

Received: 2015.09.30
Accepted: 2015.12.03
Published: 2016.03.04

Antygeny układu grupowego Duffy: budowa, właściwości serologiczne i funkcja*

Duffy blood group antigens: structure, serological properties and function

Ewa Łukasik¹, Kazimiera Waśniowska^{1,2}

¹Laboratorium Immunochemii Glikokoniugatów, Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej im. Ludwika Hirszfelda, Polskiej Akademii Nauk, Wrocław

²Wydział Wychowania Fizycznego i Fizjoterapii, Politechnika Opolska, Opole

Streszczenie

Antygeny układu grupowego Duffy (Fy) są umiejscowione na glikoproteinie, która siedmiokrotnie przenika przez błonę komórkową i jest obecna na powierzchni krwinek czerwonych i komórek śródbłonna niektórych narządów. Białko Duffy jest także krwinkowym receptorem zarodźca malarii *P. vivax* i atypowym receptorem chemokin (ACKR1). Biologiczna rola ACKR1 nie została dotychczas wyjaśniona, sugeruje się jednak, że może nią być modulowanie intensywności reakcji zapalnych.

Dwa główne antygeny Duffy Fy^a i Fy^b, które różnią się 42. resztą aminokwasową łańcucha polipeptydowego Duffy, Fy^a ma w tym miejscu glicynę, a Fy^b - kwas asparaginowy, są kodowane przez allele FY**A* i FY**B*, różniące się zmianą pojedynczego nukleotydu (SNP, single nucleotide polymorphism) w pozycji 125G>A sekwencji nukleotydowej genu FY. W populacji kaukaskiej allele FY**A* i FY**B* odpowiadają za powstanie fenotypów: Fy(a-b-), Fy(a-b+), Fy(a+b+). Fenotyp Duffy ujemny Fy(a-b-), charakteryzujący się brakiem antygenów Duffy na erytrocytach, ale obecnością na innych tkankach, występuje u osobników homozygotycznych pod względem allelu FY**B*-33. Ponadto, ekspresja antygeny Fy^b może być obniżona na powierzchni wszystkich komórek, co jest skutkiem allelu FY**X*. Allele te są odmianami allelu FY**B* z dodatkowymi podstawieniami nukleotydowymi: SNP -33T>C w części promotorowej określa allel FY**B*-33, a SNP'y w pozycjach 265C>T i 298G>A części kodującej charakteryzują allel FY**X*.

Występowanie alleli FY jest zróżnicowane w populacjach świata: w Azji dominuje allel FY**A*, w Europie - allel FY**B*, a w Afryce - allel FY**B*-33.

Słowa kluczowe:

Duffy • ACKR1 • FY • chemokiny • *P. vivax* • polimorfizm

Summary

Duffy (Fy) blood group antigens are located on seven-transmembrane glycoprotein expressed on erythrocytes and endothelial cells, which acts as atypical chemokine receptor (ACKR1) and malarial receptor. The biological role of the Duffy glycoprotein has not been explained yet. It is suggested that Duffy protein modulate the intensity of the inflammatory response.

The Duffy blood group system consists of two major antigens, Fy^a and Fy^b, encoded by two codominant alleles designated FY**A* and FY**B* which differ by a single nucleotide polymorphism

*Praca została przygotowana w ramach projektu grantowego nr NN 401 536640 finansowanego przez Narodowe Centrum Nauki.

(SNP) at position 125G>A of the *FY* gene that results in Gly42Asp amino acid change in the *Fy^a* and *Fy^b* antigens, respectively. The presence of antigen *Fy^a* and/or *Fy^b* on the erythrocytes determine three Duffy-positive phenotypes: *Fy(a+b-)*, *Fy(a-b+)* and *Fy(a+b+)*, identified in Caucasian population. The Duffy-negative phenotype *Fy(a-b-)*, frequent in Africans, but very rare in Caucasians, is defined by the homozygous state of *FY*B-33* alleles. The *FY*B-33* allele is associated with a SNP -33T>C in the promoter region of the *FY* gene, which suppresses erythroid expression of this gene without affecting its expression in other tissues. The *FY*X* allele, found in Caucasians, is correlated with weak expression of *Fy^b* antigen. *Fy^x* antigen differs from the native *Fy^b* by the Arg89Cys and Ala100Thr amino acid substitutions due to SNPs: 265C>T and 298G>A in *FY*B* allele. The frequency of the *FY* alleles shows marked geographic disparities, the *FY*B-33* allele is predominant in Africans, the *FY*B* in Caucasians, while the *FY*A* allele is dominant in Asians and it is the most prevalent allele globally.

Full-text PDF: <http://www.phmd.pl/fulltxt.php?ICID=1196360>

Word count: 7516
Tables: 4
Figures: 2
References: 120

Adres autorki: dr hab. Kazimiera Waśniowska, Laboratorium Glikokoniugatów, Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej im. Ludwika Hirszfelda PAN, ul. R. Weigla 12, 53-114 Wrocław; e-mail: wasniows@iitd.pan.wroc.pl

WSTĘP

Antygeny Duffy (*Fy*) i swoiste przeciwciała anty-Duffy, skierowane przeciw epitopom na białku Duffy, stanowią podstawę do wyróżnienia układu grupowego Duffy. Układ Duffy jest klasyfikowany przez Międzynarodowe Towarzystwo Przetaczania Krwi (International Society of Blood Transfusion, ISBT) jako 008 układ grupowy krwi.

Nośnikiem dla antygenów Duffy jest glikozylowane białko Duffy błon ludzkich erytrocytów i komórek śródbłonna, którego łańcuch polipeptydowy siedmiokrotnie przenika błonę komórkową. Charakterystyczna budowa i występowanie białka Duffy sprawia, że pełni nie tylko funkcje antygenów układu grupowego Duffy; jest także receptorem chemokin prozapalnych z grupy CC i CXC oraz receptorem dla zarodźca malarii *Plasmodium vivax*. Ze względu na zdolność wiązania chemokin białko Duffy jest również określane jako DARC - Duffy antygen/receptor dla chemokin lub ACKR1 (atypical chemokine receptor)

Wiedza o układzie grupowym Duffy wynikała początkowo z badań serologicznych, dopiero rozwój metod biologii molekularnej umożliwił poznanie charakteru chemicznego reprezentujących go antygenów. Wykazano, że antygeny Duffy są genetycznie zróżnicowanymi białkami będącymi bezpośrednimi produktami alleli różniących się pojedynczym nukleotydem w genie *FY*. Głównymi antygenami układu grupowego Duffy są antygeny *Fy^a* i *Fy^b*, które rutynowo są badane podczas serologicznej analizy fenotypów Duffy, prowadzonej w laboratoriach diagnostycznych. Wykrywa się też nowe

odmiany białka Duffy, uwarunkowane zmianą nukleotydu w regionie promotorowym lub kodującym genu *FY*, które charakteryzują się zredukowaną liczbą kopii antygenów Duffy na wszystkich komórkach lub całkowitym zniesieniem ekspresji tylko na erytrocytach.

Częstość występowania antygenów Duffy charakteryzuje zróżnicowanie wśród mieszkańców świata, np. zniesienie ekspresji białka Duffy na erytrocytach, typowe dla afrykańskich regionów o endemicznie występującej malarii, zapewnia ich mieszkańcom oporność na zakażenia pasożytem malarii, co jest niezwykle rzadkie w innych regionach.

ANTYGENY UKŁADU GRUPOWEGO DUFFY

Pierwsze doniesienie dotyczące antygenów Duffy zostało opisane w 1950 roku. U 43-letniego pacjenta, pana Duffy, chorego na hemofilię i wymagającego częstych transfuzji, odkryto alloprzeciwciała (anty-*Fy^a*) reagujące z nieznanym dotąd antygenem. Nowy układ grupowy nazwano Duffy, od nazwiska pacjenta, a symbolem *Fy* utworzonym z dwóch ostatnich liter nazwiska nazwano antygen (*Fy^a*) tego układu [19]. Rok później opisano drugi antygen - *Fy^b*, z którym reagowały alloprzeciwciała (anty-*Fy^b*) obecne w surowicy pacjentki po narodzinach trzeciego dziecka, niereagujące z erytrocytami *Fy^a* [45]. Dalsze badania wykazały, że układ grupowy Duffy zbudowany jest z dwóch głównych antygenów *Fy^a* i *Fy^b*. Na podstawie reaktywności krwinek z ludzkimi alloprzeciwciałami anty-*Fy^a* i anty-*Fy^b* wyróżniono trzy Duffy-dodatnie fenotypy w populacji kaukaskiej *Fy(a+b-)*, *Fy(a-b+)*, *Fy(a+b+)* oraz fenotyp Duffy-ujemny *Fy(a-b-)*, dominu-



jący u rdzennych mieszkańców Afryki Zachodniej i Afroamerykanów, który charakteryzuje się brakiem ekspresji antygenów Duffy na powierzchni erytrocytów [22,37,85]. Ponadto wyróżniono krwinki czerwone słabo reagujące z alloprzeciwciałami anti-Fy^b, przy jednoczesnym braku reakcji krwinek z surowicami anti-Fy^a, które nazwano Fy^x lub Fy^{bwk} (wk, -weak; słaby) [17].

Poszczególne antygeny Duffy są kodowane przez odpowiednie allele FY: antygeny Fy^a i Fy^b są kodowane przez dwa alleliczne geny FY^{*A} i FY^{*B}, a za zniesienie (fenotyp Duffy-ujemny) lub zredukowanie (Fy^x) ekspresji antygenów Duffy na powierzchni krwinek czerwonych odpowiadają allele odpowiednio FY^{*B}-33 lub FY^{*A}-33 i allele FY^{*X} [22,37]. Powstanie alleli Duffy jest uwarunkowane przez zmianę pojedynczego nukleotydu, czyli polimorfizm typu SNP (single nucleotide polymorphism) w sekwencji DNA genu FY (tab. 1).

W następnych latach wykryto też ludzkie alloprzeciwciała, występujące u osób Fy(a-b-), i przeciwciała monoklonalne, reagujące z białkiem Duffy w sposób niezależny od zróżnicowania grupowego Fy^a lub Fy^b, a więc definiujące determinanty antygenowe wspólne, które nazwano Fy3, Fy5 i Fy6 (tabela1). Epitop Fy3, określony przez ludzkie alloprzeciwciała anti-Fy3 i epitop Fy6, określony przez przeciwciała monoklonalne anti-Fy6, są obecne na krwinkach Duffy-dodatnich, ale nie występują na krwinkach Duffy-ujemnych

Tabela 1. Antygeny, fenotypy i możliwe genotypy układu grupowego Duffy

Antygeny Fy	Fenotyp Duffy	Allele / genotypy Duffy
Fy ^a (FY:1)	Fy(a+b-)	FY ^{*A} /FY ^{*A} ; FY ^{*A} /FY ^{*A} -33
Fy ^b (FY:2)	Fy(a-b+)	FY ^{*B} ¹ /FY ^{*B} ¹ ; FY ^{*B} ¹ /FY ^{*X} ; FY ^{*B} ¹ /FY ^{*B} -33
Fy ^a /Fy ^b (FY:1,2)	Fy(a+b+)	FY ^{*A} /FY ^{*B} ¹
brak antygenów Fy na erytrocytach	Fy(a-b-)	FY ^{*B} -33/FY ^{*B} -33; FY ^{*A} -33/FY ^{*B} -33; FY ^{*A} -33/FY ^{*A} -33 ²
obniżona ekspresja Fy ^b na erytrocytach	Fy(a-b ^{wk} +) lub Fy ^x	FY ^{*X} /FY ^{*X}
Fy3 (FY3)	Fy(a+b-), Fy(a-b+) Fy(a+b+)	FY ^{*A} , FY ^{*B} ¹ , FY ^{*X}
Fy5 (FY5)	Fy(a+b-), Fy(a-b+) Fy(a+b+)	FY ^{*A} , FY ^{*B} ¹ , FY ^{*X}
Fy6 (FY6)	Fy(a+b-), Fy(a-b+) Fy(a+b+)	FY ^{*A} , FY ^{*B} ¹ , FY ^{*X}

¹ prawdopodobne allele FY^{*B} lub FY^{*B}298A; ² do tej pory nie zidentyfikowano przypadku homozygoty FY^{*A}-33/FY^{*A}-33.

[3,69,83]. Rozróżnienia antygenów Fy3 i Fy6 dokonano na podstawie ich odmiennej wrażliwości na proteazy. Antygen Fy3 jest oporny na trawienie krwinek chymotrypsyną i papainą w przeciwieństwie do antygenów Fy^a, Fy^b i Fy6, które są niszczone przez trawienie krwinek tymi proteazami. Epitop Fy5 został określony przez rzadko występujące ludzkie przeciwciała, które reaguje z krwinkami czerwonymi zawierającymi oprócz antygenów Fy^a lub Fy^b również antygen Rh. W przypadku tego przeciwciała stwierdzono brak reakcji nie tylko z erytrocytami Duffy-ujemnymi, ale też z krwinkami Duffy-dodatnimi nieposiadającymi na swojej powierzchni antygeny Rh. Uważa się, że determinanta Fy5 utworzona jest przez białka Duffy i Rh [22].

PRZECIWCIAŁA ANTY-DUFFY

Naturalnie występujące przeciwciała anti-Fy^a i anti-Fy^b w surowicy osób badanych są bardzo rzadkie, najczęściej ich obecność jest skutkiem immunizacji kobiet podczas ciąży lub reakcji potransfuzyjnych o różnym nasileniu. Antygen Fy^a jest bardziej immunogenny dla osób pochodzenia kaukaskiego niż afrykańskiego, a przeciwciała anti-Fy^a występują około 20 razy częściej niż przeciwciała anti-Fy^b. Obecność przeciwciał anti-Fy^b stwierdza się głównie u osób, które w wyniku kontaktu z obcymi erytrocytami wytworzyły wiele alloprzeciwciał [54]. Przeciwciała anti-Fy^a i anti-Fy^b najczęściej występują w klasie IgG, a ich obecność wykrywa się serologicznie dostępnymi testami antyglobulinowymi [22,64]. Ponadto, dowiedziono występowania przeciwciał anti-Fy3 u osób o fenotypie Fy(a-b-), zwłaszcza chorych na anemię sierpowatą poddawanych wielokrotnym transfuzjom [3,114]. Ze względu na ryzyko wywołania poprzetoczeniowych reakcji hemolitycznych, osobom z alloprzeciwciałami anti-Fy^a lub anti-Fy^b należy dobrać koncentrat krwinek czerwonych bez tego antygeny, odpowiednio Fy(a-) lub Fy(b-).

Do tej pory otrzymano i scharakteryzowano kilkanaście przeciwciał monoklonalnych rozpoznających różne epitopy zlokalizowane na białku Duffy. Przeciwciała monoklonalne anti-Fy^a, anti-Fy^b i anti-Fy6 rozpoznają epitopy zlokalizowane w N-końcowym fragmencie białka Duffy [108,111,112], natomiast epitop dla przeciwciała anti-Fy3 jest umiejscowiony w trzeciej pętli zewnątrz-błonowej białka Duffy [100,111]. Niedawno otrzymano także pierwsze wielbłądzie nanociało CA52 o swoistości pokrywającej się ze swoistością przeciwciała monoklonalnego anti-Fy6 2C3 [92]. Przeciwciała monoklonalne są wykorzystywane do oczyszczania białka Duffy i jako odczynniki serologiczne. Listę przeciwciał monoklonalnych anti-Duffy wraz z rozpoznawanymi przez nie epitopami przedstawiono w tabeli 2.

NOŚNIKIEM ANTYGENÓW DUFFY JEST N-GLIKOZYLOWANE BIAŁKO BŁON ERYTROCYTÓW

Determinanty antygenowe Duffy (Fy^a, Fy^b, Fy3, Fy 5 i Fy 6) są zlokalizowane na białku o masie cząsteczko-

Tabela 2. Przeciwciała monoklonalne anty-Duffy i ich swoistość

Przeciwciało monoklonalne	Rozpoznawany epitop	Krwinki reagujące	Krwinki niereagujące
Anty-Fy ^a			
5T72	³⁷ PDGDYGANLEA ⁴⁷	Fy(a+b-), Fy(a+b+)	Fy(a-b+), Fy(a-b-)
655	³⁷ PDGDYGANLEA ⁴⁷		
MIMA-19	³⁷ PDGDYGANLEA ⁴⁷		
Anty-Fy ^b			
HIRO-31	³⁷ PDGDYDANLEAA ⁴⁸	Fy(a-b+), Fy(a+b+)	Fy(a+b-), Fy(a-b-)
Anty-Fy3			
MIMA-29	²⁷⁸ AQQALDLLN ²⁸⁷	Fy(a+b-), Fy(a-b+)	Fy(a-b-)
CRC-512	konformacyjny-	Fy(a+b+)	
Anty-Fy6			
BG6	¹⁶ NSSQLDFEDVWN ²⁷	Fy(a+b-) Fy(a-b+) Fy(a+b+)	Fy(a-b-)
i3A	¹⁶ NSSQLDFEDVWN ²⁷		
NaM185-2C3	¹⁶ NSSQLDFEDVWN ²⁷		
MIMA-107	¹⁶ NSSQLDFEDVWN ²⁷		
MIMA-108	¹⁶ NSSQLDFEDVWN ²⁷		
CAS2	¹⁶ NSSQLDFEDVWN ²⁷		
Czcionka podkreślona oznacza reszty aminokwasowe epitopu rozpoznawane przez przeciwciało [92,100,111]			

wej ~40-47 kDa, które migruje w żelu poliakrylamidowym, jako szerokie pasmo ze skłonnością do agregacji, nawet po inkubacji w temperaturze 100°C w obecności β-merkaptopetanolu i SDS [32,35]. Obecność łańcuchów cukrowych w białku Duffy wykazano dopiero w latach osiemdziesiątych ubiegłego wieku. Trawienie błon krwinek neuraminidazą i endoglikozydazą powodowało zmianę ruchliwości elektroforetycznej pasma reprezentującego białko Duffy, co sugerowało, że jest ono uszjalowaną glikoproteiną [35,96]. Trawienie wydzielonego białka Duffy i jego fragmentu trypsynowego glikozydazami potwierdziły obecność łańcuchów N-glikozydowych i brak łańcuchów O-glikozydowych w cząsteczce Fy [83,110]. Ponadto, analiza trawienia endoglikozydazą receptora chemokin błon erytrocytów, podobnie jak w przypadku białka Duffy, wykazała spadek masy cząsteczkowej białka i pozwoliła ustalić, że białko Duffy i krwinkowy receptor chemokin to ta sama cząsteczka [42].

W łańcuchu polipeptydowym Duffy występują trzy potencjalne miejsca N-glikozylacji przy resztach aminokwasowych Asn16, Asn27 i Asn33. Obecność łańcucha oligosacharydowego dowiedziano początkowo tylko przy Asn16 [100]. Natomiast analiza mutantów glikozylacyjnych białka Duffy pozbawionych jednego, dwóch lub trzech miejsc potencjalnej glikozylacji wykazała istnienie łańcuchów oligosacharydowych we wszystkich trzech miejscach [21,33]. Opracowanie efektywnej metody oczyszczania białka Duffy z erytrocytów i analiza części cukrowej w lektynoblotingu pozwoliły

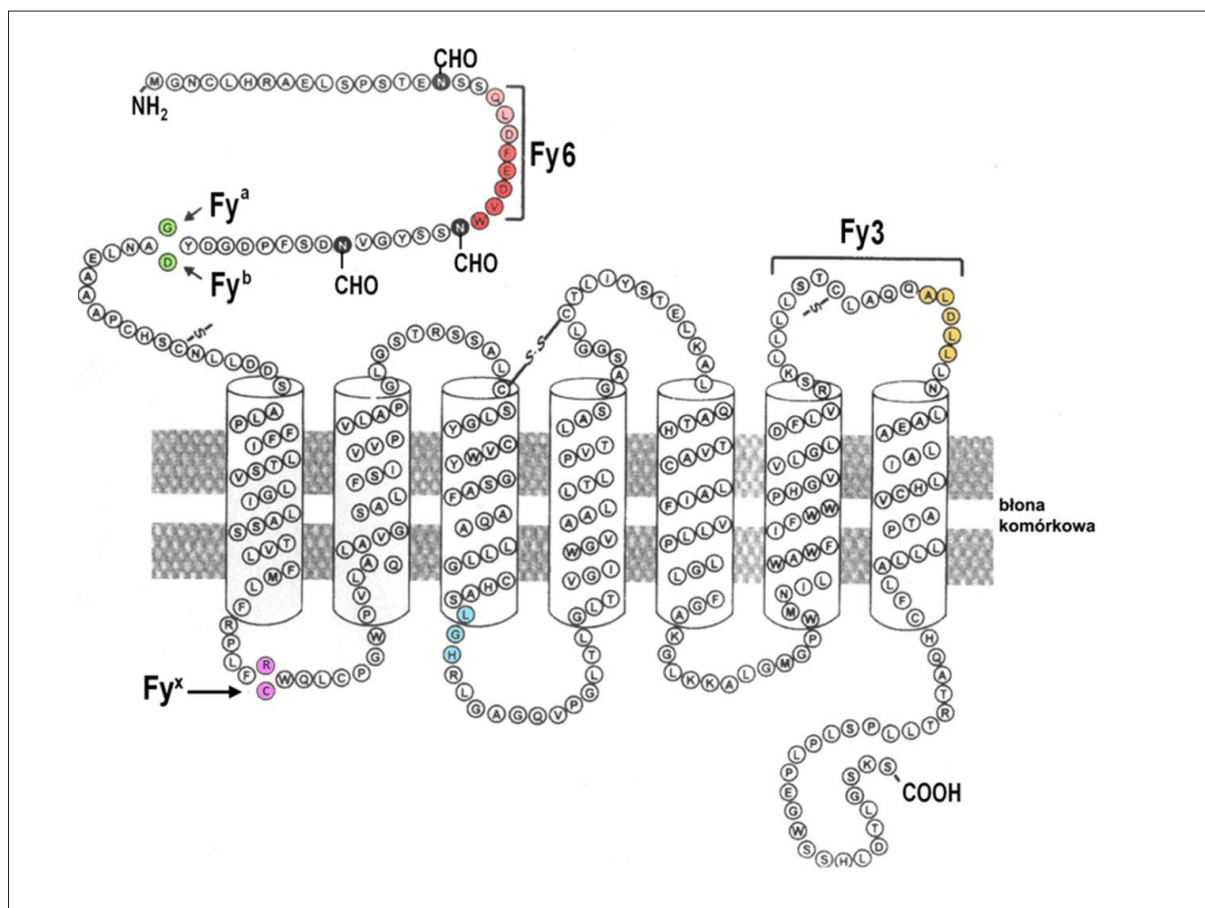
wykazać, że dołączone N-glikany to złożone trój- i/lub czteroantennowe łańcuchy oligosacharydowe zawierające reszty N-acetylolaktosaminy, zakończone resztami kwasu sjałowego przyłączonych wiązaniem α2-3 i α2-6 do galaktozy, z α1-6-fukozą i rozdzielającą resztą GlcNAc przy rdzeniu [32].

STRUKTURA PIERWSZORZĘDOWA I UŁOŻENIE W BŁONIE GLIKOPROTEINY DUFFY

W 1993 r. sklonowano gen *FY* i poznano sekwencję jego cDNA, co umożliwiło następnie poznanie struktury białka Duffy [13]. Występują dwie izoformy Duffy, które różnią się długością łańcucha polipeptydowego i odmienną sekwencją aminokwasów na początku N-końcowego fragmentu białka. Wcześniej poznana izoforma, zbudowana jest z 338 reszt aminokwasowych, zaczyna się sekwencją ¹MASGGYVLQ⁹ i jest kodowana przez jeden ekson [13], podczas gdy główna izoforma (ryc. 1), zawierająca 336 reszt aminokwasowych z sekwencją ¹MGNCLHR⁷ na N-końcu łańcucha, jest kodowana przez mRNA powstałe w wyniku składowania dwóch eksonów przedzielonych intronem [47].

Łańcuch polipeptydowy Duffy złożony z 336 reszt aminokwasowych występuje ok. 50-200 razy częściej niż łańcuch zbudowany z 338 reszt aminokwasowych, dlatego w niniejszym opracowaniu oznaczenia pozycji nukleotydów i reszt aminokwasowych odnoszą się do głównej postaci białka Duffy. Wspomniana różnica między dwiema izoformami nie ma wpływu na wiązanie prze-





Ryc. 1. Schematyczne przedstawienie sekwencji aminokwasowej białka Duffy; wyróżniono położenie epitopów Fy^a/Fy^b, Fy3 i Fy6; kolorami zaznaczono najważniejsze elementy: jasno- i ciemnozielony - antygeny Fy^a/Fy^b; różowy i czerwony - epitop Fy6; niebieski - miejsce odpowiadające położeniu sekwencji DRYLAIV w cząsteczce typowego receptora chemokin; żółty - epitop przeciwciała anti-Fy3 MIMA 29; fioletowy - miejsca polimorfizmu Fy^x; CHO - łańcuch oligosacharydowy (wg [37] zmodyfikowano)

ciwciał, chemokin i pasożytów malarii przez Duffy. Obie izoformy mają taką samą sekwencję aminokwasową w dalszej części łańcucha polipeptydowego, dlatego też zaproponowany jest taki sam model ułożenia w błonie komórkowej (ryc.1).

Łańcuch polipeptydowy glikoproteiny Duffy, który siedmiokrotnie przenika błonę komórkową, przypomina receptory przekazujące sygnał przez białka G. W obrębie cząsteczki można wyróżnić region N-końcowy umiejscowiony na zewnątrz komórki, zbudowany z 60 reszt aminokwasowych, domenę środkową złożoną z siedmiu przezbłonowych α -helis z pętlami zewnątrz- i wewnątrzkomórkowymi oraz region C-końcowy położony po stronie cytoplazmatycznej, zbudowany z 28 reszt aminokwasowych. Fragmenty łańcucha polipeptydowego białka Fy umiejscowione na zewnątrz komórki zawierają trzy miejsca N-glikozylacji, epitopy dla przeciwciał oraz miejsca wiązania chemokin i pasożytów malarii. W odróżnieniu od innych siedmiohelikalnych, funkcjonalnych receptorów chemokin, antygen Duffy nie ma sekwencji DRYLAIV z konserwatywnym motywem DRY (Asp-Arg-Tyr) na drugiej pętli cytoplazmatycznej, co jest

prawdopodobną przyczyną braku zdolności sygnalizowania antygeny Duffy [22,37]

WYSTĘPOWANIE BIAŁKA DUFFY

Białko Duffy występuje na powierzchni krwinek czerwonych i komórek śródbłonka niektórych narządów. Szacuje się, że liczba kopii białka Fy na erytrocytach Duffy-dodatnich wynosi 12000-17000 cząsteczek i jest taka sama jak liczba determinant antygenowych Fy3, Fy5 i Fy6. Liczba determinant antygenowych Fy^a jest taka sama jak liczba kopii białka Duffy u osób o fenotypie Fy(a+b-), a liczba determinant antygenowych Fy^b taka sama jak liczba kopii białka Duffy u osób o fenotypie Fy(a-b+), podczas gdy u osób o fenotypie Fy(a+b+) determinanta Fy^a występuje na połowie wszystkich cząsteczek białka Duffy, a determinanta Fy^b na drugiej połowie wszystkich cząsteczek białka Duffy [22,69]. U osób o fenotypie Fy(a-b-) brak jest białka Duffy i determinant antygenowych Fy na krwinkach; u tych osób białko Duffy i determinanty antygenowe Fy^b, Fy3 i Fy6 występują na innych komórkach, co sugeruje, że fizjologiczna rola tego białka nie ogranicza się do pro-

cesów związanych z krwinkami czerwonymi [73,77]. Osoby o fenotypie $Fy^{b^{wk}}$ (weak) mają obniżoną ekspresję białka Duffy i determinant antygenowych znajdujących się na tym białku (Fy^b , Fy_3 , Fy_6) o ~90%, nie tylko na krwinkach czerwonych, ale również na komórkach innych tkanek. Ponadto, na retikulocytach, obecność epitopu Fy_6 jest o ~50% większa niż na dojrzałych erytrocytach, co może sugerować, że wraz z dojrzewaniem krwinek czerwonych zmniejsza się liczba kopii białka Fy . W chwili urodzenia człowieka glikoproteina Fy jest w pełni wykształcona, a jej ilość na erytrocytach osoby zdrowej jest stała i nie ulega zmianie wraz z wiekiem człowieka [22,56].

Oprócz krwinek czerwonych, antygeny Duffy zlokalizowano także na komórkach śródbłonka żyłek pozawłośniczkowych w obrębie naczyń nerek i przewodów moczowych, śledziony, dwunastnicy, okrężnicy, trzustki, wątroby płodowej, oskrzelików i pęcherzyków płucnych oraz w komórkach Purkiniego w mózdzku. Wykluczono obecność Duffy na leukocytach i komórkach śródbłonka tętniczek, tętnic i żył [22,36,37,77].

Na podstawie analizy sekwencji nukleotydów genu FY oraz sekwencji aminokwasów w obrębie łańcucha polipeptydowego Fy wykazano wysoką homologię między ludzkim białkiem Duffy a innych ssaków, w tym małp, bydła i myszy. Badania zdolności wiązania przeciwciał anti-Duffy przez zwierzęcą postać białka Duffy dowiodły, że krwinki wszystkich małp reagują z przeciwciałami anti- Fy^b , lecz nie reagują z anti- Fy^a . Na tej podstawie zaproponowano, że postać antygeny Fy^b jest postacią ewolucyjnie starszą, z której wykształciła się odmiana Fy^a . U myszy i bydła nie potwierdzono występowania sekwencji podobnych do epitopów Fy^a , Fy^b , Fy_3 i Fy_6 w obrębie homologicznego białka [98].

MOLEKULARNE PODSTAWY POLIMORFIZMU ANTYGENÓW UKŁADU GRUPOWEGO DUFFY

Układ grupowy Duffy był pierwszym układem, dla którego locus umiejscowiono w autosomie [24]. Antygeny Duffy są kodowane przez allele leżące w locus FY na długim ramieniu chromosomu 1 w rejonie 1q22→q23 [13,61]. Ekson pierwszy genu FY ($DARC$) (ryc. 2) zawiera sekwencję niekodującą oraz sekwencję kodującą 7 pierwszych reszt aminokwasowych łańcucha polipeptydowego Duffy. W obrębie regionu promotorowego znajdują się miejsca wiązania czynników transkrypcyjnych, m.in. $Sp1$, $AP2$, $GATA-1$, z których najlepiej poznany motywem jest $GATA$. Ekson drugi koduje pozostałe 329 reszt aminokwasowych i obejmuje także krótki fragment niekodujący. Intron składa się z 479 nukleotydów. Według powszechnie przyjętej zasady, zastosowanej także w niniejszym opracowaniu, nukleotydy Duffy są numerowane, przyjmując za miejsce +1 nukleotyd odpowiadający początkowi sekwencji ulegającej translacji w głównej postaci mRNA, przy czym miejsce inicjacji transkrypcji (TSP) rozpoczyna się -34 nukleotydu powyżej kodonu START w kierunku 5'

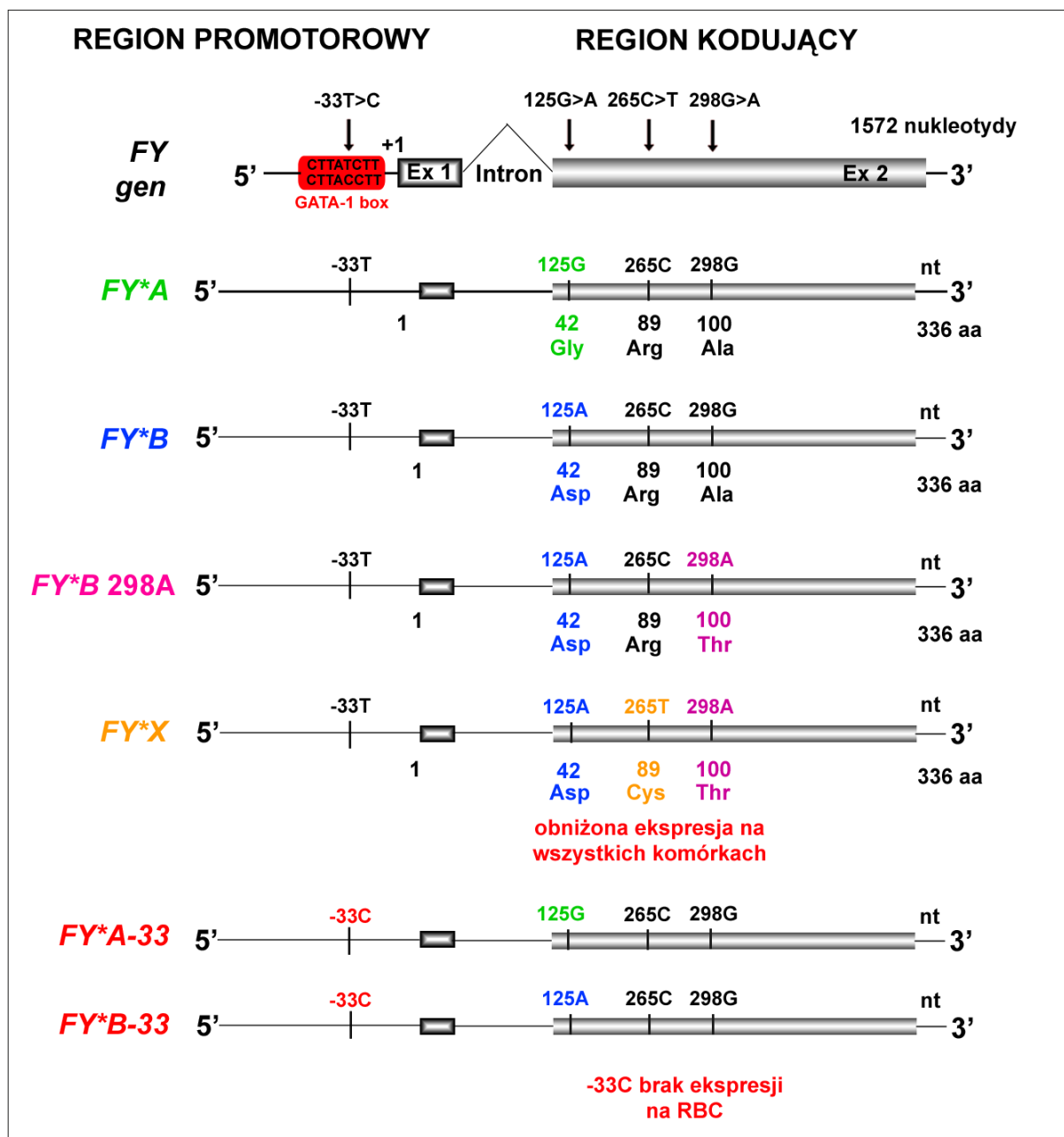
dla komórek linii erytroidalnych oraz -82 nukleotydy powyżej kodonu START w kierunku 5' dla komórek śródbłonka żyłek pozawłośniczkowych nerek i płuc [47]. Stosowana jest także alternatywna numeracja, wprowadzona przez Tournamille'a i wsp. [99], gdzie za miejsce +1 uznaje się nukleotyd odpowiadający miejscu inicjacji transkrypcji w tkankach erytroidalnych położony -21 miejsc w kierunku 5' przed ogólnie przyjętą pozycją nt +1.

Rozwój metod genotypowania przyczynił się do wyjaśnienia molekularnych podstaw polimorfizmu układu grupowego Duffy. Antygeny Duffy powstają w wyniku zmiany jednego lub dwóch nukleotydów i charakteryzowane są przez polimorfizm pojedynczego nukleotydu typu SNP (single nucleotide polymorphism) w genie FY , co schematycznie przedstawiono na ryc.2.

Główne antygeny grupowe Fy^a i Fy^b są kodowane przez alleliczne odmiany genu FY , które różnią się tylko jednym nukleotydem w pozycji 125 sekwencji nukleotydowej FY , allel FY^*A ma guaninę, a allel FY^*B adeninę. SNP 125G>A zmienia 42. resztę aminokwasową w obrębie regionu N-końcowego łańcucha polipeptydowego Duffy, z glicyny w Fy^a na kwas asparaginowy w Fy^b [59,99].

Ekspresja białka Duffy na erytrocytach może być zredukowana lub całkowicie zniesiona. Za obniżenie liczby kopii Duffy na powierzchni wszystkich komórek wykazujących ekspresję białka Duffy, odpowiadają dwa SNP'y w pozycjach 265C>T i 298G>A sekwencji nukleotydowej genu FY , gdzie odpowiednio zamiast cytozyny znajduje się tymina, a zamiast guaniny jest adenina. Oznaczony w ten sposób allel FY^*X , określane także FY^*B^{wk} (wk – weak; słaby) jest odmianą allelu FY^*B , ponieważ poza SNP'ami w pozycjach 265C>T i 298G>A ma taką samą sekwencję nukleotydową jak allel FY^*B . Produktem ekspresji allelu FY^*X jest łańcuch polipeptydowy białka Duffy, określane jako Fy^x lub $Fy^{b^{wk}}$, z dwiema missensownymi mutacjami Arg89Cys i Ala100Thr [70,72,101]. Zdolność wiązania przeciwciał anti- Fy^b , anti- Fy_6 i anti- Fy_3 przez białko Fy^x jest zredukowana o ~90%, a wiązanie chemokin o ~50% w stosunku do antygeny Fy^b . Uważa się, że różnica nie wynika jednak ze zmian konformacyjnych białka, co mogłoby zmniejszyć wiązanie przeciwciał lub chemokin, lecz z obniżonej do ~10%, liczby kopii Fy^x (antygen Fy^b z mutacjami Arg89Cys i Ala100Thr) na komórkach w porównaniu z antygenem Fy^b . Za przyczynę obniżonej ekspresji podaje się utratę dodatniego ładunku pochodzącego od reszty argininy i wprowadzenie obojętnej reszty cysteiny w pozycji 89 łańcucha polipeptydowego Duffy w pierwszej pętli cytoplazmatycznej [101,116]. Analiza ekspresji mutantów białka Duffy w komórkach 293T, w których aminokwas 89 zamieniano innymi aminokwasami potwierdziła, że zamiana argininy na lizynę, inną dodatnio naładowaną resztę aminokwasową sprawia, że białko Duffy wykazuje taką samą ekspresję jak cząsteczka natywna [95]. W ten sposób dowiedziono, że modyfikacja chemiczna





Ryc. 2. Schemat przedstawiający strukturę genu, alleli *FY* i glikoproteiny Duffy; miejsca polimorfizmu ważne dla każdego allelu zaznaczono: zielonym dla *FY*^A (antygeny *Fy*^a); niebieskim dla *FY*^B (antygeny *Fy*^b); różowym dla *FY*^B298A; żółtym dla *FY*^X (antygeny *Fy*^x) oraz czerwonym dla *FY*^A-33 i *FY*^B-33 (wg [77] zmodyfikowano)

otoczenia 89 reszty aminokwasowej utrudnia translokację łańcucha polipeptydowego Duffy przez błonę komórkową przyczyniając się do ograniczenia liczby cząsteczek *Fy* na powierzchni. Polimorfizmowi 265C>T w allelu *FY*^X, zmieniającemu 89 kodon, zawsze towarzyszy SNP 298G>A [29]. SNP w pozycji 298G>A, który zmienia kodon Ala na kodon Thr w pozycji 100. łańcucha polipeptydowego Duffy, może także samodzielnie występować w allelu *FY*^B, dlatego w niniejszej rozprawie wprowadzono nazwę dla tego allelu *FY*^B298A. Warto zaznaczyć, że allel *FY*^B298A, nie zmienia ekspresji białka *Fy* na powierzchni komórek [70,116]. Ponadto,

opisano dwa przypadki występowania tyminy zamiast guaniny w pozycji 145G>T sekwencji nukleotydowej allelu *FY*^X, lecz mimo zmiany aminokwasu Ala49Ser, nie zaobserwowano dodatkowego wpływu na ekspresję białka Duffy, z wyjątkiem tego, który wynika z obecności allelu *FY*^X [10]. Pomimo opisanego przypadku występowania obniżonej ekspresji antygeny *Fy*^a na erytrocytach u osób populacji tajskiej [91], do tej pory stwierdzono tylko jeden przypadek odmiany allelu *FY*^A z 265T i 298A, będącego odpowiednikiem allelu *FY*^X, u australijskiego dawcy pochodzenia kaukaskiego [58].

Całkowite zniesienie ekspresji białka Duffy tylko na powierzchni komórek linii erytroidalnej jest konsekwencją SNP'u w regionie promotorowym allelu FY^*B . Zamiana nukleotydu tyminy na cytozynę w pozycji -33T>C sekwencji nukleotydowej FY^*B , powoduje zniszczenie miejsca wiązania erytroidalnego czynnika transkrypcyjnego GATA-1 i w konsekwencji brak ekspresji antygeny Fy^b na erytrocytach, z zachowaniem ekspresji na komórkach śródbłonna [47,99]. Allel opisujący SNP -33T>C jest przez badaczy różnie nazywany: FY^*B^{null} [120], FY^*Fy [29], FY^*B^{es} (erythroid silent) [77], FY^*B^{GATA} [71] lub FY^*B-33 [10]. Ponadto, należy zwrócić uwagę na odmienne oznaczenia pozycji tego SNP licząc w kierunku 5'-3':

- -33T>C, od pierwszego nukleotydu inicjującego transkrypcję w dominującej postaci genu FY [77];
- -67T>C, od pierwszego nukleotydu kodonu START odpowiadającego początkowi translacji w głównej postaci genu FY [22, 64] lub
- -46T>C, od pierwszego nukleotydu inicjującego transkrypcję w alternatywnej postaci genu FY [99].

W publikacji posługiwano się nazwą allelu FY^*B-33 , a nukleotydy numerowano od pierwszego nukleotydu inicjującego transkrypcję w dominującej postaci genu FY [10,77].

Występowanie polimorfizmu Duffy jest głównie związane z pojawianiem się dodatkowych SNP'ów w obrębie allelu FY^*B . Opisano przypadki występowania SNP -33T>C w regionie promotorowym allelu FY^*A , a „nowemu” allelowi nadano nazwę FY^*A^{null} lub FY^*A-33 . Konsekwencje mutacji w pozycji -33 allelu FY^*A na ekspresję Duffy są podobne do tych wywołanych przez allel FY^*B-33 , gdyż znoszą ekspresję antygeny Fy^a na erytrocytach. Do tej pory nie udało się jednak wykazać przypadku homozygoty FY^*A-33 , allel ten występuje w układzie heterozygotycznym FY^*A-33/FY^*A lub FY^*A-33/FY^*B-33 . Analiza ekspresji antygeny Fy^a metodą cytometrii przepływową potwierdziła, że sygnał fluorescencyjny jest zredukowany o połowę po reakcji przeciwciał anti- $Fy6$ z krwinkami $Fy(a+b-)$ kodowanymi przez FY^*A/FY^*A-33 , w porównaniu do sygnału pochodzącego z wiązania anti- $Fy6$ do krwinek $Fy(a+b-)$ kodowanych przez FY^*A/FY^*A [51,120].

Rozróżnienie antygenów występujących na powierzchni krwinek czerwonych jest możliwe tylko w przypadku antygenów Fy^a i Fy^b poprzez reakcję ze swoistymi przeciwciałami, skierowanymi przeciwko epitopom obejmującym polimorfizm Fy^a i Fy^b . Serologiczne rozpoznanie antygenów kodowanych przez allele FY^*X i FY^*B298A nie jest możliwe, gdyż miejsca zmian aminokwasów w białku Duffy są umiejscowione wewnątrzkomórkowo lub w obrębie błony komórkowej, a więc niedostępne dla przeciwciał skierowanych przeciwko tym miejscom. Zdarza się jednak, że komercyjnie dostępne przeciw-

ciała anti- Fy^b są na tyle czułe, że wykrywają obecność antygeny Fy^b na krwinkach Fy^x .

Fenotyp Duffy-ujemny $Fy(a-b-)$, będący następstwem braku antygeny Duffy na erytrocytach, jest najczęściej skutkiem występowania układu homozygotycznego: FY^*B-33/FY^*B-33 , bardzo rzadko układu heterozygotycznego FY^*A-33/FY^*B-33 lub FY^*B-33/FY^*X . Inne podłoże molekularne fenotypu Fy -ujemnego, opisane zaledwie u kilku osób, wynika z delecji fragmentów części kodującej genu FY lub mutacji, w wyniku których przedwcześnie powstaje kodon STOP. Sugeruje się, że łańcuchy peptydowe, powstałe w wyniku tych zmian, nie są transportowane w kierunku błony komórkowej, albo powstałe mRNA jest niestabilne i szybko degradowane [60,82]. W konsekwencji, białko Duffy nie występuje na komórkach żadnej z tkanek. Zaobserwowano, że zmiany w ekspresji Duffy mogą być przyczyną niektórych procesów patofizjologicznych u ludzi, co omówiono w dalszej części. Wszystkie wymienione allele FY , warunkujące polimorfizm genetyczny Duffy, zebrano i podsumowano w tabeli 3. Oprócz nazw powszechnie stosowanych, wprowadzono nazwy proponowane przez ISBT. Pogrubione SNP'y decydują o wyróżnieniu poszczególnych alleli i fenotypów Duffy.

ROZKŁAD POLIMORFIZMÓW DUFFY W POPULACJACH ŚWIATA

Rozkłady antygenów Duffy, uzupełniane o kodujące je allele i prawdopodobne genotypy FY , wykazują zróżnicowaną częstość w zależności od położenia geograficznego. W obrębie niemal wszystkich populacji dominują fenotypy Duffy-dodatnie, występujące w różnej konfiguracji antygenów Fy^a i Fy^b . Jedynie wśród osób pochodzenia afrykańskiego przeważa fenotyp $Fy(a-b-)$, za który odpowiada genotyp FY^*B-33/FY^*B-33 . Rozkład allelu FY^*B-33 , którego częstość wynosi ponad 90% w regionie Afryki subsaharyjskiej jest ściśle związany z endemicznym występowaniem tam zarodźca malarii *Plasmodium vivax*. Istotne różnice wynikają także z rozkładu alleli FY^*A i FY^*B kodujących główne antygeny grupowe Fy^a i Fy^b . Najnowsze dane zebrane przez grupę Howesa wskazują, że allel FY^*A jest najczęstszy wśród mieszkańców wschodniej części globu obejmując wschodnią i południową Azję, Australię oraz od Mongolii po wschodnie Chiny i Rosję. Częstość tego allelu na poziomie ~80-100% występuje także wśród mieszkańców Alaski i północno-zachodniej Kanady. Allel FY^*B występuje głównie w Europie i wzdłuż wschodniego wybrzeża Ameryki Północnej i Południowej, gdzie występuje z częstością ~50-85% i dominuje nad rozkładem alleli FY^*A i FY^*B-33 . Warto zwrócić uwagę, że w badaniach nie wyróżniono wszystkich odmian allelu FY^*B . Allele FY^*X i FY^*B298A potraktowano w tych analizach jak allel FY^*B [43].

Przykładowe rozkłady fenotypów i/lub genotypów Duffy w obrębie niektórych krajów i regionów przedstawiono w tabeli 4. Dodatkowo, jeśli tylko informacja była dostępna, przedstawiono częstości występowania alleli



Tabela 3. Allele *FY*

Nazwa allelu powszechnie stosowana	Nazwa allelu proponowana przez ISBT	nt -33 T>C	nt 125 G>A	nt 145 G>T	nt 265 C>T	nt 287 G>A	nt 298 G>A	nt 407 G>A	nt 408 G>A	Fenotyp
<i>FY*A</i>	<i>FY*01</i>	T	G	G	C	G	G	G	G	Fy(a+)
<i>FY*B</i>	<i>FY*02</i>	T	A	G	C	G	G	G	G	Fy(b+)
<i>FY*B298A (FY*B¹)</i>	brak nazwy	T	A	G	C	G	A	G	G	Fy(b+)
Zniesienie ekspresji – fenotyp null										
<i>FY*A-33</i>	<i>FY*01N.01</i>	C	G	G	C	G	G	G	G	Fy(a-) na RBC
<i>FY*B-33</i>	<i>FY*02N.01</i>	C	A	G	C	G	G	G	G	Fy(b-) na RBC
#1	<i>FY*01N.02</i>	T	G	G	C	G	A	-	-	Fy(a-) 119 aa polipeptyd
#2 pacjent 3	<i>FY*01N.03</i>	T	G	G	C	G	G	G	A	Fy(a-) 136 aa polipeptyd
#2 pacjent 1	<i>FY*01N.04</i>	T	G	G	C	A	-	-	-	Fy(a-) 96 aa polipeptyd
#3	<i>FY*01N.05</i>	T	G	G	C	G	G	-	-	Fy(a-) 120 aa polipeptyd
#2 pacjent 2	<i>FY*02N.02</i>	T	A	G	C	G	G	A	G	Fy(a-) 136 aa polipeptyd
Obniżenie ekspresji – fenotyp weak										
<i>FY*X (FY*B²)</i>	<i>FY*02W.01</i>	T	A	G	T	G	A	G	G	Fy(b-) / Fy(b+ ^{wk})
<i>FY*B³</i>	<i>FY*02W.02</i>	T	A	T	T	G	A	G	G	Fy(b-) / Fy(b+ ^{wk})

Nt: nukleotydy; RBC: erytrocyty; aa: aminokwasy; ISBT: International Society of Blood Transfusion; #1: brak nazwy powszechnie stosowanej, allel zidentyfikowany przez [60] przypadek AZ; numeracja nukleotydów w pozycji 287 i 298 po uwzględnieniu delecji 14 nukleotydów: 281-295. Kodon STOP w pozycji 119 sekwencji aminokwasowej; #2 brak nazw powszechnie stosowanych, allele zidentyfikowane przez [82]. Kodony STOP w pozycjach: 136 sekwencji aminokwasowej – pacjent 3 i pacjent 2; 96 sekwencji aminokwasowej – pacjent 1; #3 brak nazwy, allel zidentyfikowany przez [102]. Delecja pojedynczego nukleotydu w pozycji 327 sekwencji nukleotydowej generuje kodon STOP w pozycji 120 sekwencji aminokwasowej.

Wszystkie allele oznaczone symbolem # są przyczyną braku ekspresji białka na erytrocytach i wszystkich tkankach.

FY w obrębie wymienionych regionów. Najczęściej autorzy w swych badaniach koncentrują się na allelach *FY*A*, *FY*B* i *FY*B-33*, wciąż mało wiadomo o rozkładzie alleli *FY*X* i *FY*B298A*.

Analizy prowadzone w obrębie tych samych regionów przedstawiają niekiedy różne dane. Dotyczy to szczególnie regionów w przeszłości kolonizowanych przez mieszkańców m.in. Afryki, Europy czy Azji. Przykładem są tu kraje obu Ameryk Północnej i Południowej, które charakteryzują się dużym zróżnicowaniem etnicznym, a tym samym różnym rozkładem alleli i genotypów Duffy. Ponadto, ludność świata stale migruje, dlatego w badaniach częstości występowania polimorfizmów Duffy, należy uwzględnić nie tylko miejsce badania, ale także pochodzenie osób lub ich przynależność etniczną, wyróżniając np. główne grupy: kaukaską, afrykańską, czy azjatycką [22]

Populacja kaukaska, zamieszkująca różne regiony świata, charakteryzuje się występowaniem wszystkich opisanych alleli *FY*. Częstość występowania alleli *FY*A* i *FY*B* szacuje się na ~30-50%. Allele *FY*B298A* i *FY*X* oznacza się średnio w 33% i w 3,5% przypadków, a częstość allelu *FY*B-33* szacuje się na mniej niż 1% [22,116]. Allele *FY*X* oraz *FY*B298A* początkowo kojarzone były tylko z osobami pochodzenia kaukaskiego, wkrótce jednak wykazano przypadki występowania tych alleli wśród Brazylijczyków i mieszkańców USA pochodzenia afrykańskiego [26].

Jednoczesne występowanie allelu *FY*X* i allelu *FY*B-33* w jednym genotypie (*FY*X/FY*B-33*) jest bardzo rzadkie i do tej pory przedstawiono kilka takich przypadków, w tym wśród mieszkańców Polski [10,46,49,72]. O ile obecność allelu *FY*X* w populacji polskiej nie może budzić zdziwienia, gdyż częstość tego allelu w populacji

Tabela 4. Procentowy rozkład częstości fenotypów, genotypów Duffy i alleli FY w populacjach wybranych krajów

Fenotyp/ Genotyp	FyFy(a+b-)	Fy(a-b+)	Fy(a+b+)	Fy(a-b-)									
	FY*A/ FY*A	FY*A/ FY*X	FY*A/ FY*B-33	FY*B/ FY*B	FY*B/ FY*B298A	FY*B/ FY*X	FY*B/ FY*B-33	FY*B298A/ FY*B-33	FY*A/ FY*B	FY*A/ FY*B298A	FY*B-33/ FY*B-33	FY*B-33/ FY*X	
Austria	17,7	1	0,5	31	nb	1,5	0,5	nb	47,8	nb	0	0	
*Włochy	9,7	29	61,3	0									
Brazylia C/ Af/ Az	18/5/59,34	1,5/2/ nb	1/24/ nb	36/2/ 2,39		3/3/ nb	0/0/ nb	0/11/ nb	0/2/nb	35/7/38,27	4/3/ nb	0/39/0	1,5/2/ nb
Brazylia stan Amazonas	13	0,9	18,8	16,36		nb	1,81	16,36	nb	27,3	nb	5,47	0
Argentyna	29,5	nb	4,7	24,4		nb	nb	2,9	nb	38,5	nb	0	nb
Jordania	14,5	2	14,5	11		5,5	nb	11	nb	15,5	7	18	1
*Iran	47,4	22,8	26,4	3,4									
Japonia	49,71	nb	nb	21,59		nb	nb	nb	nb	28,69	nb	0	nb
Chiny ^o	87,67	nb	nb	0		nb	nb	nb	nb	12,33	nb	0	nb
*Indie ^l	36,22	15,36	48,03	0,39									
Turcja	19,05	nb	0	19,05		nb	nb	0	nb	61,90	nb	0	nb
USA C/Af	19/0 (20)	4,2/0	2/26	21,6/ 2 (28)		19,4/0	0	0/9	0	25,4/2 (0)	8,4/0	0/ 61 (52)	0

Allele FY	FY*A	FY*B	FY*B298A	FY*B-33	FY*A-33	FY*X
Austria	42,5	55,5	nb	0,5	nb	1,5
Brazylia stan Amazonas/Af/ Az	36,5/25,8/ 78,5	39/10,5/ 20,4	nb	23/63,7/ 1,1	nb	1,5/ nb
Jordania	34	23	12	29	nb	2
Chiny	94	6	nb	nb	nb	nb
USA C/Af	40/10 (10)	60/10 (9)	nb (5)	1/80 (75)	nb	nb (1)
Afryka Zachodnia	0	0	nb	100	0	nb
Papua Nowa Gwinea	98,74	0	nb	0	1,26	nb

Fenotypy Duffy określano na podstawie reaktywności z przeciwciałami anty-Fya i anty-Fyb standardowymi metodami serologicznymi. Do genotypowania Duffy wykorzystywano metody biologii molekularnej: RFLP, real-time PCR, ASP-PCR czy sekwencjonowanie. *oznaczano jedynie fenotyp Duffy; nb – nie badano, C/Af/Az – osoby pochodzenia odpowiednio kaukaskiego, afrykańskiego, azjatyckiego, wg samodzielnych klasyfikacji osób badanych; tabelę opracowano na podstawie [7,10,11,18,27,46,52,74,76,86,116,120]

kaukaskiej wynosi ~3-5%, to pojawienie się allelu FY*B-33 już tak. Allel FY*B-33 jest typowym allelem występującym wśród osób pochodzenia afrykańskiego, a jego rozpowszechnienie w Afryce jest związane z obecnością zarodźca malarii *Plasmodium vivax*. W populacji kaukaskiej stwierdzono tylko kilka przypadków występowania allelu FY*B-33 w genotypie: m.in. wśród aszkenezyjskich i nieaszkenezyjskich Żydów i Brazylijczyków [10,54]. Ponadto, fenotyp Fy(a-b-), za który był odpowiedzialny układ homozygotyczny allelu FY*B-33, rozpoznano u jed-

nej kobiety ze Szkocji [82] oraz wśród czeskich i słowackich Romów [75].

W populacjach pochodzenia afrykańskiego znacząco dominuje allel FY*B-33, a w populacjach pochodzenia azjatyckiej allel FY*A [43]. Wśród mieszkańców regionu Papua Nowa Gwinea, gdzie endemicznie występuje *P. vivax*, przy dominującym allelu FY*A, zidentyfikowano przypadki występowania allelu FY*A-33, co wstępnie kojarzono jako odpowiednik allelu FY*B-33 w Afryce



[120]. Wykazanie obecności allelu FY^*A-33 wśród mieszkańców Sudanu zaprzeczyło podejrzeniom, że FY^*A-33 jest niezależnym allelem, którego pojawienie się było wolne od wpływów afrykańskich [51]. Podobnie do przyczyn rozprzestrzeniania się allelu FY^*B-33 w zachodniej i w centralnej Afryce, rozmieszczenie allelu FY^*A we wschodnich regionach tropikalnych mogło się dokonać pod wpływem *P. vivax* [15,53]. W odróżnieniu jednak od allelu FY^*B-33 , nie opisano przypadku występowania homozygoty FY^*A-33/FY^*A-33 warunkującej fenotyp Duffy-ujemny.

ZNACZENIE ANTYGENÓW UKŁADU GRUPOWEGO DUFFY W TRANSFUZJOLOGII

Duffy jest istotny w transfuzjologii; przetoczenie krwi niezgodnej pod względem antygenów grupowych Fy^a i Fy^b może wywołać poprzetoczeniowe reakcje hemolityczne, a w przypadku ciąży chorobę hemolityczną płodu i noworodka. Zdolność antygenów Duffy do immunizacji oraz obecność w krążeniu przeciwciał anti-Duffy umożliwiły identyfikację układu grupowego Duffy. Przeciwciała anti- Fy zagrażają głównie pacjentom poddanym wielokrotnym transfuzjom i mimo iż zazwyczaj powodują opóźnione i łagodne reakcje hemolityczne, znane są także przypadki śmiertelne [22,65,113]. U osób Duffy-dodatnich przyczyną stanów zagrażających życiu są głównie przeciwciała anti- Fy^a i anti- Fy^b , przy czym przeciwciała anti- Fy^a występują prawie 20 razy częściej niż przeciwciała anti- Fy^b . Obecność przeciwciał anti- Fy^a stwierdza się u ~10% osób poddawanych wielokrotnym transfuzjom i w niewielkim procencie u kobiet w ciąży [44]. Natomiast przeciwciała anti- Fy^b stwierdza się głównie u osób, które w wyniku immunizacji erytrocytami wytworzyły wiele alloprzeciwciał [54]. Dla osób Duffy-ujemnych dodatkowe niebezpieczeństwo stwarzają przeciwciała anti- $Fy3$ [22]. Powstają przeważnie u Duffy-ujemnych Afroamerykanów chorych na anemię sierpowatą poddawanych wielokrotnym transfuzjom [81,114].

Znaczenie dokładnego definiowania grupy Fy u dawców i biorców krwi jest szczególnie istotne u osób o fenotypie określonym serologicznie jako $Fy(a-b-)$, które na tkankach nieerytroidalnych mają antygen Fy^b , czyli ich genotyp nie pokrywa się z fenotypem. Również antygeny Duffy na krwinkach $Fy^{b_{wk}}$ (Fy^x) są trudne do zidentyfikowania metodami serologicznymi, ponieważ krwinki o tym fenotypie są aglutynowane tylko przez niektóre przeciwciała anti- Fy^b . W przypadku braku reakcji z przeciwciałem anti- Fy^b w teście aglutynacji, obecność antygeny $Fy^{b_{wk}}$ na krwinkach może być potwierdzona przez genotypowanie [22]. Warto w tym miejscu zaznaczyć, że oznaczanie głównych antygenów Duffy, Fy^a i Fy^b , przeciwciałami anti- Fy^a i anti- Fy^b z zastosowaniem powszechnie stosowanych metod aglutynacji zwykle daje zadawalające wyniki fenotypowania Duffy. Kłopotliwa staje się interpretacja „wyników wątpliwych”, co dotyczy głównie oznaczania antygeny Fy^b , ze względu na możliwość

występowania odmiany Fy^x na erytrocytach, obniżającą ekspresję Duffy.

Wielu badaczy uważa, że genotypowanie antygenów grupowych jest wskazane w celu prawidłowego oznaczenia układów grupowych krwi. Biorąc jednak pod uwagę, że molekularna charakterystyka alleli kodujących antygeny grupowe nie jest dowodem ekspresji antygenów na krwinkach, genotypowanie antygenów układów grupowych może jedynie uzupełniać wiedzę o antygenach, których obecność została ustalona w oznaczeniach serologicznych. Ponadto, diagnostyka transfuzjologiczna oparta na metodach serologicznego i molekularnego oznaczania antygenów grupowych krwi zwiększa zabezpieczenie przed ryzykiem wystąpienia poprzetoczeniowych reakcji hemolitycznych, co w przypadku Duffy dotyczy głównie biorców poddawanych wielokrotnym transfuzjom [80,94]. Wiedza uzyskana dzięki połączeniu tych dwóch metod pozwala na precyzyjne dobranie krwi biorcy i zmniejszenie ryzyka alloimmunizacji, ale także może zwiększyć pulę krwi do bezpiecznych transfuzji. Przykładem jest dobór krwi z uwzględnieniem antygenów układu grupowego Duffy, osoby z krwinkami Fy^x mogą otrzymać krew od osób $Fy(b+)$. Niektórzy podają, że przetoczenie krwi $Fy(b+)$ osobie $Fy(b-)$, jeśli brak antygeny Fy^b na erytrocytach jest skutkiem allelu FY^*B-33 , nie niesie z sobą ryzyka immunizacji przeciwciałami anti-Duffy [18,22]. Dlatego opracowywanie i modyfikowanie metod genotypowania antygenów grupowych krwi, pozwala na konstruowanie komercyjnych platform diagnostycznych, w których podczas jednego doświadczenia można zidentyfikować kilka alleli jednocześnie [80,94]. W przypadku badania alleli układu grupowego Duffy (FY^*A , FY^*B , FY^*B-33 , FY^*X) wykorzystywano dotąd głównie metody RFLP, SSP (reakcja PCR z użyciem swoistych starterów), real-time PCR i sekwencjonowania DNA [7,27,86]. W naszych badaniach, w celu wyjaśnienia podłoża molekularnego niejednoznacznych wyników serotypowania antygenów Duffy, do genotypowania FY zastosowano nowoczesną technikę genotypowania w systemie High-resolution melting (HRM) [49,59].

GLIKOPROTEINA DUFFY JAKO RECEPTOR ZARODZCÓW MALARI

Malaria (inaczej zwana zimnicą) jest chorobą pasożytniczą, wywoływaną przez pierwotniaki z rodzaju *Plasmodium*. Zarodźce malarii są przenoszone na człowieka przez komary z rodzaju widliszków (*Anopheles*), lecz możliwe jest też zarażenie podczas transfuzji krwią osoby chorej, transplantacji narządów od chorego z przewlekłą malarią lub ukłucie igłą.

Według najnowszych szacunków Światowej Organizacji Zdrowia (WHO), w 2013 r. odnotowano około 198 mln przypadków zachorowania na malarię, a liczba zgonów z powodu tej choroby mogła sięgnąć 584 000. Mimo iż śmiertelność na całym świecie systematycznie obniża się, to zimnica stanowi jeden z największych problemów

zdrowotnych współczesnego świata i uznawana jest za najpoważniejszą w skali globalnej chorobę pasożytniczą (WHO World Malaria Report, grudzień 2014).

Cztery gatunki pierwotniaków z rodziny *Plasmodium* wywołują malarię wśród ludzi: *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium malariae* i *Plasmodium ovale*. W ostatnich latach odnotowano, że również *Plasmodium knowlesi*, znany jako czynnik etiologiczny zimnicy u małp, stanowi poważne zagrożenie dla ludzi. Ponadto, w rejonach współwystępowania kilku gatunków zarodźca może dojść do inwazji więcej niż jednym gatunkiem pasożyta, co niezwykle się zdarza w przypadku zarażeń *P. falciparum* i *P. vivax*. Mimo iż zarodziec sierpowaty (*P. falciparum*) wywołuje najcięższą postać malarii (jest odpowiedzialny za największą liczbę zachorowań i zgonów) to zarodziec ruchliwy (*P. vivax*) ma największy zasięg geograficzny obejmując południową i południowo-wschodnią Azję, północną i środkowo-wschodnią Afrykę, kraje Zachodniego Pacyfiku i Amerykę Łacińską [66]. Zakażenie *P. vivax* na jego terenie endemicznym wywołuje uciążliwe i nawracające ataki malarii, co znacząco obniża warunki życia społeczności. W Europie nie obserwuje się rodzimych zachorowań na malarię, jest jednak jednym z najgroźniejszych schorzeń wśród osób podróżujących do tropików.

Wnikanie zarodźców malarii do erytrocytów jest procesem wieloetapowym, który wymaga: wstępnej interakcji między pierwotniakiem a krwinką, apikalnej organizacji organelli zarodźca oraz bezpośredniego kontaktu między cząsteczkami umożliwiającymi inwazję erytrocytów. W przypadku gatunków *Plasmodium vivax* i *Plasmodium knowlesi*, obecność białka Duffy na powierzchni krwinek umożliwia wnikanie zarodźców malarii do wnętrza krwinek, przy czym właściwy kontakt opiera się na oddziaływaniu między N-końcowym regionem glikoproteiny Duffy a białkiem PvDBP (białko *Plasmodium vivax* wiążące Duffy; *Plasmodium vivax* Duffy-binding protein) lub PkDBP (w przypadku *P. knowlesi*) zlokalizowanych na apikalnych organellach pasożytów [66]. *Plasmodium vivax* wykazuje preferencję zakażenia retikulocytów, dlatego uważa się, że wnikanie zarodźca do krwinki jest zaangażowane nie tylko białko Duffy, ale także koreceptor retikulocytarny, który umożliwia wiązanie zarodźca do krwinki, lecz jest niewystarczający do wniknięcia zarodźca do jej wnętrza. Mimo iż dotychczas nie został scharakteryzowany, na jego obecność wskazuje to, że pasożyt *P. vivax* może przylegać do powierzchni Duffy-ujemnych krwinek, bez ich zakażenia [14,28,66].

Cząsteczki PvDBP i PkDBP wykazują wysoką homologię sekwencji nukleotydowych sięgających około 70% i należą do rodziny białek wiążących erytrocyty (EBP, erythrocyte-binding protein) [66,119]. Struktura PvDBP powstała w oparciu o strukturę PkDBP i charakteryzuje się występowaniem: regionu sygnałowego, sześciu domen zewnątrzkomórkowych I-VI,

domeny przezbłonowej i domeny cytoplazmatycznej, z których jedynie domena II zewnątrzkomórkowa jest zaangażowana w wiązanie pasożytów do receptora Duffy na erytrocytach. Spośród 350 reszt aminokwasowych zawierających 12 konserwatywnych reszt cysteinowych, które tworzą domenę II, w bezpośrednim oddziaływaniu z białkiem Duffy uczestniczy fragment 170-aminokwasowy zawarty między 4 a 7 cysteiną [79]. W obrębie białka Duffy, fragment łańcucha polipeptydowego bezpośrednio zaangażowany w reakcję z domeną II PvDBP składa się z 35 aminokwasów i jest umiejscowiony na N-końcu białka między resztami Ala8 i Gly/Asp42 [14]. Badania *in vitro* wskazują, że Tyr41 jest konieczna do oddziaływania z pasożytami *P. vivax* i *P. knowlesi*, a jej siarczanowanie 1000 razy zwiększa powinowactwo pierwotniaków do Duffy [16]. Elementami istotnymi do oddziaływań z pasożytem są również epitopy Fy^a/Fy^b i Fy6 oraz miejsca wiązania chemokin, ponieważ przeciwciała skierowane przeciwko determinantom antygenowym, jak również chemokiny związane przez Duffy uniemożliwiają wiązanie zarodźca *P. vivax* do erytrocytów [14,37,119]. Podobne działanie wykazują przeciwciała skierowane przeciwko domenie II PvDBP [31], co jest obecnie przedmiotem badań mających na celu znalezienie leku zapobiegającego zakażeniu malarią.

WPLYW POLIMORFIZMU DUFFY NA OPORNOSC NA ZAKAZENIA *P. VIVAX*

Ryzyko zakażenia mieszkańców tropików malarią *P. vivax* jest ściśle zależne od fenotypu Duffy, a tym samym od obecności białka Fy na powierzchni krwinek. W latach 70 ub.w. po raz pierwszy wykryto korelację między fenotypem Duffy-ujemnym Fy(a-b-), występującym u ponad 90% rdzennych mieszkańców Afryki Zachodniej i 68% Afroamerykanów, a opornością na zakażenie zarodźcem *P. vivax*. [67,119]. Podłożem molekularnym fenotypu Duffy-ujemnego, warunkującego oporność na malarię *P. vivax*, jest genotyp Fy^aB-33/Fy^aB-33. Pojawienie się allelu Fy^aB-33 prawdopodobnie nastąpiło niezależnie od zarodźca malarii, jednak obecność pierwotniaka w regionach Afryki subsaharyjskiej wymusiła rozprzestrzenienie się allelu Fy^aB-33 w wyniku przystosowania organizmów do obecności szkodliwego czynnika selekcyjnego w środowisku, czyli pasożyta *P. vivax* [15,89].

Odkrycie allelu Fy^aA-33, prawdopodobnego odpowiednika Fy^aB-33, wśród mieszkańców Papui Nowej Gwinei [120] dostarczyło nowych danych na temat wpływu Duffy-ujemnych alleli na podatność zakażenia krwinek *P. vivax*. Zauważono, że występowanie w genotypie Fy^aA/Fy^aA-33 jednej kopii allelu Fy^aA-33, znoszącego ekspresję Duffy na krwinkach, zapewnia mieszkańcom Papui Nowej Gwinei częściową oporność na zakażenie malarią *P. vivax* [50,120]. Podobnych odkryć dokonano podczas badań mieszkańców dorzecza Amazonki, gdzie występowanie allelu Fy^aB-33 w heterozygotycznych genotypach: Fy^aA/Fy^aB-33 lub Fy^aB/Fy^aB-33 powoduje obniżenie ryzyka zakażeń osób zarodźcem



malarii w porównaniu do osób o dwóch Duffy-dodatnich allelach w genotypie [4,11]. Zwiększoną oporność na zakażenia *Plasmodium vivax* wśród osób o układach heterozygotycznych z allelami FY^*A-33 lub FY^*B-33 tłumaczy się obniżeniem liczby kopii Duffy na erytrocytach o 50%, co redukuje szansę zakażenia w porównaniu do osób o genotypach z dwoma Duffy-dodatnimi allelami. Podobne zjawisko może występować w przypadku allelu FY^*X , zmniejszającego liczbę kopii Fy na komórkach do około 10%, co nieznacznie obniża ryzyko zakażenia *P. vivax*. Mimo niewielkiego rozpowszechnienia allelu FY^*X w populacjach, do 3,5-5% w populacji kaukaskiej, wśród zainfekowanych mieszkańców stanu Amazonas w Brazylii odnotowano zmniejszoną liczbę pierwotniaka w jednostce krwi osób o genotypie FY^*A/FY^*X i FY^*B/FY^*X w porównaniu do osób o genotypach FY^*A/FY^*A , FY^*A/FY^*B czy FY^*B/FY^*B [4].

Ponadto, interesującymi wydają się wyniki badań korelowane przez Kinga, gdzie autorzy zwracają uwagę na różnice wiązania białka PvDBP do erytrocytów osób o różnych genotypach Duffy. Badanie wiązania rekombinowanego białka PvDBP do Duffy-dodatnich erytrocytów, metodą cytometrii przepływowej, wykazały obniżone o ~40-50% wiązanie do erytrocytów osób o genotypie FY^*A/FY^*A w porównaniu do erytrocytów osób o genotypie FY^*B/FY^*B ($p < 0,0001$). Hamowanie wiązania PvDBP do erytrocytów $Fy(a+b-)$ przez przeciwciała anti-PvDBPII było ~200% skuteczniejsze niż do erytrocytów $Fy(a-b+)$. Zwiększoną oporność krwinek $Fy(a+)$ w porównaniu do krwinek $Fy(b+)$ na zakażenia *Plasmodium vivax* tłumaczy się innym ładunkiem 42 reszty aminokwasowej łańcucha polipeptydowego białka Duffy. Antygen Fy^a ma w tym miejscu neutralną resztę glicyny, a Fy^b ujemnie naładowany kwas asparaginowy. Dodatnio naładowana cząsteczka PvDBP prawdopodobnie silniej wiąże się z ujemnie naładowanym N-końcowym fragmentem antygeny Fy^b , niż z N-końcem antygeny Fy^a . Uwzględniając wpływ siarczanowania tyrozyny 41 w białku Duffy na inwazję *P. vivax* badacze ocenili, że utrata grup sulfonowych w antygenie Fy^a zachodzi z większą łatwością niż w antygenie Fy^b , więc i to w niewielkim stopniu może sprzyjać łatwiejszemu infekowaniu krwinek $Fy(b+)$. Objawy kliniczne malarii u osób zakażonych *Plasmodium vivax* były najrzadsze wśród pacjentów o genotypie FY^*A/FY^*B-33 (około 4%), nieco wyższe wśród pacjentów o genotypach FY^*A/FY^*A (około 26%) i FY^*A/FY^*B (ok. 29%) oraz pacjentów o genotypach FY^*B/FY^*B-33 (ok. 41%) i FY^*B/FY^*B (ok. 45%). Nie wykazano przypadku występowania malarii u osób o fenotypie Duffy-ujemnym [53]. Powyższe wyniki pozwalają wnioskować, że obecność allelu FY^*A w genotypie może zwiększać ochronę przed zakażeniem erytrocytów przez *Plasmodium vivax*. Najnowsze badania populacyjne prowadzone w Brazylii wykazały, że polimorfizm Duffy może również wpływać na indukcję przeciwciał anti-DBPII [93]. Powszechność i częste występowanie niedokrwistości wśród mieszkańców regionów endemicznego występowania *P. vivax* również może mieć wpływ na

wzrost oporności na zakażenia *P. vivax*. Niedokrwistości są związane z występowaniem stanów patologicznych zmieniających kształt i wielkość erytrocytów, czy skracających ich życie, co utrudnia zarodkom infekowanie krwinek [119]. Powiązanie innych antygenów grupowych z chorobami zakaźnymi niedawno szczególnie omówiono [20].

W ostatnich latach pojawiły się doniesienia o pojedynczych przypadkach zakażenia przez *P. vivax* osób o fenotypie $Fy(a-b-)$, m.in. w Kenii, Mauretanii, Etiopii oraz Brazylii i na Madagaskarze. Zakażenia zarejestrowano w populacjach, w których współczynnik osób zakażonych jednym lub kilkoma gatunkami *Plasmodium* jest wysoki i dotyczy zarówno mieszkańców o fenotypie Duffy-dodatnim, jak i Duffy-ujemnym. Mechanizm zakażenia krwinek osób Duffy-ujemnych przez *P. vivax* nie jest jeszcze poznany, ale wnioski z tych obserwacji wskazują, że w określonych warunkach środowiskowych pasożyty korzystają z nieznanymi szlaków, niezależnych od białka Duffy [22,119].

Warto pamiętać, że mimo braku zakażeń lub zredukowaniu liczby zakażeń wśród rodzimych mieszkańców tropików, którzy w wyniku ewolucji wykształcili pewne mechanizmy obronne lub wytworzyli przeciwciała przeciw immunogennemu białku PvDBP, zarodźce malarii *P. vivax* występują w rejonach tropikalnych i stanowią ogromne ryzyko infekcji turystów. Niewielki odsetek osób Duffy-dodatnich, jak również zwierzęta naczelne są prawdopodobnym rezerwuarem zarodźca *P. vivax* na terenach Afryki subsaharyjskiej [119].

CHARAKTERYSTYKA BIAŁKA DUFFY - ATYPOWEGO RECEPTORA CHEMOKIN ACKR1

Białko Duffy pełni nie tylko rolę antygeny grupowy i receptora zarodźców malarii, jest także atypowym receptorem chemokin (ACKR), znanym jako DARC (Duffy antigen/receptor dla chemokin; Duffy antigen/receptor for chemokines), któremu według nowych standardów nadano nazwę systematyczną ACKR1 [5,6]. Wstępne doniesienia o obecności receptora chemokin na powierzchni krwinek czerwonych sięgają początków lat 90 ub.w. Nieznany receptor krwinkowy wiązał z dużym powinowactwem zarówno chemokiny CC jak i CXC [23]. Dalsze badania wykazały, że wielosłowy receptor chemokin występuje tylko na krwinkach Duffy-dodatnich, a przeciwciała anti- $Fy6$ hamują wiązanie chemokin do erytrocytów [42]. Ligandami dla białka Duffy są głównie chemokiny prozapalne z podrodziny CXC (CXCL1-6, CXCL8-11, CXCL13) i CC, (CCL1-2, CCL5, CCL7-8, CCL11, CCL13-14, CCL16-18) [6]. Niedawno udowodniono, że chemokina CXCL4/PF4 wydzielana przez płytki krwi po ich zetknięciu z powierzchnią zakażonych *P. falciparum* erytrocytów wykazuje powinowactwo do receptora Duffy. Uważa się, że wiązanie CXCL4 przez Duffy na krwinkach jest decydujące w niszczeniu zarodźca *P. falciparum* przez płytki krwi [62].

Wiązanie chemokin przez ACKR1 jest możliwe dzięki charakterystycznym cechom budowy: połączeniu cystein w dwa mostki disiarczkowe Cys52-Cys276 i Cys129-Cys195 oraz obecności dwóch siarczanych reszt tyrozyny (Tyr30 i Tyr41) w N-końcowym fragmencie łańcucha polipeptydowego Duffy. Zastąpienie Tyr31 fenyloalaniną znosi oddziaływanie Duffy z CXCL8, a podstawienie Tyr41 fenyloalaniną uniemożliwia wiązanie Duffy z CCL2, CCL5 i CXCL1, jak również blokuje wiązanie pasożytów *Plasmodium vivax* i *Plasmodium knowlesi* [16]. Ponadto, zniszczenie mostków disiarczkowych glikoproteiny Duffy za pomocą ditiotreitolu całkowicie pozbawia cząsteczkę zdolności wiązania chemokin [100]. Natomiast obecność łańcuchów oligosacharydowych nie jest konieczna do wiązania chemokin przez Duffy [109].

Mimo strukturalnego podobieństwa DARC do receptorów GPCR, wiązanie liganda przez białko Duffy nie uruchamia kaskady przekazywania sygnału z udziałem białek G. Za prawdopodobną przyczynę braku sygnałowania są odpowiedzialne zmiany sekwencji aminokwasowej konserwatywnego motywu DRYLAIV w drugiej pętli wewnątrzkomórkowej. W tym miejscu w łańcuchu polipeptydowym Duffy znajduje się motyw LGH (Leu-Gly-His). Związanie chemokin przez DARC nie zmienia wewnątrzkomórkowego stężenia jonów wapniowych i aktywności GTPaz w komórkach Duffy-dodatnich, co świadczy o braku transdukcji sygnału [30,34]. Sugeruje się jednak, że wiązanie chemokin przez DARC powoduje zmiany organizacyjne w komórkach, niektórzy przypisują mu nawet zdolność sygnałowania, jednak mechanizm ten nie jest dotychczas wyjaśniony [115]. Pewne jest natomiast to, że wiązanie chemokin przez ACKR1 nie prowadzi do ich degradacji, w odróżnieniu od pozostałych atypowych receptorów [103].

FUNKCJA DARC/ACKR1 - ATYPOWEGO RECEPTORA CHEMOKIN

Początkowo uważano, że rolą DARC jest efektywne wiązanie chemokin, internalizowanie i neutralizowanie ich działania [23]. Wkrótce jednak wyniki badań wykazały, że funkcja ACKR1 jest o wiele bardziej złożona i zależy od rodzaju komórek. Obecność białka Duffy nie tylko na erytrocytach, ale także na komórkach śródbłonna żyłek pozawłośniczkowych w różnych narządach sugeruje, że fizjologiczna rola Duffy nie ogranicza się do procesów związanych z krwią. Dlatego też niektórzy autorzy proponują rozgraniczenie funkcji Duffy w procesach związanych z chemokinami na rolę erytrocytarnego i śródbłonkowego DARC.

Białko Duffy występującemu na krwinkach czerwonych przypisuje się funkcję buforu i rezerwuaru chemokin. Podczas wzrostu poziomu krążących chemokin w organizmie, ACKR1 prezentowany na krwinkach czerwonych wiąże nadmiar chemokin z wydajnością ok. 15 nanomoli miejsc wiążących na litr krwi, co stanowi ~2000 miejsc wiążących na jeden erytrocyt [23,40]. Związane chemokiny nie ulegają degradacji,

ale są transportowane wraz z krwinkami i uwolnione w miejscu o niższym poziomie chemokin. Lokalne zmniejszenie stężenia chemokin zapobiega rozwojowi stanu zapalnego, gdyż związanie chemokin przez ACKR1 pozbawia je zdolności aktywowania leukocytów [40]. Zdolność erytrocytarnej postaci ACKR1 do wiązania i uwalniania chemokin zapobiega rozwojowi stanu zapalnego, przez buforowanie, neutralizację i wyrównywanie lokalnych stężeń krążących chemokin. Wyniki najnowszych obserwacji wskazują, że polimorfizm Gly42Asp (Fy^a/Fy^b) wpływa na poziom niektórych chemokin, oznaczanych w próbkach krwi osób badanych. Osoby o fenotypie Fy(a-b+) mają nieco wyższe stężenie chemokiny CCL2 w surowicy niż osoby o fenotypie Fy(a+b+) i znacznie wyższe niż Fy(a-b-). Podobnych różnic w poziomie CCL2 nie obserwowano w osoczu [87].

Nieznacznie odmienne funkcje przypisuje się ACKR1 prezentowanym na komórkach śródbłonna naczyniowego. Komórki endotelialne poprzez białko Duffy wiążą, internalizują i transportują chemokiny od tkanki do światła naczynia włosowatego, od bazolateralnej do apikalnej strony komórek śródbłonna, gdzie przepływające białe krwinki mogą się spotkać z nadmiarem chemokin [5,78]. Badania dotyczące transcytozy chemokin w transfekowanych Duffy komórkach MDCK (linia komórek nabłonkowych) sugerowały rolę w przekazywaniu sygnału niezależnego od białek G. Imobilizacja i utrzymywanie chemokin przez Duffy na komórkach po ich apikalnej stronie przez dłuższy czas, powodowała prezentację chemokin krążącym komórkom zapalnym i ich wzmożoną migrację do miejsca zapalnego [78]. Jednak transport nadmiaru chemokin w stronę światła naczyń krwionośnych mógłby wspierać funkcję erytrocytarnej postaci ACKR1 w utrzymaniu homeostazy w organizmie [103]. Sugeruje się także, że internalizacja i transport Duffy-swoistych chemokin w poprzek warstwy komórek endotelialnych może przebiegać z udziałem molekuł pośredniczących w procesach cholesterolozależnych i makropinocytozy [117]. DARC wpływa także na aktywność innych receptorów chemokin, konkurując z nimi o wiązanie ligandów [12,40]. Badania, w których komórki HEK-293 (linia komórkowa wyprowadzona z embrionalnych ludzkich komórek nerki) stymulowano czynnikiem TNF- α wykazały, że typowy receptor CCR5 i atypowy receptor ACKR1 mogą tworzyć homo- i heterodimery, co przebiega w sposób niezależny od obecności swoistych chemokin/ligandów. Heterodimeryzacja CCR5 z ACKR1 wpływa na funkcję receptora CCR5, gdyż zmniejsza jego zdolność do chemotaksji i modulowania komórkowego poziomu wapnia, lecz nie wpływa na internalizację receptora [12].

POWIĄZANIE BIAŁKA DUFFY Z CHOROZAMI

Właściwości białka Duffy, jako polimorficznego antygenu grupowego prezentowanego na powierzchni krwinek czerwonych oraz jako wieloswoistego atypowego



receptora chemokin wykazującego zdolność do wiązania i lokalnego regulowania stężenia chemokin prozapalnych, mogą mieć znaczenie w przebiegu procesów zapalnych i patofizjologicznych. Polimorfizm chemokin i ich receptorów może wpływać na rozwój chorób lub przebieg leczenia, a analogii chemokin są ważnym obiektem badań w terapiach przeciwzapalnych, przeciwnowotworowych czy przeciwwirusowych [39,107]. Wreszcie ostatnie badania wskazują, że podatność na wiele chorób może być związana z obecnością lub brakiem Duffy na erytrocytach.

Mimo iż początkowo uważano, że brak białka Duffy na krwinkach czerwonych nie powoduje żadnych konsekwencji klinicznych, teoria ta jest obecnie podważana. Wykazano, że osoby pochodzenia afrykańskiego o fenotypie Fy(a-b-), którego podłożem molekularnym jest genotyp *FY*B-33/FY*B-33*, mają w porównaniu z osobami Duffy-dodatnimi znacznie obniżoną względną liczbę leukocytów we krwi. Występowanie leukopenii i neutropenii wśród Duffy-ujemnych osobników może mieć wpływ na przebieg rozwijających się u nich chorób [97]. Podobną zależność fenotypową odkryto w przypadku miana przeciwciał IgE w przebiegu astmy, wykazując korelację między allelem *FY*B-33*, a podwyższonym stężeniem IgE w surowicy, zwiększonym występowaniem i cięższym przebiegiem dychawicy [104]. Wstępne wyniki, wskazujące na rolę Duffy w patofizjologii człowieka, skłoniły badaczy do poszukiwania potencjalnej korelacji między klinicznym statusem, a fenotypem Duffy w populacji.

Wykazano, że antygeny Duffy mogą wpływać na procesy nowotworzenia. Afroamerykanie, wśród których większość to osoby o fenotypie Duffy-ujemnym, charakteryzują się większą o 60% zapadalnością na raka prostaty i 2-krotnie większą śmiertelnością niż mężczyźni Duffy-dodatni rasy kaukaskiej. Za przyczynę zwiększonej zachorowalności uznano brak białka Duffy na erytrocytach wśród badanych Amerykańskich potomków rdzennych mieszkańców Afryki Zachodniej [55,90]. Badania kontynuowano na modelach myszy z knock-outem genu *FY*, które rodzą się i rozwijają bez widocznych defektów anatomicznych czy fizjologicznych i myszach transgenicznych z nadekspresją białka Duffy na komórkach śródbłonka. Wyniki tych badań wykazały, że w przypadku nowotworów prostaty, płuc, piersi i czerniaka złośliwego obecność Duffy hamuje rozwój guzów nowotworowych i zmniejsza przerzutowanie, na skutek wiązania przez białko Duffy angiogeny chemokin będących ligandami receptora CXCR2 [41,90,106]. Ponadto, glikoproteina Duffy na komórkach śródbłonka naczyń może bezpośrednio oddziaływać z białkiem KAI1/CD82 obecnym na powierzchni komórek nowotworowych, hamując w ten sposób powstawanie przerzutów. W opisanym modelu śródbłonkowe białko Duffy prawdopodobnie wspomaga senescencję KAI1-dodatnich komórek nowotworowych, jednak molekularne podstawy tego procesu wymagają wyjaśnienia [8]. Co więcej, badania tkanek pobranych

od pacjentów z rakiem żołądka, tarczycy i szyjki macicy wykazały korelację między ekspresją białka Duffy a stopniem zaawansowania choroby nowotworowej i wielkością guza [84,118]. Autorzy sugerują, że wraz z postępem choroby obniża się ekspresja białka Duffy na komórkach śródbłonka naczyń, co sprzyja utrzymaniu wzmożonej ilości chemokin w mikrośrodku guza i jego unaczynieniu. Ponadto, obniżenie ekspresji Duffy skojarzono z intensywną infiltracją limfocytów/krwinek białych w miejsce rozrastającego się guza.

Wykazano także wpływ białka Duffy na patomechanizm odrzucania przeszczepów płuc i nerek, sugerując jednocześnie pro- i przeciwzapalną rolę Fy zależną od mikrośrodowiska [88]. Zaobserwowano, że wśród osób Duffy-ujemnych, czyli pozbawionych antygenów Duffy na powierzchni erytrocytów z zachowaniem ekspresji na powierzchni komórek śródbłonka, występuje gorsze rokowanie po przeszczepach nerek i płuc, na skutek wzrostu w krążeniu poziomu prozapalnych chemokin dla Duffy [2,48]. Jednocześnie, analizując fragmenty tkanek pobranych od pacjentów po odrzuceniu przeszczepu nerek i płuc wykazano lokalną nadekspresję białka Duffy na powierzchni komórek śródbłonka naczyń w obrębie śródmiaższa nerki lub płuc. Wzrost ekspresji Duffy skorelowany był ze wzrostem infiltracji CCR5-dodatnich leukocytów w czasie odrzucania przeszczepu [88]. Autorzy uważają, że białko Duffy może prezentować chemokiny i w ten sposób promować naciek leukocytów do kanalików śródmiaższa nerki.

Ponadto, wykazano związek między brakiem białka Duffy na powierzchni erytrocytów, a występowaniem neutropenii i przebiegiem niedokrwiłości sierpowatej u osób Duffy-ujemnych. Badania prowadzone wśród mieszkańców USA oraz Gwadelupy wykazały, iż ponad 70% osób chorych na anemię sierpowatą miało fenotyp Fy(a-b-) i genotyp *FY*B-33/FY*B-33*, a przebieg choroby u tych osób był cięższy i częściej prowadził do uszkodzenia funkcjonowania m.in. płuc, nerek, centralnego układu nerwowego i układu kostnego w porównaniu do pacjentów o fenotypie Duffy-dodatnim [1,63]. Natomiast badania prowadzone przez innych badaczy nie wskazują na korelację pomiędzy obecnością antygeny Duffy na krwinkach a przebiegiem choroby [22,25].

Najnowsze badania prowadzone na zwierzęcym modelu immunizacyjnego zapalenia mózgu oraz na próbkach pośmiertnych ludzkiego mózgu osób chorych na stwardnienie rozsiane dowodzą, że w przebiegu tych chorób występuje zwiększona ekspresja DARC na komórkach śródbłonka żyłek mózgu. Ponadto, w warunkach *in vitro* wykazano udział białka Duffy w transśródbłonkowym transporcie chemokin zapalnych CCL2, CCL5, ale nie CCL21 (niewiązanej przez DARC), co wspiera prozapalną funkcję Duffy i uczestnictwo w pokonywaniu przez chemokiny bariery krew-mózg w przebiegu chorób zapalnych mózgu [68].

Rola białka Duffy w zakażeniu wirusem HIV od wielu lat jest badana. Wykazano, że obecne we krwi wiriony HIV-1 mogą być wiązane przez białko Duffy obecne na erytrocytach, przez co jest utrzymywane wysokie miano wirusa i zwiększone ryzyko zakażenia limfocytów T. Przez homologię sekwencyjną glikoproteiny powierzchniowej wirusa HIV gp120 i domeny I PvDBP, sugeruje się, że wiązanie HIV do antygeny Duffy może opierać się na podobnym mechanizmie molekularnym, co wiązanie PvDBP do Duffy [9]. Ponadto, zauważono związek fenotypu Duffy z zakażeniem HIV i progresją AIDS. Dotyczyło to osób o wyraźnej leukopenii, spośród których Afroamerykanie o erytrocytach Duffy-ujemnych mieli dłuższy czas przeżycia niż Duffy-dodatni Afroamerykanie lub osoby grupy kaukaskiej. Jednak uważa się, że rola

Duffy w zakażeniu HIV nie jest dobrze udokumentowana i pozostaje niewyjaśniona [22].

Innym podejściem w badaniu korelacji Duffy z chorobami są badania asocjacyjne całego genomu (GWAS), które umożliwiają jednoczesną identyfikację istotnych polimorfizmów SNP i określenie ich związku z daną cechą. W ten sposób wykazano np. potencjalny wpływ Duffy na niską masę ciała, wystąpienie pierwszej miesiączki [38], czy otyłość u dzieci [105]. Badania te mają jednak charakter prawdopodobnego wpływu Duffy na rozwijające się choroby i są jedynie wstępnymi analizami o nieznanych mechanizmach, które wymagają uzupełnienia.

PIŚMIENICTWO

- [1] Afenyi-Annan A., Kail M., Combs M.R., Orringer E.P., Ashley-Koch A., Telen M.J.: Lack of Duffy antigen expression is associated with organ damage in patients with sickle cell disease. *Transfusion*, 2008; 48: 917-924
- [2] Akalin E., Neylan J.F.: The influence of Duffy blood group on renal allograft outcome in African Americans. *Transplantation*, 2003; 75: 1496-1500
- [3] Albrey J.A., Vincent E.E., Hutchinson J., Marsh W.L., Allen F.H. Jr, Gavin J., Sanger R.: A new antibody, anti-Fy3, in the Duffy blood group system. *Vox Sang.*, 1971; 20: 29-35
- [4] Albuquerque S.R., Cavalcante F.O., Sanguino E.C., Tezza L., Chacon F., Castilho L., dos Santos M.C.: FY polymorphisms and vivax malaria in inhabitants of Amazonas State, Brazil. *Parasitol Res.*, 2010; 106: 1049-1053
- [5] Bachelerie F., Ben-Baruch A., Burkhardt A.M., Combadiere C., Farber J.M., Graham G.J., Horuk R., Sparre-Ulrich A.H., Locati M., Luster A.D., Mantovani A., Matsushima K., Murphy P.M., Nibbs R., Nomiyama H., Power C.A., Proudfoot A.E., Rosenkilde M.M., Rot A., Sozzani S., Thelen M., Yoshie O., Zlotnik A.: International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXXIX. Update on the extended family of chemokine receptors and introducing a new nomenclature for atypical chemokine receptors. *Pharmacol Rev.*, 2013; 66: 1-79
- [6] Bachelerie F., Graham G.J., Locati M., Mantovani A., Murphy P.M., Nibbs R., Rot A., Sozzani S., Thelen M.: An atypical addition to the chemokine receptor nomenclature: IUPHAR Review 15. *Br. J. Pharmacol.*, 2015; 172: 3945-3949
- [7] Bakanay S.M., Ozturk A., Ileri T., Ince E., Yavasoglu S., Akar N., Uysal Z., Arslan O.: Blood group genotyping in multi-transfused patients. *Transfus. Apher. Sci.*, 2013; 48: 257-261
- [8] Bandyopadhyay S., Zhan R., Chaudhuri A., Watabe M., Pai S.K., Hirota S., Hosobe S., Tsukada T., Miura K., Takano Y., Saito K., Pauza M.E., Hayashi S., Wang Y., Mohinta S., Mashimo T., Iizumi M., Furuta E., Watabe K.: Interaction of KAI1 on tumor cells with DARC on vascular endothelium leads to metastasis suppression. *Nat. Med.*, 2006; 12: 933-938
- [9] Bolton M.J., Garry R.F.: Sequence similarity between the erythrocyte binding domain 1 of the *Plasmodium vivax* Duffy binding protein and the V3 loop of HIV-1 strain MN reveals binding residues for the Duffy antigen receptor for chemokines. *Virol. J.*, 2011; 8: 45
- [10] Castilho L., Rios M., Pellegrino J.Jr., Saad S.T., Costa F.F., Reid M.E.: A novel FY allele in Brazilians. *Vox Sang.*, 2004; 87: 190-195
- [11] Cavasini C.E., de Mattos L.C., Couto A.A., Couto V.S., Gollino Y., Moretti L.J., Bonini-Domingos C.R., Rossit A.R., Castilho L., Machado R.L.: Duffy blood group gene polymorphisms among malaria vivax patients in four areas of the Brazilian Amazon region. *Malar. J.*, 2007; 6: 167
- [12] Chakera A., Seeber R.M., John A.E., Eidne K.A., Greaves D.R.: The Duffy antigen/receptor for chemokines exists in an oligomeric form in living cells and functionally antagonizes CCR5 signaling through hetero-oligomerization. *Mol. Pharmacol.*, 2008; 73: 1362-1370
- [13] Chaudhuri A., Polyakova J., Zabrzeczna V., Williams K., Gulati S., Pogo A.O.: Cloning of glycoprotein D cDNA, which encodes the major subunit of the Duffy blood group system and the receptor for the *Plasmodium vivax* malaria parasite. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1993; 90: 10793-10797
- [14] Chitnis C.E., Chaudhuri A., Horuk R., Pogo A.O., Miller L.H.: The domain on the Duffy blood group antigen for binding *Plasmodium vivax* and *P. knowlesi* malarial parasites to erythrocytes. *J. Exp. Med.*, 1996; 184: 1531-1536
- [15] Chittoria A., Mohanty S., Jaiswal Y.K., Das A.: Natural selection mediated association of the Duffy (FY) gene polymorphisms with *Plasmodium vivax* malaria in India. *PLoS One*, 2012; 7: e45219
- [16] Choe H., Moore M.J., Owens C.M., Wright P.L., Vasilieva N., Li W., Singh A.P., Shakri R., Chitnis C.E., Farzan M.: Sulphated tyrosines mediate association of chemokines and *Plasmodium vivax* Duffy binding protein with the Duffy antigen/receptor for chemokines (DARC). *Mol. Microb.*, 2005; 55: 1413-1422
- [17] Chown B., Lewis M., Kaita H.: The Duffy blood group system in Caucasians: Evidence for a new allele. *Am. J. Hum. Genet.*, 1965; 17: 384-389
- [18] Cotruello C., Biondi C., Racca L., Borrás S.G., Racca A.: Duffy genotyping facilitates transfusion therapy. *Clin. Exp. Med.*, 2009; 9: 249-251
- [19] Cutbush M., Mollison P.L.: The Duffy blood group system. *Heredity*, 1950; 4: 383-389
- [20] Czerwiński M.: Grupy krwi - minusy i plusy. Czy antygeny grupowe krwi chronią nas przed chorobami zakaźnymi? *Postępy Hig. Med. Dośw.*, 2015; 69: 703-722
- [21] Czerwiński M., Kern J., Grodecka M., Paprocka M., Krop-Wątołek



- A., Waśniowska K.: Mutational analysis of the N-glycosylation sites of Duffy antigen/receptor for chemokines. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2007; 356: 816-821
- [22] Daniels G.: Duffy blood group system. W: *Human Blood Groups*, 3rd edn. Wiley-Blackwell, West Sussex, 2013, 324-341
- [23] Darbonne W.C., Rice G.C., Mohler M.A., Apple T., Hebert C.A., Valente A.J., Baker J.B.: Red blood cells are a sink for interleukin 8, a leukocyte chemotaxin. *J. Clin. Invest.*, 1991; 88: 1362-1369
- [24] Donahue R.P., Bias W.B., Renwick J.H., McKusick V.A.: Probable assignment of the Duffy blood group locus to chromosome 1 in man. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1968; 61: 949-955
- [25] Drasar E.R., Menzel S., Fulford T., Thein S.L.: The effect of Duffy antigen receptor for chemokines on severity in sickle cell disease. *Haematologica*, 2013; 98: e87-e89
- [26] Estalote A.C., Proto-Siqueira R., Silva W.A.Jr, Zago M.A., Palatnik M.: The mutation G298A>Ala100Thr on the coding sequence of the Duffy antigen/chemokine receptor gene in non-caucasian Brazilians. *Genet. Mol. Res.*, 2005; 4: 166-173
- [27] Flôres M.A., Visentainer J.E., Guelsin G.A., Fracasso Ade S., de Melo F.C., Hashimoto M.N., Sell A.M.: Rh, Kell, Duffy, Kidd and Diego blood group system polymorphism in Brazilian Japanese descendants. *Transfus. Apher. Sci.*, 2014; 50: 123-128
- [28] Galinski M.R., Medina C.C., Ingravallo P., Barnwell J.W.: A reticulocyte-binding protein complex of *Plasmodium vivax* merozoites. *Cell*, 1992; 69: 1213-1226
- [29] Gassner C., Kraus R.L., Dovc T., Kilga-Nogler S., Utz I., Mueller T.H., Schunter F., Schoenitzer D.: Fyx is associated with two missense point mutations in its gene and can be detected by PCR-SSP. *Immunohematology*, 2000; 16: 61-67
- [30] Graham G.J.: D6 and the atypical chemokine receptor family: novel regulators of immune and inflammatory processes. *Eur. J. Immunol.*, 2009; 39: 342-351
- [31] Grimberg B.T., Udomsangpetch R., Xianli J., McHenry A., Panichakul T., Sattabongkot J., Cui L., Bockarie M., Chitnis C., Adams J., Zimmerman P.A., King C.L.: *Plasmodium vivax* invasion of human erythrocytes inhibited by antibodies directed against the Duffy binding protein. *PLoS Med.*, 2007; 4: e337
- [32] Grodecka M., Bertrand O., Karolak E., Lisowski M., Waśniowska K.: One-step immunopurification and lectinochemical characterization of the Duffy atypical chemokine receptor from human erythrocytes. *Glycoconj J.*, 2012; 29: 93-105
- [33] Grodecka M., Czerwiński M., Duk M., Lisowska E., Waśniowska K.: Analysis of recombinant Duffy protein-linked N-glycans with lectins and glycosidases. *Acta Biochim. Pol.*, 2010; 57: 49-53
- [34] Grodecka M., Waśniowska K.: Interceptory – „ciche” receptory chemokin. *Postępy Hig. Med. Dośw.*, 2007; 61: 231-239
- [35] Hadley T.J., David P.H., McGinniss M.H., Miller L.H.: Identification of an erythrocyte component carrying the Duffy blood group Fya antigen. *Science*, 1984; 223: 597-599
- [36] Hadley T.J., Lu Z.H., Waśniowska K., Martin A.W., Peiper S.C., Hesselgesser J., Horuk R.: Postcapillary venule endothelial cells in kidney express a multispecific chemokine receptor that is structurally and functionally identical to the erythroid isoform, which is the Duffy blood group antigen. *J. Clin. Invest.*, 1994; 94: 985-991
- [37] Hadley T.J., Peiper S.C.: From malaria to chemokine receptor: the emerging physiologic role of the Duffy blood group antigen. *Blood*, 1997; 89: 3077-3091
- [38] Hai R., Zhang L., Pei Y., Zhao L., Ran S., Han Y., Zhu X., Shen H., Tian Q., Deng H.: Bivariate genome-wide association study suggests that the DARC gene influences lean body mass and age at menarche. *Sci. China Life Sci.*, 2012; 55: 516-520
- [39] Handel T.M., Horuk R.: Duffy antigen inhibitors: useful therapeutics for malaria? *Trends Parasitol.*, 2010; 26: 329-333
- [40] Hansell C.A., Hurson C.E., Nibbs R.J.: DARC and D6: silent partners in chemokine regulation? *Immunol. Cell Biol.*, 2011; 89: 197-206
- [41] Horton L.W., Yu Y., Zaja-Milatovic S., Strieter R.M., Richmond A.: Opposing roles of murine Duffy antigen receptor for chemokine and murine CXC chemokine receptor-2 receptors in murine melanoma tumor growth. *Cancer Res.*, 2007; 67: 9791-9799
- [42] Horuk R., Chitnis C.E., Darbonne W.C., Colby T.J., Rybicki A., Hadley T.J., Miller L.H.: A receptor for the malarial parasite *Plasmodium vivax*: the erythrocyte chemokine receptor. *Science*, 1993; 261: 1182-1184
- [43] Howes R.E., Patil A.P., Piel F.B., Nyangiri O.A., Kabaria C.W., Gething P.W., Zimmerman P.A., Barnadas C., Beall C.M., Gebremedhin A., Ménard D., Williams T.N., Weatherall D.J., Hay S.I.: The global distribution of the Duffy blood group. *Nat. Commun.*, 2011; 2: 266
- [44] Hughes L.H., Rossi K.Q., Krugh D.W., O'Shaughnessy R.W.: Management of pregnancies complicated by anti-Fy(a) alloimmunization. *Transfusion*, 2007; 47: 1858-1861
- [45] Ikin E.W., Mourant A.E., Pettenkofer H.J., Blumenthal G.: Discovery of the expected haemagglutinin, anti-Fy^b. *Nature*, 1951; 168: 1077-1078
- [46] Irshaid N.M., Ramadan S., Wester E.S., Olausson P., Hellberg A., Merza J.Y., Olsson M.L.: Phenotype prediction by DNA-based typing of clinically significant blood group systems in Jordanian blood donors. *Vox Sang.*, 2002; 83: 55-62
- [47] Iwamoto S., Li J., Omi T., Ikemoto S., Kajii E.: Identification of a novel exon and spliced form of Duffy mRNA that is predominant transcript in both erythroid and postcapillary venule endothelium. *Blood*, 1996; 87: 378-385
- [48] Kangelaris K.N., Sapru A., Calfee C.S., Liu K.D., Pawlikowska L., Witte J.S., Vittinghoff E., Zhuo H., Auerbach A.D., Ziv E., Matthay M.A.: The association between a Darc gene polymorphism and clinical outcomes in African American patients with acute lung injury. *Chest*, 2012; 141, 1160-1169
- [49] Karolak E., Grodecka M., Suchanowska A., Klauska E., Bochenek S., Majorczyk E., Czerwiński M., Waśniowska K.: Molecular characterization of the Fy(a-b-) phenotype in a Polish family. *Transfus. Apher. Sci.*, 2013; 49: 313-317
- [50] Kasehagen L.J., Mueller I., Kiniboro B., Bockarie M.J., Reeder J.C., Kazura J.W., Kastens W., McNamara D.T., King C.H., Whalen C.C., Zimmerman P.A.: Reduced *Plasmodium vivax* erythrocyte infection in PNG Duffy-negative heterozygotes. *PLoS One*, 2007; 2: e336
- [51] Kempieńska-Podhorodecka A., Knap O., Drozd A., Kaczmarczyk M., Parafiniuk M., Parczewski M., Ciechanowicz A.: Analysis for genotyping Duffy blood group in inhabitants of Sudan, the fourth cataract of the Nile. *Malar. J.*, 2012; 11: 115
- [52] Keramati M.R., Shakibaei H., Kheiyami M.I., Ayatollahi H., Badii Z., Samavati M., Sadeghian M.H.: Blood group antigens frequencies in the northeast of Iran. *Transfus. Apher. Sci.*, 2011; 45: 133-136
- [53] King C.L., Adams J.H., Xianli J., Grimberg B.T., McHenry A.M., Greenberg L.J., Siddiqui A., Howes R.E., da Silva-Nunes M., Ferreira M.U., Zimmerman P.A.: Fy^a/Fy^b antigen polymorphism in human erythrocyte Duffy antigen affects susceptibility to *Plasmodium vivax* malaria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2011; 108: 20113-20118
- [54] Langhi D.M.Jr., Bordin J.O.: Duffy blood group and malaria. *Hematology*, 2006; 11: 389-398
- [55] Lentsch A.B.: The Duffy antigen/receptor for chemokines (DARC) and prostate cancer. A role as clear as black and white? *FASEB J.*, 2002; 16: 1093-1095
- [56] Liu J., Guo X., Mohandas N., Chasis J.A., An X.: Membrane remodeling during reticulocyte maturation. *Blood*, 2010; 115: 2021-2027
- [57] Liu X.F., Li L.F., Ou Z.L., Shen R., Shao Z.M.: Correlation between

en Duffy blood group phenotype and breast cancer incidence. *BMC Cancer*, 2012; 12: 374

[58] Lopez G.H., Condon J.A., Wilson B., Martin J.R., Liew Y.W., Flower R.L., Hyland C.A.: A novel FY*A allele with the 265T and 298A SNPs formerly associated exclusively with the FY*B allele and weak Fy(b) antigen expression: implication for genotyping interpretative algorithms. *Vox Sang.*, 2015; 108: 52-57

[59] Łukasik E., Waśniowska K., Grodecka M., Majorczyk E., Czerwiński M.: High-resolution melting analysis for genotyping Duffy blood group antigens. *Methods Mol. Biol.*, 2015; 1310: 83-95

[60] Mallinson G., Soo K.S., Schall T.J., Pisacka M., Anstee D.J.: Mutations in the erythrocyte chemokine receptor (Duffy) gene: the molecular basis of the Fy^a/Fy^b antigens and identification of a deletion in the Duffy gene of an apparently healthy individual with the Fy(a-b) phenotype. *Br. J. Haematol.*, 1995; 90: 823-829

[61] Mathew S., Chaudhuri A., Murty V.V., Pogo A.O.: Confirmation of Duffy blood group antigen locus (FY) at 1q22→q23 by fluorescence in situ hybridization. *Cytogenet. Cell Genet.*, 1994; 67: 68

[62] McMorrán B.J., Wiczorski L., Drysdale K.E., Chan J.A., Huang H.M., Smith C., Mitiku C., Beeson J.G., Burgio G., Foote S.J.: Platelet factor 4 and Duffy antigen required for platelet killing of *Plasmodium falciparum*. *Science*, 2012; 338: 1348-1351

[63] Mecabo G., Hayashida D.Y., Azevedo-Shimmoto M.M., Vicari P., Arruda M.M., Bordin J.O., Figueiredo M.S.: Duffy-negative is associated with hemolytic phenotype of sickle cell anemia. *Clin. Immunol.*, 2010; 136: 458-459

[64] Meny G.M.: The Duffy blood group system: a review. *Immunohematology*, 2010; 26: 51-56

[65] Michalewska B.: Naturally occurring anti-Fy^b + C^w. *Vox Sang.*, 2001; 80: 235

[66] Miller L.H., Baruch D.I., Marsh K., Doumbo O.K.: The pathogenic basis of malaria. *Nature*, 2002; 415: 673-679

[67] Miller L.H., Mason S.J., Clyde D.F., McGinniss M.H.: The resistance factor to *Plasmodium vivax* in blacks. The Duffy-blood-group genotype, FyFy. *N. Engl. J. Med.*, 1976; 295: 302-304

[68] Minten C., Alt C., Gentner M., Frei E., Deutsch U., Lyck R., Schären-Wiemers N., Rot A., Engelhardt B.: DARC shuttles inflammatory chemokines across the blood-brain barrier during autoimmune central nervous system inflammation. *Brain*, 2014; 137: 1454-1469

[69] Nichols M.E., Rubinstein P., Barnwell J., Rodriguez de Cordoba S., Rosenfield R.E.: A new human Duffy blood group specificity defined by a murine monoclonal antibody. Immunogenetics and association with susceptibility to *Plasmodium vivax*. *J. Exp. Med.*, 1987; 166: 776-785

[70] Olsson M.L., Smythe J.S., Hansson C., Poole J., Mallinson G., Jones J., Avent N.D., Daniels G.: The Fy^a phenotype is associated with a missense mutation in the Fy^b allele predicting Arg89Cys in the Duffy glycoprotein. *Br. J. Haematol.*, 1998; 103: 1184-1191

[71] Parasol N., Cohen N., Zemishlany Z., Lerer B., Kosower N.S.: Duffy antigen/receptor for chemokines (DARC): genotypes in Ashkenazi and Non-Ashkenazi Jews in Israel. *Hum Biol.*, 2001; 73: 307-313

[72] Parasol N., Reid M., Rios M., Castilho L., Harari I., Kosower N.S.: A novel mutation in the coding sequence of the FY*B allele of the Duffy chemokine receptor gene is associated with an altered erythrocyte phenotype. *Blood*, 1998; 92: 2237-2243

[73] Peiper S.C., Wang Z.X., Neote K., Martin A.W., Showell H.J., Conklyn M.J., Ogborne K., Hadley T.J., Lu Z.H., Hesselgesser J., Horuk R.: The Duffy antigen/receptor for chemokines (DARC) is expressed in endothelial cells of Duffy negative individuals who lack the erythrocyte receptor. *J. Exp. Med.* 1995; 181: 1311-1317

[74] Perna S.J., Cardoso G.L., Guerreiro J.F.: Duffy blood group genotypes among African-Brazilian communities of the Amazon region. *Genet. Mol. Res.*, 2007; 6: 166-172

[75] Pisacka M., Vytiskova J., Latinakova A., Koristka M., Strasikova M.: Molecular background of the Fy(a-b-) phenotype in gypsy population living in the Czech and Slovak Republic. *Transfusion*, 2001; 41: 15s

[76] Pittoni V., Vaglio S., Magrini L., Accorinti M., Pivetti-Pezzi P., Girelli G., Valesini G.: Polymorphism of the Duffy erythrocyte chemokine receptor in Italian patients with Behçet's disease. *Rheumatol. Int.*, 2003; 23: 116-120

[77] Pogo A.O., Chaudhuri A.: The Duffy protein: a malarial and chemokine receptor. *Semin. Hematol.*, 2000; 37: 122-129

[78] Pruenster M., Mudde L., Bombosi P., Dimitrova S., Zsak M., Middleton J., Richmond A., Graham G.J., Segerer S., Nibbs R.J., Rot A.: The Duffy antigen receptor for chemokines transports chemokines and supports their promigratory activity. *Nat. Immunol.*, 2009; 10: 101-108

[79] Ranjan A., Chitnis C.E.: Mapping regions containing binding residues within functional domains of *Plasmodium vivax* and *Plasmodium knowlesi* erythrocyte-binding proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1999; 14067-14072

[80] Reid M.E., Denomme G.A.: DNA-based methods in the immunohematology reference laboratory. *Transfus. Apher. Sci.*, 2011; 44: 65-72

[81] Reyes M.A., Illoh O.C.: Hyperhemolytic transfusion reaction attributable to anti-Fy3 in a patient with sickle cell disease. *Immunohematology*, 2008; 24: 45-51

[82] Rios M., Chaudhuri A., Mallinson G., Sausais L., Gomensoro-Garcia A.E., Hannon J., Rosenberger S., Poole J., Burgess G., Pogo O., Reid M.: New genotypes in Fy(a-b-) individuals: nonsense mutations (Trp to stop) in the coding sequence of either FY*A or FY*B. *Br. J. Haematol.*, 2000; 108: 448-454

[83] Riwoon S., Janvier D., Navenot J.M., Benbunan M., Muller J.Y., Blanchard D.: Production of a new murine monoclonal antibody with Fy6 specificity and characterization of the immunopurified N-glycosylated Duffy-active molecule. *Vox Sang.*, 1994; 66: 61-67

[84] Roche F., Latini M., Uchimura A., Prisco C., Guilhem J., Medeiros R., Baleotti W., Augusto J., Castilho L., Maria J.: Blood cells, molecules, and diseases DARC (Duffy) and BCAM (Lutheran) reduced expression in thyroid cancer. *Blood Cells Mol. Dis.*, 2012; 50: 161-165

[85] Sanger R., Race R.R., Jack J.: The Duffy blood groups of New York negroes: the phenotype Fy(a-b-). *Br. J. Haematol.*, 1955; 1: 370-374

[86] Schmid P., Ravenell K.R., Sheldon S.L., Flegel W.A.: DARC alleles and Duffy phenotypes in African Americans. *Transfusion*, 2012; 52: 1260-1267

[87] Schnabel R.B., Baumert J., Barbalic M., Dupuis J., Ellinor P.T., Durda P., Dehghan A., Bis J.C., Illig T., Morrison A.C., Jenny N.S., Keane J.F. Jr, Gieger C., Tilley C., Yamamoto J.F. i wsp.: Duffy antigen receptor for chemokines (Darc) polymorphism regulates circulating concentrations of monocyte chemoattractant protein-1 and other inflammatory mediators. *Blood*, 2010; 115: 5289-5299

[88] Segerer S., Jedlicka J., Wüthrich R.P.: Atypical chemokine receptors in renal inflammation. *Nephron. Exp. Nephrol.*, 2010; 115: e89-e95

[89] Seixas S., Ferrand N., Rocha J.: Microsatellite variation and evolution of the human Duffy blood group polymorphism. *Mol. Biol. Evol.*, 2002; 19: 1802-1806

[90] Shen H., Schuster R., Stringer K.F., Waltz S.E., Lentsch A.B.: The Duffy antigen/receptor for chemokines (DARC) regulates prostate tumor growth. *FASEB J.*, 2006; 20: 59-64

[91] Shimizu Y., Ao H., Soemantri A., Tiwawech D., Settheetham-Ishida W., Kayame O.W., Kimura M., Nishioka T., Ishida T.: Sero- and molecular typing of Duffy blood group in Southeast Asians and Oceanians. *Hum. Biol.*, 2000; 72: 511-518

[92] Smolarek D., Hattab C., Hassanzadeh-Ghassabeh G., Cochet S.,

- Gutiérrez C., de Brevern A.G., Udomsangpetch R., Picot J., Grodecka M., Waśniowska K., Muyltermans S., Colin Y., Le Van Kim C., Czerwiński M., Bertrand O.: A recombinant dromedary antibody fragment (VHH or nanobody) directed against human Duffy antigen receptor for chemokines. *Cell. Mol. Life Sci.*, 2010; 67: 3371-3387
- [93] Souza-Silva F.A., Torres L.M., Santos-Alves J.R., Tang M.L., Sanchez B.A., Sousa T.N., Fontes C.J., Nogueira P.A., Rocha R.S., Brito C.F., Adams J.H., Kano F.S., Carvalho L.H.: Duffy antigen receptor for chemokine (DARC) polymorphisms and its involvement in acquisition of inhibitory anti-Duffy binding protein II (DBPII) immunity. *PLoS One*, 2014; 9: e93782
- [94] St-Louis M.: Molecular blood grouping of donors. *Transfus. Apher. Sci.*, 2014; 50: 175-182
- [95] Tamasauskas D., Powell V., Saksela K., Yazdanbakhsh K.: A homologous naturally occurring mutation in Duffy and CCR5 leading to reduced receptor expression. *Blood*, 2001; 97: 3651-3654
- [96] Tanner M.J., Anstee D.J., Mallinson G., Ridgwell K., Martin P.G., Avent N.D., Parsons S.F.: Effect of endoglycosidase F-peptidyl N-glycosidase F preparations on the surface components of the human erythrocyte. *Carbohydr. Res.*, 1988; 178: 203-212
- [97] Thobakgale C.F., Ndung'u T.: Neutrophil counts in persons of African origin. *Curr. Opin. Hematol.*, 2014; 21: 50-57
- [98] Tournamille C., Blancher A., Le Van Kim C., Gane P., Apoil P.A., Nakamoto W., Cartron J.P., Colin Y.: Sequence, evolution and ligand binding properties of mammalian Duffy antigen/receptor for chemokines. *Immunogenetics*, 2004; 55: 682-694
- [99] Tournamille C., Colin Y., Cartron J.P., Le Van Kim C.: Disruption of a GATA motif in the Duffy gene promoter abolishes erythroid gene expression in Duffy-negative individuals. *Nat. Genet.*, 1995; 10: 224-228
- [100] Tournamille C., Filipe A., Waśniowska K., Gane P., Lisowska E., Cartron J.P., Colin Y., Le Van Kim C.: Structure-function analysis of the extracellular domains of the Duffy antigen/receptor for chemokines: characterization of antibody and chemokine binding sites. *Br. J. Haematol.*, 2003; 122: 1014-1023
- [101] Tournamille C., Le Van Kim C., Gane P., Le Pennec P.Y., Roubinet F., Babinet J., Cartron J.P., Colin Y.: Arg89Cys substitution results in very low membrane expression of the Duffy antigen/receptor for chemokines in Fy^x individuals. *Blood*, 1998; 92: 2147-2156
- [102] Tsuneyama H., Uchikawa M., Shinozaki K., Nakajima K., Uji T.: A deletion in the Duffy gene of an apparently healthy individual with the Fy(a-b-) phenotype. *Transfusion*, 2000; 40: 1165
- [103] Ulvmar M.H., Hub E., Rot A.: Atypical chemokine receptors. *Exp. Cell Res.*, 2011; 317: 556-568
- [104] Vergara C., Tsai Y.J., Grant A.V., Rafaels N., Gao L., Hand T., Stockton M., Campbell M., Mercado D., Faruque M., Dunston G., Beaty T.H., Oliveira R.R., Ponte E.V., Cruz A.A. i wsp.: Gene encoding Duffy antigen/receptor for chemokines is associated with asthma and IgE in three populations. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 2008; 178: 1017-1022
- [105] Voruganti V.S., Laston S., Haack K., Mehta N.R., Smith C.W., Cole S.A., Butte N.F., Comuzzie A.G.: Genome-wide association replicates the association of Duffy antigen receptor for chemokines (DARC) polymorphisms with serum monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) levels in Hispanic children. *Cytokine*, 2012; 60: 634-638
- [106] Wang J., Ou Z.L., Hou Y.F., Luo J.M., Shen Z.Z., Ding J., Shao Z.M.: Enhanced expression of Duffy antigen receptor for chemokines by breast cancer cells attenuates growth and metastasis potential. *Oncogene*, 2006; 25: 7201-7211
- [107] Waśniowska K.: Chemokiny – perspektywy zastosowania związków blokujących ich działanie w terapii. *Postępy Hig. Med. Dośw.*, 2004; 58: 37-46
- [108] Waśniowska K., Blanchard D., Janvier D., Wang Z.X., Peiper S.C., Hadley T.J., Lisowska E.: Identification of the Fy6 epitope recognized by two monoclonal antibodies in the N-terminal extracellular portion of the Duffy antigen receptor for chemokines. *Mol. Immunol.*, 1996; 33: 917-923
- [109] Waśniowska K., Czerwiński M., Jachymek W., Lisowska E.: Expression and binding properties of a soluble chimeric protein containing the N-terminal domain of the Duffy antigen. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2000; 273: 705-711
- [110] Waśniowska K., Eichenberger P., Kugele F., Hadley T.J.: Purification of a 28 kDa non-aggregating tryptic peptide of the Duffy blood group protein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1993; 192: 366-372
- [111] Waśniowska K., Lisowska E., Halverson G.R., Chaudhuri A., Reid M.E.: The Fy^a, Fy6 and Fy3 epitopes of the Duffy blood group system recognized by new monoclonal antibodies: identification of a linear Fy3 epitope. *Br. J. Haematol.* 2004; 124: 118-122
- [112] Waśniowska K., Petit-LeRoux Y., Tournamille C., Le Van Kim C., Cartron J.P., Colin Y., Lisowska E., Blanchard D.: Structural characterization of the epitope recognized by the new anti-Fy6 monoclonal antibody NaM 185-2C3. *Transfus. Med.*, 2002; 12: 205-211
- [113] Watorek E., Boratyńska M., Hałoń A., Klinger M.: Anti-Fy^a antibodies as the cause of an unfortunate post-transplant course in renal transplant recipient. *Ann Transplant.*, 2008; 13: 48-52
- [114] Went R., Wright J., Webster R., Stamps R.: Anti-Fy3 in sickle cell disease: a difficult transfusion problem. *Br. J. Haematol.*, 2009; 144: 621-622
- [115] Whittall C., Kehoe O., King S., Rot A., Patterson A., Middleton J.: A chemokine self-presentation mechanism involving formation of endothelial surface microstructures. *J. Immunol.*, 2013; 190: 1725-1736
- [116] Yazdanbakhsh K., Rios M., Storry J.R., Kosower N., Parasol N., Chaudhuri A., Reid M.E.: Molecular mechanisms that lead to reduced expression of Duffy antigens. *Transfusion*, 2000; 40: 310-320
- [117] Zhao Y., Mangalmurti N. S., Xiong Z., Prakash B., Guo F., Stolz D. B., Lee J. S.: Duffy antigen receptor for chemokines mediates chemokine endocytosis through a macropinocytosis-like process in endothelial cells. *PLoS One*, 2011; 6: e29624
- [118] Zhu Z., Sun Z., Wang Z., Guo P., Zheng X., Xu H.: Prognostic impact of atypical chemokine receptor expression in patients with gastric cancer. *J. Surg. Res.*, 2013; 183: 177-183
- [119] Zimmerman P.A., Ferreira M.U., Howes R.E., Mercereau-Puijalon O.: Red blood cell polymorphism and susceptibility to *Plasmodium vivax*. *Adv. Parasitol.*, 2013; 81: 27-76
- [120] Zimmerman P.A., Woolley I., Masinde G.L., Miller S.M., McNamara D.T., Hazlett F., Mgone C.S., Alpers M.P., Genton B., Boatin B.A., Kazura J.W.: Emergence of Fy^aA^{null} in a *Plasmodium vivax*-endemic region of Papua New Guinea. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1999; 96: 13973-13977

Autorzy deklaruja brak potencjalnych konfliktow interesow.