω ανασταλτικών κυτταροκινών.<sup>120</sup>

Έτσι, η έλλειψη από την επιφάνεια των PIG-A(-) mHSC των GPI-AP που διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο ως υποδοχείς για αρνητικούς ρυθμιστές της κυτταρικής αύξησης ή για ανασταλτικές κυτταροκίνες<sup>121,122</sup> υποδεικνύει ότι το πλεονέκτημα επιβίωσης και ανάπτυξης των παθολογικών κλώνων είναι έμμεσο αποτέλεσμα της μετάλλαξης του PIG-A, και όχι άμεσα εσωτερικό πλεονέκτημα, το οποίο θα σηματοδοτούσε και την κακοήγη εξαλλαγή του κλώνου, όπως συμβαίνει στην περίπτωση των πρωτο-ογκογονιδίων.

## 5.6. Ο ρόλος των T-λεμφοκυττάρων στην αιμοποίηση της νυκτερινής παροξυντικής αιμοσφαιρινουρίας

Εφόσον η βιοσύνθεση της GPI διαταράσσεται στο επίπεδο του mHSC, ο καθοριστικός ρόλος των CTL και των NK κυττάρων στην παθογένεση της μυελικής βλάβης στην ΑΑ,<sup>22,118,123</sup> όπως περιγράφηκε στις παραπάνω γραμμές, αναδεικνύει ότι στη μυελική ανεπάρκεια που χαρακτηρίζει τη νόσο συμμετέχει και ένας μηχανισμός ανοσολογικής επίθεσης έναντι των GPI(+) κυττάρων, της οποίας τα GPI(-) κύτταρα διαφεύγουν. Διάφορα αντιγόνα-στόχοι μέσω πολύπλοκων μηχανισμών διεγείρουν την κυτταρική ανοσία, η οποία οδηγεί σε επιλεκτική εξάλωση συγκεκριμένων T-λεμφοκυτταρικών κλώνων και σε βλάβη των προγονικών κυττάρων, είτε άμεσα (μέσω των CTL) είτε έμμεσα (μέσω ρυθμιστικών και βοηθητικών T-κυττάρων), λόγω της παραγωγής ανασταλτικών κυτταροκινών για το mHSC, όπως η INF-γ και ο TNF-α.<sup>124-126</sup>

Κυκλοφορούντα και μυελικά CTL έχουν ανιχνευτεί *in vivo* σε ασθενείς με ΑΑ, ενώ η ανασταλτική στην αιμοποίηση δράση τους έχει τεκμηριωθεί *in vitro*.<sup>88,127-131</sup> Αν και η κυτταροτοξική τους δράση μπορεί να στρέφεται έναντι και άλλων «αθών» ομόλογων κυττάρων και ιστών του οργανισμού, υπάρχουν ενδείξεις ότι ο βασικός μηχανισμός καταστροφής των mHSCs είναι η απόπτωση. Πράγματι, η ανάλυση της αλληλουχίας RNA των CD34(+) προγονικών κυττάρων αποκάλυψε την αυξημένη έκφραση προ-αποπτωτικών γονιδίων σε σύγκριση με τα αντίστοιχα GPI(-).<sup>80,81,132</sup> Μάλιστα, όταν

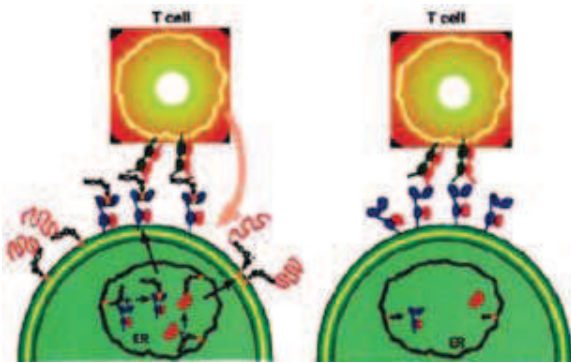
CD34(+) κύτταρα από φυσιολογικά άτομα εκτέθηκαν στη δράση της IFN- $\gamma$ , παρατηρήθηκαν παρόμοιες μεταβολές στον εκφραζόμενο γονιδιακό φαινότυπο<sup>88</sup> με τον αντίστοιχο των GPI(+) κυττάρων των ασθενών με ΝΠΑ, υποδηλώνοντας ότι τα τελευταία εκτίθενται στην επίδραση της IFN- $\gamma$ .

Όπως στην ΑΑ, έτσι και στη ΝΠΑ υπάρχουν σαφείς ενδείξεις διαταραχής της ανοσολογικής ομοιοστάσης του οργανισμού. Ολιγοκλωνικότητα της δεξαμενής των Τ-λεμφοκυττάρων<sup>133,134</sup> και ανοσοεπικρατείς παθολογικοί CTL κλώνοι έχουν ανιχνευτεί στους περισσότερους ασθενείς,<sup>130,131,135,136</sup> ενώ ορισμένες φορές λαμβάνουν τα χαρακτηριστικά LGL (large granular lymphocytes) υπερπλασίας.<sup>137</sup> Μάλιστα, φαίνεται ότι τα συγκεκριμένα εκτελεστικά κύτταρα υπερεκφράζουν ενεργοποιημένες ισομορφές της υπεροικογένειας ανασταλτικών υποδοχέων (inhibitory receptor superfamily, IRS), που έχουν εξαιρετικά ισχυρή κυτταροτοξική δράση.

Αναλυτικότερα, τα πλέον πρόσφατα δεδομένα αναδεικνύουν τον παθογενετικό ρόλο συγκεκριμένων υποτύπων CTL,<sup>131</sup> κυρίως την επικράτηση large granular Τ-λεμφοκυττάρων (T-LGL) με CD3(+)/CD8(+)/CD57(+) ανοσοφαινότυπο.<sup>130,133,134</sup> Αυτά τα κύτταρα παρουσιάζουν μια ποιοτική ανωμαλία στην έκφραση μορίων των IRS, περιλαμβανομένου του killer immunoglobulin-like receptor (KIR). Μάλιστα, στους ασθενείς με ΝΠΑ οι περισσότεροι IRS ανήκουν σε ενεργοποιημένους ισότυπους, ενώ στα φυσιολογικά άτομα ανήκουν στον ανασταλτικό ισότυπο.<sup>138</sup> Επιπρόσθετα, η παρουσία ολιγοκλωνικών CD8(+)/CD57(+) Τ-λεμφοκυττάρων φαίνεται να είναι χαρακτηριστική για τους ασθενείς με ΝΠΑ, σε συνδυασμό με το γεγονός ότι τουλάχιστον στα δύο τρίτα των ασθενών τα εν λόγω Τ-λεμφοκύτταρα παρουσιάζουν υψηλή ομολογία στη γονιδιακή αλληλουχία του Τ-κυτταρικού υποδοχέα  $\beta$  (T-cell receptor  $\beta$ , TCR- $\beta$ ).<sup>135</sup> Το γεγονός αυτό μαρτυρά ότι η υποκείμενη ανοσολογική διεργασία στους συγκεκριμένους ασθενείς έχει κοινό ή παρόμοιο, τουλάχιστον, αντιγόνο-στόχο. Ακόμη πιο πρόσφατα, οι Nyland et al έδειξαν ότι οι ασθενείς με σύνδρομο μυελικής ανεπάρκειας, όπως η ΝΠΑ, η ΑΑ και το MDS, έχουν αυξημένα επίπεδα του BA21.1 IgG αντισώματος –αντίσωμα έναντι του αντιγονικού επιτόπου BA21 πεπτιδίου του HTLV-1 (human T-cell leukemia virus 1)– όπως οι ασθενείς με λευχαιμία LGL, των οποίων τα λευχαιμικά κύτταρα τυπικά εμφανίζουν ανοσοφαινότυπο CD3(+)/CD8(+)/CD57(+)/DR(+), με κλωνική αναδιάταξη του TCR. Τα σχετικά ευρήματα αντικατοπτρίζουν εμμέσως την κοινή παθογενετική οδό της μυελικής ανεπάρκειας σε αυτές τις αιματολογικές νόσους.<sup>29</sup>

Το αντιγόνο-στόχος πιθανόν να είναι είτε κάποια πρωτεΐνη GPI-συνδεόμενη, είτε το ίδιο το μόριο ή κάποιο συστα-

τικό της «άγκυρας» GPI. Όπως είναι γνωστό, το προϊόν του *PiG-A* είναι μια ενδοκυττάρια πρωτεΐνη που μετατρέπεται σε αντιγονικό μόριο, εφόσον μεταβολικά παράγωγα που προκύπτουν κατά τη μετα-μεταφραστική ενδοκυττάρια οδό επεξεργασίας της ή κατά την αποδόμησή της εκτεθούν στα CTL, μέσω ενός μορίου HLA τάξης A, B, C<sup>30</sup> πάνω στη μεμβράνη ενός mHSC. Το γεγονός, λοιπόν, ότι οι ασθενείς με ΝΠΑ, που παρουσιάζουν σε σημαντικό βαθμό κοινές ομόλογες αλληλουχίες του TCR- $\beta$  των CTL, δεν εμφανίζουν ομοιότητα στα αλληλόμορφα HLA-A και HLA-B, υποδεικνύει ότι το αντιγόνο-στόχος του εν λόγω Τ-κυτταρικού πληθυσμού δεν είναι πεπτιδίο. Εφόσον μάλιστα η GPI είναι μια πρωτεΐνη που εκφράζεται σε όλους τους ιστούς,<sup>139</sup> η ανοσολογική αυτή επίθεση δεν περιορίζεται μόνο στον αιμοποιητικό ιστό. Έχει αποδειχθεί ότι τα συνδεδεμένα με τη  $\beta$ 2-μικροσφαιρίνη CD1 μόρια ( $\beta$ 2-microglobulin-associated CD1 molecules) (CD1a, CD1b, CD1c, CD1d), τα οποία εκφράζονται στην επιφάνεια των αντιγόνο-παρουσιαστικών κυττάρων (antigen-presenting cells, APC), παρουσιάζουν λιπίδια ή γλυκολιπίδια στα Τ-λεμφοκύτταρα.<sup>140</sup> Ειδικά, οι CD1d-συνδεδεμένες, ειδικές για τα γλυκολιπίδια, Τ-κυτταρικές αντιδράσεις (CD1d-restricted, glycolipid-specific T cell responses) φαίνεται να εμπλέκονται στην παθογένεση των αυτοάνοσων νοσημάτων,<sup>141</sup> της ανοσίας κατά ενδοκυττάρων παθογόνων<sup>142</sup> και συγκεκριμένων τύπων καρκίνου.<sup>143</sup> Σημαντικές ενδείξεις ότι ενδεχομένως να ενέχονται και στον παθογενετικό μηχανισμό της ΝΠΑ προκύπτουν και από το γεγονός ότι το αντίστοιχο μόριο CD1d του ποντικού περιέχει την GPI στο σχηματισμό του,<sup>144</sup> ενώ η GPI του παρασίτου φαίνεται να είναι ο στόχος της Τ-κυτταρικής ανοσίας στην ελονοσία των ποντικών.<sup>145</sup> Προς επιβεβαίωση της παραπάνω υπόθεσης, οι Gargiulo et al έδειξαν με πειραματικά δεδομένα σε ασθενείς με ΝΠΑ τη σημαντική παρουσία CD8(+) Τ-κυττάρων αντιδραστικών έναντι APC, τα οποία φέρουν την GPI, σε σύγκριση με φυσιολογικά άτομα. Αναλύοντας τον TCR- $\alpha$  (T-cell receptor  $\alpha$ ) αυτών των GPI-ειδικών Τ-λεμφοκυττάρων, μια αμετάβλητη αλληλουχία TCRVa21 βρέθηκε σε υψηλή συχνότητα, υποδηλώνοντας ότι ένας GPI-specific CD1d-restricted Τ-κυτταρικός πληθυσμός συμμετέχει στην παθογένεση της μυελικής ανεπάρκειας στη ΝΠΑ.<sup>146</sup> Έτσι, υπάρχουν ισχυρές ενδείξεις ότι η ίδια η «άγκυρα» GPI είναι ο στόχος για τα αυτοαντιδραστικά CTLs (εικ. 3). Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, η «άγκυρα» GPI δεν εκφράζεται μόνο στον αιμοποιητικό ιστό, έτσι ώστε να υπάρχει δυνατότητα να πλήττονται και άλλα συστήματα, σε περίπτωση που αυτή είναι το αντιγόνο-στόχος. Αξίζει να σημειωθεί ότι, μεταξύ άλλων ιστών, το CD1d εκφράζεται στο μυϊκό χιτώνα των ενδοκοιλιακών αγγείων.<sup>147</sup> Συνεπώς, η υπόθεση αυτή συμβάλλει στην ερμηνεία της παθογένεσης των φλεβικών θρομβώσεων και ειδικά την αυξημένη εμφάνισή τους σε θέσεις όπως ενδοκοιλιακά



**Εικόνα 3.** Πιθανός ρόλος των *GPI-specific, CD1d-restricted* T-λεμφοκυττάρων στην παθογένεια της νυκτερινής παροξυντικής αιμοσφαιρινουρίας. Σε αυτό το υποθετικό μοντέλο, τα GPI(+) mHSCs καταστρέφονται από τον υποπληθυσμό των T-κυττάρων (αριστερά). Τα GPI(-) mHSCs διαφεύγουν της T-μεσολαβούμενης ανοσολογικής επίθεσης (δεξιά), εξαπλώνονται και επικρατούν της φυσιολογικής αιμοποίησης σε άλλοτε άλλο βαθμό (από Karadimitris και Luzzatto, τροποποιημένο).<sup>134</sup>

ή ενδοεγκεφαλικά.<sup>13</sup> Σίγουρα, η περαιτέρω διαλεύκανση των ανοσολογικών διεργασιών που μεσολαβεί το σχετικό μόριο και άλλα παρόμοια τάξης αντιγονοπαρουσιαστικά μόρια υπόσχεται πολλά στη βαθύτερη κατανόηση των παθοφυσιολογικών μηχανισμών της ΝΠΑ.

Τέλος, σχετικά πρόσφατα αποδείχθηκε σε μοντέλα έκτοπης και μεταμοσχευτικής αιμοποίησης ότι η εξαρτώμενη από σύνδεση (contact-dependent) αλληλεπίδραση ανάμεσα στα CD4(+)CD25(+)FoxP3(+) ρυθμιστικά T-λεμφοκύτταρα (regulatory T lymphocytes, Treg) και στα προγονικά αιμοποιητικά κύτταρα είναι απαραίτητη για τη ρύθμιση της αιμοποίησης και εξαρτάται από τα MHC τάξης II, αναδεικνύοντας έτσι το θεμελιώδη ρυθμιστικό ρόλο των πεπτιδικών επιτόπων, ειδικών για τον αιμοποιητικό ιστό, που προέρχονται από τα mHSCs, καθώς και το βαθμό έκφρασης των MHC, για τη διαδικασία της αιμοποίησης.<sup>148,149</sup> Η κατασταλτική δράση των Treg στην αιμοποίηση πραγματοποιείται στο επίπεδο των mHSCs και επιτυγχάνεται μέσω της αλληλεπίδρασης με γειτονικά CD4(+) T βοηθητικά κύτταρα (T-helper cells, Th), επάγοντας μεταξύ άλλων τη μειωμένη παραγωγή της IL-2 και την αυξημένη παραγωγή IFN-γ.<sup>86-88</sup> Έτσι, προάγεται η απόπτωση στο επίπεδο των CD34(+) κυττάρων, ενώ επάγεται περαιτέρω η έκφραση των γονιδίων MHC τάξης I και II, ενισχύοντας με αυτόν τον τρόπο την παθογενετική σύνδεση ανάμεσα στα εν λόγω μόρια και στη ΝΠΑ.<sup>10</sup> Αν και το ακριβές «ιστικό ερέθισμα» που οδηγεί στη μυελική απλασία στη ΝΠΑ δεν έχει διευκρινιστεί, τα πειραματικά δεδομένα<sup>150,151</sup> υποδηλώνουν ότι η διέγερση των Treg είναι αποτέλεσμα της υπερέκφρασης των μορίων MHC τάξης II στα ΝΠΑ mHSCs, σε συνδυασμό με το ισχυρό αυτόλογο σήμα από την «υπέρμετρη» ανοσοπαρουσίαση αυτοαντιγόνων στους υποδοχείς των συγκεκριμένων κυττάρων.

### 5.7. Σύνδεση των αντιγόνων MHC με την παθογένεση της νυκτερινής παροξυντικής αιμοσφαιρινουρίας

Ο ρόλος των ανοσολογικών μηχανισμών στην παθογένεση της ΝΠΑ ενισχύεται από τη συσχέτισή της με συγκεκριμένα MHC γονίδια και απλότυπους.<sup>35</sup> Έτσι, έχει αναδειχθεί μεγαλύτερη συχνότητα του HLA-DR2 φαινότυπου στα πολυμορφοπύρνα των ασθενών με ΝΠΑ, σε σύγκριση με τα φυσιολογικά άτομα. Το εν λόγω εύρημα συσχετίστηκε κλινικά με μυελική ανεπάρκεια, «αιμολυτική» ΝΠΑ και ΑΑ με κλώνους ΝΠΑ, αλλά όχι με ΑΑ χωρίς κλώνους.<sup>35</sup> Ο DRB1\*15:01 γονότυπος και ο DRB1\*15:01-DQA1\*01:02-DQB1\*06:02 απλότυπος απαντώνται επίσης συχνά σε ασθενείς με ΝΠΑ.<sup>152,153</sup> Σε μια ιταλική μελέτη σε ασθενείς με ΝΠΑ ανευρέθηκε αυξημένη συχνότητα του B\*14:02-Cw\*08:02 απλότυπου, υποδεικνύοντας το ρόλο των γονιδίων MHC τάξης I, τουλάχιστον σε ορισμένους υπότυπους ΝΠΑ.<sup>153</sup> Οι Nowak et al συσχέτισαν την παρουσία του MHC τάξης I B\*18:01 αλληλίου με την εμφάνιση «συνδρόμου ΑΑ-ΝΠΑ», ενώ το αλληλίο A\*24:02 διαδραματίζει προστατευτικό ρόλο.<sup>89,154</sup>

Τα γονίδια MHC παρουσιάζουν ισχυρή διαταραχή ισορροπίας σύνδεσης (linkage disequilibrium, LD, η μη τυχαία σύνδεση ανάμεσα σε δύο ή περισσότερα αλληλόμορφα γονίδια, έτσι ώστε συγκεκριμένοι συνδυασμοί αλληλόμορφων γονιδίων είναι πιθανό να συμβαίνουν πιο συχνά πάνω στο ίδιο χρωμόσωμα). Έτσι, τα αλληλόμορφα τους σχηματίζουν σταθερά καθορισμένες δομές, γνωστές ως «προγονικοί απλότυποι» (ancestral haplotypes), που κληρονομούνται ανάμεσα στις γενεές. Κατ' αυτόν τον τρόπο, η βάση της επιλεκτικής ανάπτυξης των παθολογικών κλώνων στην αιμοποίηση της ΝΠΑ είναι πολυγονιδιακή, ισχυρά συνδεδεμένη με την LD, καθοριζόμενη από γονίδια στενά συνδεδεμένα με τους συγκεκριμένους απλότυπους.

Όσον αφορά στα γονίδια που εδράζονται στο σύμπλεγμα MHC, μόνο τα HLA τάξης I και II έχουν ενοχοποιηθεί για την παθογένεση της ΝΠΑ, έως σήμερα. Τα διακριτά πρότυπα συσχέτισης του συνδρόμου ΑΑ-ΝΠΑ και της *de novo* ΝΠΑ με συγκεκριμένα τάξης I και II γονίδια ομολογούν την παρουσία περισσότερων του ενός ενεργών μονοπατιών στην επιλογή του παθολογικού κλώνου.<sup>89</sup> Στους πλέον σημαίνοντες μηχανισμούς περιλαμβάνονται η απορρυθμισμένη ανοσο-επαγρύπνηση των T-κυττάρων έναντι των μορίων MHC τάξης II στην επιφάνεια των mHSC,<sup>150,151</sup> καθώς και η διαταραχή της απόπτωσης.<sup>76,78</sup>

Πολλαπλοί υποθετικοί μηχανισμοί έχουν προταθεί για τη συσχέτιση των αντιγόνων MHC με τα διάφορα νοσήματα. Εκτός από πεπτιδία προερχόμενα από παθογόνους μικροοργανισμούς, πολλοί πεπτιδικοί επίτοποι, τμήματα φυσιολογικών αυτόλογων πρωτεϊνών ειδικά για κάθε ιστό

και προερχόμενα από το ενδοκυττάριο διαμέρισμα, παρουσιάζονται επιτυχώς στην κυτταρική μεμβράνη μέσω των μορίων *MHC* τάξης I και II.<sup>155</sup> Πρόκειται για συστατικά πρωτεϊνών με υψηλό κυτταρικό turnover, τα οποία σχηματίζουν *in vivo* ειδικά για την κυτταρική σειρά πεπτιδικά αντιγονικά «αποτυπώματα», εξαρτώμενα από την αποδόμηση των πρωτεϊνών.<sup>92</sup> Μετά από την επιλογή στο θύμο και την ωρίμανση των θυμοκυττάρων,<sup>156</sup> τα εν λόγω αυτοπεπτιδία μπορούν να αναγνωριστούν ειδικά από τα *MHC* τάξης II-εξαρτώμενα Treg,<sup>149</sup> και ιδιαίτερα από τα *MHC* τάξης I-εξαρτώμενα CD8+ αθώα T-λεμφοκύτταρα, των οποίων ο υποδοχέας TCR εμφανίζει χαμηλή/ενδιάμεση συγγένεια προς το σύμπλεγμα *MHC*-πεπτιδίου.<sup>157</sup>

Μάλιστα, κεντρική θέση στην αυτο-αναγνώριση κατέχει η παρουσίαση των εν λόγω αυτοπεπτιδίων στα Treg. Προέρχονται από θυμικά κύτταρα, τα οποία υπόκεινται στην αναγνώριση του συμπλέγματος *MHC*-αυτοπεπτιδίου στην επιφάνεια των θυμικών APC.<sup>156</sup> Η παρουσίαση αυτοπεπτιδίων μέσω των μορίων *MHC* συμμετέχει ενεργά στην επικοινωνία μεταξύ των κυττάρων του ανοσοποιητικού.<sup>10</sup> Επιπλέον, τα πρώιμα mHSC χαρακτηρίζονται από υψηλή μεμβρανική έκφραση των μορίων *MHC* τάξης II,<sup>10</sup> αντανακλώντας το σημαντικό ρυθμιστικό ρόλο τους στην αιμοποίηση μέσω του συμπλέγματος Treg TCR-αυτοπεπτιδίου-*MHC* τάξης II, ανεξαρτήτως ανοσολογικών και αυτοάνοσων μηχανισμών.

Όσον αφορά στους ασθενείς με ΝΠΑ φορείς του *DRB1\*15:01*, το ισχυρό αυτόλογο σήμα από την ευρεία παρουσίαση αυτοπεπτιδίων τάξης II μέσω του μορίου αυτού, σε συνδυασμό με την υψηλή έκφραση των μορίων *MHC* στα παθολογικά ΝΠΑ mHSC, ενεργοποιεί αποτελεσματικά το Treg-μεσολαβούμενο κατασταλτικό μονοπάτι της αιμοποίησης.<sup>86</sup> Μάλιστα, στους ασθενείς με ΝΠΑ το *DQB1\*06:02* αλληλίο βρίσκεται σε απόλυτη διαταραχή ισορροπίας σύνδεσης με το *DRB1\*15:01*, με αποτέλεσμα στους ασθενείς με *DQB1\*06:02-DRB1\*15:01* απλότυπο το αυτόλογο σήμα να είναι πιο ισχυρό όσον αφορά στην ενεργοποίηση των Treg, σε σύγκριση με τους *DRB1\*15:01* φορείς με οποιοδήποτε εναλλακτικό *DQB1* αλληλίο.<sup>10,154</sup> Συνεπώς, οι σχετικές παρατηρήσεις επιβεβαιώνουν το μοντέλο της επικρατούς παρουσίασης αυτοπεπτιδίων μέσω μορίων *MHC* τάξης II και της υπερέκφρασης μορίων τάξης II στα HSC, που οδηγούν στην ενεργοποίηση της κατασταλτικής δράσης των Treg έναντι της αιμοποίησης.<sup>10</sup> Η αλληλεπίδραση με γειτονικά CD4(+) T-βοηθητικά κύτταρα (T-helper cells, Th) οδηγεί σε μειωμένη παραγωγή IL-2.<sup>86</sup> Κατά συνέπεια, τόσο το μυελικό κυτταρικό δίκτυο όσο και το δίκτυο των κυτταροκινών ρυθμίζεται ανασταλτικά ως προς την κυτταρική αύξηση, ενώ, παράλληλα, η αυξημένη παραγωγή IFN- $\gamma$ <sup>87</sup> διεγείρει την ενεργοποίηση διαφόρων αποπτωτικών γονιδίων στα CD34(+) κύτταρα.<sup>88</sup> Μάλιστα,

η υπέρμετρη παραγωγή IFN- $\gamma$  ενισχύει την έκφραση των γονιδίων *MHC* τάξης I και II, τονίζοντας την παθογενετική σύνδεση ανάμεσα στα μόρια *MHC* και τη ΝΠΑ.<sup>10</sup>

Όπως έχει ήδη περιγραφεί λεπτομερέστερα σε προηγούμενη ενότητα, ο αυξημένος κίνδυνος εμφάνισης ΝΠΑ σε φορείς του *B\*18:01* αλληλίου ερμηνεύεται από την αυξημένη ενδοκυττάρια περιεκτικότητα και ενεργοποίηση της PIPLD, ενός αντι-αποπτωτικού ενζύμου του οποίου η ενδοκυττάρια ενεργοποίηση ασκεί προστατευτικό ρόλο στα mHSC. Η ανοσοεπικρατής παρουσίαση των αντιγονικών επιτόπων της PIPLD από το *MHC* τάξης I *B\*18:01* μόριο είναι το μεμβρανικό αντίκτυπο των διεργασιών αυτών στο εσωτερικό του κυττάρου.<sup>92</sup> Με παρόμοιο μηχανισμό, η προστασία που παρέχει το *A\*24:02* αλληλίο έναντι της ΝΠΑ εδράζεται στην ανοσοεπικρατή παρουσίαση αντιγονικών επιτόπων της πρωτεϊνικής φωσφατάσης σερίνης/θρεονίνης, η οποία έχει συνδεθεί με αυξημένη ενδοκυττάρια περιεκτικότητα του ενζύμου το οποίο επάγει τον κυτταρικό θάνατο.<sup>93</sup> Οι εν λόγω δύο πρωτεΐνες, αν και παρουσιάζουν αντιδιαμετρικά αντίθετη ρυθμιστική αποπτωτική λειτουργία, εξαρτώνται εξ ίσου από την ενεργοποίηση της PIPLD από τα PI της μεμβράνης. Η ενεργοποίηση των αντι-αποπτωτικών bcl2-σχετιζόμενων A1 και Mcl-1 πρωτεϊνών από τα PI έχει συνδεθεί με αυξημένη έκφραση των γονιδίων τους στα ΝΠΑ κύτταρα.<sup>158</sup> Αντίθετα, αν και πεπτιδικοί επίτοποι του BAX inhibitor-1 παρουσιάζονται στο πλαίσιο του *A\*24:02* μορίου, δεν έχει διαπιστωθεί κάποια συσχέτιση με τα διαφορετικά επίπεδα PI μεταξύ των ΝΠΑ και των φυσιολογικών κυττάρων.<sup>78</sup>

Η παρουσία πεπτιδικών τμημάτων ενεργοποιημένων ενδοκυττάρων ενζύμων, στο πλαίσιο των σχετιζόμενων με τη ΝΠΑ μορίων *MHC* τάξης I, προέρχεται από τη δεξαμενή του πρωτεύματος κατά τη συνδεσμολογία των συγκεκριμένων μορίων στο ενδοπλασματικό δίκτυο. Με αυτόν τον τρόπο, η συσχέτιση των μορίων *MHC* τάξης I με την εμφάνιση του «συνδρόμου AA-ΝΠΑ» πολύ πιθανόν να απορρέει από την αυξημένη παρουσία ομόλογων πεπτιδίων στο ενδοπλασματικό δίκτυο των ΝΠΑ mHSC σε σύγκριση με τα φυσιολογικά mHSC, καθώς επίσης και στην υψηλότερη συγκριτικά έκφραση των γονιδίων *MHC* τάξης I στα παθολογικά mHSC, ενισχύοντας τη συγγένεια της κυτταρικής αναγνώρισης.<sup>10</sup> Έτσι, όπως είναι γνωστό, κατά την αρνητική κεντρική επιλογή στο θύμο αδένια, μόνο τα T-λεμφοκύτταρα με υποδοχέα χαμηλής/ενδιάμεσης συγγένειας διαφεύγουν και απελευθερώνονται στην περιφέρεια, όπου θα αποτελέσουν τα «αθώα» CD8(+) T-λεμφοκύτταρα. Η ισχυρή όμως ανοσοπαρουσίαση ειδικών αυτοπεπτιδίων σε συνδυασμό με την αυξημένη έκφραση των μορίων *MHC* τάξης I αυξάνει τη συγγένεια mHSC/CD8 πλησίον του ουδού ενεργοποίησης. Κατόπιν, τα εν λόγω υπο-ενεργοποιημένα

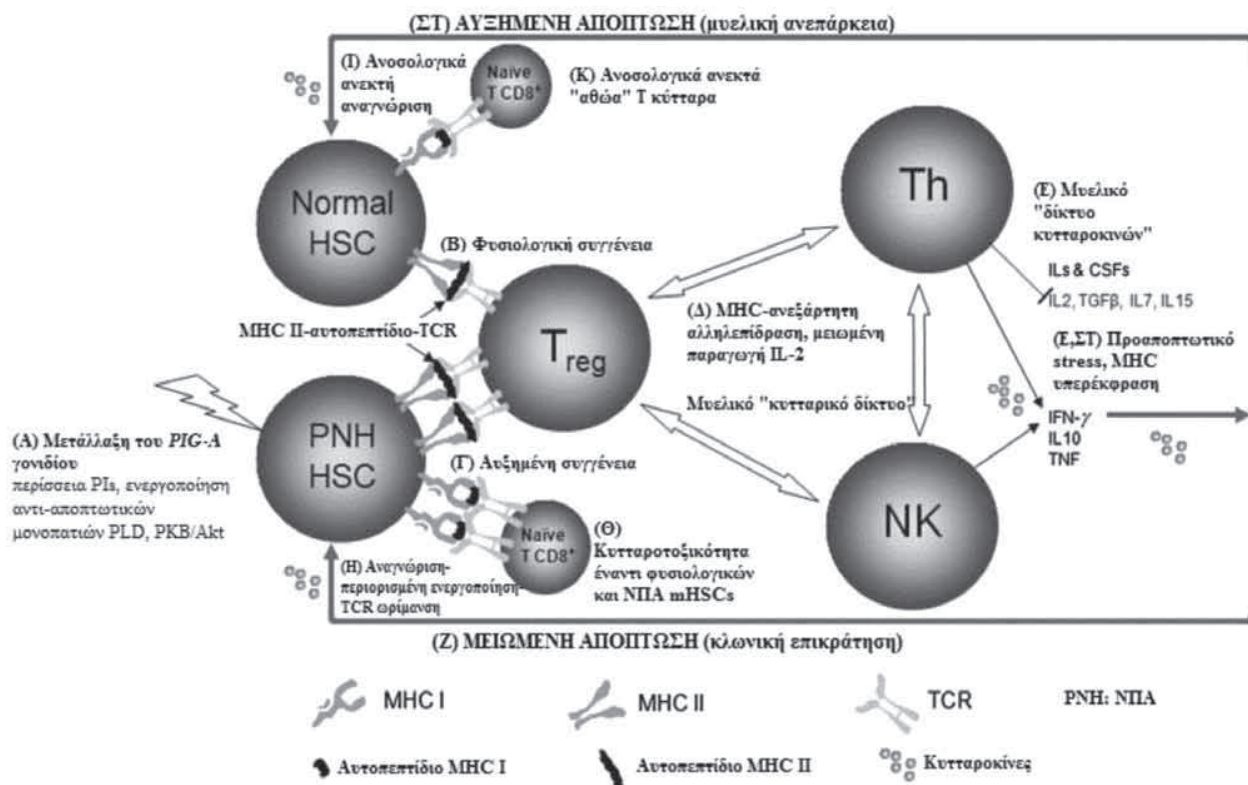
T-κύτταρα ωριμάζουν περαιτέρω και στρέφονται έναντι ΝΠΑ και φυσιολογικών mHSC, που εκφράζουν ειδικά για την κυτταρική σειρά πεπτιδικά αντιγονικά, ερμηνεύοντας μερικώς την εικόνα της ΑΑ σε ορισμένους ασθενείς με ΝΠΑ και τη συσχέτιση με συγκεκριμένα μόρια MHC τάξης I.<sup>10</sup>

**6. Η ΑΙΜΟΠΟΙΗΣΗ ΣΤΗ ΝΥΚΤΕΡΙΝΗ ΠΑΡΟΞΥΝΤΙΚΗ ΑΙΜΟΣΦΑΙΡΙΝΟΥΡΙΑ**

Από τη θεωρία της «διπλής παθογένεσης» των Rotoli και Luzzatto έως σήμερα, τα πειραματικά ευρήματα αναδεικνύουν ότι οι διαδικασίες της κλωνικής επιλογής, της εξάπλωσης και της επικράτησης είναι εξαιρετικά πολύπλοκες, εξαρτώμενες τόσο από τη διαταραχή της φυσιολογικής λειτουργίας και της ομοίωσης των ΝΠΑ mHSC, όσο και από μεταβολές στη ρύθμιση της ανοσο-αναγνώρισης και της απόπτωσης. Η ενεργοποίηση των μηχανισμών αναστολής της αιμοποίησης, παρά η κυτταροτοξικότητα, ως αποτέλεσμα της ενεργοποίησης των Treg από τη σύνδεση MHC-αυτοπεπτιδίου-TCR, ευθύνεται για την αναδυόμενη εικόνα της επικράτησης του κλώνου ΝΠΑ έναντι των φυσιολογικών αιμοποιητικών κλώνων. Παράλληλα με την ευρεία ανοσοπαρουσίαση ιστικά ειδικών αυτοπεπτιδίων

από τα mHSC στα Treg μέσω των μορίων MHC τάξης II, αντι-αποπτωτικά μονοπάτια εξαρτώμενα από τη σύσταση και τη μεταβολική ισορροπία της κυτταρικής μεμβράνης σε PI ρυθμίζονται ποικιλοτρόπως ανάμεσα σε GPI(-) και φυσιολογικά mHSC.

Στην εικόνα 4 συνοψίζονται αδρά τα υποθετικά παθογενετικά μονοπάτια που οδηγούν στη μυελική απλασία, στην κλωνική επιλογή και επικράτηση στη ΝΠΑ, καθώς και η αλληλεπίδραση μεταξύ τους, όπως περιγράφηκαν πρόσφατα από τους Nowak et al.<sup>10</sup> (α) Απαρχή όλων είναι μια σωματική μετάλλαξη του γονιδίου *PIG-A* στο mHSC, που οδηγεί σε σταδιακή ανισορροπία των PIs στη μεμβράνη, επάγοντας την ενεργοποίηση των PLD, PI3K και PKB/Akt αποπτωτικών μονοπατιών και την καταστολή των Foxo μεταγραφικών παραγόντων. Έτσι, τα GPI(-) mHSCs καθίστανται ανθεκτικά στην απόπτωση σε σχέση με τα GPI(+). (β) Η αυξημένη Treg-μεσολαβούμενη αυτοαναγνώριση των mHSCs –μέσω της παρουσίασης του MHC-αυτοπεπτιδίου– οδηγεί στην ενεργοποίηση των Treg και στη MHC-ανεξάρτητη διακυτταρική επαφή με γειτονικά CD4(+) Th, οποιασδήποτε αντιγονικής ειδικότητας, και πιθανών άλλων εκτελεστικών και ρυθμιστικών κυττάρων που γειτνιάζουν με αυτά. (γ) Η επαγωγή της εν λόγω διεργασίας είναι πιο έντονη παρου-



**Εικόνα 4.** Μονοπάτια που συμμετέχουν στη MHC-αυτοαντιγόνο-TCR αναγνώριση και την επικράτηση του κλώνου νυκτερινής παροξυντικής αιμοσφαιρινουρίας (ΝΠΑ) (από Nowak et al, τροποποιημένο).<sup>10</sup>

σία αυξημένης συγγένειας ανοσοαναγνώρισης, όπως π.χ. σε περιπτώσεις αποτελεσματικής παρουσίας συγκεκριμένων αυτοπεπτιδίων mHSC-προέλευσης, μέσω ΝΠΑ σχετιζόμενων ή μη μορίων MHC τάξης II. (δ) Το μυελικό «κυτταρικό δίκτυο» ανεπαρκεί, οδηγώντας στην αναστολή της σύνθεσης της IL-2, ενώ (ε) το «δίκτυο κυτταροκινών» μετατοπίζεται προς την υπερπαραγωγή IFN- $\gamma$ , οδηγώντας τόσο σε «προ-αποπτωτικό stress» έναντι των mHSCs, όσο και σε υπερέκφραση των MHC τάξης I και II στην επιφάνεια των προγονικών κυττάρων. Έτσι, ενώ εγκαθίσταται σταδιακά μυελική ανεπάρκεια, τοπικές μυελικές αιμοποιητικές εστίες κυττάρων ΝΠΑ διαφεύγουν του “stress”, λόγω της μετάλλαξης του PIG-A, της μεμβρανικής «ανισορροπίας» της PIs και της ενεργοποίησης αντι-αποπτωτικών μονοπατιών. Κατ’ αυτόν τον τρόπο, τα φυσιολογικά mHSCs υφίστανται (στ) υψηλούς ρυθμούς απόπτωσης, ενώ (ζ) τα αντίστοιχα παθολογικά, χαμηλούς. Σε αυτό το σημείο, ο «αντι-αποπτωτικός βρόγχος» ανάμεσα στα κύτταρα που παράγουν IFN- $\gamma$  και των PIG-A(-) mHSCs κλείνει, δημιουργώντας έτσι το μηχανισμό της κλωνικής επικράτησης. (η) Η υπέρμετρη ανοσοπαρουσίαση συγκεκριμένων αυτοαντιγόνων mHSCs-προέλευσης στο πλαίσιο της υπερέκφρασης των μορίων MHC τάξης I αυξάνει τη δυναμική της συγγένειας συγκεκριμένων TCR υποδοχέων «αθώνων» (naïve) CD8(+) T-λεμφοκυττάρων, η οποία, όταν φθάσει σε ένα συγκεκριμένο όριο διέγερσης, επάγει την ωρίμανση του TCR. (θ) Φυσιολογικά και ΝΠΑ mHSCs δέχονται την ανοσολογική επίθεση των διεγερμένων αυτών κυττάρων (CTL) και έτσι εγκαθίσταται η εικόνα της απλαστικής αναιμίας στο μυελό. Η εν λόγω διεργασία ενεργοποιείται καλύτερα από την αποτελεσματικότερη ανοσοπαρουσίαση συγκεκριμένων mHSC-προέλευσης αυτοπεπτιδίων στο πλαίσιο ΝΠΑ-σχετιζόμενων μορίων MHC τάξης I, παρά αντίστοιχων μη σχετιζόμενων. Από την άλλη πλευρά, (ι) τα φυσιολογικά mHSCs παρουσιάζουν

φυσιολογικά επίπεδα «ιστικά-ειδικών» πεπτιδίων, ενώ (κ) η αναγνώριση μέσω φυσιολογικής MHC-αυτοπεπτιδίο-TCR συγγένειας είναι ανοσολογικά ανεκτή.<sup>10</sup>

Αν και η απουσία σαφών δεδομένων όσον αφορά στη φύση των ειδικών για το αιμοποιητικό ιστικών αυτοπεπτιδίων που μετέχουν ενεργά στις διεργασίες της αυτο-αναγνώρισης *in vivo*, καθώς και σχετικά με τα επίπεδα PI στη μεμβράνη των ΝΠΑ mHSCs, αποδυναμώνουν την ισχύ της σχετικής υπόθεσης, το παραπάνω πρότυπο αιμοποίησης στη ΝΠΑ έρχεται να συμβάλλει στην κατανόηση κομβικών σημείων, όχι μόνο στη θεωρία της «διπλής παθογένεσης» των Rotoli και Luzzatto, αλλά και των μετέπειτα ερευνητών.<sup>10</sup> Για παράδειγμα, η «μυελική ανεπάρκεια» των Luzzatto et al<sup>9,159</sup> και το υποκυτταρικό μυελικό περιβάλλον του Young<sup>101</sup> μπορούν να αποδοθούν στην εκτεταμένη διέγερση των Treg, καθώς και στην τοπική επαγωγή IFN- $\gamma$ . Ο παθογενετικός ρόλος των CTL, σύμφωνα με τον Young,<sup>101</sup> η ανοσορρύθμιση των Marsh και Elebute,<sup>160</sup> καθώς και η εικόνα της απλαστικής αναιμίας σε αρκετούς ασθενείς με ΝΠΑ, μπορούν να συνδεθούν με την ενεργοποίηση αυτοαντιδραστικών «αθώνων» CD8(+) T-κυττάρων με αυξημένης συγγένειας TCR υποδοχέα. Παράλληλα, η μειωμένη ενεργοποίηση προ-αποπτωτικών μονοπατιών, που προτάθηκε από τους Tiu και Maciejewski,<sup>161</sup> μπορεί να ερμηνευτεί από τη διαταραχή ισορροπίας των PI στην κυτταρική μεμβράνη των ΝΠΑ mHSC.

Περαιτέρω μελέτες σχετικά με τη μεμβρανική ανισορροπία των PIs στην «ιστικά-ειδική» T-κυτταρική ανοσοαναγνώριση και στην TCR ωρίμανση, καθώς και την TCR βιολογία των T-κυτταρικών υποπληθυσμών (όπως π.χ. των Treg), υπόσχεται πολλά στο πεδίο νέων θεραπευτικών προσεγγίσεων στη ΝΠΑ.

## ABSTRACT

### The pathophysiological mechanisms of the pathogenesis of bone marrow failure in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria, and new insights

J.V. ASIMAKOPOULOS,<sup>1</sup> O. KAMPOUROPOULOU,<sup>2</sup> L. PAPAGEORGIOU,<sup>1</sup> M. SAMARKOS,<sup>2</sup> E. VARIAMI,<sup>2</sup> T.P. VASSILAKOPOULOS,<sup>1</sup> M.K. ANGELOPOULOU,<sup>1</sup> P. TSAFTARIDIS,<sup>1</sup> E. PLATA,<sup>1</sup> E. TERPOS,<sup>3</sup> K. KONSTANTOPOULOS,<sup>1</sup> J. MELETIS<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Hematology and Bone Marrow Transplantation Unit, National and Kapodistrian University of Athens, School of Medicine, “Laiko” General Hospital, Athens, <sup>2</sup>First Department of Internal Medicine, National and Kapodistrian University of Athens, School of Medicine, “Laiko” General Hospital, Athens, <sup>3</sup>Department of Clinical Therapeutics, National and Kapodistrian University of Athens, School of Medicine, “Alexandra” General Hospital, Athens, Greece

Archives of Hellenic Medicine 2015, 32(6):679–700

Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria (PNH), or Marchiafava-Micheli disease, is the first and only example of acquired autoimmune hemolytic anemia with a negative Coombs’ test. It is based on a red-cell membrane defect with nor-



mal morphology, which leads to paroxysmal episodes of hemoglobinuria, most noticeable in the morning. The red-cell membrane deficiency of CD55 and CD59, glycosyl-phosphatidyl-inositol (GPI)-anchored complement regulatory proteins, explains adequately the symptom of chronic intravascular hemolysis with hemosiderinuria. Recent data have demonstrated the importance of GPI-anchored membrane proteins deficiency in the pathogenesis of thromboembolic events in unusual sites that characterize the clinical course and natural history of the disease. PNH, however, includes an extremely rare acquired clonal hematopoietic stem cell disorder, a benign oligoclonal myelopathy ubiquitous to varying degrees in all cases of PNH, which cannot be explained simply by somatic mutation of the X-linked gene *PIG-A* and the impaired biosynthesis GPI anchor. Thus, the etiology of bone marrow failure, which complements the characteristic clinical triad of PNH manifestations, still remains obscure. This review summarizes the currently available scientific data concerning the pathophysiological pathways involved in the bone marrow failure of PNH, and describes a hypothetical pathogenetic model for the disease.

**Key words:** Aplastic anemia, Bone marrow failure, CD55, CD59, Decay accelerating factor (DAF), Hemolytic anemia, Membrane inhibitor factor (MIRL), Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria

## Βιβλιογραφία

- MELETIS J, TERPOS E. Recent insights into the pathophysiology of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Med Sci Monit* 2003, 9:RA161-RA172
- ΜΕΛΕΤΗΣ ΓΧ. Από το αιματολογικό εύρημα στη διάγνωση. 7η έκδοση. Εκδόσεις Νηρέας, Αθήνα, 2009:163
- PARKER CJ. The pathophysiology of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Exp Hematol* 2007, 35:523-533
- ΜΕΛΕΤΗΣ ΓΧ, ΤΕΡΠΟΣ Ε, ΛΙΛΑΚΟΣ Κ. *Νυκτερινή παροξυντική αιμοσφαιρινουρία*. Εκδόσεις Νηρέας, Αθήνα, 2011
- RISITANO AM, ROTOLI B. Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria: Pathophysiology, natural history and treatment options in the era of biological agents. *Biologics* 2008, 2:205-222
- MELETIS J, MICHALI E, SAMARKOS M, KONSTANTOPOULOS K, MELETIS C, TERPOS E ET AL. Detection of "PNH red cell" populations in hematological disorders using the Sephacryl Gel Test microtyping system. *Leuk Lymphoma* 1997, 28:177-182
- ARATEN DJ, NAFA K, PAKDEESUWAN K, LUZZATTO L. Clonal populations of hematopoietic cells with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria genotype and phenotype are present in normal individuals. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999, 96:5209-5214
- ROTOLO B, LUZZATTO L. Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Semin Hematol* 1989, 26:201-207
- LUZZATTO L, BESSLER M. The dual pathogenesis of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Curr Opin Hematol* 1996, 3:101-110
- NOWAK J, WOZNIAK J, MENDEK-CZAJKOWSKA E, DLUGOKECKA A, MIKA-WITKOWSKA R, ROGATKO-KOROS M ET AL. Potential link between MHC-self-peptide presentation and hematopoiesis; the analysis of HLA-DR expression in CD34-positive cells and self-peptide presentation repertoires of MHC molecules associated with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Cell Biochem Biophys* 2013, 65:321-333
- FUJIOKA S, ASAI T. Prognostic features of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria in Japan. *Nippon Ketsueki Gakkai Zasshi* 1989, 52:1386-1394
- SOCIÉ G, MARY JY, DE GRAMONT A, RIO B, LEPORRIER M, ROSE C ET AL. Paroxysmal nocturnal haemoglobinuria: Long-term follow-up and prognostic factors. French Society of Haematology. *Lancet* 1996, 348:573-577
- HILLMEN P, LEWIS SM, BESSLER M, LUZZATTO L, DACIE JV. Natural history of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *N Engl J Med* 1995, 333:1253-1258
- NISHIMURA J, KANAKURA Y, WARE RE, SCHICHISHIMA T, NAKAKUMA H, NINOMIYA H ET AL. Clinical course and flow cytometric analysis of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria in the United States and Japan. *Medicine (Baltimore)* 2004, 83:193-207
- 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
- BRUBAKER LH, ESSIG LJ, MENGEL CE. Neutrophil life span in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood* 1977, 50:657-662
- COHEN P, GARDNER FH, BARNETT GO. Reclassification of the thrombocytopenias by the Cr51-labeling method for measuring platelet life span. *N Engl J Med* 1961, 264:1294-1299
- MOORE JG, HUMPHRIES RK, FRANK MM, YOUNG N. Characterization of the hematopoietic defect in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Exp Hematol* 1986, 14:222-229
- 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
- ELEBUTE MO, RIZZO S, TOOZE JA, MARSH JC, GORDON-SMITH EC, GIBSON FM. Evaluation of the haemopoietic reservoir in *de novo* haemolytic paroxysmal nocturnal haemoglobinuria. *Br J Haematol* 2003, 123:552-560
- ROTOLO B, ROBLEDO R, LUZZATTO L. Decreased number of circulating BFU-Es in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood* 1982, 60:157-159
- 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
- WARE RE, PICKENS CV, DeCASTRO CM, HOWARD TA. Circulating

- PIG-A* mutant T lymphocytes in healthy adults and patients with bone marrow failure syndromes. *Exp Hematol* 2001, 29:1403–1409
24. ΜΕΛΕΤΗΣ ΙΧ, ΣΑΡΑΝΤΟΠΟΥΛΟΣ Α, ΑΣΗΜΑΚΟΠΟΥΛΟΣ ΙΒ, ΤΕΡΠΟΣ Ε. Παθογενετικοί και παθοφυσιολογικοί μηχανισμοί για την εμφάνιση της νυκτερινής παροξυστικής αιμοσφαιρινουρίας. *Αρχ Ελλ Ιατρ* 2009, 26:206–229
  25. WANG H, CHUHJOT T, YASUE S, OMINE M, NAKAO S. Clinical significance of a minor population of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria-type cells in bone marrow failure syndrome. *Blood* 2002, 100:3897–3902
  26. DUNN DE, TANAWATTANACHAROEN P, BOCCUNI P, NAGAKURA S, GREEN SW, KIRBY MR ET AL. Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria cells in patients with bone marrow failure syndromes. *Ann Intern Med* 1999, 131:401–408
  27. MELETIS J, TERPOS E. Paroxysmal nocturnal haemoglobinuria: Clinical presentation and association with other haematological disorders. *Haema* 2001, 4:79–88
  28. MUKHINA GL, BUCKLEY JT, BARBER JP, JONES RJ, BRODSKY RA. Multilineage glycosylphosphatidylinositol anchor-deficient haematopoiesis in untreated aplastic anaemia. *Br J Haematol* 2001, 115:476–482
  29. MELETIS J, TERPOS E, MAVROGIANNI D, LILAKOS K, APOSTOLIDOU E, TSIRONI M ET AL. Aplastic anaemia with large PNH-like red cell population. *Haema* 2003, 6:103–106
  30. BRODSKY RA. Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria: Stem cells and clonality. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2008:111–115
  31. PU JJ, HU R, MUKHINA GL, CARRAWAY HE, McDEVITT MA, BRODSKY RA. The small population of *PIG-A* mutant cells in myelodysplastic syndromes do not arise from multipotent hematopoietic stem cells. *Haematologica* 2012, 97:1225–1233
  32. ORAZI A, ALBITAR M, HEEREMA NA, HASKINS S, NEIMAN RS. Hypoplastic myelodysplastic syndromes can be distinguished from acquired aplastic anemia by CD34 and PCNA immunostaining of bone marrow biopsy specimens. *Am J Clin Pathol* 1997, 107:268–274
  33. MATSUI WH, BRODSKY RA, SMITH BD, BOROWITZ MJ, JONES RJ. Quantitative analysis of bone marrow CD34 cells in aplastic anemia and hypoplastic myelodysplastic syndromes. *Leukemia* 2006, 20:458–462
  34. RISITANO AM, ROTOLI B. Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria: Pathophysiology, natural history and treatment options in the era of biological agents. *Biologics* 2008, 2:205–222
  35. MACIEJEWSKI JP, FOLLMANN D, NAKAMURA R, SAUNTHARARAJAHY, RIVERA CE, SIMONIST ET AL. Increased frequency of HLA-DR2 in patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria and the PNH/aplastic anemia syndrome. *Blood* 2001, 98:3513–3519
  36. BAGLIN T, GRAY E, GREAVES M, HUNT BJ, KEELING D, MACHIN S ET AL. Clinical guidelines for testing for inheritable thrombophilia. *Br J Haematol* 2010, 149:209–220
  37. HU R, MUKHINA GL, PIANTADOSI S, BARBER JP, JONES RJ, BRODSKY RA. *PIG-A* mutations in normal hematopoiesis. *Blood* 2005, 105:3848–3854
  38. BURMAN RW, POPOVICH BW, JACKY PB, TURKER MS. Fully expanded FMR1 CGG repeats exhibit a length- and differentiation-dependent instability in cell hybrids that is independent of DNA methylation. *Hum Mol Genet* 1999, 8:2293–2302
  39. BRODSKY RA. New insights into paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2006:24–28, 516
  40. 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
  41. JASINSKI M, KELLER P, FUJIWARA Y, ORKIN SH, BESSLER M. GATA1-Cre mediates *Piga* gene inactivation in the erythroid/megakaryotic lineage and leads to circulating red cells with partial deficiency in glycosyl phosphatidylinositol-linked proteins (paroxysmal nocturnal hemoglobinuria type II cells). *Blood* 2001, 98:2248–2255
  42. KELLER P, PAYNE JL, TREMML G, GREER PA, GABOLI M, PANDOLFI PP ET AL. FES-Cre targets phosphatidylinositol glycan class A (*PIGA*) inactivation to hematopoietic stem cells in the bone marrow. *J Exp Med* 2001, 194:581–589
  43. KAWAGOE K, KITAMURA D, OKABE M, TANIUCHI I, IKAWA M, WATANABE T ET AL. Glycosylphosphatidylinositol-anchor-deficient mice: Implications for clonal dominance of mutant cells in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood* 1996, 87:3600–3606
  44. ROSTI V, 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
  45. MURAKAMI Y, KINOSHITA T, MAEDA Y, NAKANO T, KOSAKA H, TAKEIDA J. Different roles of glycosylphosphatidylinositol in various hematopoietic cells as revealed by a mouse model of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood* 1999, 94:2963–2970
  46. BRETT SJ, BAXTER G, COOPER H, ROWAN W, REGAN T, TITE J ET AL. Emergence of CD52-, glycosylphosphatidylinositol-anchor-deficient lymphocytes in rheumatoid arthritis patients following Campath-1H treatment. *Int Immunol* 1996, 8:325–334
  47. TAYLOR VC, SIMS M, BRETT S, FIELD MC. Antibody selection against CD52 produces paroxysmal nocturnal haemoglobinuria phenotype in human lymphocytes by a novel mechanism. *Biochem J* 1997, 322:919–925
  48. RAWSTRON AC, ROLLINSON SJ, RICHARDS S, SHORT MA, ENGLISH A, MORGAN GJ ET AL. The PNH phenotype cells that emerge in most patients after CAMPATH-1H therapy are present prior to treatment. *Br J Haematol* 1999, 107:148–153
  49. ROSSE WF, DACIE JV. Immune lysis of normal human and paroxysmal nocturnal hemoglobinuria (PNH) red blood cells. I. The sensitivity of PNH red cells to lysis by complement and specific antibody. *J Clin Invest* 1966, 45:736–748
  50. ROSSE WF, DACIE JV. Immune lysis of normal human and paroxysmal nocturnal hemoglobinuria (PNH) red blood cells. II. The role of complement components in the increased sensitivity of PNH red cells to immune lysis. *J Clin Invest* 1966, 45:749–757
  51. VAN DER SCHOOT CE, HUIZINGA TW, VAN'T VEER-KORTHOFF ET, WIJMANS R, PINKSTER J, VON DEM BORNE AE. Deficiency of glycosyl-phosphatidylinositol-linked membrane glycoproteins of leucocytes in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria, description of a new diagnostic cytofluorometric assay. *Blood*

- 1990, 76:1853–1859
52. NAFA K, BESSLER M, DEEG HJ, LUZZATTO L. New somatic mutation in the *PIG-A* gene emerges at relapse of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood* 1998, 92:3422–3427
  53. LUZZATTO L, NAFA K. Genetics of PNH. In: Young NS, Moss J (eds) *PNH and the GPI-linked proteins*. Academic Press, San Diego, 2000:21–47
  54. MICHELLI F. Anaemia (splenomegalia) emolitica con emoglobinuria-emosiderinuria tipo Marchiafava. *Haematologica* 1931, 12:101
  55. 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
  56. HATTORI H, MACHII T, UEDA E, SHIBANO M, KAGEYAMA T, KITANI T. Increased frequency of somatic mutations at glycophorin A loci in patients with aplastic anaemia, myelodysplastic syndrome and paroxysmal nocturnal haemoglobinuria. *Br J Haematol* 1997, 98:384–391
  57. PUROW DB, HOWARD TA, MARCUS SJ, ROSSE WF, WARE RE. Genetic instability and the etiology of somatic *PIG-A* mutations in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood Cells Mol Dis* 1999, 25:81–91
  58. HORIKAWA K, KAWAGUCHI T, ISHIIHARA S, NAGAKURA S, HIDAKA M, KAGIMOTO T ET AL. Frequent detection of T cells with mutations of hypoxanthine-guanine phosphoribosyl transferase gene in patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood* 2002, 99:24–29
  59. CHEN G, ZENG W, GREEN S, YOUNG NS. Frequent HPRT mutations in paroxysmal nocturnal haemoglobinuria reflect T cell clonal expansion, not genomic instability. *Br J Haematol* 2004, 125:383–391
  60. ARATEN DJ, LUZZATTO L. The mutation rate in *PIG-A* is normal in patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria (PNH). *Blood* 2006, 108:734–736
  61. NISHIMURA T, KANAMARU A, KAKISHITA E, NAGAI K. Flow cytometric analysis of homologous restriction factor 20KD (HRF20) expression on progeny cells during differentiation from haemopoietic progenitors in paroxysmal nocturnal haemoglobinuria. *Br J Haematol* 1995, 90:293–299
  62. YOUNG NS, MACIEJEWSKI JP. Genetic and environmental effects in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria: This little *PIG-A* goes “Why? Why? Why?”. *J Clin Invest* 2000, 106:637–641
  63. NISHIMURA JI, INOUE N, AZENISHI Y, HIROTA T, AKAOGIT, SHIBANO M ET AL. Analysis of *PIG-A* gene in a patient who developed reciprocal translocation of chromosome 12 and paroxysmal nocturnal hemoglobinuria during follow-up of aplastic anemia. *Am J Hematol* 1996, 51:229–233
  64. MEYERS G, BABCOCK WH, BEST RG, PARKER CJ. Identification of a novel hematopoietic cell translocation in a patient with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood* 2004, 104:p15b
  65. INOUE N, IZUI-SARUMARU T, MURAKAMI Y, ENDO Y, NISHIMURA J, KUROKAWA K ET AL. Molecular basis of clonal expansion of hematopoiesis in 2 patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria (PNH). *Blood* 2006, 108:4232–4236
  66. BORRMANN L, WILKENING S, BULLERDIEK J. The expression of *HMGA* genes is regulated by their 3’UTR. *Oncogene* 2001, 20:4537–4541
  67. GROSSCHEDL R, GIESE K, PAGEL J. *HMG* domain proteins: Architectural elements in the assembly of nucleoprotein structures. *Trends Genet* 1994, 10:94–100
  68. HESS JL, KOSSEV P. Molecular genetics of benign tumors. *Cancer Invest* 2002, 20:362–372
  69. REEVES R. Molecular biology of *HMGA* proteins: Hubs of nuclear function. *Gene* 2001, 277:63–81
  70. SANTULLI B, KAZMIERCZAK B, NAPOLITANO R, CALIENDO I, CHIAPPETTA G, RIPPEV ET AL. A 12q13 translocation involving the *HMGI-C* gene in richter transformation of a chronic lymphocytic leukemia. *Cancer Genet Cytogenet* 2000, 119:70–73
  71. PIERANTONI GM, SANTULLI B, CALIENDO I, PENTIMALLI F, CHIAPPETTA G, ZANESI N ET AL. *HMGA2* locus rearrangement in a case of acute lymphoblastic leukemia. *Int J Oncol* 2003, 23:363–367
  72. ANDRIEUX J, DEMORY JL, DUPRIEZ B, QUIEF S, PLANTIER I, ROUMIER C ET AL. Dysregulation and overexpression of *HMGA2* in myelofibrosis with myeloid metaplasia. *Genes Chromosomes Cancer* 2004, 39:82–87
  73. STORLAZZI CT, ALBANO F, LOCUNSOLO C, LONOCE A, FUNES S, GUASTADISEGNI MC ET AL. t(3;12)(q26;q14) in polycythemia vera is associated with upregulation of the *HMGA2* gene. *Leukemia* 2006, 20:2190–2192
  74. ODERO MD, GRAND FH, IQBAL S, ROSS F, ROMAN JP, VIZMANOS JL ET AL. Disruption and aberrant expression of *HMGA2* as a consequence of diverse chromosomal translocations in myeloid malignancies. *Leukemia* 2005, 19:245–252
  75. KELLEY RJ, TOOZE RM, DOODY GM, RICHARDS SJ, HILLMEN P. The investigation of *HMGA2* dysregulation and promoter mutations in *PIG-M* in the molecular pathogenesis of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood* 2008, 110: Abstract #1072
  76. 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
  77. KULKARNI S, BESSLER M. The effect of GPI-anchor deficiency on apoptosis in mice carrying a *Piga* gene mutation in hematopoietic cells. *J Leukoc Biol* 2002, 72:1228–1233
  78. 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
  79. WARE RE, NISHIMURA J, MOODY MA, SMITH C, ROSSE WF, HOWARD TA. The *PIG-A* mutation and absence of glycosylphosphatidylinositol-linked proteins do not confer resistance to apoptosis in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood* 1998, 92:2541–2550
  80. CHEN R, NAGARAJAN S, PRINCE GM, MAHESHWARI U, TERSTAPPEN LW, KAPLAN DR ET AL. Impaired growth and elevated fas receptor expression in *PIGA(+)* stem cells in primary paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *J Clin Invest* 2000, 106:689–696
  81. CHEN G, KIRBY M, ZENG W, YOUNG NS, MACIEJEWSKI JP. Superior growth of glycosylphosphatidylinositol-anchored protein-de-

- ficient progenitor cells *in vitro* is due to the higher apoptotic rate of progenitors with normal phenotype *in vivo*. *Exp Hematol* 2002, 30:774–782
82. ISMAIL MM, TOOZE JA, FLYNN JA, GORDON-SMITH EC, GIBSON FM, RUTHERFORD TR ET AL. Differential apoptosis and Fas expression on GPI-negative and GPI-positive stem cells: A mechanism for the evolution of paroxysmal nocturnal haemoglobinuria. *Br J Haematol* 2003, 123:545–551
  83. SAVAGE WJ, BARBER JP, MUKHINA GL, HU R, CHEN G, MATSUI W ET AL. Glycosylphosphatidylinositol-anchored protein deficiency confers resistance to apoptosis in PNH. *Exp Hematol* 2009, 37:42–51
  84. GRIBBEN JG, FREEMAN GJ, BOUSSIOTIS VA, RENNERT P, JELLIS CL, GREENFIELD E ET AL. CTLA4 mediates antigen-specific apoptosis of human T cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995, 92:811–815
  85. HOMBURG CH, DE HAAS M, VON DEM BORNE AE, VERHOEVEN AJ, REUTELINGSPERGER CP, ROOS D. Human neutrophils lose their surface Fc gamma RIII and acquire Annexin V binding sites during apoptosis *in vitro*. *Blood* 1995, 85:532–540
  86. SCHEFFOLD A, MURPHY KM, HÖFERT T. Competition for cytokines: T(reg) cells take all. *Nat Immunol* 2007, 8:1285–1287
  87. COLUZZI S, BIFFONI M, PASQUALETTI D, PERRONE MP, VAGLIO S, RAHIMI H ET AL. Production of interferon-gamma by lymphocytes from paroxysmal nocturnal haemoglobinuria patients: Relationship with clinical status. *Br J Haematol* 2004, 124:685–690
  88. ZENG W, MIYAZATO A, CHEN G, KAJIGAYA S, YOUNG NS, MACIEJEWSKI JP. Interferon-gamma-induced gene expression in CD34 cells: Identification of pathologic cytokine-specific signature profiles. *Blood* 2006, 107:167–175
  89. NOWAK J, MIKA-WITKOWSKA R, MENDEK-CZAJKOWSKA E, ROGATKO-KOROS M, GRACZYK-POL E, PYL H ET AL. Association of HLA haplotypes with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Transplant Proc* 2010, 42:3266–3270
  90. CARDONE MH, ROY N, STENNICKE HR, SALVESEN GS, FRANKE TF, STANBRIDGE E ET AL. Regulation of cell death protease caspase-9 by phosphorylation. *Science* 1998, 282:1318–1321
  91. MEJILLANO M, YAMAMOTO M, ROZELLE AL, SUN HQ, WANG X, YIN HL. Regulation of apoptosis by phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate inhibition of caspases, and caspase inactivation of phosphatidylinositol phosphate 5-kinases. *J Biol Chem* 2001, 276:1865–1872
  92. PAPADOPOULOS KP, SUCIU-FOCA N, HESDORFFER CS, TUGULEA S, MAFFEI A, HARRIS PE. Naturally processed tissue- and differentiation stage-specific autologous peptides bound by HLA class I and II molecules of chronic myeloid leukemia blasts. *Blood* 1997, 90:4938–4946
  93. NOZAWA Y. Roles of phospholipase D in apoptosis and pro-survival. *Biochim Biophys Acta* 2002, 1585:77–86
  94. WANG H, CHUHJO T, YAMAZAKI H, SHIOBARA S, TERAMURA M, MIZOGUCHI H ET AL. Relative increase of granulocytes with a paroxysmal nocturnal haemoglobinuria phenotype in aplastic anaemia patients: The high prevalence at diagnosis. *Eur J Haematol* 2001, 66:200–205
  95. ISHIYAMA K, CHUHJO T, WANG H, YACHIE A, OMINE M, NAKAO S. Polyclonal hematopoiesis maintained in patients with bone marrow failure harboring a minor population of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria-type cells. *Blood* 2003, 102:1211–1216
  96. NAKAO S, SUGIMORI C, YAMAZAKI H. Clinical significance of a small population of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria-type cells in the management of bone marrow failure. *Int J Hematol* 2006, 84:118–122
  97. BESSLER M, MASON P, HILLMEN P, LUZZATTO L. Somatic mutations and cellular selection in paroxysmal nocturnal haemoglobinuria. *Lancet* 1994, 343:951–953
  98. ROSSE WF, HOFFMAN S, CAMPBELL M, BOROWITZ M, MOORE JO, PARKER CJ. The erythrocytes in paroxysmal nocturnal haemoglobinuria of intermediate sensitivity to complement lysis. *Br J Haematol* 1991, 79:99–107
  99. MURAKAMI Y, KOSAKA H, MAEDA Y, NISHIMURA J, INOUE N, OHISHI K ET AL. Inefficient response of T lymphocytes to glycosylphosphatidylinositol anchor-negative cells: Implications for paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood* 2002, 100:4116–4122
  100. YOUNG NS, ABKOWITZ JL, LUZZATTO L. New insights into the pathophysiology of acquired cytopenias. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2000:18–38
  101. YOUNG NS. The problem of clonality in aplastic anemia: Dr Dameshek's riddle, restated. *Blood* 1992, 79:1385–1392
  102. KODUKULA K, AMTHAUER R, CINES D, YEH ET, BRINK L, THOMAS LJ ET AL. Biosynthesis of phosphatidylinositol-glycan (PI-G)-anchored membrane proteins in cell-free systems: PI-G is an obligatory cosubstrate for COOH-terminal processing of nascent proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992, 89:4982–4985
  103. HANAOKA N, KAWAGUCHI T, HORIKAWA K, NAGAKURA S, ISHIHARA S, MITSUYA H ET AL. Decrease in sensitivity of PIG-A mutant cells to natural killer cells conferred by missing of stress-inducible membrane proteins ULBPs [Abstract]. *Blood* 2004, 104:R2829
  104. HANAOKA N, KAWAGUCHI T, HORIKAWA K, NAGAKURA S, MITSUYA H, NAKAKUMA H. Immunoselection by natural killer cells of PIGA mutant cells missing stress-inducible ULBP. *Blood* 2006, 107:1184–1191
  105. HANAOKA N, NAKAKUMA H, HORIKAWA K, NAGAKURA S, TSUZUKI Y, SHIMANUKI M ET AL. NKG2D-mediated immunity underlying paroxysmal nocturnal haemoglobinuria and related bone marrow failure syndromes. *Br J Haematol* 2009, 146:538–545
  106. FENG X, CHUHJO T, SUGIMORI C, KOTANI T, LU X, TAKAMI A ET AL. Diazepam-binding inhibitor-related protein 1: A candidate autoantigen in acquired aplastic anemia patients harboring a minor population of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria-type cells. *Blood* 2004, 104:2425–2431
  107. 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
  108. HERTENSTEIN B, WAGNER B, BUNJES D, DUNCKER C, RAGHAVACHAR A, ARNOLD R ET AL. Emergence of CD52-, phosphatidylinositolglycan-anchor-deficient T lymphocytes after *in vivo* application of Campath-1H for refractory B-cell non-Hodgkin

- lymphoma. *Blood* 1995, 86:1487–1492
109. NAGAKURA S, ISHIHARA S, DUNN DE, NISHIMURA J, KAWAGUCHI T, HORIKAWA K ET AL. Decreased susceptibility of leukemic cells with *PIG-A* mutation to natural killer cells *in vitro*. *Blood* 2002, 100:1031–1037
  110. GUPTA P, OEGEMA TR Jr, BRAZIL JJ, DUDEK AZ, SLUNGAARD A, VERFAILLIE CM. Structurally specific heparan sulfates support primitive human hematopoiesis by formation of a micromolecular stem cell niche. *Blood* 1998, 92:4641–4651
  111. SIEBERTZ B, STÖCKER G, DRZENIEK Z, HANDT S, JUST U, HAUBECK HD. Expression of glypican-4 in haematopoietic-progenitor and bone-marrow-stromal cells. *Biochem J* 1999, 344:937–943
  112. STEINFELD R, VAN DEN BERGHE H, DAVID G. Stimulation of fibroblast growth factor receptor-1 occupancy and signaling by cell surface-associated syndecans and glypican. *J Cell Biol* 1996, 133:405–416
  113. JACKSON SM, NAKATO H, SUGIURA M, JANNUZI A, OAKES R, KALUZA V ET AL. Dally, a Drosophila glypican, controls cellular responses to the TGF-beta-related morphogen, Dpp. *Development* 1997, 124:4113–4120
  114. MAST AE, HIGUCHI DA, HUANG ZF, WARSHAWSKY I, SCHWARTZ AL, BROZE GJ Jr. Glypican-3 is a binding protein on the HepG2 cell surface for tissue factor pathway inhibitor. *Biochem J* 1997, 327:577–583
  115. TAM BY, FINNISON KW, PHILIP A. Glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins regulate transforming growth factor-beta signaling in human keratinocytes. *J Biol Chem* 2003, 278:49610–49617
  116. LI J, KLEEFF J, KAYED H, FELIX K, PENZEL R, BÜCHLER MW ET AL. Glypican-1 antisense transfection modulates TGF-beta-dependent signaling in Colo-357 pancreatic cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2004, 320:1148–1155
  117. KIM SJ, LETTERIO J. Transforming growth factor-beta signaling in normal and malignant hematopoiesis. *Leukemia* 2003, 17:1731–1737
  118. YOUNG NS, MACIEJEWSKI J. The pathophysiology of acquired aplastic anemia. *N Engl J Med* 1997, 336:1365–1372
  119. RIZZO S, KILLICK SB, PATEL S, BALL SE, WADHWA M, DILGER P ET AL. Reduced TGF-beta1 in patients with aplastic anaemia *in vivo* and *in vitro*. *Br J Haematol* 1999, 107:797–803
  120. BARCELLINI W, FERMO E, GUIA IMPERIALI F, ZANINONI A, BIANCHI P, BOSCHETTI C ET AL. Increased resistance of *PIG-A* bone marrow progenitors to tumor necrosis factor alpha and interferon gamma: Possible implications for the *in vivo* dominance of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria clones. *Haematologica* 2004, 89:651–656
  121. ROSSE WF. Hematopoiesis and the defect in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *J Clin Invest* 1997, 100:953–954
  122. NISHIMURA J, SMITH CA, PHILLIPS KL, WARE RE, ROSSE WF. Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria: Molecular pathogenesis and molecular therapeutic approaches. *Hematopathol Mol Hematol* 1998, 11:119–146
  123. HERRMANN F, SCHMIDT RE, RITZ J, GRIFFIN JD. *In vitro* regulation of human hematopoiesis by natural killer cells: Analysis at a clonal level. *Blood* 1987, 69:246–254
  124. SATO T, SELLERI C, ANDERSON S, YOUNG NS, MACIEJEWSKI JP. Expression and modulation of cellular receptors for interferon-gamma, tumour necrosis factor, and Fas on human bone marrow CD34+ cells. *Br J Haematol* 1997, 97:356–365
  125. DUFOUR C, CORCIONE A, SVAHN J, HAUPT R, BATTILANA N, PISTOIA V. Interferon gamma and tumour necrosis factor alpha are overexpressed in bone marrow T lymphocytes from paediatric patients with aplastic anaemia. *Br J Haematol* 2001, 115:1023–1031
  126. SLOANDE E, KIM S, MACIEJEWSKI JP, TISDALE J, FOLLMANN D, YOUNG NS. Intracellular interferon-gamma in circulating and marrow T cells detected by flow cytometry and the response to immunosuppressive therapy in patients with aplastic anemia. *Blood* 2002, 100:1185–1191
  127. ZOUMBOS NC, GASCÓN P, DJEU JY, TROST SR, YOUNG NS. Circulating activated suppressor T lymphocytes in aplastic anemia. *N Engl J Med* 1985, 312:257–265
  128. NAKAO S, TAKAMI A, TAKAMATSU H, ZENG W, SUGIMORI N, YAMAZAKI H ET AL. Isolation of a T-cell clone showing HLA-DRB1\*0405-restricted cytotoxicity for hematopoietic cells in a patient with aplastic anemia. *Blood* 1997, 89:3691–3699
  129. KOOK H, RISITANO AM, ZENG W, WLODARSKI M, LOTTEMANN C, NAKAMURA R ET AL. Changes in T-cell receptor VB repertoire in aplastic anemia: Effects of different immunosuppressive regimens. *Blood* 2002, 99:3668–3675
  130. RISITANO AM, KOOK H, ZENG W, CHEN G, YOUNG NS, MACIEJEWSKI JP. Oligoclonal and polyclonal CD4 and CD8 lymphocytes in aplastic anemia and paroxysmal nocturnal hemoglobinuria measured by V beta CDR3 spectratyping and flow cytometry. *Blood* 2002, 100:178–183
  131. PLASILOVA M, RISITANO AM, O'KEEFE CL, RODRIGUEZ A, WLODARSKI M, YOUNG NS ET AL. Shared and individual specificities of immunodominant cytotoxic T-cell clones in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria as determined by molecular analysis. *Exp Hematol* 2004, 32:261–269
  132. CHEN G, ZENG W, MACIEJEWSKI JP, KCYVANFAR K, BILLINGS EM, YOUNG NS. Differential gene expression in hematopoietic progenitors from paroxysmal nocturnal hemoglobinuria patients reveals an apoptosis/immune response in “normal” phenotype cells. *Leukemia* 2005, 19:862–868
  133. KARADIMITRIS A, MANAVALAN JS, THALER HT, NOTARO R, ARATEN DJ, NAFA K ET AL. Abnormal T-cell repertoire is consistent with immune process underlying the pathogenesis of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood* 2000, 96:2613–2620
  134. KARADIMITRIS A, LUZZATTO L. The cellular pathogenesis of paroxysmal nocturnal haemoglobinuria. *Leukemia* 2001, 15:1148–1152
  135. GARGIULO L, LASTRAIOLI S, CERRUTI G, SERRA M, LOIACONO F, ZUPO S ET AL. Highly homologous T-cell receptor beta sequences support a common target for autoreactive T cells in most patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood* 2007, 109:5036–5042
  136. RISITANO AM, MACIEJEWSKI JP, GREEN S, PLASILOVA M, ZENG W, YOUNG NS. *In-vivo* dominant immune responses in aplastic anaemia: molecular tracking of putatively pathogenetic T-cell clones by TCR beta-CDR3 sequencing. *Lancet* 2004, 364:355–364

137. RISITANO AM, MACIEJEWSKI JP, MURANSKI P, WLODARSKI M, O'KEEFE C, SLOAND EM ET AL. Large granular lymphocyte (LGL)-like clonal expansions in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria (PNH) patients. *Leukemia* 2005, 19:217–222
138. POGGI A, NEGRINI S, ZOCCHI MR, MASSARO AM, GARBARINO L, LASTRAIOLI S ET AL. Patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria have a high frequency of peripheral-blood T cells expressing activating isoforms of inhibiting superfamily receptors. *Blood* 2005, 106:2399–2408
139. TAKEDA J, MIYATA T, KAWAGOE K, IIDA Y, ENDO Y, FUJITA 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
140. PORCELLI SA, MODLIN RL. The CD1 system: Antigen-presenting molecules for T cell recognition of lipids and glycolipids. *Annu Rev Immunol* 1999, 17:297–329
141. WILSON SB, KENT SC, PATTON KT, ORBAN T, JACKSON RA, EXLEY M ET AL. Extreme Th1 bias of invariant Valpha24JalphaQT cells in type 1 diabetes. *Nature* 1998, 391:177–181
142. KUMAR H, BELLERON A, BARTHOLD SW, BOCKENSTEDT LK. Cutting edge: CD1 deficiency impairs murine host defense against the spirochete, *Borrelia burgdorferi*. *J Immunol* 2000, 165:4797–4801
143. TOURA I, KAWANO T, AKUTSU Y, NAKAYAMA T, OCHIAI T, TANIGUCHI M. Cutting edge: Inhibition of experimental tumor metastasis by dendritic cells pulsed with alpha-galactosylceramide. *J Immunol* 1999, 163:2387–2391
144. JOYCE S, WOODS AS, YEWDELL JW, BENNINK JR, DE SILVA AD, BOESTANU A ET AL. Natural ligand of mouse CD1d1: Cellular glycosylphosphatidylinositol. *Science* 1998, 279:1541–1544
145. SCHOFIELD L, McCONVILLE MJ, HANSEN D, CAMPBELL AS, FRASER-REID B, GRUSBY MJ ET AL. CD1d-restricted immunoglobulin G formation to GPI-anchored antigens mediated by NKT cells. *Science* 1999, 283:225–229
146. GARGIULO L, PAPAIOANNOU M, SICA M, TALINI G, CHAIDOS A, RICHICHI B ET AL. Glycosylphosphatidylinositol-specific, CD1d-restricted T cells in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood* 2013, 121:2753–2761
147. CANCHIS PW, BHAN AK, LANDAU SB, YANG L, BALK SP, BLUMBERG RS. Tissue distribution of the non-polymorphic major histocompatibility complex class I-like molecule, CD1d. *Immunology* 1993, 80:561–565
148. LEE JH, WANG C, KIM CH. FoxP3+ regulatory T cells restrain splenic extramedullary myelopoiesis via suppression of hemopoietic cytokine-producing T cells. *J Immunol* 2009, 183:6377–6386
149. URBIETA M, BARAO I, JONES M, JURECIC R, PANOSKALTSIS-MORTARI A, BLAZAR BR ET AL. Hematopoietic progenitor cell regulation by CD4+CD25+ T cells. *Blood* 2010, 115:4934–4943
150. LEE JW, GERSUK GM, KIENER PA, BECKHAM C, LEDBETTER JA, DEEG HJ. HLA-DR-triggered inhibition of hemopoiesis involves Fas/Fas ligand interactions and is prevented by c-kit ligand. *J Immunol* 1997, 159:3211–3219
151. YAMAGUCHI M, NADLERS, LEE JW, DEEG HJ. Induction of negative regulators of haematopoiesis in human bone marrow cells by HLA-DR cross-linking. *Transpl Immunol* 1999, 7:159–168
152. SHICHISHIMA T, OKAMOTO M, IKEDA K, KANESHIGE T, SUGIYAMA H, TERASAWA T ET AL. HLA class II haplotype and quantitation of WT1 RNA in Japanese patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood* 2002, 100:22–28
153. LOMBARDI ML, TERRAZZANO G, COSENTINI E, GARGIULO L, RISITANO A, CAMERLINGO R ET AL. Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria: Significant association with specific HLA-A, -B, -C, and -DR alleles in an Italian population. *Hum Immunol* 2008, 69:202–206
154. NOWAK J, MIKA-WITKOWSKA R, MENDEK-CZAJKOWSKA E, ROGATKO-KOROŚ M, GRACZYK-POL E, PYL H ET AL. The patterns of MHC association in aplastic and non-aplastic paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* 2011, 59:231–238
155. MARSH SGE, PARHAM P, BARBER LD. *The HLA facts book*. Academic Press, San Diego, CA, 2000
156. DERBINSKI J, KYEWSKI B. How thymic antigen presenting cells sample the body's self-antigens. *Curr Opin Immunol* 2010, 22:592–600
157. KAPPLER JW, ROEHM N, MARRACK P. T cell tolerance by clonal elimination in the thymus. *Cell* 1987, 49:273–280
158. HEENEY MM, ORMSBEE SM, MOODY MA, HOWARD TA, DeCASTRO CM, WARE RE. Increased expression of anti-apoptosis genes in peripheral blood cells from patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Mol Genet Metab* 2003, 78:291–294
159. LUZZATTO L, BESSLER M, ROTOLI B. Somatic mutations in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria: A blessing in disguise? *Cell* 1997, 88:1–4
160. MARSH JC, ELEBUTE MO. Stem cells in paroxysmal nocturnal haemoglobinuria and aplastic anaemia: Increasing evidence for overlap of haemopoietic defect. *Transfus Med* 2003, 13:377–386
161. TIU R, MACIEJEWSKI JP. Immune pathogenesis of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Int J Hematol* 2006, 84:113–117

*Corresponding author:*

J.V. Asimakopoulos, Department of Hematology and Bone Marrow Transplantation Unit, National and Kapodistrian University of Athens, "Laiko" General Hospital, 17 Agiou Thoma street, GR-115 27 Athens, Greece  
e-mail: jv.asimakopoulos@gmail.com