

**Univerzita Karlova**  
**Přírodovědecká fakulta**

Studijní program: Speciální chemicko-biologické obory  
Studijní obor: Molekulární biologie a biochemie organismů



**Tereza Podolská**

**VÝVOJ VYBRANÝCH CD ZNAKŮ A JEJICH ROLE VE FYLOGENEZI  
IMUNITNÍHO SYSTÉMU ČLOVĚKA**

Development of selected CD markers and their role in the phylogenesis of human immune system

**Bakalářská práce**

Vedoucí bakalářské práce: RNDr. Šárka Růžičková, Ph.D.

Praha, 2018

Ráda bych poděkovala své školitelce RNDr. Šárce Růžičkové, Ph.D  
za vedení této práce a mnoho podnětných připomínek při jejím řešení.  
Velký dík patří rovněž mé rodině.

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci zpracovala samostatně, pod vedením školitelky RNDr. Šárky Růžičkové, Ph.D, a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 8. 5. 2018

.....  
Tereza Podolská

---

## Abstrakt

V první části práce byl zjišťován původ vybraných povrchových CD znaků člověka, konkrétně molekul CD19, CD20, CD21, CD24, CD27 a CD38. Dále byly v práci mezidruhově porovnávány sekvence nukleotidů a aminokyselin těchto molekul pomocí *in silico* přístupu. Využity byly bioinformatické databáze sekvencí vybraných molekul na úrovni DNA, mRNA a proteinu, například GeneBank, NCBI BLAST, Homologene a OrthoDB. Záměrem bylo na doménové úrovni identifikovat nejpůvodnější organismy, u nichž lze sledovaný protein poprvé nalézt. V N-koncové doméně molekuly CD38 ptáků byla nalezena sekvence vykazující významnou podobnost s archebakteriální flagelinovou doménou. Tato flagelinová sekvence se u ptačí molekuly CD38 nachází v oblasti transmembránové domény, což naznačuje, že výskyt této sekvence mohl se vznikem transmembránové domény souviset. Použitý postup by bylo možné zařadit do komparativních hybridizačních studií jako nástroj v přípravné nelaboratorní fázi výzkumu existence paralogů a ortologů u fylogeneticky starých druhů.

**Klíčová slova:** CD znak, imunocyt, B lymfocyt, vrozená a adaptivní imunita, databáze sekvencí, aminokyselina, nukleotid

---

**Abstract**

In the first part of the thesis we investigated the origin of selected surface CD markers of human, namely CD19, CD20, CD21, CD24, CD27 and CD38 molecules. In addition, nucleotide and amino acid sequences of these molecules were compared using *in silico* approach. Bioinformatic databases of sequences of selected molecules at DNA, mRNA and protein level, such as GeneBank, NCBI BLAST, Homologene and OrthoDB, have been used. The intent was to identify at the domain level the first organism in which it is possible to find the searched molecule. At the N-terminal domain of the CD38 of birds, a sequence showing significant similarity to the archaebacterial flagellin domain was found. This flagellin sequence in the CD38 avian molecule is located in the region of transmembrane domain, indicating that the occurrence of this sequence might be related to the formation of the transmembrane domain. The approach used here could be implemented in comparative hybridization studies as a tool in the preparatory non-laboratory phase of the research of the presence of paralogs and orthologs in phylogenetically old species.

**Keywords:** CD marker, immunocyte, B lymphocyte, innate and adaptive immunity, sequence database, amino acid, nucleotide

---

## Obsah

<b>Seznam zkratk</b> .....	<b>vii</b>
<b>1 Úvod do problematiky</b> .....	<b>1</b>
<b>2 Metody a materiál</b> .....	<b>2</b>
2.1 Sekvence nukleotidů a aminokyselin .....	2
2.2 Použité databáze a programy .....	2
2.2.1 Databáze NCBI – GenBank a Protein .....	2
2.2.2 Ensembl .....	3
2.2.3 OrthoDB .....	3
2.2.4 PANTHER .....	3
2.3 Vyhledávací programy .....	4
2.3.1 Programy NCBI – BLAST a HomoloGene .....	4
2.4 Další programy a nástroje .....	5
2.4.1 ApE .....	5
2.4.2 Microsoft PowerPoint .....	5
<b>3 Charakteristika, funkce a původ vybraných CD znaků</b> .....	<b>6</b>
3.1 CD19 .....	6
3.1.1 Struktura molekuly CD19 .....	6
3.1.2 Funkce molekuly CD19 .....	7
3.1.3 Fylogeneze molekuly CD19 .....	8
3.2 CD20 .....	8
3.2.1 Struktura molekuly CD20 .....	8
3.2.2 Funkce molekuly CD20 .....	9
3.2.3 Fylogeneze molekuly CD20 .....	10
3.3 CD21 .....	10
3.3.1 Struktura molekuly CD21 .....	11
3.3.2 Funkce molekuly CD21 .....	11
3.3.3 Fylogeneze molekuly CD21 .....	12
3.4 CD24 .....	12
3.4.1 Struktura molekuly CD24 .....	13
3.4.2 Funkce molekuly CD24 .....	14
3.4.3 Fylogeneze molekuly CD24 .....	14
3.5 CD27 .....	14
3.5.1 Struktura molekuly CD27 .....	15

---

3.5.2	Funkce molekuly CD27 .....	15
3.5.3	Fylogeneze molekuly CD27 .....	16
3.6	CD38 .....	16
3.6.1	Struktura molekuly CD38 .....	17
3.6.2	Struktura genu CD38 .....	17
3.6.3	Výskyt molekuly CD38 .....	18
3.6.4	Receptorové funkce molekuly CD38 .....	18
3.6.5	Enzymatické funkce molekuly CD38 .....	19
3.6.6	Fylogeneze molekuly CD38 .....	19
3.6.7	CD38 genová rodina .....	21
<b>4</b>	<b>Mezidruhové porovnání sekvencí nukleotidů a aminokyselin CD znaků .....</b>	<b>23</b>
<b>5</b>	<b>Závěr .....</b>	<b>33</b>
<b>6</b>	<b>Použitá literatura .....</b>	<b>34</b>

---

**Seznam zkratek**

ADPR	adenosindifosfát ribóza
ARCs	ADP ribosyl cyklázy
BCR	B-buněčný receptor (B-cell receptor)
C3d	produkt komplementové kaskády
cADPR	cyklická ADP ribóza
CD	diferenciační antigen (cluster of differentiation)
CD19	antigen B lymfocytů CD19
CD20	antigen B lymfocytů CD20
CD21/CR2	komplementový receptor typu 2
CD23	ligand molekuly CD21/CR2
CD24/HSA	teplotně stabilní antigen (heat stable antigen)
CD27	TNF receptorová rodina - TNF receptor 7
CD31	ligand pro CD38
CD38	hydroláza cyklické ADP-ribózy
CD70	cytokin, ligand pro CD27
CD157/BST-1	bone marrow stromal cell antigen 1
CR1	komplementový receptor typu 1
CRD	domény bohaté na cystein, cystein-rich domains
DAMPs	damage-associated molecular patterns
fd	flagelinová doména
HMGB1	amphoterin, high-mobility group box 1
L1CAM	adhezní molekula L1, L1 Cell Adhesion Molecule
MS4A	proteinová rodina membrane-spanning 4-domain, podrodina A
NAADP <sup>+</sup>	nicotinic acid adenin dinukleotid fosfát
NAD <sup>+</sup>	nikotinamidadenin dinukleotid
NADP <sup>+</sup>	nikotinamidadenin dinukleotid fosfát
NF- $\kappa$ B	nukleární faktor kappa B
Orai 1	calcium release-activated calcium channel protein 1
ORF	otevřený čtecí rámec (open reading frame)
PI3K	fosfatidylinositol-3-kináza

---

Rib-hydrolázová doména	doména s ADP ribosyl cyklázovou a ADP-ribóza hydrolázovou aktivitou
RTX	monoklonální protilátka Rituximab cílená proti CD20
SCR doména	short consensus repeats, Sushi doména
Siglec-10	lektin vážící kyselinu sialovou, sialic acid-binding Ig-like lectin 10
TCR	T-buněčný receptor (T-cell receptor)
td	transmembránová doména
TNF	faktor nádorové nekrózy (tumor necrosis factor)
TPC	dvoupórový kanál, two-pore channel
5' UTR	5' nepřekládaná oblast, 5' untranslated region

### Přehled latinských názvů

<i>Anolis carolinensis</i>	anolis rudokrký
<i>Aplysia californica</i>	zej kalifornský
<i>Blattella germanica</i>	rus domácí
<i>Bos taurus</i>	tur domácí
<i>Gallus gallus</i>	kur domácí
<i>Helobdella robusta</i>	pijavice kalifornská
<i>Homo sapiens</i>	člověk rozumný
<i>Lottia gigantea</i>	kuželnatka velká
<i>Macaca mulatta / nemestrina</i>	makak rhesus / vepří
<i>Mesobuthus martensii</i>	štír Martensův
<i>Mus musculus</i>	myš domácí
<i>Ophiophagus hannah</i>	kobra královská
<i>Pan troglodytes / paniscus</i>	šimpanz učenlivý / bonobo
<i>Rattus norvegicus</i>	potkan obecný
<i>Schistosoma mansoni</i>	krevnička střevní
<i>Squalus acanthias</i>	ostroun obecný
<i>Strongylocentrotus purpuratus</i>	ježovka purpurová
<i>Tetranychus urticae</i>	sviluška chmelová
<i>Thermoplasma taales archaeon</i>	druh acidofilní archebakterie
<i>Xenopus laevis</i>	drápatka vodní



---

# 1 Úvod do problematiky

Diferenciační antigeny neboli CD znaky jsou nesourodou skupinou molekul na površích buněk, především imunitního systému. V dnešní době jsou využívány jako markery pro identifikaci jednotlivých subpopulací leukocytů i pro diagnostiku řady chorob. Mnohé z těchto molekul jsou evolučně konzervované a jejich homology<sup>1</sup> nacházíme u mnohých živočišných druhů. Jako takové plní mnohé receptorové i enzymatické funkce a nacházejí se i na povrchu buněk mimo imunitní systém.

Cílem této práce je blíže popsat vybrané CD znaky, vytvořit ucelený přehled jejich enzymatických a receptorových funkcí a shrnout dosavadní poznatky o jejich fylogenetickém vývoji. Dalším cílem je pomocí *in silico* metod porovnat lidské molekuly s jejich homology u vývojově starších organismů, a to především strunatců. Zaměřila jsem se zejména na srovnání jejich sekvencí nukleotidů a aminokyselin z hlediska funkčního a fylogenetického vývoje imunitního systému.

Tato práce tematicky navazuje na diplomovou práci Mgr. Andrey Grígelové *Raritní populace B lymfocytů na pozadí periferní B lymfopoézy u lidí*. V práci pomocí několika povrchových molekul zachytila a popsala minoritní B lymfocyty v periferní krvi člověka. Nakonec našla více než 40 raritních subpopulací B buněk, které doposud nebyly popsány. Tyto subpopulace lymfocytů pozorovala jak u zdravých kontrolních jedinců, tak i u pacientů postižených imunitními a nádorovými onemocněními. U některých z nich se pravděpodobně jedná o vývojově raná stadia B lymfocytů ve smyslu jejich fylogeneze (Grígelová, 2017).

Výsledky práce Mgr. Grígelové nás přiměly se zaměřit na fylogeneticky konzervované a staré diferenciační antigeny CD19, CD20, CD21, CD24, CD27 a CD38. Kombinace právě těchto markerů byly Mgr. Grígelovou vyhodnoceny jako zásadní pro charakterizaci a zachycení vývojově raných populací B lymfocytů.

V první, rešeršní, části práce se věnuji popisu těchto CD molekul z hlediska jejich struktury a funkcí a rekapituluji informace známé o jejich evoluci. Dále navazuji vlastním *in silico* výzkumem, ve kterém porovnávám v programu BLAST sekvence aminokyselin a nukleotidů těchto molekul se sekvencemi v databázích. Práce tohoto druhu týkající se námi vybraných molekul nebyla dosud nikým provedena.

---

<sup>1</sup> Homology jsou molekuly, geny či orgány fylogeneticky stejného původu. Mezi homology řadíme ortologické a paralogické molekuly. Ortology prošly procesem speciace a v průběhu své fylogeneze si udržely stejnou funkci. Naopak paralogy prošly genovou duplikací a získaly funkci jinou (Jensen RA, 2001).

---

## 2 Metody a materiál

V této práci byly použity sekvence nukleotidů a aminokyselin vybraných molekul vyhledané ve veřejně přístupných databázích a vyhledávacích programech. V databázích byly nalezeny ortology a paralogy těchto molekul. Dále byly využity programy pro porovnávání sekvencí tvorbu ilustrací.

### 2.1 Sekvence nukleotidů a aminokyselin

Sekvence DNA nukleotidů a aminokyselin byly získány z bioinformatických databází *NCBI* a *Ensembl* ve formátu FASTA, tedy s použitím jednopísmenných zkratk nukleotidů a aminokyselin. Z vybraných molekul byly vyhledány sekvence jejich ortologů u člověka, několika modelových organismů a dále organismů, které byly vyhodnoceny jako významné pro fylogenezi těchto molekul. Výsledky analýzy těchto sekvencí jsou uvedeny v kapitole č. 4.

### 2.2 Použité databáze a programy

Software a vyhledávače používané v této práci patří do tzv. databázových *search engine* vyhledávačů. V dalších podkapitolách budou popsány jednotlivé databáze použité v této práci.

#### 2.2.1 Databáze NCBI – GenBank a Protein

Databáze *NCBI* je spravována *NCBI (The National Center for Biotechnology Information)*, oddělením Národní knihovny medicíny Spojených států amerických (*United States National Library of Medicine*). Toto centrum bylo založeno roku 1988 v Marylandu. Zabývá se správou několika veřejně přístupných databází shromažďujících především data o genomu a proteomu organismů. Mimo jiné jsou na webových stránkách centra dostupné k volnému stažení bioinformatické nástroje, například *BLAST* a *Homologene* (viz níže)<sup>2</sup>.

DNA sekvence byly převzaty z databáze *GenBank*. Ta umožňuje zobrazit celkovou DNA či RNA sekvenci, sekvenci exonů a intronů, umístění a délku daného genu a jejich grafické znázornění. Do *GenBank* data vkládají přímo jednotliví autoři, příspěvky jsou poté zrevidovány

---

<sup>2</sup> Zdroj: Our Mission. *National Center for Biotechnology Information* [online]. c2017. [cit. 2017-09-09]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/home/about/mission/>

a zveřejněny. *GenBank* také spolupracuje s japonskou databází *DDBJ* a evropskou *ENA*. Mezi těmito institucemi pravidelně dochází k výměně dat<sup>3,4</sup>.

V databázi *Protein* byly vyhledány sekvence aminokyselin vybraných molekul. Databáze *Protein* je propojena s *CDD*, databází konzervovaných domén, která je rovněž pod správou NCBI. Grafický modul umožňuje i zobrazení těchto domén. Kromě samotné sekvence je v databázi *Protein* možné zobrazit i délku proteinu a vazebná místa.

### 2.2.2 *Ensembl*

Databáze *Ensembl* je projektem EBI (European Bioinformatics Institute) a shromažďuje genomy obratlovců a několika dalších modelových organismů (*Drosophila melanogaster*, *Caenorhabditis elegans* a *Saccharomyces cerevisiae*). Pro každý z organismů jsou zveřejněny informace o sekvenci genu, alternativním sestřihu, regulaci a fenotypu. Databáze rovněž vyhledává ortology genů a fylogenetické genové stromy<sup>5</sup>.

### 2.2.3 *OrthoDB*

*OrthoDB* je hierarchický katalog ortologických protein kódujících genů. Tato databáze se zaměřuje především na komparativně genomické informace. Umožňuje nalézt ortologické geny mezi 64 druhy obratlovců, 57 druhů členovců, 14 bazálních metazoi, 175 hub a 1115 bakterií. Dále je možné porovnat funkce ortologických proteinů, jejich domén, počtu aminokyselin a počtu exonů. Tato databáze je projektem švýcarského institutu SIB<sup>6,7</sup>.

### 2.2.4 *PANTHER*

*PANTHER* (Protein Analysis Through Evolutionary Relationships) je databáze využívaná pro klasifikaci proteinů a jejich rozřídění do rodin podle evoluční příbuznosti a jejich funkce. Ke každému genu je možné najít jeho funkce, ortology, paralogy a fylogenetické stromy. Tato databáze obsahuje kompletní sady genů kódujících proteiny 103 organismů<sup>8</sup>.

---

<sup>3</sup> Zdroj: GenBank Home. *National Center for Biotechnology Information* [online]. c2017. [cit. 2017-09-09]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>

<sup>4</sup> Zdroj: *International Nucleotide Sequence Database Collaboration* [online]. c2017. [cit. 2017-09-09]. Dostupné z: <http://www.insdc.org/>

<sup>5</sup> Zdroj: About the Ensembl Project. *Ensembl genome browser 90* [online]. c2017. [cit. 2017-09-09]. Dostupné z: <http://www.ensembl.org/info/about/index.html>

<sup>6</sup> Zdroj: *OrthoDB: Database of Orthologous Groups* [online]. c2007-2015. [cit. 2017-09-18]. Dostupné z: <http://cegg.unige.ch/orthodb7>

<sup>7</sup> Zdroj: *OrthoDB* [online]. c2007-2017. [cit. 2017-09-18]. Dostupné z: <http://www.orthodb.org/>

<sup>8</sup> Zdroj: *PANTHER – About. PANTHER – Gene List Analysis* [online]. c2017. [cit. 2017-09-18]. Dostupné z: <http://pantherdb.org/about.jsp>

## 2.3 Vyhledávací programy

### 2.3.1 Programy NCBI – BLAST a HomoloGene

*BLAST* (Basic Local Alignment Search Tool) je nástroj NCBI umožňující hledání v databázích NCBI podle sekvence nukleotidů a proteinů. Algoritmus porovná tyto sekvence se sekvencemi z databází a najde podobnosti mezi nimi. Dále vypočítá i statistickou významnost této shody a navíc je možné hledání omezit i na dané organismy<sup>9</sup>. Podoba vyhledávací stránky tohoto programu je zobrazena na Obr. 1.

Obr. 1 - Vyhledávací řádek programu BLAST<sup>10</sup>

The screenshot shows the NCBI BLAST search interface. At the top, there are logos for NIH and NCBI, and a 'Sign in to NCBI' link. The main heading is 'BLAST >> blastn suite'. Below this, there are navigation links: 'Home', 'Recent Results', 'Saved Strategies', and 'Help'. The main content area is titled 'Standard Nucleotide BLAST'. It features a 'blastn' tab and a 'BLASTN programs search nucleotide databases using a nucleotide query. more...' link. The 'Enter Query Sequence' section includes a text area with a DNA sequence, a 'Clear' button, and a 'Query subrange' section with 'From' and 'To' input fields. Below this is an 'Or, upload file' section with a 'Procházet...' button and a 'Job Title' input field. The 'Choose Search Set' section includes options for 'Database' (Human genomic + transcript, Mouse genomic + transcript, Others (nr etc.)), 'Organism' (optional), 'Exclude' (optional), 'Limit to' (optional), and 'Entrez Query' (optional). The 'Program Selection' section has radio buttons for 'Highly similar sequences (megablast)', 'More dissimilar sequences (discontiguous megablast)', and 'Somewhat similar sequences (blastn)'. At the bottom, there is a 'BLAST' button and a checkbox for 'Show results in a new window'.

<sup>9</sup> Zdroj: *BLAST: Basic Local Alignment Search Tool* [online]. c2017. [cit. 2017-09-09]. Dostupné z: [https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?CMD=Web&PAGE\\_TYPE=BlastHome](https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?CMD=Web&PAGE_TYPE=BlastHome)

<sup>10</sup> Zdroj: Nucleotide BLAST: Search nucleotide database using a nucleotide query. *National Center for Biotechnology Information* [online]. c2018. [cit. 2018-04-05]. Dostupné z: [https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&PAGE\\_TYPE=BlastSearch&LINK\\_LOC=blasthome](https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=blasthome)

---

*HomoloGene* je program s online přístupem, využívaný pro nalezení ortologů a paralogů. Po zadání názvu proteinu či genu program porovná sekvence proteinů z databází NCBI. Poté je podle podobnosti uspořádá do párů skupin a později do stromové struktury, přičemž příbuzné organismy se párují přednostně. Následně se porovnají jejich DNA sekvence a statisticky jsou vypočteny homologie genů a jim odpovídajícím proteinům. V proteinech jsou nalezeny i konzervované domény<sup>11</sup>.

## 2.4 Další programy a nástroje

### 2.4.1 *ApE*

*ApE* je volně přístupný program vytvořený pro práci s nukleotidovými sekvencemi ve formátech FASTA, Genbank, DNA Strider a EMBL. Umožňuje editaci sekvencí, jejich alignment, překlad do proteinu a nalezení primerů, ORF a restrikčních míst. Lze zde rovněž vytvořit lineární i cirkulární mapy ORF a restrikčních míst. V programu je možné exportovat sekvenci přímo z databází NCBI, nebo je prohledat pomocí nástroje *BLAST*<sup>12</sup>. Tento program byl v práci využit pro získání základního přehledu o dané sekvenci.

### 2.4.2 *Microsoft PowerPoint*

Schémata a ilustrace v této práci byly vytvořeny v programu Microsoft PowerPoint.

---

<sup>11</sup> Zdroj: Build procedure. *National Center for Biotechnology Information* [online]. c2017. [cit. 2017-09-09]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/homologene/build-procedure/>

<sup>12</sup> Zdroj: *ApE – A plasmid Editor* [online]. c2017. [cit. 2017-09-18]. Dostupné z: <http://biologylabs.utah.edu/jorgensen/wayned/ape/>

### 3 Charakteristika, funkce a původ vybraných CD znaků

V této kapitole budou popsány povrchové diferenciační markery CD19, CD20, CD21, CD24, CD27 a CD38 (CD – cluster of differentiation). V podkapitolách se věnují jejich struktuře, funkcím a fylogenezi. U jednotlivých molekul se rozsah znalostí liší podle toho, kolik studií se jimi zabývalo. Proto jsou některé molekuly popsány velmi podrobně a jiné stručněji.

#### 3.1 CD19

CD19 je transmembránový glykoprotein patřící do imunoglobulinové rodiny (Carter RH a Barrington RA, 2004).

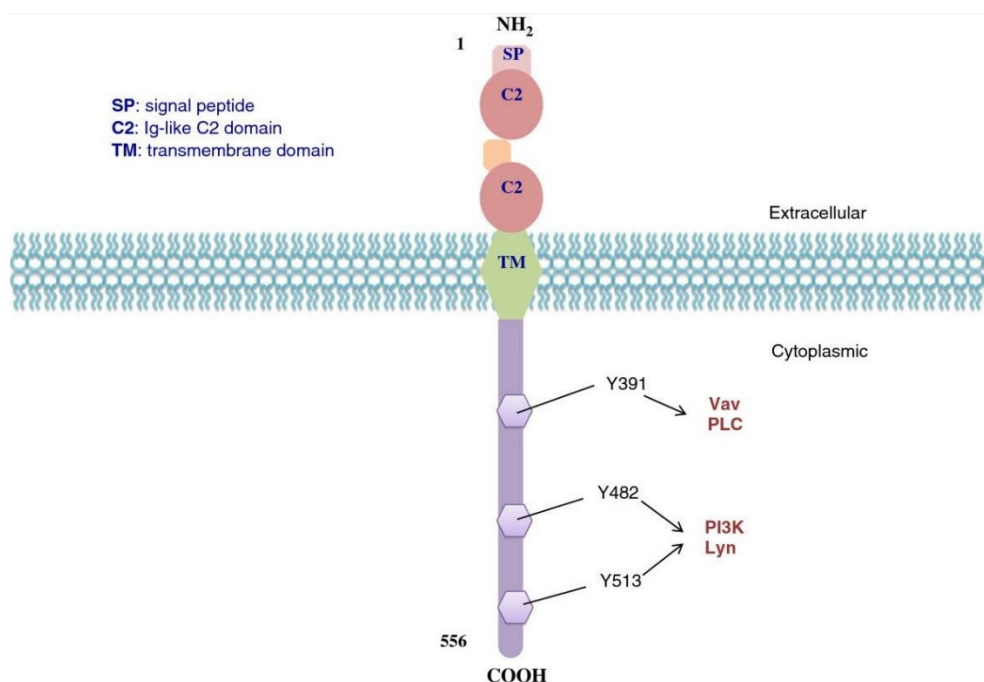
Molekula CD19 je exprimována ve zdravých B buňkách a ve folikulárních dendritických buňkách. Poprvé se na povrchu objevuje už během lymfopoézy při přeskupování genů pro BCR. Exprese je dále udržována v preB a zralých B buňkách. U plazmatických B buněk dochází ke ztrátě CD19 (Ishikawa H et al., 2002). CD19 se objevuje i na povrchu neoplastických B lymfocytů, a proto je hojně využíván jako diagnostický marker leukemií a lymfomů. Ukazuje se také jako vhodná cílová struktura pro jejich léčbu (Yang W et al., 2005).

Gen *CD19* je umístěn na krátkém raménku chromosomu 16 (v místě 16p11.2). Skládá se z 15 exonů a je dlouhý 7,4 kilobází. Existuje více mRNA transkriptů tohoto genu, ale pouze dva byly izolovány *in vivo* (Zhou LJ et al., 1992).

##### 3.1.1 Struktura molekuly CD19

Tento glykoprotein o hmotnosti 95 kDa má délku 557 aminokyselin (Thierry-Mieg D a Thierry-Mieg J, 2006). V membráně je ukotven jednou transmembránovou doménou. Do cytoplasmy směřuje C-konec, do extracelulárního prostoru N-konec. Extracelulárně orientovaná část molekuly obsahuje dvě imunoglobulin-like domény C2 typu. Cytoplasmatická doména, skládající se z 242 aminokyselin, je vysoce konzervovaná a obsahuje devět tyrosinových residuí. Biologické funkce proteinu CD19 jsou závislé právě na třech z nich (Y391, Y482 a Y513) (Tedder TF a Isaacs CM, 1989). Záměna tyrosinu za fenylalanin v pozicích Y483 a Y513 vede k inhibici fosforylace všech ostatních tyrosinů v cytoplasmatické doméně (Sato S, 1999). Struktura molekuly a její významné domény jsou znázorněny na Obr. 2.

Obr. 2 - Struktura molekuly CD19. Zobrazeny jsou dvě immunoglobulin-like domény a tři významná tyrosinová residua Y391, Y482 a Y513. Převzato z Wang K et al., 2012



### 3.1.2 Funkce molekuly CD19

Hlavní funkcí CD19 je modulace receptorové signalizace i signalizace nezávislé na receptoru. Přispívá tak k udržování citlivosti imunitní odpovědi a navození tolerance (Carter RH a Fearon DT, 1992).

Slouží jako dominantní podjednotka signálního komplexu na povrchu zdravých B buněk společně s receptorem CD21, CD81 a CD225 (Del Nagro CJ et al., 2005). Tento komplex má zásadní roli v zavedení signálních prahů receptorové signalizace a jeho regulaci, a to interakcí s BCR receptorem (Fujimoto M et al., 1998). BCR signalizace jako taková vyžaduje aktivaci protein tyrosin kináz (PTK) z rodiny Src. CD19 tyto kinázy rekrutuje a interaguje s nimi fosforylací tyrosinů Y513 a Y482 na CD19. Tím rekrutuje další Src a signál amplifikuje (Fujimoto M et al., 2000). Po aktivaci BCR molekula CD19 dále ještě zesiluje BCR signalizaci pomocí aktivace PI3K (Chung EY et al., 2012).

Nezávisle na BCR je CD19/CD21 komplex schopný vázat aktivovaný fragment komplementu C3d. Celý komplex poté translokuje do lipidového raftu, kde fosforylovaná CD19 interaguje s kinázami a moduluje BCR signalizaci (Deaglio S et al., 2007).

CD19 rovněž laterálně asociuje s CD38 v lipidových raftech a jeho přítomnost v komplexu přímo ovlivňuje schopnost CD38 signalizovat (Deaglio S et al., 2007).

### 3.1.3 Fylogeneze molekuly CD19

Fylogenezi glykoproteinu CD19 se literatura věnuje velmi málo. Ortology této molekuly jsem proto vyhledala v databázích *OrthoDB*, *PANTHER* a *HomoloGene*. CD19 jsem našla pouze u zástupců ze tříd savců a plazů. Bylo by logické předpokládat, že se molekula vyskytuje i u ptáků, nicméně obsah databází tomu nenasvědčuje. Je ovšem možné, že zatím žádný výzkum výskytu CD19 ve třídě ptáků proveden nebyl. Molekula CD19 se buď u jiných živočichů nevyskytuje, anebo zatím nebyla dostatečně zkoumána.

Doposud nebyla nalezena ani žádná významná homologie mezi CD19 a jinými známými proteiny (Tedder TF, 2009).

## 3.2 CD20

Molekula CD20 se nachází v lipidových raftech cytoplasmatické membrány B lymfocytů. Exprimuje se během ontogeneze B lymfocytů a reguluje jejich diferenciaci, vývoj a proliferaci v plazmatické buňky. Plazmatické B buňky tento CD znak ztrácí. U pacientů s leukemií a lymfomy B buněk se vyskytuje ve vyšším množství. Jedná se o významný tumorový marker. (Tedder TF et al., 1988).

Molekula CD20 je kódována genem *MS4A1*, který se nachází na chromosomu 11 v lokusu 11q12.2. Tento gen se skládá z šesti exonů (Cang S et al., 2012). *MS4A1* je součástí genové rodiny MS4A, ve které bylo doposud identifikováno 16 genů. Všechny geny této rodiny se nacházejí v clusteru na dlouhém raménku chromosomu 11 (Zuccolo J et al., 2010).

### 3.2.1 Struktura molekuly CD20

Molekula CD20 je neglykosylovaný protein dlouhý 297 aminokyselin o molekulové hmotnosti 33-37 kDa (Tedder TF et al., 1988). Molekula CD20 je tetraspaninem, typem membránového proteinu. Typickou strukturou tetraspaninů je ukotvení v membráně čtyřmi transmembránovými doménami a intracelulární orientace N- i C- konce. Do extracelulárního prostoru tak přesahují dvě smyčky, velká a malá. Struktura a ukotvení molekuly CD20 v membráně je znázorněna na Obr. 3 a Obr. 4 (Cang S et al., 2012).

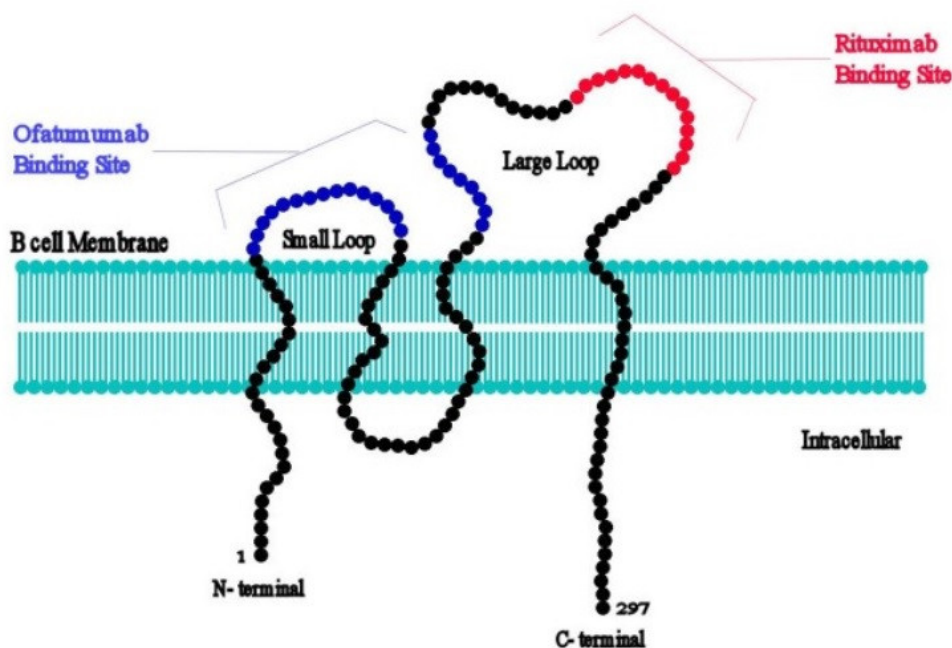


Molekuly CD20 se dále skládají do homotetramerních komplexů. Tvoří tak komplex podobný  $\text{Ca}^{2+}$  kanálu Orai1. Na rozdíl od něj ovšem neobsahuje kyselá rezidua okolo aktivního místa, která jsou esenciální pro funkci tohoto kanálu. Je tedy nepravděpodobné, že by CD20 sloužil sám osobě jako kanál. Spíše má úlohu jako regulátor či součást  $\text{Ca}^{2+}$  kanálu (Polyak MJ et al., 2008).

Obr. 3 - Struktura molekuly CD20. Znázorněny jsou transmembránové domény (TM), extracelulární smyčky (červeně) a tři cytoplasmatické domény molekuly (bíle). Převzato z Cang S et al., 2012



Obr. 4 - Ukotvení molekuly CD20 v membráně. Převzato z Cang S et al., 2012



### 3.2.2 Funkce molekuly CD20

Molekula CD20 doposud nemá žádný známý ligand (Cragg MS et al., 2005). Podobně jako CD19/CD21 komplex se i CD20 fyzicky asociuje s BCR receptorem. V B lymfocytech participuje na influxu  $\text{Ca}^{2+}$  aktivovaném po ligaci BCR. Je i pravděpodobné, že se CD20 a CD19/CD21 na této aktivaci  $\text{Ca}^{2+}$  kanálů spolupodílejí (Polyak MJ et al., 2008).

Na CD20 je cílena monoklonální protilátka Rituximab (RTX), která se, podle Canga et al., 2012, ukázala být velmi efektivní v terapiích lymfomů. RTX se váže na epitop velké

---

extracelulární smyčky a poté působí cytotoxicky. Vazebné místo RTX je zobrazeno na Obr. 4 (Cang S et al., 2012).

### 3.2.3 Fylogeneze molekuly CD20

CD20 je součástí proteinové rodiny MS4A, do které patří nejméně 16 proteinů tetraspaninové povahy. Jak již bylo zmíněno, geny pro tyto molekuly jsou lokalizované v klastru na chromosomu 11. Mnoho z nich rovněž plní funkce v imunitním systému.

Například MS4A2 je signální podjednotkou IgE receptoru a receptoru IgG žírných buněk a podílí se tedy na alergických reakcích (Zuccolo J et al., 2010). MS4A3 funguje jako adaptorový protein, který participuje v regulaci buněčného cyklu buněk lymfoidní a myeloidní linie. MS4A4 nebyl identifikován u člověka (*Homo sapiens*). Jeho myši (*Mus musculus*) ortolog se však podílí na regulaci signalizace T buněk. MS4A12 se, účastní influxu vápenatých iontů v epitelálních buňkách střeva, plní tedy funkci podobnou CD20. Funkce dalších členů MS4A rodiny jsou doposud neznámé (Zuccolo J et al., 2010).

Zuccolo et al. našli geny rodiny MS4A u savců, ptáků, plazů, obojživelníků, ryb a paryb, tedy všech čelistnatců. Žádný z těchto genů neobjevili u bezčelistnatců, bakterií, protist, hub, ani rostlin (Zuccolo J et al., 2010). Adaptivní imunitní systém se v evoluci rovněž objevuje poprvé u paryb (Cooper MD a Alder MN, 2006). To, že proteiny rodiny MS4A plní mnohé funkce v buňkách adaptivní imunity, by naznačovalo, že geny *MS4A* mohly funkčně vzniknout současně s adaptivní imunitou. Zuccolo et al. ovšem transkripty genů rodiny MS4A identifikovali i u ostrouna obecného (*Squalus acanthias*), druhu paryby, který adaptivní imunitní systém nemá. Vyvozují tedy, že současný vznik MS4A genové rodiny a adaptivní imunity u paryb byl náhodný (Zuccolo J et al., 2010).

## 3.3 CD21

CD21 je membránový glykoprotein, který je též označován jako komplementový receptor typu 2 (CDR2, anglicky complement receptor type 2) nebo Epstein-Barr virus receptor. CD21 je exprimován na povrchu B lymfocytů, folikulárních dendritických buněk a periferních T lymfocytů (Asokan R et al., 2006).

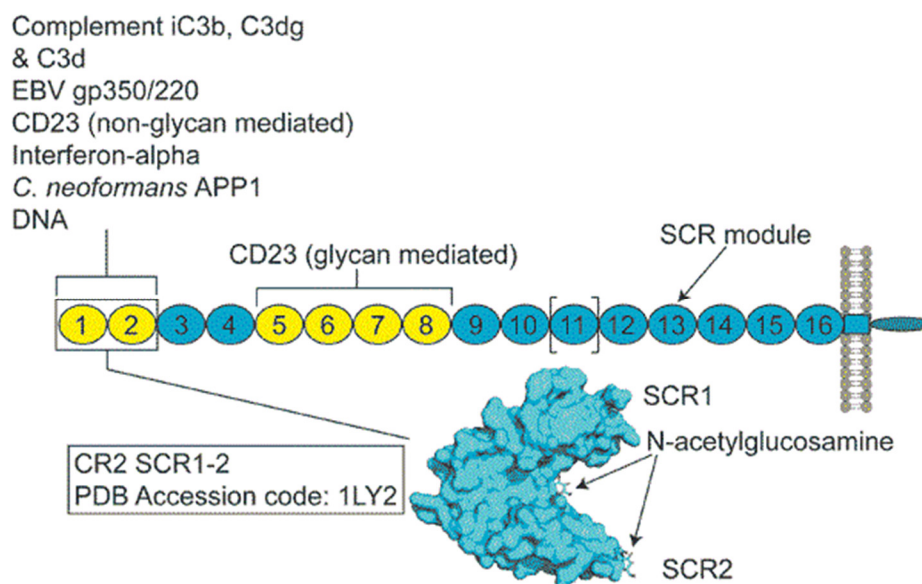
Protein CD21 je kódovaný genem *CR2* na chromosomu 1 v lokusu 1q32.2. Nachází se zde také jiné geny aktivace komplementu (Weis JH et al., 1987).

### 3.3.1 Struktura molekuly CD21

Molekula CD21 je ukotvena v membráně jednou transmembránovou doménou, obsahuje extracelulární a krátkou intracelulární doménu, dlouhou 34 aminokyselin. Extracelulární část je složena z 15-16 opakujících se domén SCR (short consensus repeats), v závislosti na alternativním sestřihu. Tyto domény jsou dlouhé 60-70 aminokyselin. Všechny alternativní izoformy proteinu vykazují stejné aktivity (Carel JC et al., 1990).

Dvě z SCR domén (SCR1 a SCR2) tvoří vazebné místo ve tvaru V, do kterého se váží všechny jeho známé ligandy C3d, CD23, EBV gp350/220 (Szakonyi G et al., 2001). Struktura molekuly je znázorněna na Obr. 5.

Obr. 5 - Struktura molekuly CD21. Převzato z Hannan JP, 2016



### 3.3.2 Funkce molekuly CD21

CD21 je multifunkčním receptorem na povrchu B lymfocytů. Mezi jeho ligandy patří komponenty komplementové kaskády, CD23, IFN- $\alpha$  a protein gp350 viru Epstein-Barrové. Ligandy se asociují s doménami SCR1 a SCR2 (Asokan R et al., 2006).

Centrální funkcí CD21 je spolupráce v odpovědi proti cizím antigenům. Laterálně se asociuje s BCR receptorem a slouží jako jeho koreceptor. Poté, co dojde k aktivaci komplementu, naváží se komplementové proteiny na antigenní povrch. Zatímco BCR váže antigen přímo, CD21 naváže tyto produkty komplementové kaskády (iC3b, C3dg a C3d), na kterých je antigen navázán. Tím CD21 propojuje složky adaptivní a vrozené imunity (Carter RH a Fearon DT, 1992). Dále se amplifikuje signalizační kaskáda skrze CD19/CD21/CD81

---

komplex, což vede k zesílení uvolňování  $\text{Ca}^{2+}$ , aktivaci kináz a proliferaci B lymfocytů (Asokan R et al., 2006).

Dalším ligandem CD21 je CD23, nalézající se na membránách i jako solubilní protein. Jejich vazba pak má za následek zvýšení produkce IgE (Aubry JP et al., 1992).

Tento glykoprotein má klíčovou roli v udržení tolerance vůči vlastním antigenům, například vůči ssDNA, dsDNA, chromatinu a histonům (Prodeus AP et al., 1998). Mutace v genu *CR2* vede k rozvoji lupu (Asokan R et al., 2006).

CD21 je receptorem také pro protein gp350 viru Epstein-Barrové (EBV) a napomáhá jeho infekci B buněk (Yefenof E et al., 1976).

### 3.3.3 Fylogeneze molekuly CD21

Receptory pro komplement, *CR2* geny většiny savců produkují dva proteiny – dlouhý protein CR1 a krátký CR2. Například u myši je CR1 složený z 21 domén SCR a CR2 z 15 domén SCR. CR2 vzniká při alternativním sestřihu vyššími exonů 2-8, které kódují domény SCR1-6. *CR2* gen primátů ztratil schopnost produkovat oba proteiny CR1 a CR2. Exony kódující domény proteinu CR1 jsou ale v genu stále přítomné, pouze nejsou přepisovány do transkriptu. CR1 je kódována samostatným genem *CRI* (Jacobson AC a Weis JH, 2008).

Rovněž molekula CD21 je nedostatečně evolučně pospána. Podle *OrthoDB* je protein CD21 konzervován mezi savci, včetně vačnatců a ptakořitných. CD21 byl rovněž nalezen u kobry královské (*Ophiophagus hannah*) a leguána anolise rudokrkého (*Anolis carolinensis*). Lze se tedy domnívat, že se molekula vyskytuje alespoň u části, ne-li u všech plazů. Pro potvrzení této hypotézy máme ovšem nedostatečná data. Jistá podobnost byla databází nalezena i s blíže nespecifikovanými proteiny několika zástupců členovců - dvou druhů komárů (*Anopheles arabiensis*, *Anopheles coluzzii*), štíra Martensova (*Mesobuthus martensii*), svilušky chmelové (*Tetranychus urticae*) a rusa domácího (*Blattella germanica*). Rovněž zde nemáme k dispozici dostatečné údaje. Proto nemůžeme potvrdit evoluční spojitost mezi proteinem CD21 a těmito proteiny.

## 3.4 CD24

Glykoprotein CD24 byl poprvé identifikován v roce 1978. Je rovněž známý pod zkratkou HSA, tedy heat stable antigen. Tato molekula se vyznačuje širokou distribucí v tkáních nejen imunitního systému, ale i vysokou variabilitou (Springer T et al., 1978).

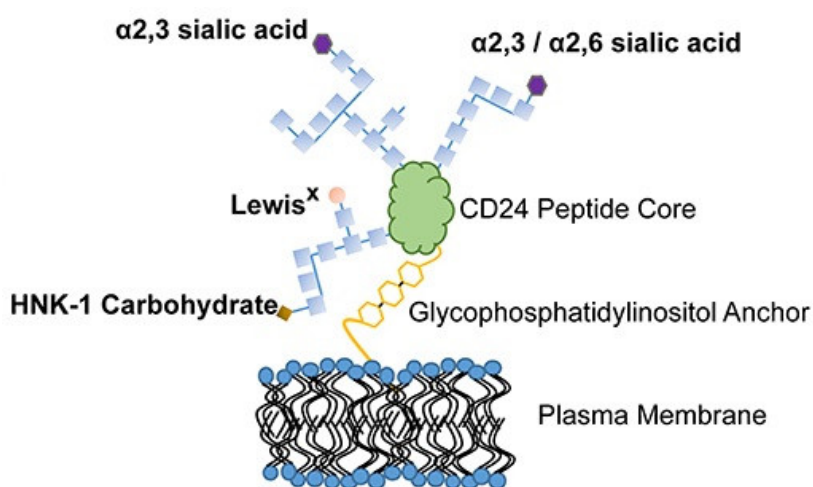
Protein je exprimován v B a T lymfocytech, neutrofilech, eozinofilech, dendritických buňkách a makrofázích. Mimo imunitní systém se vyskytuje na povrchu neuronů, epitelálních buněk, keratinocytů, svalových buněk a buňkách pankreatu. CD24 se rovněž objevuje u rakovinných buněk mnoha typů (Fang et al., 2010). V mnoha buněčných typech se exprimuje v průběhu vývoje a maturace, v menší míře pak u maturovaných buněk. CD24 je významným markerem prekurzorů B buněk (Hardy et al., 1991).

Gen *CD24* je lokalizován na dlouhém raménku chromosomu 6. U člověka byly rovněž identifikovány tři *CD24* pseudogeny na chromosomech 1, 15 a Y, z nichž ani jeden neobsahuje introny (Hough MR et al., 1994).

### 3.4.1 Struktura molekuly CD24

CD24 je krátký glykoprotein variabilní délky, ukotvený GPI kotvou k vnější straně cytoplasmatické membrány. Během maturace je tato molekula sestřižena z prekurzoru dlouhého 80 aminokyselin v protein o délce 31-35 aminokyselin. Dochází rovněž k N- a O-glykosylaci v mnoha místech. Alternativní sestřih transkriptu a glykosylace jsou vysoce variabilní a jsou závislé na buněčném typu. To má významný vliv na velikost, tvar i funkci proteinu. Molekulová hmotnost glykoproteinu CD24 se tak může pohybovat v rozmezí 20-70 kDa v závislosti na tkáni, ze které byl izolován. Lidský CD24, na rozdíl od myšího, obsahuje serinová a threoninová rezidua, jedná se tedy o glykoprotein mucinového typu (Kay R et al., 1991). Struktura molekuly je znázorněna na Obr. 6.

*Obr. 6 - Schematické znázornění struktury glykoproteinu CD24. Peptidové jádro je kotveno k cytoplasmatické membráně GPI kotvou. Upraveno podle Ayre DC a Christian SL, 2016a*



### 3.4.2 *Funkce molekuly CD24*

CD24 plní mnohé funkce v mnoha typech tkání, což je možné díky strukturní rozmanitosti molekuly a vysoce variabilní glykosylaci. V T lymfocytech slouží jako kostimulační faktor v regulaci homeostáze a proliferace, v B lymfocytech aktivuje proliferaci (Tan Y et al., 2016).

Hlavní funkcí molekuly CD24 je ovšem zprostředkování adheze. Bylo identifikováno několik adhezivních ligandů této molekuly, například Siglec-10 a HMGB-1, protein ze skupiny DAMPs (Chen GY et al., 2009). Specificita ligace je často závislá na typu buňky exprimující protein CD24, a tedy i jeho glykosylaci. Dalším příkladem ligandu molekuly CD24 mohou být P-selektiny exprimované na epiteliálních buňkách, které jsou schopné vázat molekulu CD24 na povrchu leukocytů myeloidní linie, thymocytů a B lymfocytů (Aigner et al., 1995). Adhezní molekula LICAM je ligandem neuronů nesoucích CD24 molekulu a reguluje růst axonu. Tato interakce plní funkci ve vývoji nervového systému savců (Kadmon et al., 1995).

CD24 se ale podílí i na šíření metastáz a adhezi nádorových buněk. Vysoká míra exprese CD24 byla detekována u pacientů s epiteliálním karcinomem vaječníku (Kristiansen G et al., 2002), karcinomem pankreatu (Jacob J et al., 2004), prostaty (Kristiansen G et al., 2004), prsu (Kristiansen G et al., 2003b) a nemalobuněčného karcinomu plic (Kristiansen G et al., 2003a).

Molekula CD24 rovněž hraje roli v kontrole autoimunity. Polymorfismy a delece v genu *CD24* jsou spojeny s několika autoimunitními chorobami, jako je roztroušená skleróza a systémový lupus erythematosus (Tan Y et al., 2016).

### 3.4.3 *Fylogeneze molekuly CD24*

Ortologické molekuly CD24 nacházíme u plazů, ptáků a savců. Tato molekula tedy vznikla ještě před oddělením tříd ptáků a plazů. Její výskyt je plně konzervován u placentálních savců. Homologie se ovšem nacházejí v poměrně malém počtu aminokyselin. Nejvíce konzervovanými oblastmi jsou glykosylační místa, která v maturovaném proteinu zprostředkovávají interakci s ligandy. Mezi druhy se různí i struktura genu. Rozdíly byly nalezeny v počtech exonů, intronů a přítomnosti UTR (Ayre DC et al., 2016b).

## 3.5 CD27

CD27 je povrchový antigen T lymfocytů, NK buněk, plazmatických B lymfocytů a paměťových B lymfocytů. Je rovněž označován jako receptor pro TNF. (Borst et al., 2005)

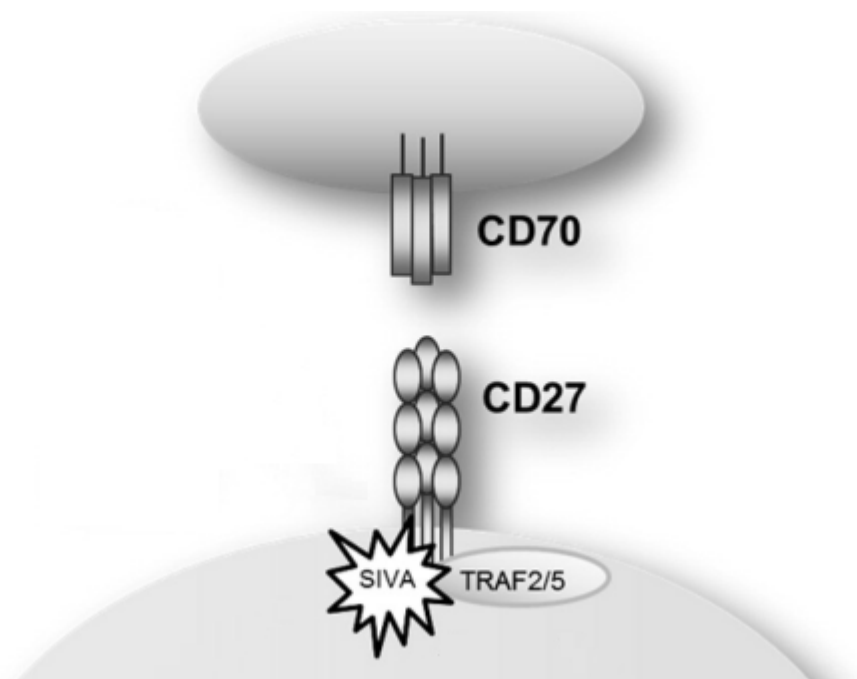
Gen *CD27* je umístěn na 12. chromosomu v lokusu 12p13.31. (Baens M et al., 1995)

### 3.5.1 Struktura molekuly CD27

Molekula CD27 se skládá z 260 aminokyselin (Widney D et al., 1999). V živých systémech se nalézá ve formě homodimeru o hmotnosti 55 kDa. Spojení dvou monomerů je realizováno disulfidickým můstkem (Yamamoto H et al., 1998). Molekula CD27 se vyskytuje na povrchu buněk kotvená v membráně, nebo jako solubilní molekula vzniklá odštěpením membránové formy. Solubilní forma má hmotnost 32 kDa (Widney D et al., 1999). Orientace molekuly v membráně nebyla nalezena v člancích, ani databázích.

V extracelulární oblasti se nacházejí tři domény bohaté na cystein (CRD1-3, anglicky cystein-rich domains), které jsou typické pro TNF receptorovou rodinu. Epitop pro ligand CD70 zahrnuje rezidua 57-68 v doméně CRD2. Tato rezidua jsou stoprocentně konzervovaná u lidského a myšího ortologa molekuly CD27 (Teplyakov A et al., 2017). Struktura molekuly CD27 je zobrazena na Obr. 7.

*Obr. 7 - Struktura molekuly CD27 a její interakce s ligandem CD70. Upraveno podle Jacobs J et al., 2015*



### 3.5.2 Funkce molekuly CD27

Jediným známým ligandem je cytokin CD70, exprimovaný v aktivovaných B a T lymfocytech a dendritických buňkách. (Borst J et al., 2005) Jejich kooperace ovlivňuje regulaci imunity a tolerance (Denoeud J a Moser M, 2011). Ligace CD27-CD70 spouští NF- $\kappa$ B signalizaci, mediovanou adaptorovým proteinem TRAF2. Tato dráha stimuluje proliferaci B a T lymfocytů, diferenciaci plazmatických buněk a sekreci protilátek. (Yamamoto H et al., 1998).

---

Přítomnost CD27 je vyžadována pro udržení T buněčné imunity, zajišťují totiž jejich proliferaci výše zmíněnou signální drahou. Po aktivaci T lymfocytů dochází ke zvýšené expresi CD27 na jejich povrchu (Camerini D et al., 1991).

Dalšími důsledky CD27-CD70 ligace je mobilizace vápenatých iontů, aktivace proteinkinázy C a protein tyrosin kinázy (Kobata T et al. 1994).

Molekula CD27 je dobrým markerem lidských plazmatických a paměťových B buněk. Naivní B buňky jsou CD27 negativní (Klein U et al., 1998; Agematsu K et al., 2000).

### **3.5.3 Fylogeneze molekuly CD27**

Tato molekula rovněž nebyla z hlediska fylogeneze podrobně popsána. Vyhledáváním v databázi *OrthoDB* jsem zjistila, že molekula CD27 je konzervována mezi savci. Podobnost s CD27 byla nalezena u necharakterizovaných proteinů plže *Lottia gigantea* a druhu pijavice *Helobdella robusta*. Je však možné, že se jedná o jiné proteiny z rodiny TNF receptorů a shoda byla nalezena pouze v konzervovaných doménách CRD.

Bylo však zjištěno, že u myší a krys není molekula CD27 charakteristickým znakem pro paměťové B lymfocyty a nelze ji tedy použít jako diferenciací marker (Anderson SM et al., 2007). Funkce a výskyt molekuly CD27 tak nejspíš nejsou ani v rámci savčích druhů plně konzervovány.

## **3.6 CD38**

CD38 je transmembránový glykoprotein nacházející se na povrchu T i B lymfocytů, některých buněk myeloidní linie, osteoklastů a osteoblastů (Tenca C et al., 2003; Zilber MT et al., 2000). Výskyt CD38 byl prokázán i na některých buňkách neimunitních tkání. Jedná se o fylogeneticky konzervovanou molekulu, starou přibližně 700 milionů let. CD38 má nejen funkci receptorovou, jedná se také o multifunkční ektoenzym (Ferrero E a Malavasi F, 1997; Malavasi F et al., 2008). Molekula CD38 byla velmi důkladně prozkoumána, a proto jsou znalosti o její funkci velmi rozsáhlé oproti výše popsaným CD znakům.

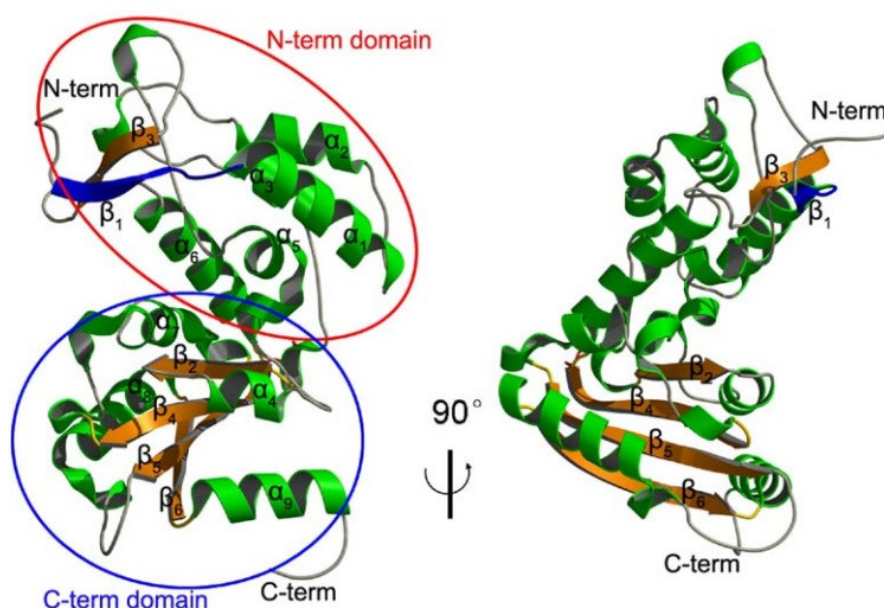
Tento glykoprotein je u savců kotven nejenom v cytoplasmatické membráně, ale může se objevovat i v membráně jaderné (Orciani M et al., 2012), mitochondriální (Ziegler M et al., 1997) či vezikulární (Masuda W a Jimi E, 2011).



### 3.6.1 Struktura molekuly CD38

Produkt genu CD38 se u člověka skládá z 300 aminokyselin. Na N-konci se nachází jeden transmembránový helix dlouhý 21 aminokyselin a dalších 21 aminokyselin přesahujících do cytoplasmy. Orientace C-konce molekuly do extracelulárního prostoru je u obratlovců primární. Nicméně u člověka se objevuje také topologie opačná, tedy otočení C-konce do cytoplasmy (Zhao YJ et al., 2012). Místo enzymatické NADAsové aktivity se nachází v C-terminální sekvenci 273-285, je tedy orientováno extracelulárně (Hoshino S et al., 1997).

Obr. 8 - Stuhkovité zobrazení molekuly CD38. Struktura je vyobrazena v pohledech ze dvou úhlů. Převzato z Liu Q et al., 2005



Celkový tvar molekuly je zobrazen na Obr. 8 a lze ho přiblížit písmenu L. N koncová doména je tvořena pěti  $\alpha$ -helixy a dvěma krátkými  $\beta$ -listy, C-koncová čtyřmi  $\alpha$ -helixy a čtyřmi  $\beta$ -listy. V molekule se nachází celkem 6 disulfidických můstků (Liu Q et al., 2005).

CD38 se vyskytuje v membránách ve formě monomeru i dimeru. Tato skutečnost je využívána v regulaci receptorové funkce molekuly (Deaglio S et al., 2007).

### 3.6.2 Struktura genu CD38

Lidský gen pro molekulu CD38 se nachází na 4. chromosomu, konkrétně v místě 4p15 (Nakagawara et al., 1995). Gen je dlouhý 70 kb a skládá se z 8 exonů a 7 intronů. Exon 1 je největší a kóduje cytoplasmatickou, transmembránovou i extracelulární část molekuly. Přes 98 % genu se skládá z intronových sekvencí (Ferrero E a Malavasi F, 1997).

Regulační oblast tohoto genu je charakteristická absencí TATA boxu a přítomností CpG ostrovu kontrolovaného methylocí (Ferrero E a Malavasi F, 1997).

V lidském *CD38* genu byl nalezen polymorfismus v intronu 1, který je nejdelším intronem tohoto genu. Byla prokázána existence dvou alel, *CD38\* A* a *CD38\* B*. V italské populaci, ve které byl výzkum prováděn, je alela *CD38\* B* častější a jeden ze čtyř jedinců je heterozygotem (Ferrero E, Saccucci F a Malavasi F, 1999).

### **3.6.3 Výskyt molekuly CD38**

Molekula CD38 byla původně objevena na lidských T lymfocytech za použití myších monoklonálních protilátek. K výrazné expresi dochází v double-pozitivních thymocytech, nenachází se u double-negativních (Tenca C et al., 2003). CD38 se rovněž nevyskytuje, nebo se vyskytuje na velmi nízké úrovni u paměťových T lymfocytů (Deaglio S et al., 2001).

CD38 má též vysokou expresi u prekurzorů kostní dřeně. U klidových B buněk je tato exprese regulačně snížena. CD38 se poté znovu objevuje u terminálně diferenciovaných plazmatických buněk (Funaro A, Malavasi F, 1999).

V myeloidní linii se CD38 objevuje u cirkulujících monocytů, u makrofágů však chybí (Zilber MT et al., 2000). Při maturaci monocytu v nezralou dendritickou buňku dochází ke ztrátě CD38 (Fedele G et al., 2004.) K její opětovné expresi ovšem dojde po indukci lipopolysacharidem a následném zrání dendritické buňky (Frasca L, et al., 2006). CD38 se objevuje i na povrchu NK buněk (Mallone R et al., 2001), granulocytů (Fujita T et al., 2005), cirkulujících osteoklastů a osteoblastů (Shalhoub V et al., 2000).

Výskyt CD38 byl potvrzen i v některých tkáních mimo imunitní systém, a to například na povrchu červených krvinek (Ramaschi G et al., 1996), krevních destiček (Zocchi E et al., 1993) a v Langerhansových ostrůvcích (Koguma T et al., 1994; Mallone R et al., 2002). Molekula byla nalezena i na Purkyňových buňkách (Mizuguchi M et al., 1995) a v hladké a příčně pruhované svalovině (Fernandez JE et al., 1998).

Nejzajímavější nález byl získán analýzou krve novorozenců, kdy nebyli nalezeni žádní CD38 negativní jedinci. Z hlediska ontogeneze člověka to znamená, že nepřítomnost molekuly CD38 je neslučitelná se životem (Malavasi F et al., 2008).

### **3.6.4 Receptorové funkce molekuly CD38**

Ligandem CD38 je protein CD31, nacházející se ve velkém množství v endotelu. Jeho vazba zajišťuje adhezi T lymfocytů na endoteliální buňky a tedy i homing lymfocytů (Dianzani U

et al., 1994). Interakce CD38 a CD31 též reguluje cytoplasmatický tok Ca iontů. Součinnost obou molekul rovněž hraje klíčovou roli v regulaci buněčného cyklu a migraci leukocytů (Deaglio S et al., 1998).

Receptor je regulován třemi úrovněmi kontroly – výskytem monomerní či dimerní formy CD38, lokalizací molekuly v lipidových raftech cytoplasmatické membrány a dále laterální asociací v těchto mikrodoménách s komplexy molekul spolupracujících na signalizaci. Tyto komplexy se ovšem podle typu leukocytů různí (Deaglio S et al., 2007). Například u T buněk se jedná o TCR/CD3 komplex. Přenos signálu je zde po vazbě CD38 a CD31 zajištěn tyrosinovou fosforylací ramen molekuly CD3 (Zubiaur M et al., 1999). V B lymfocytech CD38 asociuje s CD19 komplexem. Utlumení funkce molekuly CD19 inhibuje schopnost CD38 zprostředkovat vlévání  $Ca^{2+}$ , přičemž ale neovlivňuje povrchovou expresi CD38 (Deaglio S et al., 2007).

### **3.6.5 Enzymatické funkce molekuly CD38**

Glykoprotein CD38 je ADP-ribosyl cyklázou (ARCs). ARCs jsou enzymy glykoproteinové povahy s NADasovou aktivitou, které za neutrálního pH katalyzují hydrolýzu  $NAD^+$  (nikotinamid adenin dinukleotidu) v cyklickou ADP ribosu – cADPR (Howard M et al., 1993). Tento produkt dále plní významnou funkci druhého posla při mobilizaci  $Ca^{2+}$ . Spojují se zde tedy funkce enzymatické a receptorové (Lee, H C, 2001). ARCs enzymy zajišťují rovněž hydrolýzu cADPR na ADPR (Howard M et al., 1993).

V kyselém prostředí ovšem CD38 přeměňuje  $NADP^+$  v NAADP<sup>+</sup> (nicotinic acid adenin dinukleotid fosfát), tedy dalšího druhého posla, který figuruje v mobilizaci vápenatých kationtů (Aarhus R et al., 1995). Zatímco cADPR aktivuje ryanodinový receptor, NAADP cílí na TPC, *two-pore channels*, které mobilizují  $Ca^{2+}$  z lyzozomu a dalších kyselých organel (Lee, H C, 2001).

Další funkcí CD38 je schopnost extracelulární domény zprostředkovat ADP ribosylaci několika proteinů včetně sebe sama. (Grimaldi JC et al., 1995).

### **3.6.6 Fylogeneze molekuly CD38**

CD38, jak již bylo zmíněno, se řadí mezi takzvané ARCs, tedy ADP-ribosyl cyklázy. Tato rodina enzymů je velmi starobylá. A jako taková s sebou nese relikty svého dlouhého fylogenetického vývoje. Ortologické ARC molekuly, byly objeveny nejen u obratlovců, ale i bezobratlých (Ferrero E et al., 2014).

Například, ortology molekuly CD38 byly popsány u savců – skotu *Bos taurus* (Pekala PH a Anderson BM, 1978), ptáků - kura *Gallus gallus* (NCBI ADQ89191), obojživelníků – drápatky *Xenopus laevis* (Churamani D et al., 2012), mnoha zástupců ježovek (Churamani D et al., 2008) a dokonce ploštěnců - *Schistosoma mansoni* (Goodrich SP et al., 2005). Vzhledem k dnešnímu rozšíření ARCs mezi takto širokou škálou obratlovců i bezobratlých, se musela ARC vyskytovat u posledního společného předka trojlístých, takzvaného *Urbilateriana*. Jednalo se pravděpodobně o malého mořského živočicha podobného ploštěncům (De Robertis EM, 2008). Jeho existence je fosilně doložena přinejmenším před 630 miliony lety během kambrické exploze (Knoll AH a Carroll SB, 1999). Podle některých autorů se ale *Urbilaterian* vyskytoval už dříve, přibližně před 700 miliony let. (Erwin et al. 2011).

Ribhydrolázová doména je silně konzervovaná u ARCs, největší uniformitu vykazují v konzervovaných cysteinech, formujících disulfidické můstky. Naopak u C- a N- konce molekul nabývají nejmenších homologií (Chothia C et al., 2003).

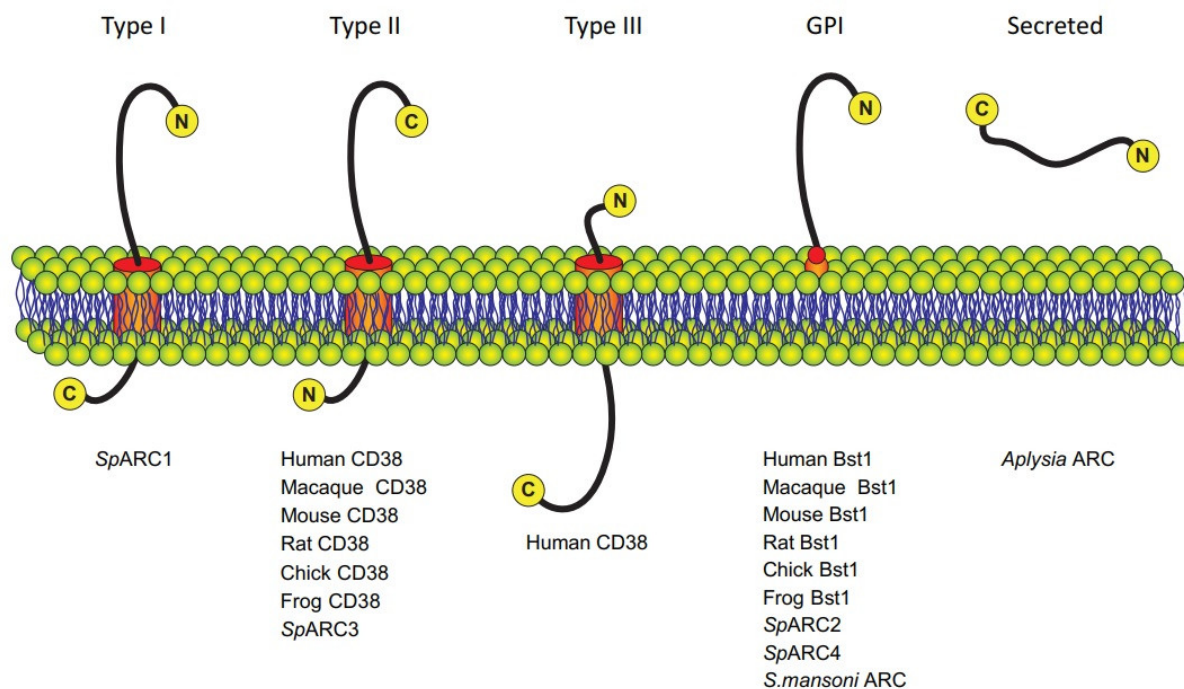
CD38 ortolog byl nalezen u mořského plže zeje kalifornského, *Aplysia californica* (Hellmich MR a Strumwasser F, 1991). Jedná se o jediného člena rodiny ADP-ribosyl cykláz, který je solubilní, tedy není vázaný v membráně (molekula je zobrazena na Obr. 9). Význam *Aplysia* cyklázy spočívá především ve schopnosti signalizace pomocí druhých posílů. K expresi tohoto proteinu dochází ve zralých i nezralých oocytech a hraje významnou roli při fertilizaci (Glick DL et al., 1991). *Aplysia* cykláza byla rovněž detekována v cytosolu neuronů tohoto měkkýše, přičemž během depolarizace se translokovala do jádra (Bezin S et al., 2008).

U ježovky purpurové, *Strongylocentrotus purpuratus*, byly objeveny dokonce čtyři různé ADP-ribosyl cyklázy, a to ve třech různých orientacích. Dvě cyklázy jsou kotvené GPI-kotvou, dvě mají transmembránovou doménu, ovšem jsou zakotveny v opačných orientacích C- a N-koncem. Všechny typologie cykláz ježovky jsou zobrazeny na Obr. 9 pod označením SpARC1-4 (Ramakrishnan L et al., 2010). I zde se ARCs vyskytují v oocytech a podílí se na fertilizaci závislé na mobilizaci vápenatých kationtů. Vzhledem k tomu, že ježovka je modelovým organismem vývojové biologie, je tento proces důkladněji popsán než u *Aplysie* (Davis LC et al., 2008).

CD38 se vyskytuje i u parazitického helminta krevničky střešní, *Schistosoma mansoni*. Molekula je GPI-kotvená v tegumentu schistosom, povrchové struktury zajišťující obranu před imunitním systémem hostitele (Castro-Borges W et al., 2011). Tento enzym výhradně

hydrolyzuje NAD na ADPR a nevykazuje žádnou cyklázovou aktivitu (Goodrich SP et al., 2005). Ztráta této enzymatické aktivity je způsobena mutací v aktivním místě – záměnou histidinu za konzervovaný tryptofan (Kuhn I et al., 2006).

Obr. 9 - Typologie ARCs a jejich lokalizace v membránách. Převzato z Ferrero E et al., 2014



Jak již bylo zmíněno, molekula CD38 je u obratlovců orientována C- koncem do extracelulárního prostoru, ovšem u lidského ortologa je možná i orientace opačná. U jiných obratlovců nebyla zatím tato dvojí orientace popsána, ale ani vyvrácena (orientace a ukotvení molekul v membráně viz Obr. 9) (Zhao YJ et al., 2012).

Savčí ortology CD38 se exprimují v poměrně velkém množství tkání. K vysoké expresi dochází v krvi, lymfě, kostní dřeni, ale i v dalších orgánech, jako například mozek, srdce, játra, svaly, či pankreas. CD38 má také, jak se zdá, zásadní vliv na sekreci oxytocinu a sociální chování (Jin D et al., 2007).

### 3.6.7 CD38 genová rodina

U obojživelníků, plazů, ptáků a savců se kromě molekuly CD38 vyskytuje ještě další ARC – CD157. Byla tedy definována CD38 genová rodina, která zahrnuje pouze geny pro tyto dvě molekuly. Bylo zjištěno, že oba geny od sebe byly odvozeny genovou duplikací (Ferrero E,

---

Saccucci F a Malavasi F., 1999). K této události došlo před 340 miliony lety, před oddělením obojživelníků a plazů (Chothia C et al., 2003).

CD157 je též známá jako BST-1 (*bone marrow stromal cell antigen 1*). Geny *CD157* a *CD38* jsou orientovány tandemově na lidském chromosomu 4 (4p15) v orientaci hlava-ocas. U myši se geny pro *CD38* i *CD157* nacházejí na 5. chromosomu (Malavasi F et al., 2008).

Gen *CD157* má délku 35 kb a skládá se z 9 exonů (Muraoka O et al., 1996). Je vysoce podobný genu pro *CD38* a exony 2-8 jsou podobné délky. Na rozdíl od *CD38* je ale molekula *CD157* v membráně kotvena GPI kotvou na C- konci (viz Obr. 9) (Kaisho T et al., 1994).

## 4 Mezidruhové porovnání sekvencí nukleotidů a aminokyselin CD znaků

V této kapitole budou popsány postupy, které jsem použila pro vyhledání nejstarších ortologů molekul CD19, CD20, CD21, CD24, CD27 a CD38 a výsledky těchto vyhledávání. Mezidruhové porovnání sekvencí nukleotidů a aminokyselin CD znaků jsem provedla pomocí programů popsaných v kapitole č. 2.

Pro získání prvního přehledu o výskytu ortologických molekul jsem molekuly vyhledala v databázi *OrthoDB*. Identifikované ortology jsou uvedeny v tabulce Tab. 1.

Tab. 1 - Přehled nalezených ortologů jednotlivých molekul

Molekula	Ortology nalezené u:
CD19	savci, anolis, kobra, komáři
CD20	savci, ptáci, plazi, ryby, hlístice, pijavice, měkkýši, houbovci, krevnička, pláštěnci, nezmar, ježovka, vločkovci
CD21	savci, anolis, kobra, komáři
CD24	savci, ptáci, plazi, obojživelníci
CD27	savci
CD38	savci, ptáci, plazi, obojživelníci, ryby, paryby, hlístice, pijavice, měkkýši, houbovci, krevnička, nezmar, ježovka, vločkovci

Sekvence nukleotidů a aminokyselin lidských homologů molekul CD19, CD20, CD21, CD24, CD27 a CD38 jsem vyhledala v databázi *NCBI* (*Protein* a *Gene*). Následně jsem tyto sekvence porovnávala programem *BLAST* s celou databází *NCBI* a vyhledala proteiny a geny s vysokým stupněm identity. Z těchto výsledků jsem vybrala pouze shody s kompletními sekvencemi. Odfiltrovány byly i duplicitní sekvence molekul a genů stejného druhu. Toto srovnání však vypovídá pouze o celkové homologii molekul, nikoliv jejich domén. Nejvyšší shody dosahují homology molekul primátů a dalších savců. Výsledky jsou prezentovány pro sekvence nukleotidů v tabulce Tab. 2 a pro sekvence aminokyselin v tabulce Tab. 3.

Výsledkem vyhledávání pomocí programu *BLAST* byly pouze sekvence obratlovců. To je dáno charakteristikou algoritmů tohoto vyhledávacího programu, který poskytuje pouze 100 sekvencí s nejvyšší identitou. U dalších homologických molekul a genů tedy shoda není zjištělná bez použití filtrů.

Tab. 2 - Výsledky porovnání sekvencí nukleotidů genů pro jednotlivé molekuly programem BLAST. Popis hodnot je vysvětlen v poznámkách pod čarou.

Gen pro molekulu	Druh	Výsledky pro porovnání sekvencí nukleotidů				
		Max score <sup>13</sup>	Total score <sup>14</sup>	Query cover <sup>15</sup>	Identita <sup>16</sup>	Accession number <sup>17</sup>
CD19	<i>Homo sapiens</i>	3513	9510	100%	99%	AH005421.2
	<i>Pan troglodytes</i>	3193	12608	99%	97%	AC275222.1
	<i>Macaca mulatta</i>	520	1950	25%	95%	XR_001441690.1
CD20	<i>Homo sapiens</i>	5107	14619	100%	100%	AH003353.2
	<i>Pan troglodytes</i>	798	3022	21%	99%	XM_024347171.1
	<i>Macaca mulatta</i>	4124	12515	99%	94%	AC197791.4
CD21	<i>Homo sapiens</i>	3330	7300	77%	100%	M26004.1
	<i>Pan paniscus</i>	3225	7163	77%	99%	XM_003822895.2
	<i>Macaca fascicularis</i>	2780	6109	75%	94%	XM_005540689.2
CD24	<i>Homo sapiens</i>	15285	15285	100%	100%	FJ226006.1
	<i>Pan troglodytes</i>	3587	5474	42%	99%	XM_016956068.2
	<i>Macaca nemestrina</i>	2892	4202	37%	93%	XM_011736401.2
	<i>Mus musculus</i>	X	X	X	X	X
	<i>Rattus norvegicus</i>	X	X	X	X	X
CD27	<i>Homo sapiens</i>	25547	29173	100%	100%	NG_031995.1
	<i>Pan troglodytes</i>	1493	2936	11%	99%	XM_016922832.1
	<i>Macaca mulatta</i>	7415	66590	97%	92%	AC202669.10
CD38	<i>Homo sapiens</i>	6567	14821	100%	100%	D84284.2
	<i>Pan troglodytes</i>	2025	3851	26%	98%	XM_001160669.5
	<i>Macaca nemestrina</i>	1792	3681	30%	92%	XM_011751563.1
	<i>Mus musculus</i>	X	X	X	X	X
	<i>Rattus norvegicus</i>	X	X	X	X	X

<sup>13</sup> Max score - maximální skóre - skóre nejlépe alignované sekvence

<sup>14</sup> Total score - celkové skóre - součet skóre všech alignovaných sekvencí

<sup>15</sup> Query cover - podíl vyhledané sekvence alignované se sekvencí vyhledávanou

<sup>16</sup> Identita - poměr identických bazí/aminokyselin v sekvenci

<sup>17</sup> Accession number - kód genu/proteinu vyhledatelný v databázích



Tab. 3 - Výsledky porovnání sekvencí aminokyselin jednotlivých molekul programem BLAST. Popis hodnot je vysvětlen v poznámkách pod čarou tabulky Tab. 2.

Molekula	Druh	Výsledky pro porovnání sekvencí aminokyselin				
		Max score	Total score	Query cover	Identita	Accession number
CD19	<i>Homo sapiens</i>	1127	1127	100%	100%	AAB60697.1
	<i>Pan troglodytes</i>	1116	1116	100%	99%	XP_016784252.1
	<i>Macaca mulatta</i>	944	944	100%	91%	XP_001103043.1
CD20	<i>Homo sapiens</i>	604	604	100%	100%	NP_068769.2
	<i>Pan troglodytes</i>	598	598	100%	99%	XP_003826386.1
	<i>Macaca mulatta</i>	591	591	100%	97%	NP_001274241.1
CD21	<i>Homo sapiens</i>	2246	2246	100%	100%	AAA35784.1
	<i>Pan paniscus</i>	2175	2175	100%	97%	PNJ00346.1
	<i>Macaca fascicularis</i>	2041	2041	100%	91%	XP_005540745.1
CD24	<i>Homo sapiens</i>	150	150	100%	100%	NP_037362.1
	<i>Pan troglodytes</i>	147	147	100%	98%	XP_016783410.1
	<i>Macaca nemestrina</i>	61.6	61.6	100%	75%	XP_005552293.1
	<i>Mus musculus</i>	48.1	48.1	82%	61%	NP_033976.1
	<i>Rattus norvegicus</i>	48.9	48.9	82%	65%	NP_036884.1
CD27	<i>Homo sapiens</i>	536	536	100%	100%	NP_001233.1
	<i>Pan troglodytes</i>	456	456	86%	98%	XP_008971981.1
	<i>Macaca mulatta</i>	502	502	100%	94%	XP_001104337.1
CD38	<i>Homo sapiens</i>	625	625	100%	100%	NP_001766.2
	<i>Pan troglodytes</i>	620	620	100%	99%	XP_001160669.1
	<i>Macaca mulatta</i>	546	546	100%	91%	NP_001248702.1
	<i>Mus musculus</i>	356	356	98%	59%	NP_031672.2
	<i>Rattus norvegicus</i>	340	340	98%	59%	NP_037259.1

Pro další analýzu jsem zvolila molekulu CD38. Tu jsem vyhledala v databázi *HomoloGene*. Homology genů i proteinů byly nalezeny nejen mezi savčími druhy, ale i mezi ptáky, obojživelníky a rybami. U všech homologů molekuly CD38 byla nalezena velmi podobná rib-hydrolázová doména. Překvapivě byla nalezena i archebakteriální flagelinová doména u CD38 molekuly kura domácího (*Gallus gallus*) (viz Obr. 10). Pozoruhodné je, že tato doména u jiných druhů objevena nebyla a že se nachází přibližně v oblasti domény transmembránové (jak popisují dále). Další zajímavostí je, že transmembránová doména nebyla v *HomoloGene* nalezena, přestože je jinak v databázích (alespoň u člověka a myši) přesně definována.

Obr. 10 - Výsledek vyhledávání molekuly CD38 v programu HomoloGene. Růžově je zobrazena Rib-hydrolázová doména, zeleně archebakteriální flagelinová.

#### HomoloGene:1345. Gene conserved in Euteleostomi

##### Genes

Genes identified as putative homologs of one another during the construction of HomoloGene.

CD38, *H.sapiens*  
 CD38 molecule  
 CD38, *P.troglodytes*  
 CD38 molecule  
 CD38, *M.mulatta*  
 CD38 molecule  
 CD38, *C.lupus*  
 CD38 molecule  
 Cd38, *M.musculus*  
 CD38 antigen  
 Cd38, *R.norvegicus*  
 CD38 molecule  
 CD38, *G.gallus*  
 CD38 molecule  
 cd38, *X.tropicalis*  
 CD38 molecule  
 LOC101886891, *D.rerio*  
 ADP-ribosyl cyclase 1-like

##### Proteins

Proteins used in sequence comparisons and their conserved domain architectures.

NP\_001766.2 ————  
 300 aa  
 XP\_001160669.1 ————  
 300 aa  
 XP\_001099851.1 ————  
 301 aa  
 NP\_001003143.1 ————  
 308 aa  
 NP\_031672.2 ————  
 304 aa  
 NP\_037259.1 ————  
 303 aa  
 NP\_001188317.1 —■———  
 308 aa  
 NP\_001011230.1 ————  
 253 aa  
 XP\_005162637.1 ————  
 259 aa

Pokusila jsem se tedy vyhledat sekvenci této flagelinové domény v databázích. Tato doména nebyla popsána v *Nucleotide*, *GenPept* ani v žádné jiné databázi. Sekvenci jsem tedy musela vyhledat jiným způsobem. V *GenPept* byla popsána rib-hydrolázová doména, která podle této databáze zahrnuje rezidua 57-286 (kód proteinu v databázi ADQ89191.1). Z výsledků databáze *HomoloGene* bylo jasné, že flagelinová doména se nalézá v N-koncové oblasti před rib-hydrolázovou doménou, tedy před 57. aminokyselinou. Rezidua 1-56 jsem tedy vyhledala v *BLASTu* a skutečně byl nalezena flagelinová doména v reziduích 18-40 (viz Obr. 11).

Obr. 11 - Identifikace flagelinové domény programem BLAST



Poté jsem celou sekvenci aminokyselin této domény vyhledala v *BLASTu* zvlášť. Kromě homologií s ADP-ribosyl cyklázami ostatních ptačích druhů byla nalezena identita s proteiny bakterií, například ABC transportéry. Příklady těchto homologů jsou zobrazeny v tabulce Tab. 4.

Tab. 4 - Příklady molekul vykazujících identitu s flagelinovou doménou nalezených programem BLAST. Popis hodnot je vysvětlen v poznámkách pod čarou tabulky Tab. 2.

Název molekuly	Max score	Total score	Query cover	Identita	Kód proteinu
ADP-ribosyl cyclase/cyclic ADP-ribose hydrolase 1 [ <i>Gallus gallus</i> ]	68.5	68.5	100%	100%	NP_001188317.1
hypothetical protein [ <i>Gordonia polyisoprenivorans</i> ]	44.8	44.8	86%	76%	WP_006368243.1
ABC transporter [ <i>Microbacterium</i> sp. 70-38]	42.6	42.6	78%	83%	OJU70125.1
ABC transporter permease [ <i>Bifidobacterium</i> sp. 7101]	42.6	42.6	82%	79%	WP_081709055.1
ATP-binding cassette, subfamily C, CydC [ <i>Curtobacterium</i> sp. 9128]	41.8	41.8	82%	74%	SBN63118.1
DUF2953 domain-containing protein [ <i>Paenibacillus chitinolyticus</i> ]	37.5	37.5	86%	69%	WP_042228534.1
ABC transporter permease [ <i>Streptosporangium amethystogenes</i> ]	37.5	90.1	95%	70%	WP_030904236.1
ABC transporter permease [ <i>Albimonas donghaensis</i> ]	36.7	36.7	91%	64%	WP_092679183.1
amino acid permease [ <i>Aeromicrobium</i> sp. Root472D3]	36.7	36.7	82%	74%	WP_056608000.1
hypothetical protein PHLGIDRAFT_104115 [ <i>Phlebiopsis gigantea</i> 11061_1 CR5-6] <sup>18</sup>	36.7	36.7	78%	72%	KIP08617.1

Následně jsem hledání omezila pouze na druhy archebakterií. Nalezeno bylo alespoň 175 podobných proteinů. Přehled několika příkladů flagelinových proteinů s nalezenou identitou je shrnut v tabulce Tab. 5. Vybrala jsem flagelin druhu *Thermoplasmatales archaeon*, který dále porovnávám s flagelinovou doménou kura domácího (viz Obr. 19).

Tab. 5 - Příklady molekul vykazujících identitu s flagelinovou doménou nalezených programem BLAST s použitím filtru pro archebakterie. Popis hodnot je vysvětlen v poznámkách pod čarou tabulky Tab. 2.

Název molekuly	Max score	Total score	Query cover	Identita	Kód proteinu
archaeal flagellin [ <i>Thermoplasmatales archaeon</i> SCGC AB-540-F20]	35.0	35.0	86%	65%	EMR74789.1
flagellin [ <i>Thermococcus zilligii</i> ]	32.5	32.5	86%	65%	WP_010477643.1
flagellin-like protein [ <i>Cuniculiplasma divulgatum</i> ]	30.8	30.8	78%	62%	SIM68664.1

Dále jsem porovnála sekvence nukleotidů a aminokyselin N koncové oblasti před rib-hydrolázovou doménou mezi kurem domácím (*Gallus gallus*), člověkem a myší domácí (*Mus musculus*). Všechny tři homologické geny se skládají z osmi exonů. V této práci prezentuji porovnání sekvencí pouze exonů 1 (Obr. 13, Obr. 14, Obr. 15), neboť v exonech 2-8 se distribuce domén napříč druhy shodovala. V obrázcích jsou zvýrazněny rib-hydrolázové domény červeně a transmembránové a flagelinové domény modře. Využila jsem sekvence proteinů z databáze *NCBI-Protein* a sekvence DNA z databáze *Ensemble*.

<sup>18</sup> jedná se o kornatce obrovského (*Phlebiopsis gigantea*), dřevokaznou houbu, tedy o eukaryontní organismus

Obr. 12 - Chybné označení exonů genu *CD38* kura domácího jako UTR v databázi *Ensemble*

Exons/ Introns		Translated sequence	Flanking sequence	Intron sequence	UTR
Variants		Missense			
Markup		loaded			

No.	Exon / Intron	Start	End	Start Phase	End Phase	Length	Sequence
	5' upstream sequence						.....g c g g c t c g g c g c g g a g g c g c a g c g t g c g t g e t g e t g g c c g g c a t c g c c
1	<a href="#">ENSGALE00000433382</a>	77,193,125	77,192,950	-	-	176	ATCCTGCTGATCGCCCTCGTCCTGGCCGCGCTGCTGGCCTCCGTCTCACGGGGAGC AAA GAGGAGGCGAACCCGGAGCCGCTGAGGTGGCAGGGCAGGGGGACACCAGGAACCTGCGG GAGATCGTCCTGGGGAGATGCTACAGCTACCTCGCGAGGGGCACCGGAGCTGAG
	Intron 1-2	77,192,949	77,181,656			11,294	gtgagtattggcctcgtgtgtgtgcc.....taatgatgattcaatctgtctgcag
2	<a href="#">ENSGALE00000432551</a>	77,181,655	77,181,526	-	0	130	AGATAAGGATTGCCTTAAAATATGGGAATCGTTAAAAGCTGCATTTCGTTCAACAAGATCC CTGTAATGCTACAAACAGAAGATTATCGGCCTTAAATGGAGTTGACAAGTCATCCAGTACC CTGCAACAAG
	Intron 2-3	77,181,525	77,180,963			563	gtaacagcgggatgcacgggtggggc.....ttgcacattgtacccttatttcacag
3	<a href="#">ENSGALE00000153130</a>	77,180,962	77,180,827	0	1	136	TCACTGTTTTGGAGCAGGACGTATGACCTCGTTCATCTTTATTCAAATGCAATCATCAT TTCCTTACCTTGGAGGACAGTTCCTGGGTTATATGCTTGATGGGCTTTCATGGTGTGGA GACCCCTCAGTCCAG

Ke komplikacím došlo při vyhledávání exonů kuřecího genu *CD38* v databázi *Ensemble*. Jako 5'UTR totiž databáze označovala celý exon 1 a část exonu 2 (viz Obr. 12). Podle mých překladových kontrol v exonu 1 zjevně chyběla počáteční část sekvence a chyběl tak kód části flagelinové sekvence. Označení jako 5'UTR je v této databázi pravděpodobně automatické, když tedy nebyl nalezen první ATG kodón, byla takto označena celá sekvence až do ATG kodónu v exonu 2. Sekvenci exonu 1 jsem se pokusila doplnit z jiných databází. V databázi *Nucleotide* bylo možné nalézt pouze sekvenci mRNA genu *CD38*. Pomocí nástroje pro překlad sekvencí na portálu *SIB ExPASy* se mi podařilo nalézt nukleotidový kód prvního metioninu a následně celého exonu. Tento zrestaurovaný kód je zobrazen na Obr. 13.

Obr. 13 - Nukleotidová a aminokyselinová sekvence molekuly *CD38* u kura domácího (*Gallus gallus*). Jsou zobrazeny pouze sekvence prvního exonu. Flagelinová doména je podbarvena modře, rib-hydrolázová doména červeně.

1	60
ATGCCCTCGCAGCGCGGCTCGGCGCGGAGGCGGCAGCGCTGCGTGCTGCTGGCCGGC	ATC
-M--P--S--Q--R--G--S--A--R--R--R--Q--R--C--V--L--L--A--G--I--	
61	120
GCCATCCTGCTGATCGCCCTCGTCCTGGCCGCGCTGCTGGCCTCCGTCTCACGGGGAGC	
-A--I--L--L--I--A--L--V--L--A--A--V--L--A--S--V--L--T--G--S--	
121	180
AAAGAGGAGGCGAACCCGGAGCCGCTGAGGTGGCAGGGCAGGGGGACGACCAGGAACCTG	
-K--E--E--A--N--P--E--P--L--R--W--Q--G--R--G--T--T--R--N--L--	
181	239
CGGGAGATCGTCCTGGGGAGATGCTACAGCTACCTCGCCGAGGGGCACGCGGAGCTGAG	
-R--E--I--V--L--G--R--C--Y--S--Y--L--A--E--G--H--A--E--L--R--	

Obr. 14 - Nukleotidová a aminokyselinová sekvence molekuly CD38 u člověka (*Homo sapiens*). Jsou zobrazeny pouze sekvence prvního exonu. Transmembránová doména je podbarvena modře, rib-hydrolázová doména červeně.

1	60
ATGGCCA	ACTGCGAGTTCAGCCCGGTGTCCGGGGACAAACCCTGCTGCCGGCTCTCTAGG
-M--A--N--C--E--F--S--P--V--S--G--D--K--P--C--C--R--L--S--R-	
61	120
AGAGCCCA	ACTCTGTCTTGGCGTCAGTATCCTGGTCCTGATCCTCGTTCGTGGTCTCGCG
-R--A--Q--L--C--L--G--V--S--I--L--V--L--I--L--V--V--V--L--A-	
121	180
GTGGT	CGTCCCGAGGTGGCGCCAGCAGTGGAGCGGTCCGGGCACCACCAAGCGCTTTCCC
-V--V--V--P--R--W--R--Q--Q--W--S--G--P--G--T--T--K--R--F--P-	
181	233
GAGACCGT	CCTGGCGCGATGCGTCAAGTACACTGAAATTCATCCTGAGATGAG
-E--T--V--L--A--R--C--V--K--Y--T--E--I--H--P--E--M--R	

Obr. 15 - Nukleotidová a aminokyselinová sekvence molekuly CD38 u myši domácí (*Mus musculus*). Jsou zobrazeny pouze sekvence prvního exonu. Transmembránová doména je podbarvena modře, rib-hydrolázová doména červeně.

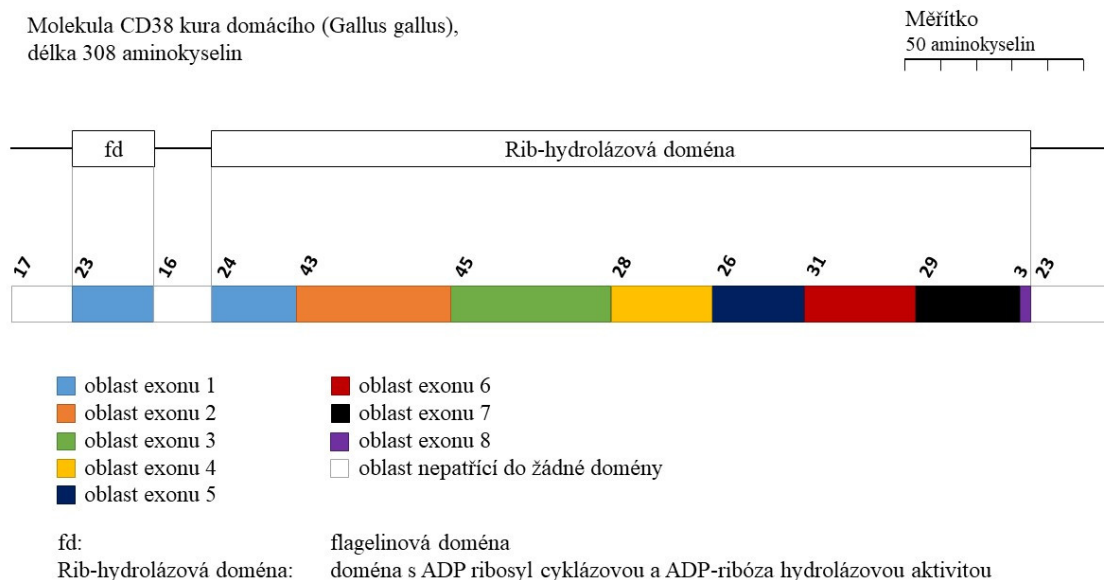
1	60
ATGGCTA	ACTATGAATTTAGCCAGGTGTCTGGGGACAGACCTGGCTGCCGCCTCTCTAGG
-M--A--N--Y--E--F--S--Q--V--S--G--D--R--P--G--C--R--L--S--R-	
61	120
AAAGCCC	CAGATCGGTCTCGGAGTGGGTCTCCTGGTCCTGATCGCCTTGGTAGTAGGGATC
-K--A--Q--I--G--L--G--V--G--L--L--V--L--I--A--L--V--V--G--I-	
121	180
GTGGT	CATACTTCTGAGGCCGCGCTCACTCCTGGTGTGGACTGGAGAGCCTACCACGAAG
-V--V--I--L--L--R--P--R--S--L--L--V--W--T--G--E--P--T--T--K-	
181	240
CACTTTT	CTGACATCTTCTGGGACGCTGCCTCATCTACACTCAGATCCTCCGGCCGGAG
-H--F--S--D--I--F--L--G--R--C--L--I--Y--T--Q--I--L--R--P--E-	
241	245
ATGAG	
-M--R	

Celkovou distribuci domén v rámci molekul CD38 člověka (*Homo sapiens*), dlouhou 300 aminokyselin, myši domácí (*Mus musculus*), dlouhou 304 aminokyselin, a kura domácího (*Gallus gallus*), dlouhou 308 aminokyselin, jsem znázornila ve schématech (Obr. 16, Obr. 17, Obr. 18). Všechna schémata jsou vykreslena ve stejném měřítku. V horní části každého nákresu je znázorněn poměr celkové délky molekuly k jednotlivým doménám – flagelinové (fd), transmembránové (td) a doméně s ADP ribosyl cyklázovou a ADP-riboza hydrolázovou aktivitou (rib-hydrolázové). Barevně jsou zachyceny segmenty domén kódované různými exony. Bíle je vyznačen úsek proteinu nepatřící k žádné doméně. Každý segment je dále označen číselným počtem aminokyselin, ze kterých se skládá. V případě, že je aminokyselina

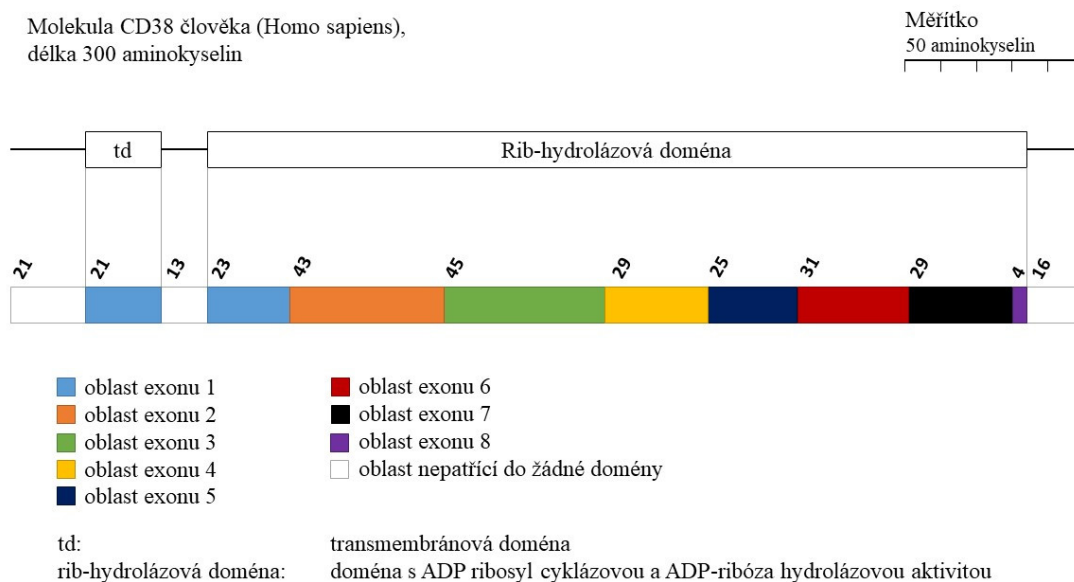


kódovaná kodónem nacházejícím se na rozhraní dvou exonů, je započítána do oblasti toho exonu, v kterém se nacházejí dva nukleotidy kódující tuto aminokyselinu.

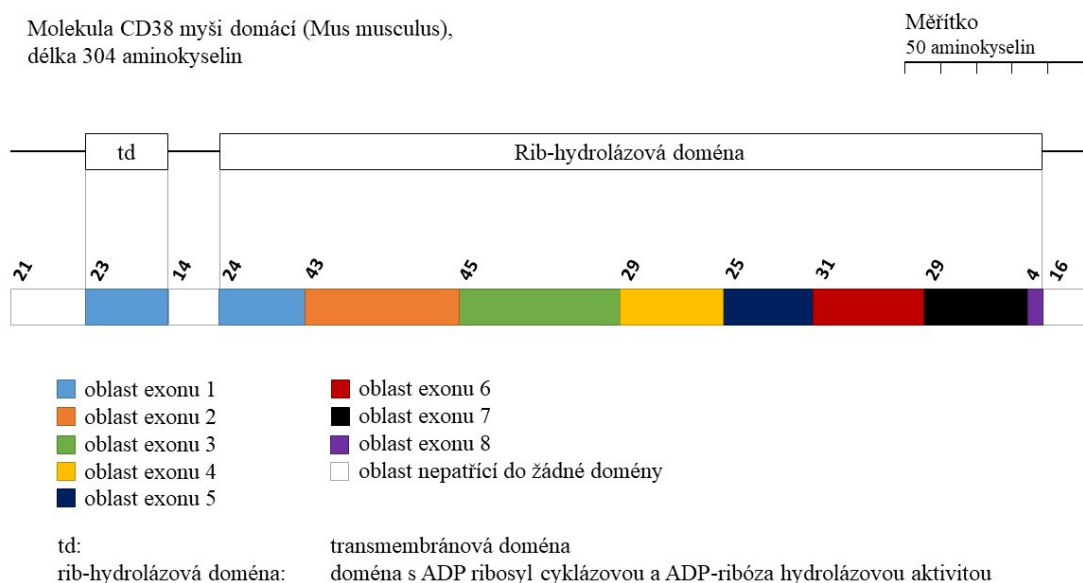
Obr. 16 - Distribuce domén v rámci molekuly CD38 kura domácího a jejich oblasti kódované exony



Obr. 17 - Distribuce domén v rámci molekuly CD38 člověka a jejich oblasti kódované exony



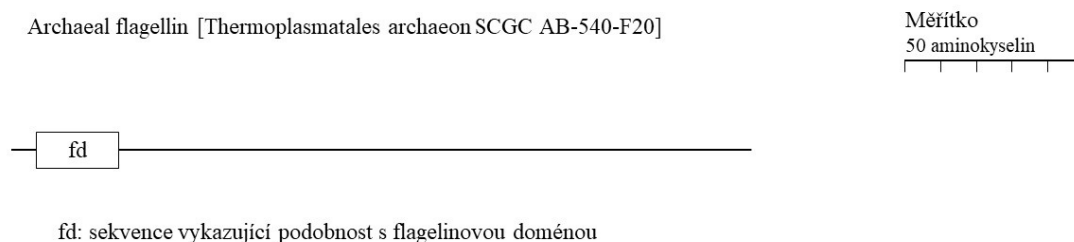
Obr. 18 - Distribuce domén v rámci molekuly CD38 myši domácí a jejich oblasti kódované exony



V databázích nebylo možné nalézt rezidua transmembránové domény molekuly CD38 u druhu *Gallus gallus*. Ze schémat je však patrné, že tato doména se u člověka (*Homo sapiens*) a myši (*Mus musculus*) nacházejí v přibližně stejné oblasti jako flagelinová doména kura (*Gallus gallus*). Je tedy velice pravděpodobné, že transmembránová doména kura domácího se nachází právě v oblasti původně archebakteriální flagelinové domény.

Je otázkou, proč se tato flagelinová sekvence nachází právě zde, a to navíc v oblasti překrývající se s transmembránovou doménou. A zda je zde evolučně využita již existující sekvence pro flagelin a z jakého důvodu. Z hlediska fylogeneze si lze představit situaci, kdy již existující strukturní a funkční vzor mohl být pomocí různých mutací, duplikací a inzercí pozměněn již na genové úrovni a dal by tak vzniknout funkčně nové části proteinu. K tomu by mohlo dojít v souvislosti se změnou prostředí, např. výstupem živočichů na souš, a tím s nutností se přizpůsobit novým selekčním tlakům. Také u ostatních molekul jako je CD19, CD20, CD21, CD24 a CD27 se lze domnívat, že pokud by byla k dispozici sekvenční data alespoň u konzervovaných oblastí, bylo by možné podobný trend nalézt také u jejich vývoje.

Pro porovnání jsem dále vypracovala schéma molekuly archeálního flagelinu druhu *Thermoplasmales archaeon* (Obr. 19). Mezi sekvencí právě tohoto proteinu a flagelinovou doménou CD38 kura byla nalezena identita programem BLAST (viz tabulka Tab. 5).

Obr. 19 - Schéma molekuly archeálního flagelinu druhu *thermoplasmatales archaeon*

Celý tento postup dokládáme zejména na molekule CD38, protože další vybrané molekuly nejsou zatím dostatečně popsány. Přesto výsledky této práce potvrzují, že zvolený postup je korektní.

Pro úplné dokreslení řešené problematiky uvádím na závěr kapitoly genové stromy molekul CD38 (Obr. 20) a CD24 (Obr. 21) vygenerované databází *PANTHER*. Z obou obrázků je patrné, že metoda *gene tree* je nejjednodušším postupem pro získání představy o fylogenezi molekul.

Obr. 20 - Genový strom pro molekulu CD38 vygenerovaný databází *PANTHER*

Tree	Gene Id	Gene Name	Organism	Definition	Subfamily Name
					ADP-RIBOSYL CYC...
	MGI:107474	Cd38	<i>Mus musculus</i>	ADP-ribosyl cyclase/...	ADP-RIBOSYL CYC...
	RGD:2303	Cd38	<i>Rattus norvegicus</i>	ADP-ribosyl cyclase/...	ADP-RIBOSYL CYC...
	HGNC:1667	CD38	<i>Homo sapiens</i>	ADP-ribosyl cyclase/...	ADP-RIBOSYL CYC...
	Ensembl:ENSGALG00000001...	CD38	<i>Gallus gallus</i>	Uncharacterized prot...	ADP-RIBOSYL CYC...
	Xenbase:XB-GENE-945949	cd38	<i>Xenopus tropicalis</i>	Uncharacterized prot...	ADP-RIBOSYL CYC...

Obr. 21 - Genový strom pro molekulu CD24 vygenerovaný databází *PANTHER*

Tree	Gene Id	Gene Name	Organism	Definition	Subfamily Name
					SIGNAL TRANSDUC...
	HGNC:1645	CD24	<i>Homo sapiens</i>	Signal transducer C...	SIGNAL TRANSDUC...
	Ensembl:ENSGGOG000000...		<i>Gorilla gorilla gorilla</i>	Uncharacterized prot...	SIGNAL TRANSDUC...
	Ensembl:ENSMMUG000000...	CD24	<i>Macaca mulatta</i>	Uncharacterized prot...	SIGNAL TRANSDUC...
	MGI:88323	Cd24	<i>Mus musculus</i>	Signal transducer C...	SIGNAL TRANSDUC...
	RGD:2298	Cd24	<i>Rattus norvegicus</i>	Signal transducer C...	SIGNAL TRANSDUC...
	Ensembl:ENSBTAG00000003...	MGC127538	<i>Bos taurus</i>	MGC127538 protein	SIGNAL TRANSDUC...
	Ensembl:ENSSSCG00000003...		<i>Sus scrofa</i>	Uncharacterized prot...	SIGNAL TRANSDUC...
	Ensembl:ENSECAG00000000...		<i>Equus caballus</i>	Uncharacterized prot...	SIGNAL TRANSDUC...
	Ensembl:ENSFAFG00000000...		<i>Canis lupus familiaris</i>	Uncharacterized prot...	SIGNAL TRANSDUC...
	Ensembl:ENSGALG00000003...	CD24	<i>Gallus gallus</i>	Uncharacterized prot...	SIGNAL TRANSDUC...



---

## 5 Závěr

V N-koncové doméně molekuly CD38 ptáků jsem pomocí nástrojů programu *BLAST* našla sekvence vykazující významnou podobnost s archebakteriální flagelinovou doménou. V žádné databázi nebylo možné nalézt, která rezidua tvoří transmembránovou doménu molekuly CD38 u *Gallus gallus*. Je nicméně velice pravděpodobné, že se nachází právě v oblasti flagelinové domény. Je otázkou, proč se tato flagelinová sekvence nachází právě zde, v oblasti překrývající se s transmembránovou doménou. Jedním z vysvětlení by mohlo být, že právě podobnost s flagelinem umožnila vznik transmembránové domény v molekule CD38 a její transformaci ze solubilní molekuly v membránový receptor.

Během analýzy pomocí *in silico* postupu jsem vyhledala v dostupných genových a proteinových databázích homology, paralogy a ortology některých povrchových CD znaků. Pro správnost postupu svědčí to, že naše výsledky korespondují se známými informacemi o molekule CD38. U dalších molekul jako je např. CD20 nebo CD24 bylo možné dohledat homologické molekuly až k bezobratlým, vložkocům nebo respektive k obojživelníkům. Jako nejefektivnější postup se ukázalo využívat především konzervované domény a úseky sledovaných molekul. Na základě toho by pak bylo možné vytvořit genový strom (*gene tree*), jehož jednotlivé větvení bude přesně sledovat fylogenezi druhů. Tento postup by mohl být využitelný v přípravné fázi komparativních hybridizačních studií k usnadnění laboratorní práce.

## 6 Použitá literatura

- Aarhus R, Graeff RM, Dickey DM, Walseth TF, Lee HC. 1995. ADP-ribose cyclase and CD38 catalyze the synthesis of a calcium-mobilizing metabolite from NADP. *J Biol Chem*; 270: 30327–30333.
- Agematsu K, Hokibara S, Nagumo H, Komiyama A. CD27: a memory B-cell marker. *Immunol Today*; 21(5):204-6. 2000.
- Aigner S, Ruppert M, Hubbe M, Sammar M, Stoeber Z, Butcher EC, Vestweber D, Altevogt P. 1995. Heat stable antigen (mouse CD24) supports myeloid cell binding to endothelial and platelet P-selectin. *Int. Immunol*; 7(10):1557-65.
- Anderson SM1, Tomayko MM, Ahuja A, Haberman AM, Shlomchik MJ. 2007. New markers for murine memory B cells that define mutated and unmutated subsets. *J Exp Med*; 204(9):2103-14.
- Asokan R, Hua J, Young KA, Gould HJ, Hannan JP, Kraus DM, Szakonyi G, Grundy GJ, Chen XS, Crow MK, Holers VM. 2006. Characterization of human complement receptor type 2 (CR2/CD21) as a receptor for IFN- $\alpha$ : a potential role in systemic lupus erythematosus. *J Immunol*; 177(1):383-94.
- Aubry JP, Pochon S, Graber P, Jansen KU, Bonnefoy JY. 1992. CD21 is a ligand for CD23 and regulates IgE production. *Nature*; 358(6386):505-7.
- Ayre DC, Christian SL. CD24: A Rheostat That Modulates Cell Surface Receptor Signaling of Diverse Receptors. 2016a. *Front. Cell Dev. Biol*; 4:146.
- Ayre DC, Pallegar NK, Fairbridge NA, Canuti M, Lang AS, Christian SL. 2016b. Analysis of the structure, evolution, and expression of CD24, an important regulator of cell fate. *Gene*; 590(2):324-37.
- Baens M, Aerssens J, van Zand K, Van den Berghe H, Marynen P. 1995. Isolation and regional assignment of human chromosome 12p cDNAs. *Genomics*; 29(1):44-52.
- Bezin S, Charpentier G, Lee HC, Baux G, Fossier P, Cancela JM. 2008. Regulation of nuclear Ca<sup>2+</sup> signaling by translocation of the Ca<sup>2+</sup> messenger synthesizing enzyme ADP-ribose cyclase during neuronal depolarization. *J Biol Chem*; 283(41):27859-70.
- Borst J, Hendriks J, Xiao Y. 2005. CD27 and CD70 in T cell and B cell activation. *Curr Opin Immunol*; 17(3):275-81.
- Camerini D, Walz G, Loenen WA, Borst J, Seed B. 1991. The T cell activation antigen CD27 is a member of the nerve growth factor/tumor necrosis factor receptor gene family. *J Immunol*; 147(9):3165-9.
- Cang S, Mukhi N, Wang K, Liu D. 2012. Novel CD20 monoclonal antibodies for lymphoma therapy. *J Hematol Oncol*; 5:64.
- Carel JC, Myones BL, Frazier B, Holers VM. 1990. Structural requirements for C3d,g/Epstein-Barr virus receptor (CR2/CD21) ligand binding, internalization, and viral infection. *J Biol Chem*; 265(21):12293-9.
- Carter RH, Fearon DT. 1992. CD19: lowering the threshold for antigen receptor stimulation of B lymphocytes. *Science*; 256(5053):105-7.
- Carter RH, Barrington RA. 2004. Signaling by the CD19/CD21 complex on B cells. *Curr Dir Autoimmun*; 7:4–32.
- Castro-Borges W, Dowle A, Curwen RS, Thomas-Oates J, Wilson RA. 2011. Enzymatic shaving of the tegument surface of live schistosomes for proteomic analysis: a rational approach to select vaccine candidates. *PLoS Negl Trop Dis*; 5(3):e993.
- Chen GY, Tang J, Zheng P, Liu Y. 2009. CD24 and Siglec-10 selectively repress tissue damage-induced immune responses. *Science*; 323(5922):1722-5.
- Chothia C, Gough J, Vogel C, Teichmann SA. 2003. Evolution of the protein repertoire. *Science*; 300(5626):1701-3.
- Chung EY, Psathas JN, Yu D, Li Y, Weiss MJ, Thomas-Tikhonenko A. 2012. CD19 is a major B cell receptor-independent activator of MYC-driven B-lymphomagenesis. *J Clin Invest*; 122(6):2257–2266.
- Churamani D, Boulware MJ, Ramakrishnan L, Geach TJ, Martin AC, Vacquier VD, Marchant JS, Dale L, Patel S. 2008. Molecular characterization of a novel cell surface ADP-ribose cyclase from the sea urchin. *Cell Signal*; 20(12):2347-55.
- Churamani D, Geach TJ, Ramakrishnan L, Prideaux N, Patel S, Dale L. 2012. The signaling protein CD38 is essential for early embryonic development. *J Biol Chem*; 287(10):6974-8.
- Cooper MD, Alder MN. 2006. The evolution of adaptive immune systems. *Cell*; 124:815–822.
- Cragg MS, Walshe CA, Ivanov AO, Glennie MJ. 2005. The Biology of CD20 and Its Potential as a Target for mAb Therapy. *Curr Dir Autoimmun*; 8:140-74.
- Davis LC, Morgan AJ, Ruas M, Wong JL, Graeff RM, Poustka AJ, Lee HC, Wessel GM, Parrington J, Galione A. 2008. Ca<sup>2+</sup> signaling occurs via second messenger release from intraorganelle synthesis sites. *Curr Biol*; 18(20):1612-8.
- Deaglio S, Morra M, Mallone R, Ausiello CM, Prager E, Garbarino G, Dianzani U, Stockinger H, Malavasi F. 1998. Human CD38 (ADP-ribose cyclase) is a counter-receptor of CD31, an Ig superfamily member. *J Immunol*; 160:395–402.
- Deaglio S, Mallone R, Baj G, Donati D, Giraudo G, Corno F, Bruzzone S, Geuna M, Ausiello C, Malavasi F. 2001. Human CD38 and its ligand CD31 define a unique lamina propria T lymphocyte signaling pathway. *FASEB J*; 15(3):580-2.

- Deaglio S, Vaisitti T, Billington R, Bergui L, Omede P, Genazzani AA, Malavasi F. 2007. CD38/CD19: A lipid raft-dependent signaling complex in human B cells. *Blood*; 109:5390–5398.
- Del Nagro CJ, Otero DC, Anzelon AN, Omori SA, Kolla RV, Rickert RC. 2005. CD19 function in central and peripheral B-cell development. *Immunol Res*; 31(2):119–131.
- Denoeud J, Moser M. 2011. Role of CD27/CD70 pathway of activation in immunity and tolerance. *J Leukoc Biol*; 89(2):195–203.
- De Robertis EM. 2008. Evo-devo: variations on ancestral themes. *Cell*; 132(2):185–95.
- Dianzani U, Funaro A, DiFranco D, Garbarino G, Bragardo M, Redoglia V, Buonfiglio D, De Monte LB, Pileri A, Malavasi F. 1994. Interaction between endothelium and CD4+CD45RA+ lymphocytes. Role of the human CD38 molecule. *J Immunol*; 153:952–959.
- Erwin DH, Laflamme M, Tweedt SM, Sperling EA, Pisani D, Peterson KJ. 2011. The Cambrian conundrum: early divergence and later ecological success in the early history of animals. *Science*; 334(6059):1091–7.
- Fang X, Zheng P, Tang J, Liu Y. 2010. CD24: from a to Z. *Cell. Mol. Immunol*; 7(2):100–3.
- Fedele G, Frasca L, Palazzo R, Ferrero E, Malavasi F, Ausiello CM. 2004. CD38 is expressed on human mature monocyte-derived dendritic cells and is functionally involved in CD83 expression and IL-12 induction. *Eur J Immunol*; 34:1342–1350.
- Fernandez JE, Deaglio S, Donati D, Beusan IS, Corno F, Aranega A, Forni M, Falini B, Malavasi F. 1998. Analysis of the distribution of human CD38 and of its ligand CD31 in normal tissues. *J Biol Regul Homeost Agents*; 12:81–91.
- Ferrero E, Malavasi F. 1997. Human CD38, a leukocyte receptor and ectoenzyme, is a member of a novel eukaryotic gene family of nicotinamide adenine dinucleotide<sup>+</sup>-converting enzymes: extensive structural homology with the genes for murine bone marrow stromal cell antigen 1 and aplysian ADP-ribosyl cyclase. *J Immunol*; 159:3858–3865.
- Ferrero E, Saccucci F, Malavasi F. 1999. The human CD38 gene: polymorphism, CpG island, and linkage to the CD157 (BST-1) gene. *Immunogenetics*; 49(7–8):597–604.
- Ferrero E, Lo Buono N, Horenstein AL, Funaro A, Malavasi F. 2014. The ADP-ribosyl cyclases - the current evolutionary state of the ARCs. *Front Biosci (Landmark Ed)*; 19:986–1002.
- Frasca L, Fedele G, Deaglio S, Capuano C, Palazzo R, Vaisitti T, Malavasi F, Ausiello CM. 2006. CD38 orchestrates migration, survival, and Th1 immune response of human mature dendritic cells. *Blood*; 107:2392–2399.
- Fujimoto M, Poe JC, Inaoki M, Tedder TF. 1998. CD19 regulates B lymphocyte responses to transmembrane signals. *Semin Immunol*; 10(4):267–277.
- Fujimoto M, Fujimoto Y, Poe JC, Jansen PJ, Lowell CA, DeFranco AL, Tedder TF. 2000. CD19 regulates Src family protein tyrosine kinase activation in B lymphocytes through processive amplification. *Immunity*; 13(1):47–57.
- Fujita T, Kantarci A, Warbington ML, Zawawi KH, Hasturk H, Kurihara H, Van Dyke TE. 2005. CD38 expression in neutrophils from patients with localized aggressive periodontitis. *J Periodontol*; 76:1960–1965.
- Funaro A, Malavasi F. 1999. Human CD38, a surface receptor, an enzyme, an adhesion molecule and not a simple marker. *J Biol Regul Homeost Agents*; 13(1):54–61.
- Glick DL, Hellmich MR, Beushausen S, Tempst P, Bayley H, Strumwasser F. 1991. Primary structure of a molluscan egg-specific NADase, a second-messenger enzyme. *Cell Regul*; 2(3):211–8.
- Goodrich SP, Muller-Steffner H, Osman A, Moutin MJ, Kusser K, Roberts A, Woodland DL, Randall TD, Kellenberger E, LoVerde PT, Schuber F, Lund FE. 2005. Production of calcium-mobilizing metabolites by a novel member of the ADP-ribosyl cyclase family expressed in *Schistosoma mansoni*. *Biochemistry*; 44(33):11082–97.
- Grigelová, Andrea. 2017. Rarítní populace B lymfocytů na pozadí periferní B lymfopoézy u lidí. Diplomová práce. Univerzita Karlova. Přírodovědecká fakulta.
- Grimaldi JC, Balasubramanian S, Kabra NH, Shanafelt A, Bazan JF, Zurawski G, Howard MC. 1995. CD38-mediated ribosylation of proteins. *J Immunol*; 155:811–817.
- Hannan JP. 2016. The Structure-Function Relationships of Complement Receptor Type 2 (CR2; CD21). *Curr Protein Pept Sci*; 17(5):463–87.
- Hardy RR, Carmack CE, Shinton SA, Kemp JD, Hayakawa K. 1991. Resolution and characterization of pro-B and pre-pro-B cell stages in normal mouse bone marrow. *J. Exp. Med*; 173(5):1213–25.
- Hellmich MR, Strumwasser F. 1991. Purification and characterization of a molluscan egg-specific NADase, a second-messenger enzyme. *Cell Regul*; 2(3):193–202.
- Hoshino S, Kukimoto I, Kontani K, Inoue S, Kanda Y, Malavasi F, Katada T. 1997. Mapping of the catalytic and epitopic sites of human CD38/NAD<sup>+</sup> glycohydrolase to a functional domain in the carboxyl terminus. *J Immunol*; 58(2):741–7.
- Hough MR, Rosten PM, Sexton TL, Kay R, Humphries RK. 1994. Mapping of CD24 and homologous sequences to multiple chromosomal loci. *Genomics*; 22:154–161.
- Howard M, Grimaldi JC, Bazan JF, Lund FE, Santos-Argumedo L, Parkhouse RM, Walseth TF, Lee HC. 1993. Formation and hydrolysis of cyclic ADP-ribose catalyzed by lymphocyte antigen CD38. *Science*; 262(5136):1056–9.

- Ishikawa H, Tsuyama N, Mahmoud MS, Fujii R, Abroun S, Liu S, Li FJ, Kawano MM. 2002. CD19 expression and growth inhibition of tumours in human multiple myeloma. *Leuk Lymphoma*; 43(3):613-6.
- Jacob J, Bellach J, Grützmann R, Alldinger I, Pilarsky C, Dietel M, Kristiansen G. 2004. Expression of CD24 in adenocarcinomas of the pancreas correlates with higher tumor grades. *Pancreatology*; 4(5):454-60.
- Jacobs J, Deschoolmeester V, Zwaenepoel K, Rolfo C, Silence K, Rottey S, Lardon F, Smits E, Pauwels P. 2015. CD70: An emerging target in cancer immunotherapy. *Pharmacol Ther*; 155:1-10.
- Jacobson AC, Weis JH. 2008. Comparative functional evolution of human and mouse CR1 and CR2. *J Immunol*; 181(5):2953-9.
- Jensen RA. 2001. Orthologs and paralogs - we need to get it right. *Genome Biology*; 2(8):INTERACTIONS1002.
- Jin D, Liu HX, Hirai H, Torashima T, Nagai T, Lopatina O, Shnayder NA, Yamada K, Noda M, Seike T, Fujita K, Takasawa S, Yokoyama S, Koizumi K, Shiraishi Y, Tanaka S, Hashii M, Yoshihara T, Higashida K, Islam MS, Yamada N, Hayashi K, Noguchi N, Kato I, Okamoto H, Matsushima A, Salmina A, Munesue T, Shimizu N, Mochida S, Asano M, Higashida H. 2007. CD38 is critical for social behaviour by regulating oxytocin secretion. *Nature*; 446(7131):41-5.
- Kadmon G, von Bohlen und Halbach F, Horstkorte R, Eckert M, Altevogt P, Schachner M. 1995. Evidence for cis interaction and cooperative signalling by the heat-stable antigen nectadrin (murine CD24) and the cell adhesion molecule L1 in neurons. *Eur. J. Neurosci*; 7(5):993-1004.
- Kaisho T, Ishikawa J, Oritani K, Inazawa J, Tomizawa H, Muraoka O, Ochi T, Hirano T. 1994. BST-1, a surface molecule of bone marrow stromal cell lines that facilitates pre-B-cell growth. *Proc Natl Acad Sci U S A*; 91(12):5325-9.
- Kay R, Rosten PM, Humphries RK. 1991. CD24, a signal transducer modulating B cell activation responses, is a very short peptide with a glycosyl phosphatidylinositol membrane anchor. *J Immunol*; 147:1412-1416.
- Klein U, Rajewsky K, Küppers R. 1998. Human immunoglobulin (Ig)M+IgD+ peripheral blood B cells expressing the CD27 cell surface antigen carry somatically mutated variable region genes: CD27 as a general marker for somatically mutated (memory) B cells. *J Exp Med*; 188(9):1679-89.
- Knoll AH, Carroll SB. 1999. Early animal evolution: emerging views from comparative biology and geology. *Science*; 284:2129-2137.
- Kobata T, Agematsu K, Kameoka J, Schlossman SF, Morimoto C. 1994. CD27 is a signal-transducing molecule involved in CD45RA+ naive T cell costimulation. *J Immunol*; 153(12):5422-32.
- Koguma T, Takasawa S, Tohgo A, Karasawa T, Furuya Y, Yonekura H, Okamoto H. 1994. Cloning and characterization of cDNA encoding rat ADP-ribosyl cyclase/cyclic ADP-ribose hydrolase (homologue to human CD38) from islets of Langerhans. *Biochim Biophys Acta*; 1223:160-162.
- Kristiansen G, Denkert C, Schlüns K, Dahl E, Pilarsky C, Hauptmann S. 2002. CD24 is expressed in ovarian cancer and is a new independent prognostic marker of patient survival. *Am J Pathol*; 161(4):1215-21.
- Kristiansen G, Schlüns K, Yongwei Y, Denkert C, Dietel M, Petersen I. 2003a. CD24 is an independent prognostic marker of survival in nonsmall cell lung cancer patients. *Br J Cancer*; 88(2):231-6.
- Kristiansen G, Winzer KJ, Mayordomo E, Bellach J, Schlüns K, Denkert C, Dahl E, Pilarsky C, Altevogt P, Guski H, Dietel M. 2003b. CD24 expression is a new prognostic marker in breast cancer. *Clin Cancer Res*; 9(13):4906-13.
- Kristiansen G, Pilarsky C, Pervan J, Stürzebecher B, Stephan C, Jung K, Loening S, Rosenthal A, Dietel M. 2004. CD24 expression is a significant predictor of PSA relapse and poor prognosis in low grade or organ confined prostate cancer. *Prostate*; 58(2):183-92.
- Kuhn I, Kellenberger E, Rognan D, Lund FE, Muller-Steffner H, Schuber F. 2006. Redesign of Schistosoma mansoni NAD+ catabolizing enzyme: active site H103W mutation restores ADP-ribosyl cyclase activity. *Biochemistry*; 45(39):11867-78.
- Lee, HC. 2001. Physiological functions of cyclic ADP-ribose and NAADP as calcium messengers. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol*; 41:317-45.
- Liu Q, Kriksunov IA, Graeff R, Munshi C, Lee HC, Hao Q. 2005. Crystal structure of human CD38 extracellular domain. *Structure*; 13(9):1331-9.
- Malavasi F, Deaglio S, Funaro A, Ferrero E, Horenstein AL, Ortolan E, Vaisitti T, Aydin S. 2008. Evolution and function of the ADP ribosyl cyclase/CD38 gene family in physiology and pathology. *Physiol Rev*; 88(3):841-86.
- Mallone R, Funaro A, Zubiatur M, Baj G, Ausiello CM, Tacchetti C, Sancho J, Grossi C, Malavasi F. 2001. Signaling through CD38 induces NK cell activation. *Int Immunol*; 13:397-409.
- Mallone R, Ortolan E, Pinach S, Volante M, Zanone MM, Bruno G, Baj G, Lohmann T, Cavallo-Perin P, Malavasi F. 2002. Anti-CD38 autoantibodies: characterisation in new-onset type I diabetes and latent autoimmune diabetes of the adult (LADA) and comparison with other islet autoantibodies. *Diabetologia*; 45:1667-1677.
- Muraoka O, Tanaka H, Itoh M, Ishihara K, Hirano T. 1996. Genomic structure of human BST-1. *Immunol Lett*; 54(1):1-4.
- Masuda W, Jimi E. 2011. CD38/ADP-ribosyl cyclase in the rat sublingual gland: subcellular localization under resting and saliva-secreting conditions. *Arch Biochem Biophys*; 513(2):131-9.

- Mizuguchi M, Otsuka N, Sato M, Ishii Y, Kon S, Yamada M, Nishina H, Katada T, Ikeda K. 1995. Neuronal localization of CD38 antigen in the human brain. *Brain Res*; 697:235–240.
- Nakagawara K, Mori M, Takasawa S, Nata K, Takamura T, Berlova A, Tohgo A, Karasawa T, Yonekura H, Takeuchi T. 1995. Assignment of CD38, the gene encoding human leukocyte antigen CD38 (ADP-ribosyl cyclase/cyclic ADP-ribose hydrolase), to chromosome 4p15. *Cytogenet Cell Genet*; 69(1-2):38-9.
- Orciani M1, Trubiani O, Guarnieri S, Ferrero E, Di Primio R. 2008. CD38 is constitutively expressed in the nucleus of human hematopoietic cells. *J Cell Biochem*; 105(3):905-12.
- Pekala PH, Anderson BM. 1978. Studies of bovine erythrocyte NAD glycohydrolase. *J Biol Chem*; 253(20):7453-9.
- Polyak MJ, Li H, Shariat N, Deans JP. 2008. CD20 homo-oligomers physically associate with the B cell antigen receptor. Dissociation upon receptor engagement and recruitment of phosphoproteins and calmodulin-binding proteins. *J Biol Chem*; 283(27):18545-52.
- Prodeus AP, Goerg S, Shen LM, Pozdnyakova OO, Chu L, Alicot EM, Goodnow CC, Carroll MC. 1998. A critical role for complement in maintenance of self-tolerance. *Immunity*; 9(5):721-31.
- Quarona V, Zaccarello G, Chillemi A, Brunetti E, Singh VK, Ferrero E, Funaro A, Horenstein AL, Malavasi F. 2013. CD38 and CD157: a long journey from activation markers to multifunctional molecules. *Cytometry B Clin Cytom*; 84(4):207-17.
- Ramakrishnan L, Muller-Steffner H, Bosc C, Vacquier VD, Schubert F, Moutin MJ, Dale L, Patel S. 2010. A single residue in a novel ADP-ribosyl cyclase controls production of the calcium-mobilizing messengers cyclic ADP-ribose and nicotinic acid adenine dinucleotide phosphate. *J Biol Chem*; 285(26):19900-9.
- Ramaschi G, Torti M, Festetics ET, Sinigaglia F, Malavasi F, Balduini C. 1996. Expression of cyclic ADP-ribose-synthetizing CD38 molecule on human platelet membrane. *Blood*; 87:2308–2313.
- Sato S. 1999. CD19 is a central response regulator of B lymphocyte signaling thresholds governing autoimmunity. *J Dermatol Sci*; 22(1):1–10.
- Shalhoub V, Elliott G, Chiu L, Manoukian R, Kelley M, Hawkins N, Davy E, Shimamoto G, Beck J, Kaufman SA, Van G, Scully S, Qi M, Grisanti M, Dunstan C, Boyle WJ, Lacey DL. 2000. Characterization of osteoclast precursors in human blood. *Br J Haematol*; 111:501–512.
- Springer T, Galfre G, Secher DS, Milstein C. 1978. Monoclonal xenogeneic antibodies to murine cell surface antigens: identification of novel leukocyte differentiation antigens. *Eur J Immunol*; 8:539–551.
- Szakonyi G, Guthridge JM, Li D, Young K, Holers VM, Chen XS. 2001. Structure of Complement Receptor 2 in Complex with Its C3d Ligand. *Science*; 292(5522):1725-8.
- Tan Y, Zhao M, Xiang B, Chang C, Lu Q. 2016. CD24: from a hematopoietic differentiation antigen to a genetic risk factor for multiple autoimmune diseases. *Clin. Rev. Allergy Immunol*; 50(1):70-83.
- Tedder TF, Streuli M, Schlossman SF, Saito H. 1988. Isolation and structure of a cDNA encoding the B1 (CD20) cell-surface antigen of human B lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A*; 85(1):208-12.
- Tedder TF, Isaacs CM. 1989. Isolation of cDNAs encoding the CD19 antigen of human and mouse B lymphocytes, A new member of the immunoglobulin superfamily. *J Immunol*; 143(2):712–717.
- Tedder TF. 2009. CD19: a promising B cell target for rheumatoid arthritis. *Nat Rev Rheumatol*; 5(10):572–577.
- Tenca C, Merlo A, Zarcone D, Saverino D, Bruno S, De Santanna A, Ramarli D, Fabbri M, Pesce C, Deaglio S, Ciccone E, Malavasi F, Grossi CE. 2003. Death of T cell precursors in the human thymus: a role for CD38. *Int Immunol*; 15(9):1105-16.
- Teplyakov A, Obmolova G, Malia TJ, Gilliland GL. 2017. Crystal structure of CD27 in complex with a neutralizing noncompeting antibody. *Acta Crystallogr F Struct Biol Commun*; 73(Pt 5):294-299.
- Thierry-Mieg D, Thierry-Mieg J. 2006. AceView: a comprehensive cDNA-supported gene and transcripts annotation. *Genome Biol*; 7 Suppl 1:S12.1-14.
- Wang K, Wei G, Liu D. 2012. CD19: a biomarker for B cell development, lymphoma diagnosis and therapy. *Exp Hematol Oncol*; 1:36.
- Wang L, Lin S, Rammohan KW, Liu Z, Liu JQ, Liu RH, Guinther N, Lima J, Zhou Q, Wang T, Zheng X, Birmingham DJ, Rovin BH, Hebert LA, Wu Y, Lynn DJ, Cooke G, Yu CY, Zheng P, Liu Y. 2007. A dinucleotide deletion in CD24 confers protection against autoimmune diseases. *PLoS Genet*; 3(4):e49.
- Weis JH, Morton CC, Bruns GA, Weis JJ, Klickstein LB, Wong WW, Fearon DT. 1987. A complement receptor locus: genes encoding C3b/C4b receptor and C3d/Epstein-Barr virus receptor map to 1q32. *J Immunol*; 138(1):312-5.
- Widney D, Gundapp G, Said JW, van der Meijden M, Bonavida B, Demidem A, Trevisan C, Taylor J, Detels R, Martínez-Maza O. 1999. Aberrant expression of CD27 and soluble CD27 (sCD27) in HIV infection and in AIDS-associated lymphoma. *Clin Immunol*; 93(2):114-23.
- Yamamoto H, Kishimoto T, Minamoto S. 1998. NF-kappaB activation in CD27 signaling: involvement of TNF receptor-associated factors in its signaling and identification of functional region of CD27. *J Immunol*; 161(9):4753-9.
- Yang W, Agrawal N, Patel J, Edinger A, Osei E, Thut D, Powers J, Meyerson H. 2005. Diminished expression of CD19 in B-cell lymphomas. *Cytometry B Clin Cytom*; 63(1):28-35.

- 
- Yefenof E, Klein G, Jondal M, Oldstone MB. 1976. Surface markers on human B and T-lymphocytes. IX. Two-color immunofluorescence studies on the association between ebv receptors and complement receptors on the surface of lymphoid cell lines. *Int J Cancer*; 17(6):693-700.
- Zhao YJ, Lam CM, Lee HC. 2012. The membrane-bound enzyme CD38 exists in two opposing orientations. *Sci Signal*; 5(241):ra67.
- Zhou LJ, Ord DC, Omori SA, Tedder TF. 1992. Structure of the genes encoding the CD19 antigen of human and mouse B lymphocytes. *Immunogenetics*; 35(2):102–111.
- Ziegler M, Jorcke D, Schweiger M. 1997. Identification of bovine liver mitochondrial NAD<sup>+</sup> glycohydrolase as ADPribosyl cyclase. *Biochem J*; 326(Pt 2):401-5.
- Zilber MT, Gregory S, Mallone R, Deaglio S, Malavasi F, Charron D, Gelin C. 2000. CD38 expressed on human monocytes: a coaccessory molecule in the superantigen-induced proliferation. *Proc Natl Acad Sci USA*; 97:2840–2845.
- Zocchi E, Franco L, Guida L, Benatti U, Bargellesi A, Malavasi F, Lee HC, De Flora A. 1993. A single protein immunologically identified as CD38 displays NAD<sup>+</sup> glycohydrolase, ADP-ribosyl cyclase and cyclic ADP-ribose hydrolase activities at the outer surface of human erythrocytes. *Biochem Biophys Res Commun*; 196:1459– 1465.
- Zubiaur M, Guirado M, Terhorst C, Malavasi F, Sancho J. 1999. The CD3-gamma delta epsilon transducing module mediates CD38-induced protein-tyrosine kinase and mitogen-activated protein kinase activation in Jurkat T cells. *J Biol Chem*; 274:20633–20642.
- Zuccolo J, Bau J, Childs SJ, Goss GG, Sensen CW, Deans JP. 2010. Phylogenetic analysis of the MS4A and TMEM176 gene families. *PLoS One*; 5(2):e9369.