

Eritrosit Membranından NAD⁺ Glikohidrolaz Enziminin Saflaştırılması

Purification of NAD⁺ Glycohydrolase Enzyme from Erythrocyte Membrane

Dr. Özlem COŞKUN,^a
Dr. Rüstem NURTEN^b

^aBiyofizik AD,
Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi
Tıp Fakültesi, Çanakkale

^bBiyofizik AD,
İstanbul Üniversitesi
İstanbul Tıp Fakültesi, İstanbul

Geliş Tarihi/Received: 12.05.2010
Kabul Tarihi/Accepted: 05.11.2010

Yazışma Adresi/Correspondence:
Dr. Özlem COŞKUN
Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi
Tıp Fakültesi,
Biyofizik AD, Çanakkale,
TÜRKİYE/TURKEY
ozlemcd38@hotmail.com

ÖZET Amaç: Bu çalışmada, Lenfosit farklılaşması ve aktifleşmesinde rol oynayan, eritrosit membranında da bulunan CD38 yüzey antijeninin sahip olduğu eritrosit membranına bağlı NAD⁺ glikohidrolaz enziminin saflaştırılması amaçlanmıştır. Saflaştırılan enzimin CD38'in dolayısıyla hematopoetik hücrelerin olgunlaşma, yaşlanma ve yıkım sürecine ve bu süreçler üzerinde etkili olan patolojik gelişmelere ışık tutacağı düşünülmüştür. **Gereç ve Yöntemler:** Enzim; sağlıklı bireylerden alınan heparinli kan örneklerinden elde edilen eritrosit posasından (ghost) çözündürülen protein kesiminin sırasıyla hidroksil apatit, moleküler elek kromatografisi (sephadex G-100), Cu⁺⁺ bağımlı iminodiasetik asit (IDA), kromatografisi, oktil agaroz, DEAE selüloz kolon kromatografisi aşamalarından geçirilmesi ile saflaştırıldı. **Bulgular:** Saflaştırma işlemleri sonrası yapılan SDS-PAGE analizinde 45.000 Dalton molekül ağırlığına sahip bir protein bandı elde edildi. **Sonuç:** Membrana bağlı NAD⁺ glikohidrolaz (ekto-NADaz) etkinliği, saflaştırma işlemleri sonrası başlangıç membran posası verimine oranla 257 kat artmış olarak elde edildi. Saflaştırma veriminin %1.4 olduğu belirlendi.

Anahtar Kelimeler: CD38 antijenleri; CD38 proteini; NAD⁺ nükleozidaz

ABSTRACT Objective: In this study our object was the purification of the erythrocyte membrane bound NAD glycohydrolase of the CD38 surface antigen that is involved in the lymphocyte differentiation and activation and is also found on the erythrocyte membrane. We think that the purification of the enzyme will elucidate the structure and the activity of the CD38 and consequently the maturation, aging and death of the hemopoietic cells and the pathologic mechanisms involved in this process. **Material and Methods:** Fresh blood samples from the healthy individuals were obtained by anticoagulated with heparin. Solubilized erythrocyte ghosts were purified utilizing hydroxylapatite resin, Sephadex G-100 (gel filtration chromatography), Cu⁺⁺-bound IDA (iminodiacetic acid), chromatography, octyl agarose, DEAE cellulose column chromatography steps, respectively. **Results:** A protein band with a molecular weight 45 000 Dalton was obtained in the SDS-PAGE analysis after the purification. **Conclusion:** Membrane bound NAD⁺ glycohydrolase activity after purification was found 257 times higher than the initial erythrocyte ghost yield. The yield of the purification was 1.4%.

Key Words: Antigens, CD38; CD38 protein; NAD⁺ nucleosidase

Türkiye Klinikleri J Cardiovasc Sci 2010;22(3):318-23

NAD⁺ glikohidrolaz, NAD⁺'nin nikotinamid ve ADP-riboza hidrolizini katalizleyen bir enzimdir.¹ Ökaryotlarda NAD⁺ glikohidrolaz enzim sınıfının çoğu temsilcisinin membrana bağlı olduğu, bazılarının ise hücre membranının dış yüzeyinde yer aldığı görülür.² Bu tür ekto-NAD⁺ glikohidrolaz enzimleri arasında öne çıkan CD38 uzun yıllar insan

lenfosit yüzey antijenlerinin bir temsilcisi olarak tanınmıştır. Ancak, 1990'lı yıllarda *Aplysia californica* siklik ADP-riboz (cADP-riboz) sentetaz enzimi ile CD38 yüzey antijeninin birincil yapıları arasında saptanan büyük benzerlik üzerine başlatılan çalışmalar CD38' inde cADP-riboz sentetaz, ayrıca cADP-riboz hidrolaz ve NAD⁺ glikohidrolaz etkinliklerine sahip olduğunu ortaya koymuştur.³ CD38, bunun ötesinde, memelilerdeki başlıca NAD⁺ glikohidrolaz olarak belirlenmiş ve değişik dokulardaki NAD⁺ glikohidrolaz etkinliğinin başlıca sorumlusu olduğu gösterilmiştir.^{4,5}

CD38'in enzimatik etkinliklerinin ekto-konumu, hücre dışında oluşan bir ürünün hücre içindeki olası (Ca²⁺'un açığa çıkması) bağlamında ortaya çıkan ikileminin açıklanmasını gerektirmektedir.⁶ Yürütülen yoğun çalışmalara karşın CD38'in ve taşıdığı enzimatik etkinliklerin fizyolojik anlamı da günümüze dek açıklığa kavuşmamıştır. Bununla birlikte, CD38'in, özellikle kan hücrelerinin, kemik iliğindeki öncüllerinden olgun biçimlerine dönüşme sürecinde anlatım bulunan, hücre farklılaşması ve gelişmesinde önemli rol oynayan, bu sürecin belirli ayırımlarının belirteci niteliğinde bir protein olduğu düşünülmektedir.⁷ İnsan, fare ve sıçan CD38 proteinleri deniz kestanesi (*Aplysia*) siklazı ile aynı enzimsel etkinliğe sahip olmakla birlikte bu etkinlik bu membran proteinlerinin hücre dışı bölümünde bulunmaktadır.^{8,9} CD38 proteininin ekto-enzim niteliği hücre dışında oluşan bir substratın hücre içinde hangi mekanizmayla etkisini gösterdiği sorusunu gündeme getirmiştir. Bu konuya açıklık getirmek için hücre dışında açığa çıkan cADP'nin membranda iki CD38 molekülünün aralarında oluşturduğu bir kanal üzerinden hücre içine taşınmasını; henüz tanımlanmamış bazı ligantların bağlanmasıyla CD38'in kendisinin hücre içine alınmasını; ya da bu ligantların CD38 bağlanmasıyla bir sinyal iletim yolağını aktifleştirmesini öngören modeller geliştirilmiştir.^{10,11}

GEREÇ VE YÖNTEMLER

Bu çalışma; İstanbul Üniversitesi Rektörlüğü Araştırma Yürütücü sekreterliği tarafından T-1157/18062001 sayılı proje kapsamında etik kurul onayı alınarak gerçekleştirilmiştir.

ERİTROSİT MEMBRAN POSASI ("GHOST") ELDESİ

Sağlıklı bireylerden alınan antikoagülanlı (heparin) kan örnekleri Hettich 32R model santrifüj aletinde 3000 devir/dakika hızında 5 dakika süreyle santrifüjlendikten sonra eritrosit çökeltisi %0.9'luk NaCl içine alındı ve yeniden 3000 devir/dakika hızında 10 dakika santrifüjlendi. Santrifüj sonrası üst sıvı uzaklaştırıldı. Eritrosit çökeltisi 5 mM Na-fosfat tamponu pH: 7.4 ile en az 5 kez tekrarlanan santrifüjleme işlemleriyle (beyaz oluncaya kadar) yıkandı.¹²

ERİTROSİT MEMBRAN POSASINDAKİ NAD⁺ GLİKOHİDROLAZ ETKİNLİĞİNİN SAPTANMASI

NAD⁺ glikohidrolaz etkinliği [¹⁴C] NAD⁺ den [Karbonil-¹⁴C] Nikotinamidin ayrılmasını sağlayan Bio-rad AG 1X4 iyon değiştirici kromatografisi yoluyla belirlendi. Tepkime, 12 ml örnek (serum, membran posası ya da saflaştırılmış kesim), 7ml karışım (10 mM NaCl, 500 mM ZnCl₂, 50 mM CaCl₂, 20 mM Tris-HCl pH: 9.0), 5 mM [¹⁴C] NAD (35 mCi/mmol) içeren toplam 20 ml hacimde 37 °C'de 30 dakika bekletilerek gerçekleştirildi. Tepkime 1 ml %0.1'lik SDS ile durdurulduktan sonra tepkime karışımı Tampon A (20 mM HEPES, %0.1 Triton-X pH: 7.2) ile dengelenmiş AG 1X4 anyon değiştirici kolonuna (0.4 ml) uygulandı. Örneklerin kolona uygulanmasından sonra, kolondan 3 ml damıtık H₂O geçirilerek [¹⁴C] nikotinamid kesimi elde edildi. Kolonda bağlı kalan ve [¹⁴C] NAD kesimine karşılık gelen radyoaktivite 0.5 M NaCl ile yıkandı.¹³ Cam tüplerde ayrı ayrı toplanan kesimlerden alınan 0.5 ml örneklerin radyoaktivite içeriği Bray (4 g PPO, 0.2 g POPOP, 50 g naftalin, 100 ml metanol, etilen glikol 20 ml, 1.4 dioksan ile 1000 ml'ye tamanlanır) eriyiği içine alınarak sıvı sintilasyon sayacında belirlendi.

Deneyde pozitif kontrol olarak saflaştırılan kesimler yerine ticari NADaz kullanıldı. Negatif kontrol ise [¹⁴C] NAD'nin yalnızca tampon A içinde AG 1X4 kolonu uygulamasıyla gerçekleştirildi. Kolon 0.5 M NaCl ile yıkanıp tampon A ile dengelenerek yeniden kullanılabilir duruma getirildi.

ERİTROSİT MEMBRAN POSASINDAKİ NAD⁺ GLİKOHİDROLAZ ENZİMİNİN WESTERN EMDİRİM YÖNTEMİYLE SAPTANMASI

Saflaştırma aşamalarında NAD⁺ glikohidrolaz etkinliği yüksek bulunan kesimler standart protein-

lerle birlikte çift taraflı SDS-PAGE (Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektrofrezine) uygulandı.¹⁴ Elektrofrez işlemi sonrası bir jel örneği boyandı. Diğer boyanmamış jel, nitroselüloz membran ve 3MM Whatman filtre kağıtları arasına yerleştirildi. Oluşturulan sandviç düzeneğe aktarım tamponu (5.8 g Tris, 29 g glisin, 1 g SDS, 200 ml metanol, damıtık su ile 1000 ml'ye tamamlanır) ile doldurulmuş tankta (transblot) 63 volt gerilimde 16 saat süreyle aktarım işlemi gerçekleştirildi. Aktarımdan sonra nitroselüloz membran, özgün olmayan bağlanmaları önlemek için %0.5 BSA içeren Tris tamponlu tuz çözeltisi (TBST) ile oda sıcaklığında 2 saat çalkalanarak doyuruldu. Membran, TBST çözeltisi ile iki kez yıkandıktan sonra monoklonal anti-CD38 antikoru içeren üst sıvı ile oda sıcaklığında bir saat çalkalandı. Membran TBST çözeltisi ile üç kez yıkandı. Alkalen fosfataza bağlı fare Ig-karşıtı immünglobulin 500 kez sulandırılarak ortama eklendikten sonra membran bir saat oda sıcaklığında çalkalanarak bekletildi. Tekrar TBST çözeltisi ile üç kez yıkandı. Alkalen fosfataz substratı BCIP (150 mg/ml) ve NBT (300 mg/ml) substrat tamponu içinde çözüldükten sonra membran bu ortama alınarak oda sıcaklığında, karanlıkta çalkalanarak bantların oluşması sağlandı. Membran 20 mM EDTA içine alınarak tepkime durduruldu.

ERİTROSİT POSASINDAN NAD⁺ GLİKOHİDROLAZIN (CD38'İN) SAFLAŞTIRILMASI

OH- Apatit İyon Değiştirici Kromatografisi

Eritrosit membran posası Gereç ve Yöntemler bölümünde anlatıldığı gibi elde edildi. 180 ng membran posası, 10 mM Tris-HCl pH: 6.5 ve %0.5 Triton X-100 ile dengelenmiş hidroksilapatit anyon değiştirici resin ile +4 °C'de karıştırılarak çökteltmeli yıkama (batch) yöntemiyle tabakalandırıldı. Dengeleme tamponu ile yapılan yıkama işlemi sonrası kesimler hidroksil apatit 3000 devir/dakika'da 5 dakika süreyle santrifüjlendi. Bağlanan enzimin yıkanması 50 mM KCl içeren dengeleme tamponu ile yapıldı.¹⁵ Kesimlerin spektrofotometrede A₂₈₀ değerleri ölçüldü. NAD⁺ glikohidrolaz etkinlikleri AG 1X4 anyon değiştirici reçine kullanılarak belirlendi. NAD⁺ glikohidrolaz etkinliğinin büyük öl-

çüde tuz ile yıkanan kesimde olduğu görüldü. Etkin kesimler birleştirilerek gece boyu +4 °C'de 10 mM Tris-HCl pH: 7.4'e karşı diyalizlendi.

Cu²⁺-bağlı İminodiasetik Asit Kromatografisi (IDA)

NAD⁺ glikohidrolaz etkinliğinin yüksek bulunduğu G-100 kesimleri birleştirilerek Gereç ve Yöntemler bölümünde anlatıldığı gibi ön işlemler Cu²⁺-bağlı iminodiasetik asit kromatografisine uygulandı. 50 mM Na-fosfat pH: 7.4 ve 0.5 M NaCl (IDA tamponu) içeren tampon ile dengelenmiş IDA gereci örnekle +4 °C'de 1 saat karıştırıldı. Çökteltmeli yıkama yöntemi kullanılarak IDA tamponu ile yıkama işlemi yapıldı. Kolona bağlanan enzimin yıkanması (elüsyonu) 0.2 M imidazol içeren IDA tamponu ile gerçekleştirildi. Her yıkama işleminden sonra kesimler 3000 devir/dakika'da santrifüjlendi.¹⁵ Kesimlerin A₂₈₀ değerleri ve NAD⁺ glikohidrolaz etkinliği likit sintilasyon sayacı yardımıyla dakikadaki sayım (cpm) değerleri ile belirlendi. NAD⁺ glikohidrolaz etkinliğinin büyük ölçüde yıkanan kesiminde olduğu görüldü.

Moleküler Elek Kromatografisi (Sephadex G-100)

Diyalizlenen etkin kesimler Sephadex G-100 kolon (2 x 90 cm) kromatografisine uygulandı. 50 mM Tris-HCl pH: 7.4 ve 100 mM KCl içeren tampon ile yıkama yapıldı.¹⁶ Kolondan +4 °C'de 20 dakika 1 ml akış hızında 1 ml'lik kesimler toplandı. Kesimlerin A₂₈₀ değerleri ve NAD⁺ glikohidrolaz etkinlikleri belirlendi. A₂₈₀ tepesinde özgün etkinlik düşük bulunurken, yüksek özgün etkinlik A₂₈₀ tepesinin inene saçağında yer aldığı görüldü.

DEAE selüloz İyon Değiştirici Kromatografisi

Oktil agaroz NAD⁺ glikohidrolaz etkinliği yüksek kesimler^{10,11} birleştirilerek +4 °C'de 10 mM Tris-HCl pH: 7.4'e karşı gece boyu diyalizlendi. 10 mM Tris-HCl pH: 7.4 tamponu ile dengelenmiş DEAE selüloz anyon değiştirici kolonuna (1 x 5 cm) uygulandı. Aynı tampon ile yapılan yıkama işleminden sonra kolon 50 mM KCl ve ayrıca 150 mM KCl içeren tamponla yıkandı. 1 ml halinde toplanan kesimlerin A₂₈₀ değerleri ve NAD⁺ glikohidrolaz etkinliği (cpm) değerleri belirlendi. NAD⁺ glikohidrolaz etkinliği kolona bağlanmayan yıkama kesiminde yüksek bulundu.

Hidrofobik Etkileşim Kromatografisi

IDA kolon kromatografisi sonrası etkin kesimler birleştirilerek gece boyu +4 °C'ta 10 mM Tris-HCl pH: 7.4'e karşı diyalizlendi. 50 mM Na-fosfat pH: 7.4 tamponu ile dengelenmiş oktil agaroz kolonuna (1 x 5 cm) uygulandı. Dengeleme tamponu ile yapılan yıkama işlemi sonrası kolona bağlanan enzimin yıkanması %1 emülfojen içeren dengeleme tamponu ile yapıldı.¹⁷ Kesimlerin A₂₈₀ değerleri ve NAD⁺ glikohidrolaz etkinliği (cpm) değerleri belirlendi. NAD⁺ glikohidrolaz etkinliğinin büyük ölçüde yıkanan kesiminde olduğu görüldü.

BULGULAR

Eritrosit posası NAD⁺ glikohidrolaz enziminin saflaştırma işleminin değişik aşamalarında elde edilen kesimlerin protein içeriklerinin SDS-PAGE analizi, ikinci G-100 kromatografisi aşamasından sonraki kesimde yaklaşık 45 kDa molekül ağırlıklı bir proteinin büyük ölçüde zenginleşmiş olduğunu ortaya koydu (Şekil 1A). Eş zamanlı olarak CD38'e özgü monoklonal antikor OKT10 (anti CD38) ile yürütülen Western emdirim işlemiyle 45 kDa'luk protein bandının CD38'e karşılık geldiği bulundu (Şekil 1B).

TARTIŞMA

NAD⁺'nin ADP-riboz ve nikotin amide dönüşmesini katalizleyen NAD⁺ glikohidrolaz enzimlerinin NAD/ADP-riboz metabolizmasındaki etkileri çok uzun yıllardan beri bilinmektedir.¹⁸ Ancak, son yıl-

lardaki araştırmalarda, NAD⁺ glikohidrolazın büyük bir bölümünün ADP-ribozil siklaz etkinliği de taşıdığı gösterilmesiyle bu enzimin Ca²⁺'a bağımlı düzenleme olaylarında oynadıkları önemli rol belirginleşmiştir.¹⁹

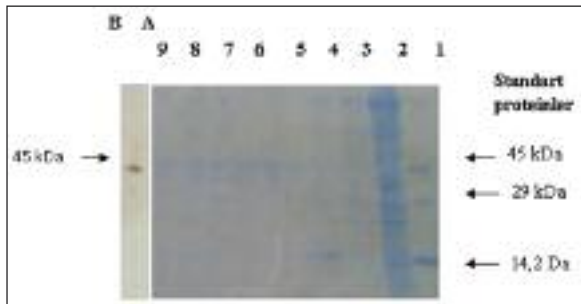
Ökaryotlarda NAD⁺ glikohidrolaz enzimi genelde membrana bağlı olarak, bazıları da hücre yüzeyinde "ekto" konumlu olarak bulunmaktadır.²⁰ Bu son sınıf NAD⁺ glikohidrolaz enzimlerinin "klasik" bir temsilcisi olan CD38, insanda önce lenfosit yüzeyinde tanımlanmıştır. CD38'in biyolojik işlevi yeterince açıklığa kavuşmamış olmakla beraber, özellikle hematopoetik sistemin çeşitli temsilcilerinin olgunlaşma süreçlerinin belirli aşamalarında anlatım bulması, bu proteinin hücre çoğalması, farklılaşması ve olgunlaşması bağlamındaki olası rollerine işaret etmektedir.^{21,22}

Daha önce yapılan çalışmalar CD38 etkinliğinin kanserli hasta eritrositlerinde ve serumlarında anlamlı olarak arttığını ortaya koymuştur.²³ Serumdaki etkinliğin serum enziminin membrana bağlı CD38'in proteolitik kırımı sonucu serumda açığa çıktığını düşündürmüştür.^{24,25} Bu bulgulara yeni açılım getirmek, özellikle CD38'in organizmadaki dönüşümüne ışık tutmak ve patolojik gelişmelerle bağlantısını açıklayabilmek için organizmada membrana bağlı NAD glikohidrolaz enziminin saflaştırılmasına çalışılmıştır.

NAD⁺ glikohidrolaz etkinliğinin eritrosit membranlarından (posa ya da "ghost" kesiminden) saflaştırılmasında kromatografik aşamalardan elde edilen profiller ve SDS-PAGE analizi sonuçlarına göre, membran enziminin (CD38) sitoplazmik ve membran içi bölümlerinin kırılmasından kaynaklanabileceği düşünülmektedir. Bu bulgulara göre CD38'in saflaştırılmış kesimlerin yardımıyla geliştirilecek test sistemlerinin, kanser gibi hücre değişimiyle bağlantılı sistemik hastalıkların tanısında ve bunlara ilişkin prognostik bilgilere ulaşılmasında yardımcı olacağı düşünülmektedir.

SONUÇ

Sephadex G-100 aşamasından sonra NAD⁺ glikohidrolaz etkinliğinin başlangıç membran kesimine oranla 257 kat artmış ve saflaşmanın %1,4 verimle gerçekleşmiş olduğu bulundu (Tablo 1).



ŞEKİL 1: A. Eritrosit membran posasından NAD⁺ glikohidrolazın saflaştırma sürecinde elde edilen %12 SDS-PAGE analizi. 1. standart proteinler (45 kDa ovalbumin, 29 kDa karbonik anhidraz, 12 kDa α-laktalbumin), 2. Eritrosit membran posası. Yapılan kromatografi işlemleri sonrası NAD⁺ glikohidrolaz enzim etkinliği yüksek saptanan kesimler: 3. OH₂ apatit, 4. G-100, 5. Boş, 6. IDA, 7. Oktil agaroz, 8. DEAE selüloz, 9. G-100 (2.).

B. Eş zamanlı olarak CD38'e özgü monoklonal OKT10 ile yürütülen Western emdirim analizi sonucu.

TABLO 1: Eritrosit membran posasından NAD⁺ glikohidrolaz enziminin saflaştırılması

| Kesim | Toplam Protein (mg) | Hacim (ml) | Toplam etkinlik (pmol) | Özgün etkinlik (pmol/mg) | Saflaştırma katı | %Verim |
|----------------|---------------------|------------|------------------------|--------------------------|------------------|--------|
| Membran posası | 180 | 15 | 112 | 622.2 | 1 | 100 |
| OH-apatit | 30 | 15 | 68 | 2266.6 | 3.6 | 60.7 |
| G-100 | 5 | 8 | 23 | 4600 | 7.4 | 20.5 |
| IDA | 0.3 | 3 | 375 | 12500 | 20.1 | 3.35 |
| Oktil agaroz | 0.1 | 2 | 1.9 | 19000 | 30.5 | 1.7 |
| DEAE-selüloz | 0.07 | 2 | 2.6 | 37143 | 59.7 | 2.32 |
| 2. G-100 | 0.010 | 2 | 1.6 | 160000 | 257 | 1.43 |

Eritrosit membran posası NAD⁺ glikohidrolazın saflık analizi SDS-PAGE ile yapıldı. Yaklaşık 45.000 Da molekül ağırlığında bir protein bandı elde edildi (Şekil 1).

Daha önce NAD⁺ glikohidrolaz etkinliğinin serumdan saflaştırılmasına yönelik aşamalara karşın, eritrosit membran posasından saflaştırılmasında daha farklı aşamalara gereksinilmiştir. Bunun

membran enziminin doğal hidrofobik özellikleriyle ilişkili olduğu düşünülmektedir. NAD⁺ glikohidrolaz eritrosit membranına bağlı (CD38'e karşılık gelen) türü ile serumda çözülmüş türü arasındaki molekül ağırlık farkı, çözülmüş türün CD38'in yaşlanması sürecinde proteolitik kırılması sonucu açığa çıkmış türevi olabileceğini düşündürmektedir.

KAYNAKLAR

- Ziegler M, Jorcke D, Schweiger M. Identification of bovine liver mitochondrial NAD⁺ glycohydrolase as ADP-ribosyl cyclase. *Biochem J* 1997;326(Pt 2):401-5.
- Kim H, Jacobson EL, Jacobson MK. NAD glycohydrolases: a possible function in calcium homeostasis *Mol Cell Biochem* 1994;138(1-2):237-43.
- De Wolf MJS, Van Dessel GAF, Lagrou AR, Hilderson HJJ, Dierick WSH. Topography, purification and characterization of thyroidal NAD⁺ glycohydrolase. *Biochem J* 1985; 226(2):415-27.
- Lee HC, Zocchi E, Guida L, Franco L, Benatti U, De Flora A. Production and hydrolysis of cyclic ADP-ribose at the outer surface of human erythrocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 1993;191(2):639-45.
- Gelman L, Deterre P, Gouy H, Boumsell L, Debré P, Bismuth G. The lymphocyte surface antigen CD38 acts as a nicotinamide adenine dinucleotide glycohydrolase in human T lymphocytes. *Eur J Immunol* 1993;23(12):3361-4.
- Takasawa S, Nata K, Yonekura H, Okamoto H. Cyclic ADP-ribose in insulin secretion from pancreatic beta cells. *Science* 1993;259 (5093):370-3.
- Randall TD, Lund FE, Howard MC, Weissman IL. Expression of murine CD38 defines a population of long-term reconstituting hematopoietic stem cells. *Blood* 1996;87(10):4057-67.
- Zocchi E, Franco L, Guida L, Calder L, De Flora A. Self-aggregation of purified and membrane-bound erythrocyte CD38 induces extensive decrease of its ADP-ribosyl cyclase activity *FEBS Lett* 1995;359(1):35-40.
- Mehta K, Shahid U, Malavasi F. Human CD38, a cell-surface protein with multiple functions. *FASEB J* 1996;10(12):1408-17.
- Malavasi F, Deaglio S, Funaro A, Ferrero E, Horenstein AL, Ortolan E, et al. Evolution and function of the ADP ribosyl cyclase/CD38 gene family in physiology and pathology. *Physiol Rev* 2008;88(3):841-86.
- Deaglio S, Aydin S, Vaisitti T, Bergui L, Malavasi F. CD38 at the junction between prognostic marker and therapeutic target. *Trends Mol Med* 2008;14(5):210-8.
- Wang J, Nemoto E, Kots AY, Kaslow HR, Dennert G. Regulation of cytotoxic T cells by ecto-nicotinamide adenine dinucleotide (NAD) correlates with cell surface GPI-anchored/arginine ADP-ribosyltransferase. *J Immunol* 1994;153(9):4048-58.
- Bertheliev V, Laboureau J, Boulla G, Schuber F, Deterre P. Probing ligand-induced conformational changes of human CD38. *Eur J Biochem* 2000;267(10):3056-64.
- Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970;227(5259):680-5.
- Zocchi E, Franco L, Guida L, Benatti U, Bargellesi A, Malavasi F, et al. A single protein immunologically identified as CD38 displays NAD⁺ glycohydrolase, ADP-ribosyl cyclase and cyclic ADP-ribose hydrolase activities at the outer surface of human erythrocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 1993;196(3):1459-65.
- Franco L, Guida L, Bruzzone S, Zocchi E, Usai C, De Flora A. The transmembrane glycoprotein CD38 is a catalytically active transporter responsible for generation and influx of the second messenger cyclic ADP-ribose across membranes. *FASEB J* 1998;12(14): 1507-20.
- Muller-Steffner H, Schenherr-Gusse I, Tarnus C, Schuber F. Calf spleen NAD⁺ glycohydrolase: solubilization, purification, and properties of the intact form of the enzyme. *Arch Biochem Biophys* 1993;304(1):154-62.
- Lin H. Nicotinamide adenine dinucleotide: beyond a redox coenzyme. *Org Biomol Chem* 2007;5(16):2541-54.
- Muller-Steffner HM, Augustin A, Schuber F. Mechanism of cyclization of pyridine nucleotides by bovine spleen NAD⁺ glycohydrolase. *J Biol Chem* 1996;271(39):23967-72.

20. Nishina H, Inageda K, Takahashi K, Hoshino S, Ikeda K, Katada T. Cell surface antigen CD38 identified as ecto-enzyme of NAD glycohydrolase has hyaluronate-binding activity. *Biochem Biophys Res Commun* 1994;203(2):1318-23.
21. Lee HC, Graeff R, Walseth TF. Cyclic ADP-ribose and its metabolic enzymes. *Biochimie* 1995;77(5):345-55.
22. Funaro A, Malavasi F. Human CD38, a surface receptor, an enzyme, an adhesion molecule and not a simple marker. *J Biol Regul Homeost Agents* 1999;13(1):54-61.
23. Albeniz I, Demir O, Nurten R, Bermek E. NAD glycohydrolase activities and ADP-ribose uptake in erythrocytes from normal subjects and cancer patients. *Biosci Rep* 2004;24(1):41-53.
24. Korkut C, Yalçintepe L, Kiremit-Korkut N, Uzun-Altınöz S, İşsever S, Gümüşel F, et al. Serum proteins with NAD⁺ glycohydrolase activity and anti-CD38 reactivity--elevated levels in serum of tumour patients. *Cancer Lett* 1998;126(1):105-9.
25. Albeniz I, Demir O, Türker-Sener L, Yalçintepe L, Nurten R, Bermek E. Erythrocyte CD38 as a prognostic marker in cancer. *Hematology* 2007;12(5):409-14.