

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

Katedra zoologie



**Sylvie Dluhošová**

Evoluční dynamika molekuly CD45  
Evolutionary dynamics of the CD45 molecule

Bakalářská práce

Vedoucí práce: RNDr. Michal Vinkler, Ph.D.

Praha, 2017

**Prohlášení:**

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně 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, 10. srpna 2017

Podpis:

### **Poděkování:**

Touto cestou bych ráda poděkovala především RNDr. Michalu Vinklerovi, Ph.D. za vedení bakalářské práce, poskytnutí cenných odborných rad, ale také za korekturu, ochotu a trpělivost. Mé poděkování též patří Mgr. Zuzaně Bainové za ochotu a pomoc při zpracování dat. V neposlední řadě bych chtěla poděkovat své rodině, jež mi studium na vysoké škole umožnila.

## Abstrakt

U mnoha skupin obratlovců je v současnosti stanovení zdravotního stavu a kondice na základě hematologických znaků odkázáno na technicky nedokonalou a poměrně nepřesnou mikroskopickou kvantifikaci krevních buněk. Řešením by mohlo být využití metod průtokové cytometrie, které je ale u všech skupin obratlovců mimo savce komplikováno přítomností jaderných erytrocytů. Aby bylo možné cytometricky odlišit erytrocyty od leukocytů, je potřeba využít specifického značení buněčného markeru leukocytů, kterým je povrchová molekula CD45 kódovaná genem *PTPRC*. Současná odborná literatura poukazuje na vysokou mezidruhovou expresní a strukturní variabilitu této molekuly, která značně komplikuje možné využití tohoto markeru v zoologickém výzkumu. Mnou provedené porovnání struktur CD45 u různých zástupců obratlovců na základě predikce domén ze sekvenčních genomových dat ukázalo vysokou variabilitu extracelulární části, a to i mezi fibronektinovými doménami, které starší autoři popsali jako konzervované. Ačkoliv doposud nebyla receptorová funkce CD45 dostatečně prozkoumána, existující práce se shodují na působení silné pozitivní selekce na tuto molekulu. Na závěr shrnuji, že přestože se jedná o užitečný molekulární nástroj, není pravděpodobné, že by bylo možné vytvořit univerzální protilátku, která by umožnila testování fylogeneticky široké škály živočichů.

Klíčová slova: CD45, srovnávací imunologie, evoluce, selekce, markery leukocytů, povrchové molekuly, proteinová fosfatáza, kondice, zdravotní stav.

## **Abstract**

Determining the health state and condition of vertebrates based on hematological traits is currently dependent on technically imperfect and erroneous quantification of blood cells. Solution of this problem can be found in the use of flow cytometry. This is, however, complicated by the presence of nuclear erythrocytes in all vertebrate groups outside the mammals. To distinguish erythrocytes from leukocytes, it is necessary to use specific labeling with a leukocyte marker, which is the CD45 surface molecule encoded by the *PTPRC* gene. Current literature suggests high expression and structural interspecific variability of this molecule, which highly complicates the possible use of this marker in zoological research. Based on the prediction of domains from genomic sequence data, my analysis comparing the structure of the CD45 in various vertebrate representatives showed a high variability of the extracellular part, even in fibronectin domains, which have been earlier described as conservative. Although the CD45 receptor function has not been sufficiently resolved yet, the existing research results indicate strong positive selection aimed to this molecule. Taken together, although the CD45 is a useful molecular marker, the possibility of designing a universal antibody allowing testing of a wide range of phylogenetically unrelated animals remains unlikely.

Keywords: CD45, comparative immunology, evolution, selection, leukocyte markers, cell surface molecules, protein phosphatases, condition, health state.

## Obsah

1	Úvod.....	1
2	CD molekuly jako nástroj k determinaci buněk.....	3
3	Struktura genu pro CD45 .....	4
4	Proteinová struktura CD45 .....	6
4.1.1	Porovnání predikovaných struktur CD45 u obratlovců na základě dat ze sekvenčních databází .....	7
4.1.2	Vznik a funkce izoform CD45.....	9
5	Funkce molekuly CD45 .....	11
6	Variabilita selekčních tlaků v rámci molekuly .....	14
6.1	Vlastní selekční analýza.....	16
7	Cross-reaktivita protilátek proti CD45 .....	17
8	Závěr.....	18
9	Seznam literatury:.....	21

# 1 Úvod

Kondice jedince je v zoologickém výzkumu široce studovaný znak. Odhad kondice dle hmotnosti například umožňuje detekovat úspěšnost jedince ve shánění potravy, na základě čehož lze predikovat reprodukční úspěch. Ovšem kromě vnějších vlivů, mezi které se řadí i již zmíněná výživa, mají výrazný dopad na celkovou kondici zvířete i další faktory, jejichž změny se v množství tukové tkáně nemusí okamžitě projevit, ačkoliv mohou mít velký vliv například na zmíněný reprodukční úspěch. Znaky diagnostikující takovéto změny je tedy třeba zhodnotit také. Takovými jsou zdravotní stav a stres zvířete, posuzované na základě výsledků různých metodických přístupů. Aktuálně užívané metody, například měření hladin kortikosteronu v krvi umožňují spolehlivě zhodnotit krátkodobý stres. Stres také může vyvolat zvýšenou sekreci glukagonu, jenž zvyšuje hladinu glukózy v krvi, na základě které lze pak také odhadnout patřičnou míru stresu. Celkový zdravotní stav pak reflektuje složení krve, kdy různé výkyvy v obsahu krevních buněk mohou kromě dlouhodobého stresu poukazovat na infekce patogenů, na alergie, či například na obsah jedovatých látek v krvi. Celková kondice je tedy fyziologicky provázaná se zdravotním stavem a stresem do vztahu, který se odráží ve složení krve. U jedinců v dobré kondici pak lze očekávat i efektivnější imunitní odpověď k infekčním chorobám (Zhao et al. 2017). Hematologické metody jsou tedy pro relevantní určení kondičního stavu nezbytné a odhady na základě hmotnosti a dalších jednoduše měřitelných znaků jsou často nedostatečné.

I přes svou důležitost je však možno v současnosti některé pokročilejší hematologické metody užívat pouze pro modelové druhy savců a člověka a posuzování kondičního stavu dalších druhů obratlovců je možné pouze na základě mikroskopické kvantifikace krevních buněk. Ta však kromě technické nedokonalosti přináší i další obtíže v podobě časové náročnosti a také je zatížena relativně velkou chybovostí (Bílková et al. 2017). Užití metod průtokové cytometrie, která by umožnila tyto nesnáze překonat, je však značně komplikováno přítomností jaderných erytrocytů u všech obratlovců kromě savců. K řešení tohoto problému v cytometrii existují molekulární nástroje v podobě protilátek specificky

rozlišující povrchové struktury erytrocytů a leukocytů. Specifickým markerem leukocytů je povrchová molekula CD45 kódovaná genem *PTPRC* (fosfatázový receptor typu C).

CD45 se pro svůj značný výskyt na leukocytech běžně užívá jako marker v lidském hematologickém výzkumu, avšak pro posuzování kondičního stavu na široké škále obratlovců tato molekula zatím nebyla využita. Cílem této práce je tedy získat vhled do exprese, struktury a také do funkce této molekuly u různých zástupců obratlovců. Dále také zpřehlednit, jak jsou tyto charakteristiky CD45 vnitrodruhově a mezidruhově variabilní, popřípadě zda a do jaké míry za touto variabilitou stojí selekce. Konečně mezi cíle mé práce patří zhodnocení možnosti navržení univerzálních mezidruhově reaktivních protilátek pro detekci této molekuly.



## 2 CD molekuly jako nástroj k determinaci buněk

CD (z anglického cluster of differentiation, diferenciační skupina) je souhrnné označení pro povrchové antigeny molekul exprimované na leukocytech, ale i dalších buňkách imunitního systému. Nomenklatura byla zavedena v roce 1982 za účelem přehlednější komunikace ve vědecké sféře sjednocením názvů protilátek proti povrchovým antigenům (Boumsell 1996). Engel et al. (2015) ve svém review publikovali aktuální seznam všech popsaných CD, který čítá na 401 různých molekul.

Různá distribuce CD molekul na odlišných buněčných typech umožňuje identifikaci těchto buněčných typů na základě použití protilátek proti konkrétním CD antigenům, což se dále uplatňuje při imunologických či histologických technikách, například při průtokové cytometrii (Aydin et al. 2017), či imunohistochemii (Sakabe et al. 2017). Kupříkladu snížený výskyt CD127 na Treg (regulačních T lymfocytech) zjednodušuje identifikaci těchto lymfocytů (Liu et al. 2006), mezenchymální kmenové buňky jsou definovány kombinovanou expresí CD105, CD73 a CD90 (Dominici et al. 2006). Dobře známá je prezence CD3 na všech zralých T lymfocytech, CD8 na Tc (cytotoxických T lymfocytech), či CD4 na Th (pomocných T lymfocytech), monocytech, makrofázích a Treg.

Povrchové glykolipidy a glykoproteiny, mezi jež se řadí i CD, umožňují leukocytům různorodé interakce, které zajišťují správné fungování imunitního systému. Mezi důležité funkce CD antigenů patří často funkce koreceptorů. Jako známý příklad mohou opět posloužit CD4 a CD8, které pomáhají vázat MHC glykoproteiny (z anglického major histocompatibility complex, hlavní histokompatibilní komplex), čímž zesilují signál přes TCR (T buněčný receptor) (Miceli and Parnes 1991). Za zmínku stojí i kostimulační receptor CD28, jenž se na povrchu APC (antigen prezentující buňky) váže na molekuly CD80 a CD86, což je zapotřebí ke spuštění buněčného dělení a diferenciaci T lymfocytů. Posledním příkladem může být CD40 vyskytující se na povrchu B lymfocytů, který se váže na CD40 ligand na Th2 buňkách, čímž dochází ke stimulaci B lymfocytů. CD se dále uplatňují jako komplementové receptory. B lymfocytový CD21 váže C3dg (degradační produkt C3) a tvoří komplex s CD19, který váže antigen. Dojde tak k zesílení odpovědi vůči antigenu. Dalšími odlišnými funkcemi jsou vazba a prezentace glykolipidů CD1 molekulami

T lymfocytům, dále CD3, komplex transmembránových proteinů, které v rámci TCR zprostředkovávají signalizaci do buňky, CD95, Fas receptor, po jehož vazbě s Fas ligandem se spouští apoptóza, či adhezivní vlastnosti molekul CD34, CD2, CD11, CD54 a dalších (Hořejší 2013). Fosfatázové aktivitě molekuly CD45 bude věnován vlastní prostor (kap. 5).

CD45 (též známý pod názvy L-CA, T200, B220 či Ly-5) je transmembránový glykoprotein typu I, receptor s funkcí tyrosin fosfatázy (Tonks et al. 1988) a antigen hojně se vyskytující na povrchu všech buněk hematopoetické linie, s výjimkou zralých erytrocytů a jejich progenitorů. Pro tento výskyt se běžně používá jako marker leukocytů při imunologických výzkumech modelových druhů savců i člověka, například při průtokové cytometrii (Mota and Rico-Hesse 2009), často při rozpoznávání chronických lymfoproliferativních onemocnění nebo akutní leukemie (Braylan et al. 2001).

### 3 Struktura genu pro CD45

Gen kódující molekulu CD45, *PTPRC*, byl na fylogenetické škále popsán v genomech všech čelistnatců a kruhoústých (Aken et al. 2016), kódující sekvence se však mezi taxony významně liší v délce. Celková exon-intronová struktura genu se zdá být mezidruhově poměrně konzervována, přičemž u většiny druhů je gen *PTPRC* tvořen přibližně třiceti exony. Shodně očíslované exony u různých živočichů však nemusí nutně kódovat stejné části molekuly, nejsou tedy homologní.

Lidský *PTPRC* se délkou pohybuje kolem 120 kb (kilobazí) (Fernandez-Luna et al. 1991) a charakteristický je pro něj poměrně vysoký počet exonů, nejčastěji 33 (Aken et al. 2016). Těmito exony jsou kódovány různé strukturní části molekuly. U savců tedy kódují exony 3-15 extracelulární část, přičemž exony 4, 5 a 6 identifikují u člověka část O-glykosylovaného extracelulárního řetězce podléhající alternativnímu splicingu (kap. 4.1.2). Exon 16 dále kóduje transmembránovou část, exony 17-32 intracelulární část a 33. exon C-terminální konec (Hall et al. 1988). Mezi člověkem a primáty byla popsána až 92% shodnost v nukleotidových sekvencích genu *PTPRC* a až 86% v aminokyselinových, přičemž i sekvence kódující extracelulární část molekuly jsou na 70 % homologní (Montoya, Vernot,

and Patarroyo 2004). Také poměrně dlouho známý myší gen pro CD45, historicky označován jako Ly-5, je strukturně velmi podobný lidskému, obsahuje však například navíc 34. exon a také na alternativním splicingu se podílí více exonů než u člověka (kap. 4.1.2) (Saga et al. 1988). Mezi lidskými a hlodavčími sekvencemi identifikujícími extracelulární část pak byla spatřena už pouze 40% homologie (Okumura et al. 1996). Jako ortolog velice blízký lidskému *PTPRC* se také jeví gen pro CD45 u kura se svou 70% podobností v nukleotidové sekvenci pro intracelulární část molekuly a 20% pro extracelulární část (Fang et al. 1994).

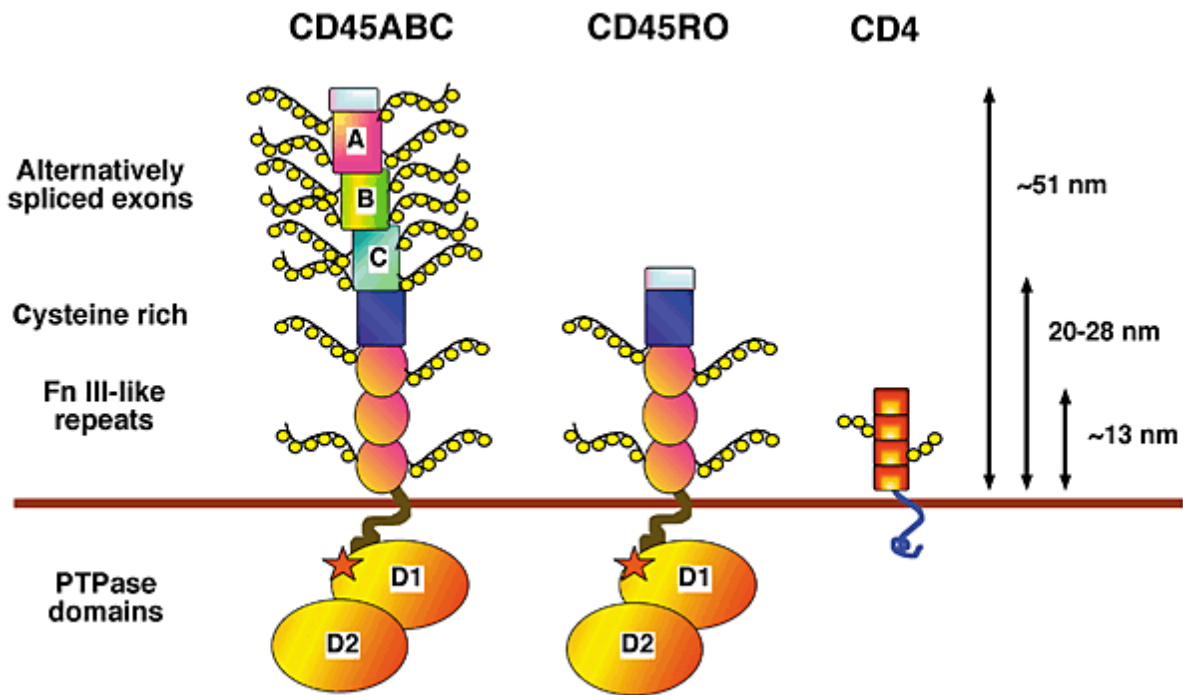
U čtverzubce byly identifikovány exony 4-12 jako kódující sekvence extracelulární části, u savců však tuto část kódují exony 3-15. Dále exon 13 pro transmembránovou část a exony 14-33 pro cytoplasmatickou část, což je opět odlišné od situace u savců. C-terminus je pak kódován exonem 30. Nejvýraznějším rozdílem je však celková délka genu, kdy *PTPRC* čtverzubce vzhledem k velmi malé velikosti intronů nabývá rozsahu pouze 12 kb, jediným rozsáhlým místem je intron 1 a chybí také ekvivalent savčího exonu 3 (Díaz del Pozo, Beverley, and Timón 2000). Dále při porovnání sekvence kódující extracelulární domény molekuly u sliznatky s jinými zástupci obratlovců, tedy s člověkem, kurem, kaprem, čtverzubcem a žralokem, vyšla najevo velice nízká aminokyselinová podobnost, a to 20-25%. Naopak v sekvenci specifikující fosfatázovou část molekuly je rozlišností značně méně, jak například reflektuje až 59% podobnost s lidskou sekvencí (Nagata et al. 2002). Tyto poznatky mimo jiné indikují funkční konzervativnost molekuly. Podobně tak mezi savci, žralokem a kurem byla popsána pouze 20% homologie sekvencí kódujících extracelulární část (Okumura et al. 1996). Naopak při srovnání potkaního a myšího genu pro CD45 byla zjištěna 69% homologie nukleotidových sekvencí a 47% aminokyselinových sekvencí kódujících extracelulární doménu a 87-89% podobnost pro cytoplasmatickou doménu (Saga et al. 1986). Sekvence *PTPRC* jsou tedy na mezidruhové úrovni velice málo konzervativní, obzvláště mezi blízkce nepříbuznými druhy živočichů. Na vnitrodruhové úrovni lze pak v genu *PTPRC* spatřit značný polymorfismus vzniklý nejčastěji na základě četných bodových mutací, tedy především insercí, delecí a substitucí (Ballingall et al. 2001, Montoya, Vernot, and Patarroyo 2004), způsobujících variaci sekvencí v délce a kromě toho také intragenické rekombinace (Uinuk-ool et al. 2005). Vysoký podíl na vnitrodruhové variabilitě má ale i alternativní splicing, jehož vlivem vzniká z *PTPRC* několik izoforem molekuly CD45 (kap. 4.1.2).

I přes proběhlé spekulace, že *PTPRC* mihulí není ortologní genu pro CD45 u obratlovců, ho analýzy nakonec jako ortologní potvrdily (Uinuk-ool et al. 2005, Uinuk-ool et al. 2002, Shintani et al. 2000). Data o genové a proteinové struktuře CD45 u pláštěnců a kopinatců prozatím chybí (Nagata et al. 2002, Aken et al. 2016), je tedy možné, že právě u nižších strunatců se vyskytují pouze paralogy genu *PTPRC*. Zkoumána byla z hlediska výskytu CD45 například i octomilka obecná. Objevený protein DLAR (*Drosophila* leukocyte-antigen-related-like) sice obsahuje transmembránovou fosfatázu, ovšem zcela odlišné uspořádání domén vylučuje možnost, že DLAR je ortologem CD45. Evolučně nejstarším a nejvíc divergentním genem pro CD45 od obratlovčího se tedy prozatím zdá být *PTPRC* mihulí (Nagata et al. 2002).

#### 4 Proteinová struktura CD45

I přes různé délky kódujících sekvencí se celková struktura domén zdá být mezidruhově relativně konzervovaná. Molekula CD45 je glykoprotein obsahující jedinou transmembránovou doménu skládající se z 22 aminokyselin. Transmembránová doména rozděluje molekulu na protáhlou glykosylovanou N-terminální extracelulární část a C-terminální cytoplazmatickou část. Cytoplazmatická část je u člověka dohromady tvořena 707 aminokyselinami (Shin et al. 2011) a sestává ze dvou proteinových tyrosin fosfatáz, jejichž působení bude objasněno v samostatné kapitole (kap. 5). Délka extracelulární části je velmi variabilní a pohybuje se v rozmezí 391 až 552 aminokyselin (Streuli, Hall, et al. 1987). Naproti fosfatázovým doménám, které jsou u obratlovců fylogeneticky konzervativní (Nagata et al. 2002, Dowding 1992), byla právě v extracelulární části zaznamenána vysoká míra evoluční plasticity. Přesto i zde je však možné napříč různými druhy obratlovců najít konzervované části. Nejvyšší míra konzervativnosti je patrně zacílena především do fibronektinových domén typu III (Okumura et al. 1996) ležících v bezprostřední blízkosti membrány, kdy počet domén je některými autory udáván na tři, některými na dvě (Uinuk-ool et al. 2005). Následující části směřující k N-konci molekuly se již jeví variabilnějšími. Jsou jimi oblast bohatá na cysteiny, kdy se však počet jednotlivých cysteinových zbytků i jejich pozice mezi obratlovci liší (Holmes 2006, Fang et al. 1994,

Nagata et al. 2002). Tato doména tvoří disulfidické vazby, mimo intradoménových také vazby s fibronektinovou doménou. Tyto atypické interdoménové vazby mohou patrně sloužit k udržování stability proteinu (Symons, Willis, and Barclay 1999). Zásadní podíl na variabilitě molekuly má pak poslední část, různě dlouhý O-glykosylovaný řetězec (kap. 4.1.2). Schéma proteinové struktury CD45 je zobrazeno na obr. 1.

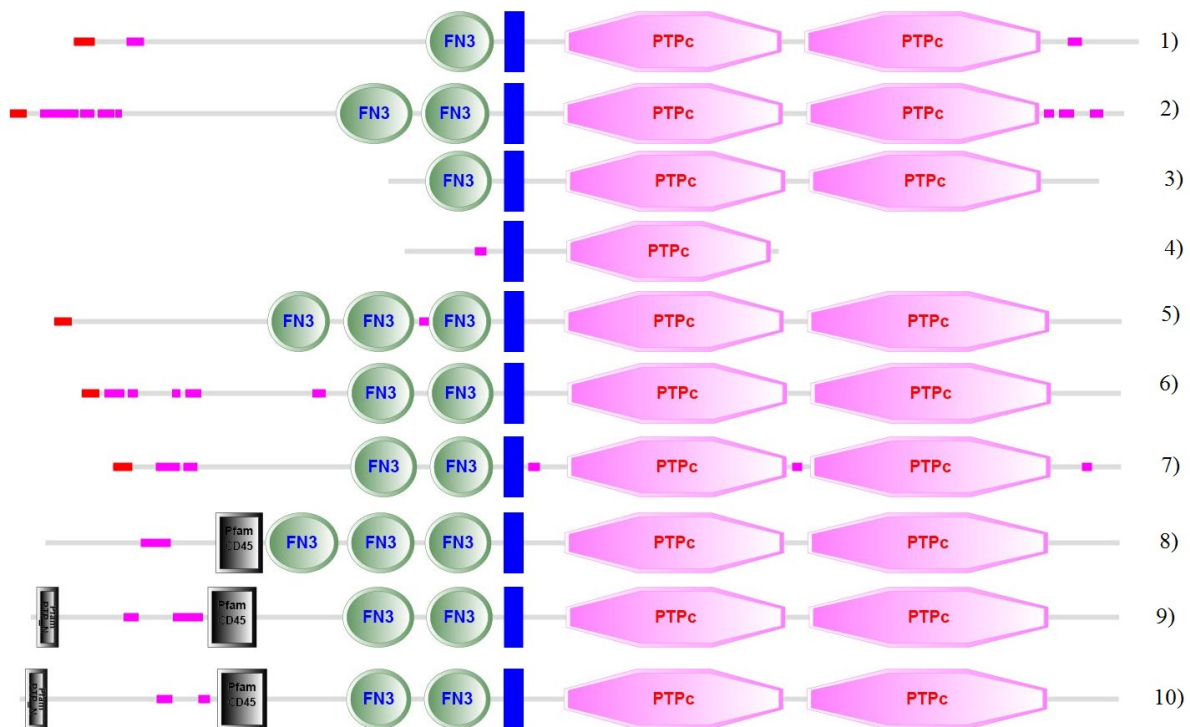


Obrázek 1. Struktura CD45. Velká isoforma (CD45ABC) a malá isoforma (CD45RO) s vystříženými alternativními exony. Porovnání proteinové struktury CD45 se strukturou molekuly CD4. Převzato z Penninger et al. (2001).

#### 4.1.1 Porovnání predikovaných struktur CD45 u obratlovců na základě dat ze sekvenčních databází

Abych doplnila mezery v informacích o strukturní variabilitě CD45 u obratlovců v současné odborné literatuře, provedla jsem analýzu sekvencí stažených z genomové databáze ENSEMBL (Aken et al. 2016) využívající program SMART (Schultz et al. 2000) k predikci lokalizace struktur proteinových domén. Sekvenční data u vybraných druhů obratlovců podporují výše zmíněnou představu o variabilitě v délce molekuly CD45 především v důsledku různé délky extracelulární N-terminální části molekuly (obr. 2), která podléhá glykosylaci. Nejkratší extracelulární část CD45 byla detekována u čtverzubce zeleného, což je shodné s výsledky analýz autorů (Díaz del Pozo, Beverley, and Timón 2000), jímž jako model

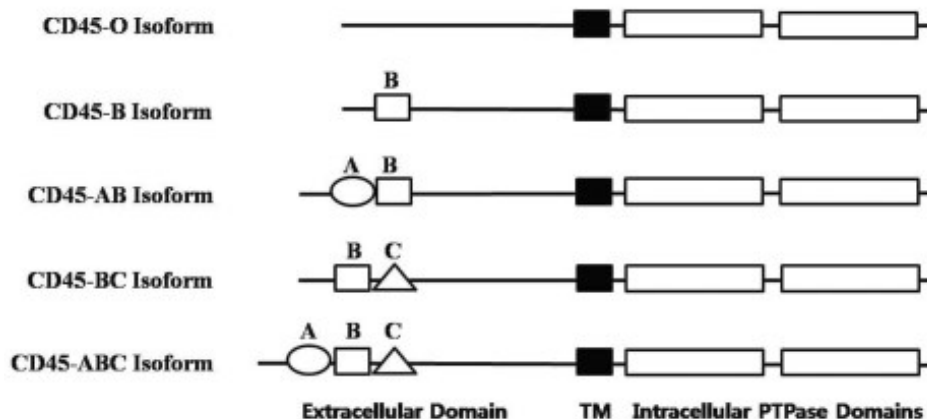
posloužil čtverzubec rudoploutvý. Naopak nadměru dlouhá ektodoména CD45 se vyskytuje u platy skvrnitě. Krátká sekvence *PTPRC* u drápatky tropické je pravděpodobně nekompletně popsána. Z výsledku je také patrné, že konzervovanost tří fibronektinových domén, k níž se přiklání několik dřívějších autorů (Okumura et al. 1996, Holmes 2006), je sporná. Ačkoliv je predikce existence a lokalizace strukturních domén na základě sekvenčních dat závislá na použitém predikčním algoritmu (krystalograficky určené struktury CD45 nejsou pro většinu druhů v současnosti dostupné), domnívám se, že tyto výsledky podporující u různých druhů výskyt jedné až tří fibronektinových domén dokumentují zvýšenou míru evoluční variability i v této oblasti molekuly CD45.



Obrázek 2. Doménová struktura molekuly CD45 u vybraných zástupců obratlovců. Cytoplasmatická doména s dvěma fosfatázami, transmembránový peptid a extracelulární část obsahující fibronektinové domény. Sestupně: 1) Tetra mexická (*Astyanax mexicanus*) 2) Plata skvrnitá (*Xiphophorus maculatus*) 3) Čtverzubec zelený (*Tetraodon nigroviridis*) 4) Drápatka tropická (*Xenopus tropicalis*) 5) Anolis rudokrký (*Anolis carolinensis*) 6) Krocán divoký (*Meleagris gallopavo*) 7) Lejsek bělokrký (*Ficedula albicollis*) 8) Tur domácí (*Bos taurus*) 9) Myš domácí (*Mus musculus*) 10) Člověk (*Homo sapiens*). Sekvence *PTPRC* u drápatky tropické je pravděpodobně nekompletně popsána. Vytvořeno na základě dat z genomové databáze ENSEMBL (Aken et al. 2016).

#### 4.1.2 Vznik a funkce izoforem CD45

Jak je již dříve známo, na vnitrodruhové úrovni se strukturní variabilita glykoproteinu CD45 ukázala být zapříčiněna kromě genetického polymorfismu také alternativním splicingem exonů kódujících O-glykosylované řetězce (Streuli, Hall, et al. 1987). V závislosti na kombinaci alternativních exonů, které konečná mRNA obsahuje, jsou translatovány různě dlouhé izofomy, jejichž molekulární hmotnost se u savců udává v rozmezí od 180 do 240 kDa (Barclay et al. 1987). Alternativní peptidy, dlouhé 66 aminokyselin (peptid A), 47 (peptid B) a 48 (peptid C) mohou být do konečného proteinu zařazeny za 8 vždy přítomných aminokyselin na N-konci extracelulární části, čímž formují rozličné délky izoforem CD45 (Shin et al. 2011) (obr. 3).



Obrázek 3. Struktura izoforem CD45 u člověka. Nejdelší izoforma CD45-ABC obsahuje všechny tři alternativní exony, nejmenší CD45-O neobsahuje žádný. Písmeno A indikuje přítomnost exonu 4, B exonu 5 a C exonu 6. Převzato z Shin et al. (2011).

Přestože ze tří alternativních exonů 4, 5 a 6 je teoreticky možné si představit osm různých izoforem, u člověka bylo v reálu izolováno pouze pět izoforem (Shin et al. 2011), zatímco u myši je patrně možno specifickou protilátkou detekovat i šestou, obsahující pouze exon 4 (Bio-Rad [online]).

Kromě obvykle jmenovaných exonů 4, 5 a 6 podílejících se na alternativním splicingu u člověka i myši existují i důkazy o účasti exonů 7, 8 a 10 kódujících myši cysteinovou oblast

molekuly (Chang et al. 1991, Virts, Barritt, and Raschke 1998). Mechanismus splicingu se sice zdá být evolučně konzervovaný, avšak počet alternativních exonů, které se ho účastní, není u různých zástupců obratlovců shodný (Nagata et al. 2002, Uinuk-ool et al. 2005, Montoya, Vernot, and Patarroyo 2004). Kupříkladu u čtverzubce se na alternativním splicingu podílí pouze dva exony, a to exon 5 a 6 (Díaz del Pozo, Beverley, and Timón 2000). Naopak vysoký počet exonů je do alternativního splicingu zahrnut u sumečka tečkovaného, kde bylo detekováno třináct alternativních exonů. Některé jsou však zcela identické či podobné, může se tedy jednat o výsledek duplikace exonů. Kombinací bylo však detekováno 21 a nejdelší cDNA obsahovala deset alternativních exonů, z nichž šest kódovalo glykosylační místa (Kountikov et al. 2004). Jestli a kolik z nich se pak exprimuje na povrch buňky ale zatím není známo. V úvahu připadá možnost existence těchto izoform pouze jako mRNA transkriptu, který například může být po translaci degradován. Podobně jako u čtverzubce se účast dvou exonů na alternativním splicingu odhadovala i v případě sliznatek. Obdobně jako u sumečka byly však v oblasti N-terminálního konce objeveny tandemové duplikace a studie cDNA u sliznatek nakonec poukázaly na možnost existence čtyř potenciálních alternativních exonů (Nagata et al. 2002, Kountikov et al. 2004). U mihulí byl popsán zcela odlišný typ alternativního splicingu, kdy nemusí být vystříženy celé exony, jak bylo popsáno u jiných živočichů, ale pouze části exonů, a to bez zjevného funkčního dopadu (Uinuk-ool et al. 2005). Výskyt glykosylačních míst v částech molekuly kódovaných alternativními exony je poměrně konzervovaný jev, popsáný u sumečka i čtverzubce (Díaz del Pozo, Beverley, and Timón 2000), ale například i u kurů a žraloků (Okumura et al. 1996).

U člověka byl popsán princip regulace alternativního splicingu negativními trans-regulačními elementy, které potlačují zahrnutí alternativních exonů do mRNA. V důsledku této regulace je pak například na povrchu paměťových T lymfocytů distribuována především malá izoforma CD45RO, zatímco naivní T lymfocyty exprimují velkou izoformu CD45RABC. Při aktivaci T lymfocytů tak dochází k určitému přepnutí izoform (Rothstein et al. 1992, Akbar et al. 1988). Jejich různá exprese je pak u člověka diagnosticky užitečná právě pro rozeznávání naivních a paměťových T lymfocytů (Beverley 1992). V případě B lymfocytů je na povrchu vždy přítomno větší množství CD45RABC izoformy (Rothstein et al. 1992). Tato distribuce je pozorovatelná například i u sumců a kurů



(Kountikov et al. 2004), ale také u žab (Barritt and Turpen 1995) či u primátů (Montoya, Vernot, and Patarroyo 2004).

Jako funkční vysvětlení existence alternativního splicingu v CD45 bylo navrženo, že se různé izoformy molekuly CD45 liší v míře glykosylace, která pak patrně může ovlivňovat funkci fosfatáz. Majeti et al. (1998) ve své práci představují, jak s využitím strukturního klínu vzniklého homodimerizací fosfatázových domén dokáže jedna fosfatáza blokovat katalyticky aktivní oblast druhé, čímž dochází k zamezení fosfatázové aktivity celé molekuly. Podle Xu a Weisse (2002) je pak O-glykosylace, ke které dochází v části molekuly kódované alternativními exony, jedním z možných nástrojů, jak tuto dimerizaci mechanisticky ovlivnit. Odlišnosti v dimerizaci u různě glykosylovaných izoform se poté projevují na následné aktivitě molekuly. Zatímco tedy fosfatázy bohatě O-glykosylovaných molekul dimerizují méně, ty méně glykosylované jsou k dimerizaci náchylnější, což vede k utlumení signalizace přes TCR. Také Irlles et al. (2003) potvrzují, že pro správné vedení signálu přes TCR je výhodná velká izoforma. Dimerizace fosfatáz by mohla být indukovatelná přítomností potenciálního ligandu podobně jako u receptorových kináz, kde však vede k pozitivní regulaci (Majeti et al. 1998). Různé stupně glykosylace CD45 by pak mohly regulovat možnost interakce s ligandy a tak dále přispívat k regulaci signalizační funkce této molekuly. Zásadní otázkou však zůstává, zda CD45 opravdu má vlastní ligand a který ligand to je, popřípadě které ligandy to jsou (Holmes 2006).

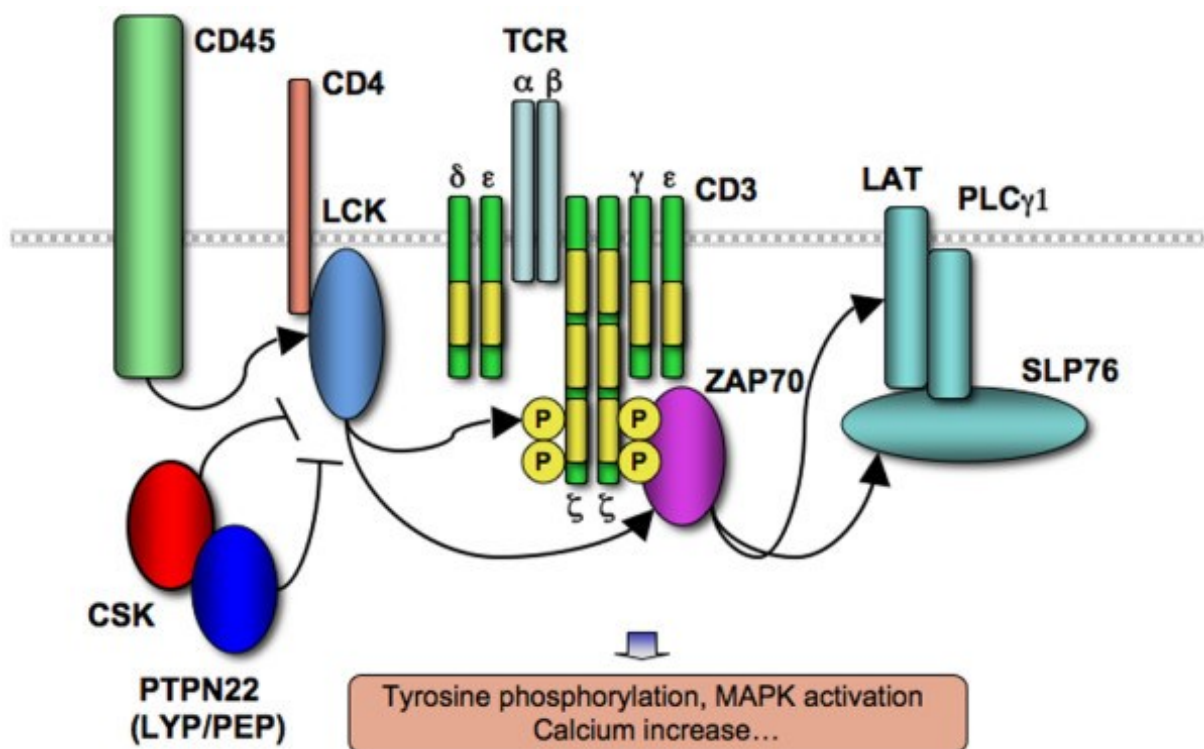
## 5 Funkce molekuly CD45

Defosforylace (odstranění fosfátové skupiny z molekuly) je společně s fosforylací procesem hojně regulujícím proteinovou aktivitu. Defosforylace je zprostředkována aktivitou proteinových fosfatáz, jejichž název se dále odvíjí od toho, na jaký konkrétní substrát působí. V případě CD45 je tímto substrátem tyrosin (Tonks et al. 1988, Mustelin et al. 2003).

Jak již bylo zmíněno, proteinové tyrosin fosfatázy se v intracelulární části molekuly CD45 vyskytují ve dvou vedle sebe ležících doménách, přičemž enzymaticky aktivní je pouze první fosfatáza D1 (Nam et al. 2005). Fosfatáza D2 však zastává důležité regulační funkce.

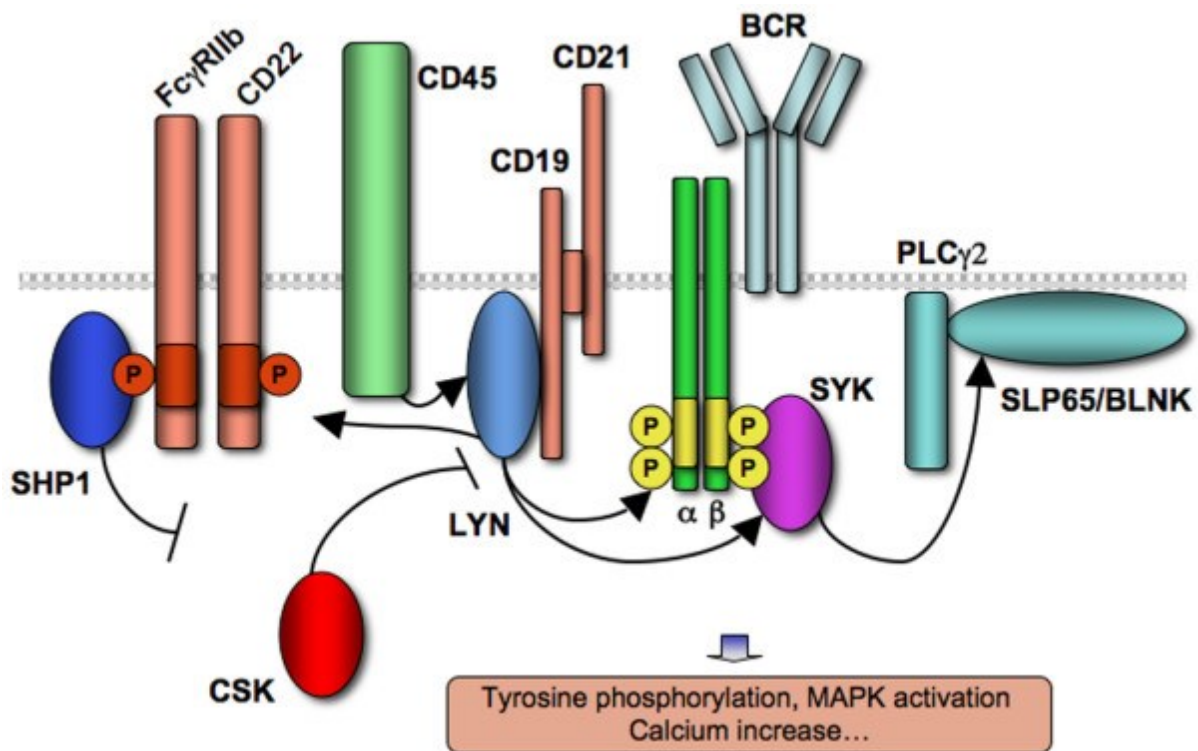
Kromě zajištění stabilizace a zesílení aktivity D1 (Felberg and Johnson 2000) se podílí i na regulaci vápníkové signalizační kaskády vedoucí k aktivaci T lymfocytů (Leitenberg et al. 2007), nezbytnou se ukázala být i pro správnou produkci interleukinu 2 ovlivněním substrátové specifity D1 (Kashio et al. 1998).

Fosfatázová doména reguluje Src kinázy Lck (p56) a Fyn (p59) defosforylací jejich negativního regulátoru C-terminálního fosfotyrosinu. Tím je zajištěna otevřená konformace kináz, v důsledku čehož dochází k aktivaci i proliferaci T lymfocytů (Ostergaard et al. 1989, Hurley, Hyman, and Sefton 1993). Pokud je ale defosforylován tyrosinový zbytek v aktivním místě (Y394) Lck, kinázová aktivita je utlumena (D'Oro et al. 1996). Lck tedy může být jak pozitivně, tak negativně regulována fosfatázou CD45. Dalšími substráty podléhajícími defosforylaci CD45 jsou však například i CD3 zeta řetězec, což naznačuje kromě zahájení aktivity i další funkci, a to zakončení odpovědi T lymfocytů (Furukawa et al. 1994). Dále je CD45 asociována například i s fosfoproteinem LPAP (Schraven et al. 1994), CD100 (Herold et al. 1996) či interferonem- $\alpha$  (Petricoin et al. 1997). Signální dráha, k níž dochází na povrchu T lymfocytů je naznačena na obr. 4.



Obrázek 4. Signální dráha molekuly CD45 a s ní asociovaných molekul na povrchu T lymfocytu. Převzato z Zikherman and Weiss (2009).

Na rozdíl od situace u T lymfocytů, na B lymfocytech se přítomnost CD45 ukázala hrát v regulaci signalizace pouze pozitivní roli a při cíleném zamezení exprese CD45 není signalizace přes BCR (B buněčný receptor) omezena tak kriticky jako je tomu u signalizace přes TCR (Zikherman et al. 2012, Stone et al. 1997). Nicméně i na B lymfocytech podléhají defosforylaci Src kinázy. V případě kinázy Lyn jsou dynamicky regulována dvě tyrosinová místa, přičemž defosforylace C-terminálního tyrosinu je opět nezbytná pro vedení signálu přes BCR (Yanagi et al. 1996). Procesy odehrávající se na povrchu B lymfocytů jsou vyznačeny na obr. 5.



Obrázek 5. Komplex CD45 a ostatních molekul účastníci se signální dráhy na povrchu B lymfocytu vedoucí k uvolnění vápenatých iontů. Převzato z Zikherman and Weiss (2009).

CD45 se rovněž účastí i signalizace přes cytokinové receptory, kdy v důsledku defosforylace pozitivní regulační pozice JAK (Janus kináz) negativně reguluje JAK/STAT signalizaci (Irie-Sasaki et al. 2001). Kromě T a B lymfocytů však zajišťuje obdobné procesy například i na NK (z anglického natural killer, přirození zabijáči) buňkách (Krzywinska et al. 2016). Uplatňuje se tedy v adaptivní imunitní odpovědi jako klíčový regulátor proteinových tyrosin kináz a reguluje signální transdukcí vedoucí k proliferaci buněk či produkci protilátek.

Významnou funkci mimo fosfatázy zajišťují i fibronektinové domény, jež umožňují molekule CD45 blokovat integrinem zprostředkovanou adhezi a migraci buněk. Ukazuje se, že v případě T lymfocytů je v nepřítomnosti CD45 adheze zvýšena (Shenoi et al. 1999).

Výskyt CD45 u sliznatek a mihulí, jejichž specifická imunita je analogická k imunitě čelistnatců, také mimo jiné indikuje funkční podíl CD45 v jejich alternativní adaptivní imunitní odpovědi, a to zejména regulaci signalizace cytokinových receptorů (Nagata et al. 2002, Im et al. 2016, Uinuk-ool et al. 2005). Výše popsaná regulace signální transdukce přes TCR se tak zdá být evolučně mladší funkcí (Nagata et al. 2002) zajištěnou ortologou CD45 u všech druhů čelistnatců (Dowding 1992, Barritt and Turpen 1995, Maddox, Mackay, and Brandon 1985, Fang et al. 1994).

I přes značný polymorfismus v genu *PTPRC*, který lze spatřit jak na úrovni mezidruhové, tak vnitrodruhové (Uinuk-ool et al. 2005), se mezi jednotlivými alelami z velké části neprojevuje funkční rozdíl v aktivitě fosfatázy. Domnívám se tedy, že se jedná o neutrální variabilitu. Polymorfismus však byl zkoumán z hlediska korelace s rozvojem autoimunitních chorob u člověka a některé publikace naznačují existenci podobných vztahů. To platí například u Graves-Basedowovy nemoci (polymorfismus exonu 6) (Boxall et al. 2004) či roztroušené sklerózy (polymorfismus exonu 4) (Jacobsen et al. 2000), ačkoliv některé další výsledky ukazují nejednoznačnost těchto závěrů (Milterski et al. 2002). Zásadní funkce CD45 v aktivaci specifické imunitní odpovědi se zdá být využívána evolučně adaptovanými patogeny, kteří tak vazbou na CD45 inhibují signální transdukci a proliferaci T lymfocytů (Gabaev et al. 2011). Je tedy pravděpodobné, že na molekulu dlouhodobě působí různé selekční tlaky, které se mohou podílet na indukci vzniku polymorfismu.

## **6 Variabilita selekčních tlaků v rámci molekuly**

Výše popsané mezidruhové odlišnosti ve struktuře povrchové molekuly CD45 spolu s jejím funkčním významem naznačují adaptivní význam mezidruhové variability CD45 u obratlovců. Snahu o identifikaci kandidátních pozitivně selektovaných pozic však značně komplikuje právě výše popsaná vysoká sekvenční variabilita v ortologních genech *PTPRC*

kódujících CD45 u různých druhů (kap. 3). Ta v kombinaci s vysokým počtem exonů v tomto genu značně komplikuje spolehlivou konstrukci alignmentu sekvencí *PTPRC* na širší fylogenetické škále. Patrně v důsledku této metodické nesnáze je molekulárně evolučních studií, které by popisovaly adaptivní evoluci *PTPRC* stále spíše poskrovnu. Přesto již z dostupných studií, které byly prováděny především v rámci blízce příbuzných druhů, vyplývá, že z různých potenciálních selekčních tlaků působících na gen pro CD45 převažuje pozitivní selekce. To například dokazují výsledky Ballingalla et al. (2001), kteří ve své studii porovnali CD45 několika divergentních plemen tura. Nejvyšší míru selekce zjistili na exonu 9 kódujícím část extracelulární domény molekuly. Ačkoliv autoři nebyli schopni plně vysvětlit molekulární podstatu této selekce, předpokládají selekci ze strany intravaskulárních patogenů, například trypanozom. Podobně i Filip a Mundy (2004) podpořili význam pozitivní selekce působící na extracelulární doménu CD45 u úzkonosých primátů, porovnáním poměrů nesynonymních substitucí k synonymním u exonů, které podléhají alternativnímu splicingu s exony, které nepodléhají, a s intronem 6. Závěrem je, že nejsilnější selekci podléhají exony 9 a 14, kódující fibronektinové domény. Alternativní exony 4-6 kódující variabilní oblast jsou pod slabší pozitivní selekcí. U úzkonosých primátů je však selekční tlak vyvolaný trypanozomy jen málo pravděpodobný z důvodu nízké prevalence. K podobným výsledkům, tedy vysokému poměru nesynonymních substitucí k synonymním, došli i Montoya, Vernot, and Patarroyo (2004) při porovnání sekvencí u člověka a ploskonosých primátů z čeledi mirikinovitých. Nejsilnější selekce je opět zacílena do extracelulární části.

Nejvíce divergentní *PTPRC* od čelistnatců se jeví gen mihulí. Po srovnání DNA sekvencí odlišných jedinců mihulí se ukázalo, že některé alely se různí mnohonásobnými substitucemi, což by mohlo vyloučit působení recentních mutací a indikovat selekci. U exonů 3, 5, 7 a 9, jež specifikují extracelulární část, opět převažují nesynonymní substituce. Zajímavé ovšem je, že u mihulí se variace ukázala být i v exonech určujících intracelulární část, počet synonymních a nesynonymních substitucí si je zde však roven (Uinuk-ool et al. 2005).

V těchto studiích byla často užita metoda poměru nesynonymních substitucí nukleotidů k synonymním u homologických sekvencí,  $K_a/K_s$ , kdy poměr vyšší než 1 značí pozitivní

selekcí. Pozitivní selekce je u genů vztahujících se k imunitě často pozorovatelná (Sawyer et al. 2005, Hughes 1997). Pod silnou pozitivní selekcí se ukázala být například i CD59, zejména alela A (Osada et al. 2002).

Silné selekční tlaky mohou být důsledkem rychle se vyvíjejících patogenů a nutnosti reakce na jejich evoluci. Ačkoliv z dostupných dat vyplývá existence poměrně intenzivní selekce na molekulu CD45, přímé důkazy vztahu variability v CD45 s variabilitou mezi parazity však prozatím chybí. Je však evidentní, že spíše než funkce fosfatáz jsou selektovány extracelulární interakce, ať už mezi buňkami, nebo mezi jednotlivými molekulami CD45 (Montoya, Vernot, and Patarroyo 2004).

## 6.1 Vlastní selekční analýza

Abych přispěla k poznatkům získaných z dostupné odborné literatury, rozhodla jsem se provést vlastní selekční analýzu, a to v rozmezí blízce nepříbuzných zástupců savců, u kterých bylo možné získat alignment jen s menším podílem delecí. Z genomické databáze ENSEMBL (Aken et al. 2016) jsem tedy stáhla 18 sekvencí *PTPRC* vybraných druhů savců a pomocí programu Geneious (Kearse et al. 2012) jsem za použití nástroje „muscle alignment“ v režimu respektujícím tripletovou strukturu kódujících sekvencí vytvořila alignment. Z alignmentu byly dále odstraněny všechny pozice obsahující u některého z analyzovaných druhů delece či inserce. Takto upravený alignment byl poté nahrán na server Datamonkey (Delport et al. 2010), ve kterém byl identifikován vhodný substituční model pro má data a provedena následná analýza selekce pomocí metod FEL, FUBAR a MEME. Protože se nejedná o blízce příbuzné druhy, nepředpokládám výskyt relevantního množství rekombinací. Z výsledků analýz jsem poté vybrala pouze signifikantní selektovaná místa podpořená všemi třemi analýzami zároveň. Takto získaných 21 selektovaných pozic číslovaných dle sekvence kodonů lidské CD45 jsem pak vyobrazila na lineárním strukturním modelu (obr. 6) pomocí softwaru R (R Development Core Team 2017). Početný výskyt selektovaných pozic v aminokyselinové sekvenci extracelulární části naznačuje působení silné pozitivní selekce na tuto část molekuly, a to jak na oblast O-glykosylovaného řetězce, tak na cysteinové a fibronektinové domény. Selektované pozice v aminokyselinové sekvenci transmembránové domény a fosfatáz nebyly detekovány.



Obrázek 6. Lineární struktura lidské molekuly CD45. Šipky označují pozice v aminokyselinové sekvenci molekuly nacházející se pod pozitivní selekcí. Výsledky na základě vlastních dat.

## 7 Cross-reaktivita protilátek proti CD45

V důsledku výše zmíněných expresních a strukturních rozličností je pravděpodobná omezená mezidruhová cross-reaktivita protilátek proti CD45, což potvrzují kupříkladu Jeurissen a Janse (1998). Přestože jsou však protilátky většinou druhově specifické, některé lidské protilátky cross-reagují v rámci primátů. Některé pak dokonce reagují i napříč různými savci, jak dokazují Saalmüller et al. (2005), kdy jedna z testovaných monoklonálních protilátek reagovala mezi makakem, turem, ovčí, kozou, koněm a norkem. I přes polymorfní epitopy také protilátky reagovaly mezi různými druhy cichlid, u nichž se vazba zdá být zajištěna v cysteinové oblasti molekuly, která je N-glykosylována (Dowding 1992). Je tedy možné, že cílené vázání protilátek do této oblasti by bylo u některých zvířat vhodnější, než do O-glykosylované části podléhající alternativnímu splicingu. Jak však bylo zmíněno výše, například u myši podléhají splicingu také právě cysteinové části molekuly, tato metoda by tak nebyla vhodná pro všechny druhy. Pro specifické stanovení lidské CD45 byly vytvořeny protilátky proti všem izoformám CD45 a protilátky, které na základě exonu A rozeznávají pouze dvě izoformy (obr. 3) (Rothstein et al. 1992, Streuli, Matsuyama, et al. 1987). Proto by teoreticky mohlo být možné užívat podobné protilátky i mezi ostatními savci vykazujícími obdobné izoformy a tvořené stejnými exony. Takové, odpovídající lidské malé (CD45RO) a velké (CD45RABC) izoformě, byly kupříkladu detekovány u primátů (Montoya, Vernot, and Patarroyo 2004). Aby však mohla protilátka proti CD45 cross-reagovat mezi vzdálenými druhy obratlovců, musela by u nich být navázána do konzervovaných

extracelulárních částí molekuly. Takové oblasti ale vzhledem k vysoké expresní a strukturní mezidruhové variabilitě molekuly CD45 prakticky nelze nalézt. Možnost vytvořit univerzální protilátku umožňující testování fylogeneticky široké škály živočichů se tak jeví jako nepravděpodobná. Avšak další studium mezidruhové a vnitrodruhové variability genu *PTPRC* by mohlo přispět k využití tohoto hematologického markeru v metodice stanovení kondice u navzájem příbuzných druhů.

## 8 Závěr

Současná odborná literatura pojednávající o různých aspektech struktury a funkce molekuly CD45 postrádá souhrnné informace o evoluci této molekuly u obratlovců. Ačkoliv bylo izolováno u různých druhů poměrně mnoho genomických DNA sekvencí *PTPRC* a mRNA jejího transkriptu, ne všechny studie shrnují přesné strukturní a velikostní poměry genu a nepřinášejí žádné souborné mezidruhové srovnání napříč skupinami obratlovců. Jako ideální model pro další studium funkce CD45 se jeví malé, kompaktnější geny jako je například *PTPRC* čtverzubce, naopak výzkum komplexních a dlouhých savčích genů je poměrně komplikovaný, avšak zejména z hlediska studia transkripční variability a alternativního splicingu může přinést cenné poznatky. Popsání *PTPRC* genu u nových druhů by mohlo značně ulehčit další studium molekuly CD45. Stále chybí například práce komplexně popisující výskyt a význam CD45 u ektotermních živočichů, typicky plazů. Dále také chybí data identifikující CD45 u pláštěnců a kopinatců (Nagata et al. 2002), pravděpodobně tak ortology *PTPRC* postrádají. Prozatím byl tedy za evolučně nejstarší gen pro CD45 identifikován *PTPRC* mihulí (Nagata et al. 2002).

V genu pro CD45 je napříč různými druhy patrná nízká sekvenční konzervativnost. Přestože i v této části genu lze najít polymorfismus, nejvíce shodné jsou sekvence kódující fosfatázy. Z toho je také zjevná funkční konzervovanost CD45 jako fosfatázy nepostradatelné pro správnou regulaci signalizace na receptorech T a B lymfocytů, a tím pro specifickou imunitní odpověď obratlovců. Důležitou aktivitou je ale zrovna tak i regulace signalizace přes cytokinové receptory, jež patrně mohla být z hlediska evoluce prvotní funkcí CD45.



Jak vyplývá z mezidruhového srovnání na základě genomových sekvencí, extracelulární domény molekuly CD45 jsou konzervované o mnoho méně. Dle starších autorů je nejvyšší míra variability u obratlovců zacílena do oblasti cysteinů a především do O-glykosylovaného řetězce, já se však dle srovnání struktur CD45 na základě dat z genomických databází domnívám, že značnou roli ve variabilitě extracelulární části molekuly hrají i fibronektinové domény. Na základě těchto predikovaných struktur se minimálně zdá, že starší názor ohledně konzervovanosti výskytu tří fibronektinové domén není zcela přesný. Značný podíl na vnitrodruhové i mezidruhové variabilitě má alternativní splicing exonů kódujících především O-glykosylovaný řetězec. Z důvodu účasti rozličného množství alternativních exonů u různých obratlovců však vznikají i různé počty izoform. Zda ale vzniklé izoformy disponují i rozdílnou funkcí není zcela jasné. Zůstává tak otevřená cesta ke spekulacím a dohadům, jejichž rozřešení by mohly nápomoci experimentální studie, které je ale s ohledem na pleiotropní funkci CD45 obtížné provést. Pokud opravdu slouží variabilita extracelulární části CD45 k regulaci fosfatázové aktivity, jak je možné predikovat z modelu stérické blokáce funkce fosfatáz klínem, nabízí se otázka, zda existuje tato regulace i u dalších obratlovců než člověka, popřípadě jak je zajištěna u živočichů s jiným počtem izoform. Také je evidentní, že RNA studie jsou pro stanovení počtu izoform nedostatečné a nutné je provést i expresní studie na úrovni proteinů, které vyloučí vedlejší produkty alternativního splicingu (Díaz del Pozo, Beverley, and Timón 2000).

Mimo evolučně konzervovaný mechanismus alternativního splicingu mají především na vnitrodruhovou variabilitu molekuly CD45 vliv bodové mutace pravděpodobně vzniklé důsledkem silné pozitivní selekce. Ta je dle výsledků publikovaných v odborné literatuře a mé analýzy zacílena do extracelulární oblasti molekuly. Jaký aspekt funkce CD45 je pod pozitivní selekcí zůstává nejasné, avšak je možné se domnívat, že málo konzervované extracelulární části obsahují struktury, které patrně slouží k interakci s potenciálním ligandem. Přestože repertoár známých molekul asociovaných s CD45 je stále rozšiřován, klíčové interagující prostředníky jako právě specifické ligandy pro CD45 zůstávají neznámé. Nabízí se také možnost, že některé selektované exony budou měnit glykosylační místa, což by poté mohlo vést k existenci různých ligandů u různých druhů živočichů. Určení těchto či tohoto ligandu by každopádně doplnilo celkovou představu o signální kaskádě,

kteře se molekula CD45 účastnř, a dále by napomohlo určit, co konkrétně stojí za selekcí a co je selektováno.

Na závěr bych shrnula, že se molekula CD45 vzhledem k vysoké mezidruhové variabilitě strukturních domén nejevř jako vhodný antigen pro testování široké škály obratlovců jedinou cross-reaktivnř protilátkou. Jeř užitř jako hematologického markeru pro stanovenř kondičnř stavů u blřzce přřbuznřch druhů živočichů by vřak mohlo břit efektivnř. Aplikace podobného přřstupu je ale podmřněna dalřřm studiem mezidruhové a vnitrodruhové variability genu *PTPRC*.

## 9 Seznam literatury:

- Akbar, A. N., L. Terry, A. Timms, P. C. Beverley, and G. Janossy. 1988. "Loss of CD45R and Gain of UCHL1 Reactivity Is a Feature of Primed T Cells." *The Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 140 (7): 2171–78.
- Aken, Bronwen L., Sarah Ayling, Daniel Barrell, Laura Clarke, Valery Curwen, Susan Fairley, Julio Fernandez Banet, et al. 2016. "The Ensembl Gene Annotation System." Database 2016 (January). doi:10.1093/database/baw093.
- Aydin, Mustafa, Sumeyye Barut, H. Handan Akbulut, Sit Ucar, and Aysen Orman. 2017. "Application of Flow Cytometry in the Early Diagnosis of Neonatal Sepsis." *Annals of Clinical and Laboratory Science* 47 (2): 184–90.
- Ballingall, K. T., L. Waibochi, E. C. Holmes, C. H. Woelk, N. D. MacHugh, V. Lutje, and D. J. McKeever. 2001. "The CD45 Locus in Cattle: Allelic Polymorphism and Evidence for Exceptional Positive Natural Selection." *Immunogenetics* 52 (3–4): 276–83.
- Barclay, A. N., D. I. Jackson, A. C. Willis, and A. F. Williams. 1987. "Lymphocyte Specific Heterogeneity in the Rat Leucocyte Common Antigen (T200) Is due to Differences in Polypeptide Sequences near the NH<sub>2</sub>-Terminus." *The EMBO Journal* 6 (5): 1259–64.
- Barritt, Laura C., and James B. Turpen. 1995. "Characterization of Lineage Restricted Forms of a Xenopus CD45 Homologue." *Developmental & Comparative Immunology* 19 (6): 525–36. doi:10.1016/0145-305X(95)00031-N.
- Beverley, P. C. 1992. "Functional Analysis of Human T Cell Subsets Defined by CD45 Isoform Expression." *Seminars in Immunology* 4 (1): 35–41.
- Bílková, Barbora, Zuzana Bainová, Jozef Janda, Lukáš Zita, and Michal Vinkler. 2017. "Different Breeds, Different Blood: Cytometric Analysis of Whole Blood Cellular Composition in Chicken Breeds." *Veterinary Immunology and Immunopathology* 188 (June): 71–77. doi:10.1016/j.vetimm.2017.05.001.
- Boumsell, L. 1996. "The International Workshops and Conferences on Human Leukocyte Differentiation Antigens: Birth, Current Status and Future." *Tissue Antigens* 48 (4): 238–41. doi:10.1111/j.1399-0039.1996.tb02641.x.
- Boxall, Sally, Tara Stanton, Kouzo Hirai, Victoria Ward, Tomoyo Yasui, Hideki Tahara, Akihiro Tamori, et al. 2004. "Disease Associations and Altered Immune Function in CD45 138G Variant Carriers." *Human Molecular Genetics* 13 (20): 2377–84. doi:10.1093/hmg/ddh276.
- Braylan, R. C., A. Orfao, M. J. Borowitz, and B. H. Davis. 2001. "Optimal Number of Reagents Required to Evaluate Hematolymphoid Neoplasias: Results of an International Consensus Meeting." *Cytometry* 46 (1): 23–27.
- Chang, H. L., L. Lefrancois, M. H. Zaroukian, and W. J. Esselman. 1991. "Developmental Expression of CD45 Alternate Exons in Murine T Cells. Evidence of Additional Alternate Exon Use." *The Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 147 (5): 1687–93.
- "CD45 Characterization & Isoforms." Bio-Rad. [online] [cit. 2017-17-07] Dostupné z: <https://www.bio-rad-antibodies.com/cd45-characterization-isoforms-structure-function-antibodies-minireview.html>.
- Delpont, Wayne, Art F. Y. Poon, Simon D. W. Frost, and Sergei L. Kosakovsky Pond. 2010. "Datamonkey 2010: A Suite of Phylogenetic Analysis Tools for Evolutionary Biology." *Bioinformatics* 26 (19): 2455–57. doi:10.1093/bioinformatics/btq429.
- Díaz del Pozo, E., P. C. Beverley, and M. Timón. 2000. "Genomic Structure and Sequence of the Leukocyte Common Antigen (CD45) from the Pufferfish *Fugu rubripes* and Comparison with Its Mammalian Homologue." *Immunogenetics* 51 (10): 838–46.
- Dominici, M., K. Le Blanc, I. Mueller, I. Slaper-Cortenbach, Fc Marini, Ds Krause, Rj Deans, A. Keating, Dj Prockop, and Em Horwitz. 2006. "Minimal Criteria for Defining Multipotent Mesenchymal

- Stromal Cells. The International Society for Cellular Therapy Position Statement." *Cytotherapy* 8 (4): 315–17. doi:10.1080/14653240600855905.
- D’Oro, U., K. Sakaguchi, E. Appella, and J. D. Ashwell. 1996. "Mutational Analysis of Lck in CD45-Negative T Cells: Dominant Role of Tyrosine 394 Phosphorylation in Kinase Activity." *Molecular and Cellular Biology* 16 (9): 4996–5003.
- Dowding, A. J. 1992. "FL.1, an Anti-Fish Leukocyte mAb, Reacts with CD45 in Oreochromine Fish." *Biochemical Society Transactions* 20 (4): 350S.
- Engel, Pablo, Laurence Boumsell, Robert Balderas, Armand Bensussan, Valter Gattei, Vaclav Horejsi, Bo-Quan Jin, et al. 2015. "CD Nomenclature 2015: Human Leukocyte Differentiation Antigen Workshops as a Driving Force in Immunology." *The Journal of Immunology* 195 (10): 4555–63. doi:10.4049/jimmunol.1502033.
- Fang, K. S., K. Barker, M. Sudol, and H. Hanafusa. 1994. "A Transmembrane Protein-Tyrosine Phosphatase Contains Spectrin-like Repeats in Its Extracellular Domain." *The Journal of Biological Chemistry* 269 (19): 14056–63.
- Felberg, Jackie, and Pauline Johnson. 2000. "Stable Interdomain Interaction within the Cytoplasmic Domain of CD45 Increases Enzyme Stability." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 271 (2): 292–98. doi:10.1006/bbrc.2000.2623.
- Fernandez-Luna, J. L., R. J. Matthews, B. H. Brownstein, R. D. Schreiber, and M. L. Thomas. 1991. "Characterization and Expression of the Human Leukocyte-Common Antigen (CD45) Gene Contained in Yeast Artificial Chromosomes." *Genomics* 10 (3): 756–64.
- Filip, L. C., and N. I. Mundy. 2004. "Rapid Evolution by Positive Darwinian Selection in the Extracellular Domain of the Abundant Lymphocyte Protein CD45 in Primates." *Molecular Biology and Evolution* 21 (8): 1504–11. doi:10.1093/molbev/msh111.
- Furukawa, T., M. Itoh, N. X. Krueger, M. Streuli, and H. Saito. 1994. "Specific Interaction of the CD45 Protein-Tyrosine Phosphatase with Tyrosine-Phosphorylated CD3 Zeta Chain." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91 (23): 10928–32.
- Gabaev, Ildar, Lars Steinbrück, Claudia Pokoyski, Andreas Pich, Richard J. Stanton, Reinhard Schwinzer, Thomas F. Schulz, Roland Jacobs, Martin Messerle, and Penelope C. Kay-Fedorov. 2011. "The Human Cytomegalovirus UL11 Protein Interacts with the Receptor Tyrosine Phosphatase CD45, Resulting in Functional Paralysis of T Cells." *PLOS Pathogens* 7 (12): e1002432. doi:10.1371/journal.ppat.1002432.
- Hall, L. R., M. Streuli, S. F. Schlossman, and H. Saito. 1988. "Complete Exon-Intron Organization of the Human Leukocyte Common Antigen (CD45) Gene." *The Journal of Immunology* 141 (8): 2781–87.
- Herold, C., A. Elhabazi, G. Bismuth, A. Bensussan, and L. Boumsell. 1996. "CD100 Is Associated with CD45 at the Surface of Human T Lymphocytes. Role in T Cell Homotypic Adhesion." *The Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 157 (12): 5262–68.
- Holmes, Nick. 2006. "CD45: All Is Not yet Crystal Clear." *Immunology* 117 (2): 145–55. doi:10.1111/j.1365-2567.2005.02265.x.
- Hořejší, Václav. *Základy imunologie*. 5. vyd. Praha: Triton, 2013. ISBN 978-80-7387-713-2.
- Hughes, A. L. 1997. "Rapid Evolution of Immunoglobulin Superfamily C2 Domains Expressed in Immune System Cells." *Molecular Biology and Evolution* 14 (1): 1–5.
- Hurley, T. R., R. Hyman, and B. M. Sefton. 1993. "Differential Effects of Expression of the CD45 Tyrosine Protein Phosphatase on the Tyrosine Phosphorylation of the Lck, Fyn, and c-Src Tyrosine Protein Kinases." *Molecular and Cellular Biology* 13 (3): 1651–56. doi:10.1128/MCB.13.3.1651.
- Im, Se Pyeong, Jung Seok Lee, Si Won Kim, Jong Earn Yu, Young Rim Kim, Jaesung Kim, Jeong-Ho Lee, and Tae Sung Jung. 2016. "Investigation of Variable Lymphocyte Receptors in the Alternative Adaptive Immune Response of Hagfish." *Developmental and Comparative Immunology* 55 (February): 203–10. doi:10.1016/j.dci.2015.10.001.

- Irie-Sasaki, Junko, Takehiko Sasaki, Wataru Matsumoto, Anne Opavsky, Mary Cheng, Grant Welstead, Emily Griffiths, et al. 2001. "CD45 Is a JAK Phosphatase and Negatively Regulates Cytokine Receptor Signalling." *Nature* 409 (6818): 349–54. doi:10.1038/35053086.
- Irlles, Claudine, Antony Symons, Frédérique Michel, Talitha R. Bakker, P. Anton van der Merwe, and Oreste Acuto. 2003. "CD45 Ectodomain Controls Interaction with GEMs and Lck Activity for Optimal TCR Signaling." *Nature Immunology* 4 (2): 189–97. doi:10.1038/ni877.
- Jacobsen, M., D. Schweer, A. Ziegler, R. Gaber, S. Schock, R. Schwitzer, K. Wonigeit, et al. 2000. "A Point Mutation in PTPRC Is Associated with the Development of Multiple Sclerosis." *Nature Genetics* 26 (4): 495–99. doi:10.1038/82659.
- Jeurissen, S. H. M., and E. M. Janse. 1998. "The Use of Chicken-specific Antibodies in Veterinary Research Involving Three Other Avian Species." *Veterinary Quarterly* 20 (4): 140–43. doi:10.1080/01652176.1998.9694859.
- Kashio, Nobuyuki, Wataru Matsumoto, Sirlester Parker, and David M. Rothstein. 1998. "The Second Domain of the CD45 Protein Tyrosine Phosphatase Is Critical for Interleukin-2 Secretion and Substrate Recruitment of TCR- $\zeta$  in Vivo." *Journal of Biological Chemistry* 273 (50): 33856–63. doi:10.1074/jbc.273.50.33856.
- Kearse, Matthew, Richard Moir, Amy Wilson, Steven Stones-Havas, Matthew Cheung, Shane Sturrock, Simon Buxton, et al. 2012. "Geneious Basic: An Integrated and Extendable Desktop Software Platform for the Organization and Analysis of Sequence Data." *Bioinformatics* (Oxford, England) 28 (12): 1647–49. doi:10.1093/bioinformatics/bts199.
- Kountikov, E., M. Wilson, N. Miller, W. Clem, and E. Bengten. 2004. "Organization and Expression of Thirteen Alternatively Spliced Exons in Catfish CD45 Homologs." *Developmental and Comparative Immunology* 28 (10): 1023–35. doi:10.1016/j.dci.2004.04.004.
- Krzywinska, Ewelina, Amelie Cornillon, Nerea Allende-Vega, Dang-Nghiem Vo, Celine Rene, Zhao-Yang Lu, Christine Pasero, et al. 2016. "CD45 Isoform Profile Identifies Natural Killer (NK) Subsets with Differential Activity." *PLoS One* 11 (4): e0150434. doi:10.1371/journal.pone.0150434.
- Leitenberg, David, Rustom Falahati, Dan Dan Lu, and Akiko Takeda. 2007. "CD45-Associated Protein Promotes the Response of Primary CD4 T Cells to Low-Potency T-Cell Receptor (TCR) Stimulation and Facilitates CD45 Association with CD3/TCR and Lck." *Immunology* 121 (4): 545–54. doi:10.1111/j.1365-2567.2007.02602.x.
- Liu, Weihong, Amy L. Putnam, Zhou Xu-yu, Gregory L. Szot, Michael R. Lee, Shirley Zhu, Peter A. Gottlieb, et al. 2006. "CD127 Expression Inversely Correlates with FoxP3 and Suppressive Function of Human CD4+ T Reg Cells." *Journal of Experimental Medicine* 203 (7): 1701–11. doi:10.1084/jem.20060772.
- Maddox, J F, C R Mackay, and M R Brandon. 1985. "The Sheep Analogue of Leucocyte Common Antigen (LCA)." *Immunology* 55 (2): 347–53.
- Majeti, R., A. M. Bilwes, J. P. Noel, T. Hunter, and A. Weiss. 1998. "Dimerization-Induced Inhibition of Receptor Protein Tyrosine Phosphatase Function through an Inhibitory Wedge." *Science* 279 (5347): 88–91. doi:10.1126/science.279.5347.88.
- Miceli, M. C., and J. R. Parnes. 1991. "The Roles of CD4 and CD8 in T Cell Activation." *Seminars in Immunology* 3 (3): 133–41.
- Miterski, Bianca, Eckhart Sindern, Michael Haupts, Sebastian Schimrigk, and Joerg T. Epplen. 2002. "PTPRC(CD45) Is Not Associated with Multiple Sclerosis in a Large Cohort of German Patients." *BMC Medical Genetics* 3: 3. doi:10.1186/1471-2350-3-3.
- Montoya, G.e., J-P. Vernot, and M.e. Patarroyo. 2004. "Comparative Analysis of CD45 Proteins in Primate Context: Owl Monkeys vs Humans." *Tissue Antigens* 64 (2): 165–72. doi:10.1111/j.0001-2815.2004.00279.x.
- Mota, Javier, and Rebeca Rico-Hesse. 2009. "Humanized Mice Show Clinical Signs of Dengue Fever according to Infecting Virus Genotype." *Journal of Virology* 83 (17): 8638–45. doi:10.1128/JVI.00581-09.

- Mustelin, Tomas, Souad Rahmouni, Nunzio Bottini, and Andres Alonso. 2003. "Role of Protein Tyrosine Phosphatases in T Cell Activation." *Immunological Reviews* 191 (1): 139–47. doi:10.1034/j.1600-065X.2003.00014.x.
- Nagata, Taeko, Takashi Suzuki, Yuko Ohta, Martin F. Flajnik, and Masanori Kasahara. 2002. "The Leukocyte Common Antigen (CD45) of the Pacific Hagfish, *Eptatretus Stoutii*: Implications for the Primordial Function of CD45." *Immunogenetics* 54 (4): 286–91. doi:10.1007/s00251-002-0469-1.
- Nam, Hyun-Joo, Florence Poy, Haruo Saito, and Christin A. Frederick. 2005. "Structural Basis for the Function and Regulation of the Receptor Protein Tyrosine Phosphatase CD45." *The Journal of Experimental Medicine* 201 (3): 441–52. doi:10.1084/jem.20041890.
- Okumura, M., R. J. Matthews, B. Robb, G. W. Litman, P. Bork, and M. L. Thomas. 1996. "Comparison of CD45 Extracellular Domain Sequences from Divergent Vertebrate Species Suggests the Conservation of Three Fibronectin Type III Domains." *The Journal of Immunology* 157 (4): 1569–75.
- Osada, Naoki, Jun Kusuda, Makoto Hirata, Reiko Tanuma, Munetomo Hida, Sumio Sugano, Momoki Hirai, and Katsuyuki Hashimoto. 2002. "Search for Genes Positively Selected during Primate Evolution by 5'-end-Sequence Screening of *Cynomolgus* Monkey cDNAs." *Genomics* 79 (5): 657–62. doi:10.1006/geno.2002.6753.
- Ostergaard, H L, D A Shackelford, T R Hurley, P Johnson, R Hyman, B M Sefton, and I S Trowbridge. 1989. "Expression of CD45 Alters Phosphorylation of the Lck-Encoded Tyrosine Protein Kinase in Murine Lymphoma T-Cell Lines." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 86 (22): 8959–63.
- Petricoin, E. F., S. Ito, B. L. Williams, S. Audet, L. F. Stancato, A. Gamero, K. Clouse, et al. 1997. "Antiproliferative Action of Interferon-Alpha Requires Components of T-Cell-Receptor Signalling." *Nature* 390 (6660): 629–32. doi:10.1038/37648.
- R Development Core Team. 2017. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0,[cit. 2017-29-07] Dostupné z: <http://www.R-project.org>.
- Rothstein, D. M., H. Saito, M. Streuli, S. F. Schlossman, and C. Morimoto. 1992. "The Alternative Splicing of the CD45 Tyrosine Phosphatase Is Controlled by Negative Regulatory Trans-Acting Splicing Factors." *The Journal of Biological Chemistry* 267 (10): 7139–47.
- Saalmüller, Armin, Joan K. Lunney, Claudia Daubenberger, William Davis, Uwe Fischer, Thomas W. Göbel, Phil Griebel, et al. 2005. "Summary of the Animal Homologue Section of H LDA8." *Cellular Immunology*, The 8th International Workshop on Human Leucocyte Differentiation Antigens, Adelaide, Australia 12-16 December 2004, 236 (1–2): 51–58. doi:10.1016/j.cellimm.2005.08.009.
- Saga, Y., J. S. Tung, F. W. Shen, and E. A. Boyse. 1986. "Sequences of Ly-5 cDNA: Isoform-Related Diversity of Ly-5 mRNA." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 83 (18): 6940–44.
- Saga, Y., J. S. Tung, F. W. Shen, T. C. Pancoast, and E. A. Boyse. 1988. "Organization of the Ly-5 Gene." *Molecular and Cellular Biology* 8 (11): 4889–95.
- Sakabe, Tomohiko, Junya Azumi, Tomohiro Haruki, Yoshihisa Umekita, Hiroshige Nakamura, and Goshi Shiota. 2017. "CD117 Expression Is a Predictive Marker for Poor Prognosis in Patients with Non-Small Cell Lung Cancer." *Oncology Letters* 13 (5): 3703–8. doi:10.3892/ol.2017.5925.
- Sawyer, Sara L., Lily I. Wu, Michael Emerman, and Harmit S. Malik. 2005. "Positive Selection of Primate TRIM5 $\alpha$  Identifies a Critical Species-Specific Retroviral Restriction Domain." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102 (8): 2832–37. doi:10.1073/pnas.0409853102.
- Schraven, B., D. Schoenhaut, E. Bruyns, G. Koretzky, C. Eckerskorn, R. Wallich, H. Kirchgessner, P. Sakorafas, B. Labkovsky, and S. Ratnofsky. 1994. "LPAP, a Novel 32-kDa Phosphoprotein That

- Interacts with CD45 in Human Lymphocytes." *Journal of Biological Chemistry* 269 (46): 29102–11.
- Schultz, J., R. R. Copley, T. Doerks, C. P. Ponting, and P. Bork. 2000. "SMART: A Web-Based Tool for the Study of Genetically Mobile Domains." *Nucleic Acids Research* 28 (1): 231–34.
- Shenoi, H., J. Seavitt, A. Zheleznyak, M. L. Thomas, and E. J. Brown. 1999. "Regulation of Integrin-Mediated T Cell Adhesion by the Transmembrane Protein Tyrosine Phosphatase CD45." *The Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 162 (12): 7120–27.
- Shin, Hyang-Mi, Woon-Dong Cho, Geon-Kook Lee, Seon-Hwa Lee, Kyung-Mee Lee, Gil-Yong Ji, Sang-Soon Yoon, et al. 2011. "Characterization of Monoclonal Antibodies against Human Leukocyte Common Antigen (CD45)." *Immune Network* 11 (2): 114–22. doi:10.4110/in.2011.11.2.114.
- Shintani, Seikou, Janos Terzic, Akie Sato, Mirna Saraga-Babic, Colm O'hUigin, Herbert Tichy, and Jan Klein. 2000. "Do Lampreys Have Lymphocytes? The Spi Evidence." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 97 (13): 7417–22. doi:10.1073/pnas.110505597.
- Stone, J. D., L. A. Conroy, K. F. Byth, R. A. Hederer, S. Howlett, Y. Takemoto, N. Holmes, and D. R. Alexander. 1997. "Aberrant TCR-Mediated Signaling in CD45-Null Thymocytes Involves Dysfunctional Regulation of Lck, Fyn, TCR-Zeta, and ZAP-70." *The Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 158 (12): 5773–82.
- Streuli, M., L. R. Hall, Y. Saga, S. F. Schlossman, and H. Saito. 1987. "Differential Usage of Three Exons Generates at Least Five Different mRNAs Encoding Human Leukocyte Common Antigens." *The Journal of Experimental Medicine* 166 (5): 1548–66.
- Streuli, M., T. Matsuyama, C. Morimoto, S. F. Schlossman, and H. Saito. 1987. "Identification of the Sequence Required for Expression of the 2H4 Epitope on the Human Leukocyte Common Antigens." *The Journal of Experimental Medicine* 166 (5): 1567–72.
- Symons, A., A. C. Willis, and A. N. Barclay. 1999. "Domain Organization of the Extracellular Region of CD45." *Protein Engineering* 12 (10): 885–92.
- Tonks, N. K., H. Charbonneau, C. D. Diltz, E. H. Fischer, and K. A. Walsh. 1988. "Demonstration That the Leukocyte Common Antigen CD45 Is a Protein Tyrosine Phosphatase." *Biochemistry* 27 (24): 8695–8701.
- Uinuk-ool, T., N. Nikolaidis, A. Sato, W. E. Mayer, and J. Klein. 2005. "Organization, Alternative Splicing, Polymorphism, and Phylogenetic Position of Lamprey CD45 Gene." *Immunogenetics* 57 (8): 607–17. doi:10.1007/s00251-005-0019-8.
- Uinuk-Ool, Tatiana, Werner E. Mayer, Akie Sato, Roman Dongak, Max D. Cooper, and Jan Klein. 2002. "Lamprey Lymphocyte-like Cells Express Homologs of Genes Involved in Immunologically Relevant Activities of Mammalian Lymphocytes." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99 (22): 14356–61. doi:10.1073/pnas.212527699.
- Virts, E, D Barritt, and W. C Raschke. 1998. "Expression of CD45 Isoforms Lacking Exons 7, 8 and 10." *Molecular Immunology* 35 (3): 167–76. doi:10.1016/S0161-5890(98)00025-X.
- Xu, Zheng, and Arthur Weiss. 2002. "Negative Regulation of CD45 by Differential Homodimerization of the Alternatively Spliced Isoforms." *Nature Immunology* 3 (8): 764–71. doi:10.1038/ni822.
- Yanagi, S., H. Sugawara, M. Kurosaki, H. Sabe, H. Yamamura, and T. Kurosaki. 1996. "CD45 Modulates Phosphorylation of Both Autophosphorylation and Negative Regulatory Tyrosines of Lyn in B Cells." *The Journal of Biological Chemistry* 271 (48): 30487–92.
- Zhao, Yuliang, Mo Li, Yanfeng Sun, Wei Wu, Guanqun Kou, Lingling Guo, Danning Xing, Yuefeng Wu, Dongming Li, and Baohua Zhao. 2017. "Life-History Dependent Relationships between Body Condition and Immunity, between Immunity Indices in Male Eurasian Tree Sparrows." *Comparative Biochemistry and Physiology. Part A, Molecular & Integrative Physiology* 210 (August): 7–13. doi:10.1016/j.cbpa.2017.05.004.
- Zikherman, Julie, Kristin Doan, Ramya Parameswaran, William Raschke, and Arthur Weiss. 2012. "Quantitative Differences in CD45 Expression Unmask Functions for CD45 in B-Cell Development, Tolerance, and Survival." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109 (1): E3–12. doi:10.1073/pnas.1117374108.

Zikherman, Julie, and Arthur Weiss. 2009. "Antigen Receptor Signaling in the Rheumatic Diseases." *Arthritis Research & Therapy* 11 (1): 202. doi:10.1186/ar2528.

Vysvětlivka: Podtržení označuje review.

### **Zdroje obrazových příloh:**

- Obr. 1: Penninger, J. M., J. Irie-Sasaki, T. Sasaki, and A. J. Oliveira-dos-Santos. 2001. "CD45: New Jobs for an Old Acquaintance." *Nature Immunology* 2 (5): 389–96. doi:10.1038/87687.
- Obr. 3: Shin, Hyang-Mi, Woon-Dong Cho, Geon-Kook Lee, Seon-Hwa Lee, Kyung-Mee Lee, Gil-Yong Ji, Sang-Soon Yoon, et al. 2011. "Characterization of Monoclonal Antibodies against Human Leukocyte Common Antigen (CD45)." *Immune Network* 11 (2): 114–22. doi:10.4110/in.2011.11.2.114.
- Obr. 4: Zikherman, Julie, and Arthur Weiss. 2009. "Antigen Receptor Signaling in the Rheumatic Diseases." *Arthritis Research & Therapy* 11 (1): 202. doi:10.1186/ar2528.
- Obr. 5: Zikherman, Julie, and Arthur Weiss. 2009. "Antigen Receptor Signaling in the Rheumatic Diseases." *Arthritis Research & Therapy* 11 (1): 202. doi:10.1186/ar2528.