

UNIVERZA NA PRIMORSKEM
FAKULTETA ZA MATEMATIKO, NARAVOSLOVJE IN
INFORMACIJSKE TEHNOLOGIJE

Zaključna naloga

Primerjava proteinov iz družine CTRP

(Comparison of CTRP protein family)

Ime in priimek: Sara Gašper

Študijski program: Bioinformatika

Mentor: doc. dr. Katja Lakota

Somentor: doc. dr. Matjaž Hladnik

Koper, december 2022

Ključna dokumentacijska informacija

Ime in PRIIMEK: Sara GAŠPER

Naslov zaključne naloge: Primerjava proteinov iz družine CTRP

Kraj: Koper

Leto: 2022

Število listov: 43

Število slik: 20

Število tabel: 3

Število referenc: 50

Mentor: doc. dr. Katja Lakota

Somentor: doc. dr. Matjaž Hladnik

Ključne besede: proteini družine CTRP, funkcija in primerjava proteinov CTRP, bioinformatične podatkovne baze

Izveček:

V diplomski nalogi sem s pomočjo informacij, pridobljenih iz podatkovnih zbirk ter filogenetskega drevesa preučila proteine iz družine CTRP (C1q/TNF podobni proteini) in adiponektina. Pridobila sem podatke o strukturi, funkciji in transkriptih vseh 18 proteinov CTRP ter jih med seboj primerjala. Prav tako sem med seboj primerjala mišje in človeške proteine CTRP.

Key words documentation

Name and SURNAME: Sara GAŠPER

Title of final project paper: Protein comparison of CTRP

Place: Koper

Year: 2022

Number of pages: 43

Number of figures: 20

Number of tables: 3

Number of references: 50

Mentor: Assist. Prof. Katja Lakota, PhD

Co-Mentor: Assist. Prof. Matjaž Hladnik, PhD

Keywords: CTRP protein family, function of CTRP, comparison of CTRP, bioinformatics database

Abstract: In my final project paper, I used bioinformatics tools to obtain information and phylogenetic tree of CTRP (C1q/TNF related protein) family and adiponectin and compare their structure, I compared the structure, function and transcripts of all 18 CTRP proteins as well as similarity between mouse and human CTRP.

Zahvala

Iskreno se zahvaljujem mentorici Katji Lakoti, ki mi je pomagala pri strokovnem delu izvedbe moje diplomske naloge. Hvala vam, ker v vseh treh letih niste obupali nad mano in ste me pripeljali do te končne točke, da lahko nalogo že oddam in jo zagovarjam. Zahvaljujem se tudi somentorju Matjažu Hladniku pri zadnjih zaključkih, za podana strokovna mnenja in popravke. Hvala tudi mojemu partnerju, staršem in bratu, ki so me ves čas spodbujali, podpirali in mi pomagali, da sem lahko nalogo dokončala.

Kazalo vsebine

1	Uvod	1
2	Pregled proteinov CTRP	5
3	Metode dela	9
4	Rezultati in diskusija	11
4.1	Genomska in funkcijska analiza	11
4.2	Primejava človeških in mišjih proteinov CTRP	14
4.3	Transkripti CTRP-jev	15
4.4	Primarna struktura in filogenetska povezanost proteinov CTRP	18
4.5	Predvidena sekundarna struktura	19
4.6	Terciarna 3D struktura	21
4.7	Kvartarna stuktura	25
5	Zaključek	29
6	Literatura	30

Kazalo tabel

1	Družina CTRP	12
2	Primerjava z miško	14
3	Sekundarna struktura	19

Kazalo slik

1	Izražanje	13
2	Transkripti CTRP1	15
3	Transkripti CTRP6	16
4	Transkripti CTRP7	16
5	Transkripti CTRP12	17
6	Filogenetsko drevo CTRP-jev	18
7	Predvidena sekundarna struktura Adiponektina	19
8	Predvidena sekundarna struktura CTRP9A	20
9	Predvidena sekundarna struktura CTRP9B	20
10	Družina CTRP – ureditev različnih domen	21
11	C1QL – prisotnost domen	22
12	3D struktura Adiponektina	22
13	3D struktura CTRP1	23
14	3D struktura CTRP4	23
15	3D struktura CTRP5	24
16	3D struktura CTRP15	24
17	Povezovanje multimerov	25
18	Kvartarna struktura CTRP5	26
19	Kvartarna struktura CTRP13	27
20	Kvartarna struktura CTRP14	28

Seznam kratic

<i>AMPK</i>	Aktivirana protein kinaza
<i>Bai3</i>	Možgansko specifični inhibitor angiogeneze 3
<i>CEBP</i>	Človeški gen, ki modelira izražanje leptina
<i>CFs</i>	Plezalno tkivo
<i>CORS26</i>	Kartonectin
<i>CTRP</i>	Protein C1q/TNF
<i>CYP11B2</i>	Kortikosteron metiloksidaza
<i>C1q</i>	Komponenta komplementnega sistema 1q
<i>C1QL1</i>	Komplement 1 podoben C1q
<i>DNA</i>	Deoksiribonukleinska kislina
<i>cDNA</i>	Komplementarna DNA
<i>FAM132</i>	Družina s podobnostjo zaporedja 132
<i>GLY</i>	Glicin
<i>HMW</i>	Kompleksi z visoko molekularno maso
<i>IL</i>	Interlevkin
<i>LAMP</i>	Membranski protein povezan z lizosomi
<i>LMW</i>	Kompleksi z nizko molekularno maso
<i>LPS</i>	Lipopolisaharid
<i>MFRP</i>	Membransko frizni protein
<i>MMW</i>	Kompleksi s srednjo molekularno maso
<i>PPARγ</i>	Receptor aktiviran s peroksidnim proliferatorjem
<i>mRNA</i>	Informacijska ribonukleinska kislina
<i>RNA</i>	Ribonukleinska kislina
<i>RXFP1</i>	Peptidni receptor družine Relaksin
<i>TNF</i>	Faktor tumorske nekroze
<i>TPM</i>	Enota za določitev izražanja genov (število transkriptov na milijon)

1 Uvod

Proteini so makromolekule, ki nastanejo s povezovanjem aminokislinskih ostankov s peptidno vezjo. Razlikujejo se po tem, katere celice jih izražajo, po funkciji in strukturi. Primarna struktura je zaporedje aminokislin, ki so med seboj povezane s peptidno vezjo v linearnem zapisu in nastane iz mRNA v procesu prevajanja (translacije) na ribosomih. Sekundarna struktura je tridimenzionalna oblika lokalnih segmentov proteina, ki jo stabilizirajo vodikove vezi med karbonilno in amino skupino peptidne verige, če to dopuščajo stranske verige aminokislin, ki tvorijo zaporedje proteina. Najpogostejši elementi sekundarne strukture so α heliks ali vijačnice in β ravnin. Terciarna struktura je razporeditev v 3D prostoru, kjer so povezani oddaljeni deli proteina. Lahko povezuje več sekundarnih struktur, stabilizirana je s pomočjo vodikovih, kovalentnih, disulfidnih in hidrofobnih vezi. Kvartarno strukturo ima protein, če je sestavljen iz večih polipeptidnih verig. Sestavljen je lahko iz dimerov ali multimerov, ki so sestavljeni iz monomerov. Lahko je homomultimer, to je multimeri protein, ki je sestavljen iz dveh ali več istih monomerov ali, heteromultimer, ki je multimeri protein, ki je sestavljen iz večih različnih monomerov.

Proteini, ki se nahajajo v vodnem okolju (celica, izven celice), imajo v notranjosti hidrofobno jedro, na površini pa so hidrofilni. Oblika, ki jo zavzame protein in v kateri je najbolj stabilen, je nativna oblika. Določamo pa jo lahko s pomočjo rentgenske difrakcije ali kristalizacije. Protein ni toga struktura, ampak lahko prehaja med različnimi konformacijami, glede na pH, temperaturo in vezane ligande. Med opravljanjem svojih funkcij se proteini spreminjajo v različne konformacije tako, da nase vežejo kakšen substrat (primer encim substrat). Kompleksnejši proteini so sestavljeni iz več proteinskih domen – to je del proteina, ki se zvije v različne strukturne enote in ima specifično funkcijo.

Genska družina je set podobnih genov, ki se oblikujejo s pomočjo duplikacije enega glavnega gena, običajno imajo podobne funkcije. Gene kategoriziramo v družine glede na podobnosti, ki običajno izhajajo iz evlucijskega razvoja. Vsebujejo lahko tudi psevdogene – to so geni, ki se ne izražajo zaradi sprememb v promotorjih in stop kodonih. Genske družine imajo skupnega prednika in nastanejo z duplikacijami in nadaljnji mutacijami, zaradi katerih se povečujejo razlike med homolognimi geni. Multigenske družine običajno zajemajo gene z isto funkcijo in bolj divergentno sekvenco

zaporedja. Super družine pa so večje in vsebujejo do sto genov. [1] Družina proteinov je skupina proteinov, ki imajo skupnega prednika. Ponavadi se družina proteinov razvije iz skupnega prednika in imajo podobne lastnosti, funkcije, tridimenzionalno strukturo in podobno zaporedje. [2]

Proteinska izoforma je eden od članov večje skupine podobnih proteinov, ki izvirajo iz enega gena ali genske družine in najpogosteje nastanejo z alternativnim izrezovanjem (alternative splicing) in s pomočjo spremenljivega promotorja, do tega lahko pride tudi s pomočjo spreminjanja genov – mutacij in polimorfizma. Mnoge izoforme lahko opravljajo iste biološke vloge, nekatere pa imajo unikatne vloge. Na osnovi 20.000 genov v človeškem genomu lahko zaradi alternativnega izrezovanja nastane več kot 100.000 proteinov, pri čemer vsak gen lahko kodira različne izoforme, ki so rezultat alternativnega izrezovanja RNA. Znano je, da je pri 98 % genov pri človeku prisotno alternativno izrezovanje [3] [4].

Filogenetska drevesa temeljijo na poravnavi homolognih zaporedij iste vrste ali različnih vrst organizmov. Z njimi lahko odkrijemo evolucijske vezi in funkcijo specifičnih članov družine [5]. Poznavanje zaporedja aminokislin omogoča raziskovalcem uporabo metod za identifikacijo podobnosti med proteinskimi zaporedji, kar je v primerjavi s podatkom o podobnosti ali različnosti DNA zaporedij bolj informativno. V DNA se lahko vrinejo zaporedja, ki jih v končnem proteinu ni (npr. introni). Pozicija eksonov v kodirnem zaporedju pa se uporabi za ugotavljanje skupnega prednika [6]. Poznamo koreninjena in nekoreninjena drevesa. Kladogram prikazuje sorodstvene odnose filogram pa prikazuje sorodstvene odnose in evolucijsko razdaljo. Pri filogenetskih drevesih so pomembni izrazi: ortologi, paralogi, homologija in analogija. Ortologi so geni, ki so ločeni s speciacijo in imajo enako funkcijo. Paralogni geni so ločeni z duplikacijo in imajo različne funkcije. Analogija je podobnost ali ujemanje v nekaterih lastnostih, ki je različnega izvora. Homologija je podobnost v znakih, ki imajo skupni evolucijski izvor. Poznamo več različnih homolognih znakov: apomorfija – stanje znaka podedovano od skupnega prednika, sinamorfija – skupni izpeljani znak, pleziomorfija – predniško stanje znaka [7].

C1q/TNF podobni proteini so družina proteinov, ki pri človeku vsebuje 18 proteinov. Družina proteinov CTRP ima raznolike vloge v različnih tkivih: v imunskem, endokrinem, skeletnem, nevronskem, reproduktivnem, čutilnem in žilnem sistemu. Imajo tudi pomembno regulacijsko vlogo pri metabolizmu in odpornosti, vpleteni so v razvoj rakavih obolenj, vendar točnih bioloških funkcij različnih proteinov CTRP še ne znamo razložiti [8]. Znano je, da je RXFP1 (angl. relaxin family peptide receptor) receptor CTRP8 [9] in da sta LAMP1 in LAMP2 (angl. lysosomal-associated membrane protein) receptorja za CTRP3 [10], medtem ko za ostale CTRP proteine receptorji še niso znani. Vpletenost v metabolizem so dokazali za CTRP1, 3, 5, 9, 12, 13, 15 in adiponektin,

medtem ko so v kardiovaskularno patologijo vpleteni CTRP3, 9 in adiponektin [11].

Vsi proteini CTRP, z izjemo CTRP4, so sestavljeni iz štirih različnih strukturnih domen: signalni peptid, variabilne regije, kolagenske domene in globularne C1q domene. Kratki N-terminalni signalni peptid posreduje pri izločanju proteinov iz celice, zato so CTRP zunajcelični proteini. Kratka variabilna regija vsebuje enega ali več ohranjenih cisteinskih ostankov. Cisteinski ostanki so med seboj povezani z disulfidnimi vezmi, ki stabilizirajo višje rede sestavejenih CTRP multimerov. CTRP variabilni regiji sledi kolagenu podobna domena, ki je sestavljena iz spremenljivega števila ponovitev GLY-X-Y, pri čemer X predstavlja katerokoli aminokislino, Y pa je pogosto prolin ali hidroksiprolin in tvori levo konformacijo zvite tuljave. Tri polipeptidne verige, ki jih imenujemo tudi protomeri, se med seboj povežejo in tvorijo kolagenu podobno trojno spiralno steblo (angl. triple helical stalk), ki stabilizira formacijo homo in heterotrimere CTRP. Večina proteinov družine CTRP obstaja kot homotrimeri, nekateri (CTRP8, CTRP9B) pa tudi kot heksaheteromeri [8]. CTRP4 (glej sliko 14) je po sestavi malo drugačen, saj ima namesto celotne kolagenske domene dve C1q globularni domeni, ki ju med seboj povezuje 18 aminokislinskih vezi. [12, 13]

C1q domena je skupna proteinom CTRP, komponenti kompleksa C1q, nefibrilarnima kolagenoma VIII in X ter cerebrinolinu in caprinu-2. Človeški genom vsebuje več kot 30 proteinov z globularno domeno C1q. C terminalna globularna domena C1q proteina, ki je prototip proteinov s C1q domeno, je sestavljena v glavnem iz beta ravnin in je po zaporedju približno 25 % identična ne-kolagenskim C terminalnim domenam kolagena VIII in X. C1q globularna domena je pri proteinih družine CTRP odgovorna za povezovanje v trimere [15].

Adiponektin je eden od najbolj znanih predstavnikov družine CTRP. Prvič je bil opisan leta 1995, o njem je v bazi PubMed več kot 20.000 člankov. V krvi se nahaja v največjih koncentracijah od vseh adipokinov in negativno korelira z debelostjo. Ima tri znane receptorje, to so AdipoR1, AdipoR2 in cadherinu podoben receptor. Sodi med adipokine, kar pomeni, da ga v glavnem izločajo adipociti – to so maščobne celice. Adipokini modulirajo občutljivost na inzulin, metabolizem, homeostazo energije in imajo pomembno vlogo pri rasti in razvoju zarodka [16].

Adiponektin je po sestavi homomultimer. Trimeri (lmw – multimeri s nizko molekularno maso) se sestavljajo z nekovalentnimi interakcijami kolagenu podobnih domen v trojnem heliksu in hidrofobnih interakcij v notranji globularni C1q domeni. Trimeri se lahko povežejo v disulfidno povezane heksamere (mmw – multimer s srednjo molekularno maso) ali v večje komplekse (hmw – multimer z visoko molekularno maso). Zaporedje HMW kompleksov je lahko odvisno tudi od hidroksilacije lizina in glikolizacije. Preko domene C1q lahko reagira s CTRP9A. Kristalna struktura adiponektinske globularne

domene je podobna tridimenzionalni strukturi $\text{TNF}\alpha$ [17].

Namen naloge je s pomočjo bioinformatičnih podatkovnih zbirk pridobiti informacije o primarni in sekundarni strukturi proteinov CTRP pri človeku in miši. S pomočjo filogenetskega drevesa in primerjave sekundarne strukture želim ugotoviti sorodstveno povezavo in ugotoviti, kateri proteini CTRP so najbolj podobni adiponektinu. Poleg tega nameravam narediti primerjavo človeških proteinov CTRP z mišjimi ter primerjavo sekundarnih struktur.

2 Pregled proteinov CTRP

CTRP1 je protein, ki se nahaja na 17. kromosomu. Ekspresijo proteina CTRP1 regulira transkripcijski faktor $PPAR\gamma$, poviša pa se ob stimulaciji LPS, $TNF\alpha$ in $IL-1\beta$. Adosteron regulira CTRP1 preko izražanja CYP11B2. Poročali so, da ima CTRP1 podobne biokemične učinke kot adiponektin na hiperglikemijo, inzulinsko rezistenco in debelost. Miške brez CTRP1 imajo manj ateroskleroze in žilnega vnetja. Visoki nivoji CTRP1 so prisotni pri metabolnem sindromu, hipertenziji in srčnem popuščanju [18]. To pomeni, da bi bil lahko CTRP1 ključen za molekularno povezavo med debelostjo in hipertenzijo ter drugimi boleznimi [19]. CTRP1 podobno kot adiponektin, izboljša občutljivost na inzulin ter s tem koncentracijo glukoze v krvi in metabolizem lipidov, zmanjša nastajanje žilnih plakov in zmanjšuje agregacijo trombocitov. Poveča izločanje aldosterona in s tem uravnava krvni pritisk. Poveča proliferacijo in zorenje hondrocitov, hkrati pa ga povezujejo z napredovanjem ateroskleroze (stimulacijo gladkih mišic žilne stene) in napredovanjem glioblastom [20]. Višje serumske nivoje so našli pri metabolnem sindromu, tipu 2 diabetesa, hipertenziji in bolezni koronarne arterije.

CTRP2 tvori heteromerne komplekse z CTRP7 in adiponektinom. Ima podobne funkcije kot adiponektin, vendar se njegove serumske koncentracije za razliko od adiponektinskih ob debelosti zvišajo. Izloča ga maščobno tkivo, vendar ne adipociti ampak stromalna vaskularna frakcija. Od vseh članov družine CTRP, CTRP2 deli z adiponektinom največjo podobnost v C1 globularni domeni (43 %) in kot adiponektin aktivira AMPK (angl. activated protein kinase ali 5'AMP) in s tem povzroči podobne metabolne učinke kot adiponektin. V starih miših ga več nastaja tudi v skeletnih mišicah [21]. Povišane vrednosti so našli tudi pri bolnikih s koronarno arterijsko boleznijo.

CTRP3 je poznan tudi kot CORS26, cartducin ali cartonectin. Odkrit je bil leta 2001 v matičnih celicah, ki so jih diferencirali v hondrocite, zaradi podobnosti s kolagenom ima ime Collagenous ponavljajoča sekvenca 26 kDa protein (CORS26). Zaradi povezave s hrustancem (cartilage) pa je dobil ime cartducin in cartonectin. CTRP3 zaradi vloge pri obnovi hrustanca lahko zaščitno deluje pri artritisu, prav tako zmanjšuje vnetje in poškodbo po srčni kapi. Ker je hidrofilen in izločen iz celice je njegovo glavno delovanje izven celice. Nivoji v serumu moških so višji kot v serumu žensk, prav tako se (neobičajno za adipokine) poviša s staranjem. [10] Pred kratkim so predlagali, da

sta receptorja zanj Lysosomal-associated membrane protein 1 in 2 (LAMP1, LAMP2), prav tako zmanjšuje interakcijo LPS-TLR4 na do sedaj še neznan način. Transkripcijski faktor PPAR γ zmanjšuje njegovo ekspresijo. Povezujejo ga z razvojem nekaterih vrst raka (osteosarcoma), nealkoholno zamaščenostjo jeter, diabetesom tipa 2 in metaboličnim sindromom [10].

CTRP4 *In vitro* (na celičnih kulturah) deluje kot vnetni (aktivira NF κ B in STAT3 in s tem poveča izločanje IL6 in TNF α), medtem ko *in vivo* študije na živalskih modelih, ki transgeno izražajo CTRP4, dokazujejo protivnetno in protirakasto delovanje [22,23]. Prav tako kot večina ostalih CTRP proteinov ima vlogo v metabolizmu – transgene CTRP4 miši so odporne na debelost in insulinsko rezistenco. V glavnem ga izražajo maščobne celice, možganske celice in matične celice kostnega mozga. Za razliko od ostalih CTRP proteinov ima CTRP4 dve globularni domeni, ki sta 51 % identični (glej sliko 14) [23]. Tudi pri miših in ribah CTRP4 izražajo nevroni, njegovo izražanje pa se poveča po stradanju: povzroči manjši vnos hrane, kar kaže, da CTRP4 uravnava energetske ravnovesje organizma [24] CTRP4 regulira tudi metabolizem osteoblastov in pospešuje njihovo diferenciacijo, zato je potencialna nova tarča za kostne bolezni [25].

CTRP5 se nahaja na 11. kromosomu in se najbolj izraža v adipoznem tkivu. CTRP5 je biološki označevalec za debelost in kronično bolezen pljuč in je bicistronski, kar pomeni da se dva proteina prepiseta iz istega gena, vendar nimata iste funkcije – vključuje še sekvenco proteina membranskega friznega receptorja (MFRP), ki je izrezan iz notranjega promotorja. Ima pomembno vlogo pri regulaciji metabolne energije, signalizacije inzulina, vnetne poti, migracije in proliferacije v gladkih mišičnih celicah žil, ki so vključene v patomehanizem diabetesa tipa 2 in kardiovaskularne bolezni [26]. Encim AMPK lahko aktivira CTRP5, da regulira celično presnovo maščobnih kislin in stabilizacijo energije. Nižje ravni CTRP5 so povezane s trajno aktivacijo AMPK, kar vodi v njegovo neobčutljivost v celičnem energetskem stanju [27].

CTRP6 se nahaja na 22. kromosomu. Igra pomembno vlogo pri ohranjanju nosečnosti ter pri patogenih boleznih, kot je artritis. Reguliral naj bi tudi metabolizem glukoze in vnetja v telesu. Regulira aktivacijo komplemента in njegova odsotnost pri miši prispeva k razvoju artritisa [28]. Asociacijske študije kažejo, da mutacije na CTRP6 povečajo verjetnost razvoja diabetesa tipa 1. Miši z insulinsko rezistenco imajo višje nivoje CTRP6, prav tako so nivoji višji ob debelosti pri človeku in miših. Pri tem je glavni vir maščobno tkivo, vendar ne adipociti, ampak stromalna vaskularna frakcija (makrofagi). *In vitro* študije so pokazale, da CTRP6 uravnava adipogenezno, oksidacijo maščobnih kislin, poveča izražanje protivnetnega IL10 v makrofagih in inhibira fibrogenezno v kožnih fibroblastih [29].

CTRP7 se nahaja na 4. kromosomu. Več študij na živalih je potrdilo, da je CTRP7 vpleten v regulacijo metabolizma. Na njegovo izražanje v različnih mišjih

tkivih vpliva hranjenje/stradanje. Miši z nedelujočim genom za CTRP7 so pri dieti z malo maščobami normalne, debele miši brez gena za CTRP7 pa so imele izboljššan glukozni metabolizem, manj vneto maščobno tkivo, manj jetrne fibroze. To povezuje povišane nivoje CTRP7 z okvarjenim metabolizmom glukoze ob debelosti [30]. Povišan CTRP7 so izmerili tudi v serumu debelih ljudi, pred kratkim je bila objavljena tudi študija, da je CTRP7 povišan pri osebah z metaboličnim sindromom [31].

CTRP8 se nahaja na 16. kromosomu, je homotrimer ali heterotrimer. Kadar je soizražen v celicah, lahko oblikuje heterotrimere s CTRP1, CTRP9 in CTRP10. Pri človeku je omejen na izražanje v pljučih in modih, je ligand relaksinskega receptorja (RXFP1) v glioblastomskih celicah in ima pomembno vlogo pri možganskem raku [32]. Relaksinu podoben sistem ligand receptor (RXFP1) ima pomembno vlogo pri rasti tumorjev in njihovi invaziji, posebej pri možganskih tumorjih. Zanimivo pri tem je, da del CTRP6 uspešno zaustavi migracijo gliomskih celic, kar nakazuje do sedaj slabo raziskano vlogo CTRP proteinov pri raku [9].

CTRP9 je najbolj podoben adiponektinu po aminokislinskem zaporedju v globularni domeni C1q. Njegovi nivoji so višji pri ženskah kot pri moških in so višji v mladosti. Povišano izražanje CTRP9 pri debelosti uspešno zniža nivoje glukoze v krvi, izboljša metabolizem glukoze in inzulinsko senzitivnost [33]. CTRP9 ima tudi pozitivne kardiovaskularne učinke, saj povzroči relaksacijo ožilja, zmanjša remodelacijo srca po ishemični poškodbi in varuje pred koronarno arterijsko boleznijo [34]. Zadnje čase se nakazuje tudi, da učinki CTRP9 v možganih te zaščitijo pred staranjem [35]. Ženske izražajo večje količine transkripta kot moški. Poznamo dve različici CTRP9, to sta CTRP9A in CTRP9B, ki imata zelo podobno aminokislinsko zaporedje. Oba imata enako zaporedje v regiji signalnega peptida, v kolagenski regiji se razlikujeta v eni aminokislini in v C1q domeni v 5 aminokislinah, CTRP9A ima mesta glikolizacije, ki jih CTRP9B nima [8].

CTRP10 se izraža v možganih, očeh in placenti. Večinoma ga proizvajajo celice stromalne vaskularne frakcije. Z zdravljenjem s pomočjo rozaglitazona se zvišuje raven CTRP10 v maščobah. Tvori homotrimere in višje oligomere preko disulfidnih vezi [36]. O njem je malo raziskanega, naj bi vplival na eksikatorne sinapse v možganih. Izraža se v hipokampusu in se veže na postinaptične glutamatne receptorje kainatnega tipa [37].

CTRP11: njegovo izražanje se poveča po hranjenju, ki sledi stradanju. V glavnem ga proizvaja stromalna vaskularna frakcija maščobnega tkiva in tako vpliva na adipocite. CTRP11 zavira diferenciacijo adipocitov, saj zavira izražanje glavnih transkripcijskih faktorjev PPAR γ in CEBP, ki sta odgovorna za to [38]. Prav tako CTRP11 stimulira rast žil (angiogenezo) [39]. Zanekrat meritve njegovih nivojev v krvi pri človeku še niso objavljene. Pri soizražanju tvori heteromerne komplekse na C-terminalni globularni domeni s CTRP10, CTRP13 in CTRP14. Njegova vloga je regulacija adipoge-

neze [38].

CTRP12 je imenovan tudi adipolin ali FAM132a. Čeprav ima le majhno podobnost z ostalo družino CTRP, podobno kot adiponketin, CTRP12 deluje anti-diabetično. Poveča učinke inzulina v jetrih in maščobnem tkivu ter tako znižuje glukozo v serumu, učinka pa niso zaznali v skeletnih mišicah. Za razliko od večine CTRP-jev so endogeni CTRP12 zaznali v dveh izoformah – kot celotno in kratko globularno obliko. Cepitev izvede encim furin, obe obliki pa imata različno signaliziranje v celici. Sekveniranje cDNA genoma je pokazalo, da so isto sekvenco poimenovali tudi FAM132a (protein, ki zaenkrat nima opisane vloge) [40]. Povišane nivoje v serumu poročajo pri pre-diabetesu in debelosti [41], znižane nivoje so našli pri bolnikih s koronarno arterijsko boleznijo (v povezavi z inflamatornimi citokini), diabetesu tipa 2 [42] in dokazali so tudi mehanizem, s katerim se izboljša ateroskleroza.

CTRP13 regulira metabolno funkcijo, saj aktivira AMPK v perifernih tkivih in tako poveča prevzem glukoze v celice. V možganih CTRP13 zavira apetit in znižuje telesno težo miši. Prav tako ugodno vpliva na endoteljsko funkcijo, zmanjšuje razvoj penastih celic iz makrofagov, vpliva na kalcifikacijo žil in tako zavira razvoj ateroskleroze [43]. Nivoji CTRP13 v serumu so nižji pri diabetesu tipa 2 in sindromu policističnih jajčnikov [44]. Razlika med mišjim in človeškim CTRP13 je v eni sami aminokislini. V mRNA se izraža v adipoznem tkivu. Tvori tudi multimere s CTRP10, če se z njim soizraža *in vitro*. CTRP13 se sintetizira v maščobnih tkivih in ima dober vpliv na mišice, jetra in adipozno tkivo [36].

CTRP14 imenujemo tudi C1QL1. Njegov mRNA se selektivno in visoko izraža v spodnjih oljčnih (inferior olivary (IO)) nevronih v času odraščanja in skozi odraslost. C1QL1 ima ključno vlogo pri krepitvi in vzdrževanju plezalnih vlaken in njihove povezave s Purkinijevimi nevroni, ki izražajo protein Bai3 (brain specific angiogenesis inhibitor 3), na katerega se veže C1QL1. Signalizacija C1QL1–Bai3 je bistvena za CFs posredovanje pri normalnem motoričnem učenju, ne pa tudi pri osnovni motorični koordinaciji [45].

CTRP15, za razliko od ostalih CTRP, je v glavnem izražen v skeletnih mišicah, zato sodi med miokine in njegovo drugo ime je mionektin [46]. Mišice ga začnejo izločati po hranjenju. CTRP15 pri miših zniža proste maščobne kisline v serumu, ker poveča njihov privzem v hepatocite in adipocite. Po krvavitvi ga izločajo eritroblasti in v jetrih ekspresijo hepcidina, kar povzroči absorbcijo železa in mobilizacijo njegovih zalog. Od tod tudi tretje ime eritroferon [47].

3 Metode dela

Podatke o proteinih sem pridobila iz podatkovne zbirke Protein, ki jo upravlja NCBI (The National Center for Biotechnology Information) omogoča dostop do bioinformatičnih orodij. Iskala sem tako, da sem vnesla ime proteina in vrsto *Homo sapiens*. Uporabila sem tudi podatkovni zbirki Gene in Homologene. Podatkovno zbirko Gene sem uporabila da sem pridobila podatke o lokaciji kromosoma, številu eksonov in mestu izražanja pri družini proteinov CTRP. Podatkovno zbirko Homologene sem uporabila za primerjavo družine proteinov CTRP med ljudmi in mišmi.

Uniprot (angl. The Universal Protein Resource) je zanesljiv vir za podatke o zaporedju proteinov in njihovih lastnostih. Podatkovna zbirka UniProt je sestavljena iz UniProt Knowledgebase (UniProtKB), UniProt Reference Clusters (UniRef) in UniProt Archive (UniParc). Pri vzdrževanju UniProtov podatkovne zbirke sodelujejo EMBL-EBI, SIB in Pir, ki se zavzemajo za ohranjanje podatkov.

EMBL-EBI (angl. European Molecular biology laboratory – European bioinformatic institute) je spletna podatkovna baza podatkov za vretenčarje in bližnje nevretenčarje. SOPMA je izboljšana verzija SOPM metode, ki temelji na homologni metodi Levin et al. SOPMA opredeljuje podatke zaporedij, ki so iz iste družine. Če pa ni homolognih sekvenc, pa se predvidevanje strukture naredi s pomočjo SOPM metode.

GENEcards je uporabnikom prijazna spletna stran, po kateri lahko iščeš podatke o vseh znanih človeških genomih. Podatkovna baza avtomatsko išče podatke o genih s 150 različnih spletnih strani, vključno s transkripti, proteomi, geni, kliničnimi informacijami o funkcijah.

STRING je podatkovna baza znanih in predvidenih interakcij med proteini. Interakcije vsebujejo direktno ali fizično, indirektno ali funkcijsko asociacijo, ki izvira iz računalniškega predvidevanja, iz prenosa znanja med organizmi in iz interakcij pridobljenih z drugih spletnih strani.

GTEXPportal je projekt, s katerim bi radi znanstvenikom zagotovili podatke za raziskovanje izražanja in regulacijo človeških genov ter njihov odnos do genetskih variacij.

Filogenetsko drevo sem naredila s pomočjo programa MEGA. To je računalniški program, s katerim je mogoče izvesti statistične analize molekulske evolucije in izrisati filogenetska drevesa z uporabo različnih metod [48].

Na slikah 10 in 11 so podatki, pridobljeni iz spletne databaze NCBI, in sicer o

vsakem proteinu CTRP, glede na njihovo dostopno številko, ki je razvidna iz tabele 1. Podatke sem za vsak CTRP posebej združila v tabular in ga razdelila na več delov glede na posamezne dele proteina, ki so bili omenjeni, in prikazala na katerih aminokislinah so se nahajali.

4 Rezultati in diskusija

Pri človeku so opisali 18 proteinov, ki pripadajo družini proteinov CTRP, kar je okrajšava za C1q/TNF podobnim proteinov. Ti proteini so novo odkriti paralogi adiponektina s podobnimi domenami: kolagenska domena, C1q globularna domena, kratke variabilne regije, signalnega peptida, nekateri pa imajo tudi znana mesta glikolizacije. Kljub podobni sestavi imajo različne učinke na celično presnovo in različne regulacijske vzorce.

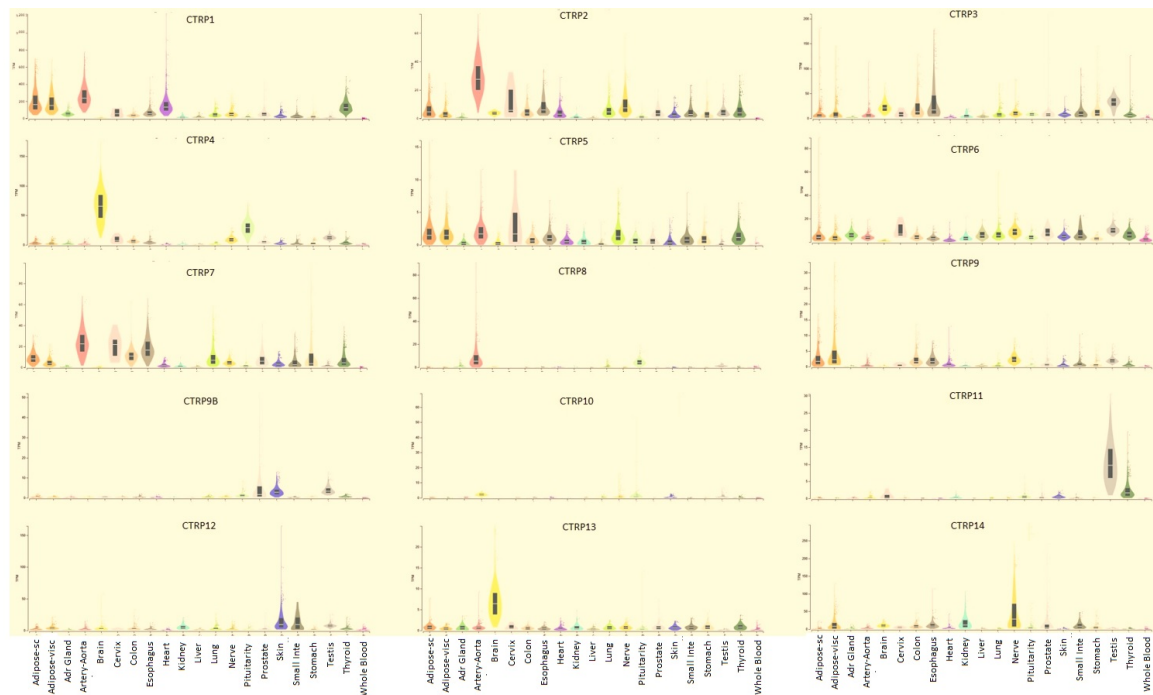
4.1 Genomska in funkcijska analiza

Tabela 1 prikazuje vse proteine družine CTRP, njihovo lokacijo na kromosomu, akcesijsko številko, število eksonov in tkivo, v katerem se izražajo pri človeku. Prisotni so v maščobi, posteljici, modih, pljučih, požiralniku, sečnem mehurju, možganih, kostnem mozgu, žolčniku, endometriozni, srcu, koži, ledvicah in ščitnici. Iz preglednice lahko opazimo, da sta po dva gena na kromosomih 2, 5, 11, 13, 17. Na CTRP6 je samo po en gen na kromosomu 22, CTRP7 na 4. kromosomu, CTRP8 na 16. kromosomu, CTRP11 na 12. kromosomu, CTRP12 na 1. kromosomu, CTRP13 na 10. kromosomu in adiponektin na 3. kromosomu. Torej dužino proteinov CTRP najdemo na 12 različnih kromosomih človeškega genoma. Skupno CTRP proteinom z 2–3 eksoni je, da ne vsebujejo kolagenske domene, imajo pa C1q domeno, kar lahko vidimo v poglavju terciarna struktura 11. Najbolj variabilni pri humanih proteinih so prvi eksoni, pri čemer kombinacija promotorja in eksona omogoča, da ga izločajo specifične celice in tkiva v telesu. Ob tem se ti prvi eksoni občasno izrežejo [49].

Tabela 1: Ime proteina družine CTRP, lokacija na človeškem kromosomu, število eksonov v genu in tkivo, ki ta protein najbolj izraža, podatki so pridobljeni s strani <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/>

Ime	Lok. Krom.	Akcesijska številka	Št. Ek.	Mesto izražanja
CTRP1	17q25.3	NP_940995.1	9	maščoba, posteljica
CTRP2	5q33.3	NP_114114.2	5	moda, pljuča
CTRP3	5p13.2	NP_852100.3	13	požiralnik, sečni mehur
CTRP4	11p11.2	NP_114115.2	3	možgani, kostni mozeg
CTRP5	11q23.3	NP_056460.1	15	žolčnik
CTRP6	22q12.3	NP_872292.1	9	endometrijoza, posteljica
CTRP7	4p15.32	NP_001128642.1	7	endometrijoza, žolčnik
CTRP8	16p13.3	NP_997302.2	5	moda, nadledvične žleze
CTRP9A	13q12.12	NP_848635.2	6	moda, srce
CTRP9B	13q12.12	NP_001007538.1	6	moda, koža
CTRP10	2q14.2	NP_872334.2	2	možgani, kostni mozeg
CTRP11	12q13.12	NP_001008224.1	3	moda
CTRP12	1p36.33	NP_001014980.1	9	dvanajsternik, tanko črevo
CTRP13	10p13	NP_001010908.1	2	možgani, ledvice
CTRP14	17q21.31	NP_006679.1	2	možgani, ledvice
CTRP15	2q37.3	NP_001278761.1	8	ščitnica, moda
Adiponektin	3q27.3	NP_001171271.1	4	maščobe

Slika 1 prikazuje izražanje genov CTRP v različnih organih. Grafi izražanja so v zdravem adipoznem tkivu v višjih vrednostih le pri CTRP1, kjer segajo do 1200 TPM, ter pri CTRP4 – 150 TPM, CTRP3 – 200 TPM, C1QL1 250 TPM. Povsod drugod je vrednost pod 100 TPM-jev. V arteriji aorti je izražanje največje pri CTRP1, 2, 7 in 8. V možganih se izražata CTRP4 in CTRP13, v živcih CTRP14, v testisih se izraža samo pri CTRP11. CTRP12 se izraža v koži, ki ni izpostavljena soncu, CTRP10 se izraža v nadledvični žlezi, CTRP9B pa v prostati. Nasploh pa se vsi proteini družine CTRP relativno malo izražajo v zdravih tkivih. Za nekatere CTRP vemo, da se izražanje dvigne v prisotnosti bolezni, s stradanjem ali drugimi faktorji [21, 26, 30, 33].



Slika 1: Izražanje genov iz družine CTRP v različnih organih, glede na podatkovno zbirko <https://gtexportal.org>. Izražanje genov je prikazano z enoto TPM (transkriptov na milijon)

Podatki med tabelo 1 in grafi (slika 1) so pridobljeni iz dveh različnih podatkovnih zbirk in med sabo ne sovpadajo. V podatkovni zbirki NCBI je izražanje narejeno s pomočjo RNA sekvenciranja na 95 ljudeh in 27 tkivih. Na gtexportalu pa so podatki pridobljeni v 54 tkivih z več ponovitvami in sekvencirani na približno 1000 ljudi, zaradi česar je možno, da so prišli do drugačnih rezultatov.

4.2 Primerjava človeških in mišjih proteinov CTRP

Za večino proteinov CTRP imamo več različnih transkriptov zaporedij, ki kodirajo enak protein. Primerjava je narejena na podlagi primerjave aminokislin v proteinskem zaporedju, za podobnost se šteje enaka aminokislina.

Tabela 2: Primerjava človeških aminokislinskih zaporedij po odstotkih identitete proteinov CTRP z mišjimi proteini CTRP – vsi podatki so bili pridobljeni s pomočjo blasta na strani <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/homologene>

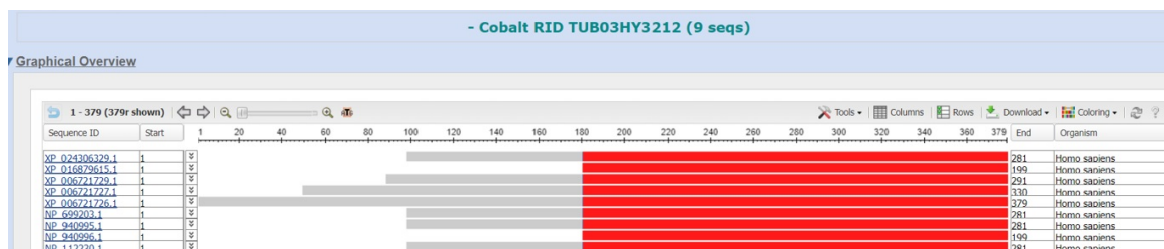
Ime	št. dostopa	Mus. št. dostopa	Primerjava
CTRP1	NP_940995.1	NP_001191058.1	77,6 %
CTRP2	NP_114114.2	NP_081255.1	94,1 %
CTRP3	NP_852100.3	NP_001191063.1	93,1 %
CTRP4	NP_114115.2	NP_080437.2	95,0 %
CTRP5	NP_056460.1	NP_001177242.1	93,8 %
CTRP6	NP_872292.1	NP_082607.3	67,7 %
CTRP7	NP_001128642.1	NP_001128644.1	96,5 %
CTRP9B	NP_001007538.1	NP_898998.2	83,5 %
CTRP10	NP_872334.2	NP_997116.1	94,1 %
CTRP11	NP_001008224.1	NP_001019873.1	96,6 %
CTRP12	NP_001014980.1	NP_080401.1	71,0 %
CTRP13	NP_001010908.1	NP_694795.1	99,6 %
CTRP14	NP_006679.1	NP_035925.2	98,5 %
CTRP15	NP_001278761.1	NP_775571.2	71,2 %
Adiponektin	NP_001171271.1	NP_033735.3	84,6 %

Iz tabele 2 je razvidno, da mišja proteina za CTRP8 in CTRP9A ne obstajata. Najmanj sta si podobna proteina v človeškem in mišjem proteinu CTRP12, največja podobnost pa je pri proteinu CTRP13, ki je kar 99,6 %. Potrdimo lahko predhodno ugotovitev, da so proteini iz družine CTRP dobro ohranjeni, saj je ohranjenost med mišjimi in človeškimi proteini med 36 % in 100 % s povprečno vrednostjo 85 % [50].

4.3 Transkripti CTRP-jev

Adiponektin ima dva transkripta, ki se razlikujeta na 5' neprevedeni regiji, tako da rezultirata oba v proteinu z 244 aminokislinami.

CTRP1 ima 10 transkriptov in 9 proteinov, od tega so 3 prekursorji izoforme 1. Transkripti 1–3 rezultirajo v istem proteinu, medtem ko je varianta 4 brez signalnega peptida s 199 aminokislinami.



Slika 2: Prikazuje transkripte CTRP1, v vsaki vrstici je svoj transkript, z rdečo barvo je označena ohranjenost med vsemi transkripti, s sivo barvo pa razlike v transkriptih

CTRP2 ima 5 transkriptov in 5 proteinov, od katerih sta 2 prekursorja, izoforme X1, X2, X4 pa so predvidene avtomatsko z računalniško analizo.

CTRP3 obsega dva transkripta, ker v 73 aminokislinah daljši varianti B intron 1 ni izrezan. Zato varianta B obsega dodatno N glikolizacijsko mesto. Razlika med izoformama ni čisto jasna, obe se pa nahajata v serumu, pri čemer se daljša izoforma prej razgradi, razen če oligomerizira.

CTRP4 ima tri transkripte: validiran je NM_031909.3 dolžine 1,413 baznih parov, in še dva računalniško predvidena, dolžine 2,506 baznih parov linear in 2,732 baznih parov. Iz tega pridejo trije proteini, vsi dolžine 329 aminokislin, pri čemer je en validiran, dva pa le predvidena z uporabo predikcijske metode: genomon, ki jo podpira mRNA in EST.

CTRP5 ima dva transkripta – daljši NM_015645 je bicistronski in je dolg 3949 baznih parov. Bicistronski pomeni, da vključuje še gen za membrane frizzled-related protein gene (MFRP), medtem ko krajšemu, monocistronskemu transkriptu NM_001278431.2, dolgemu 1,353 baznih parov, manjka nekaj eksonov na 5' strani in kodira samo CTRP5, izražen iz notranjega promotorja. Oba transkripta kodirata isti, 243 aminokislin dolg protein.

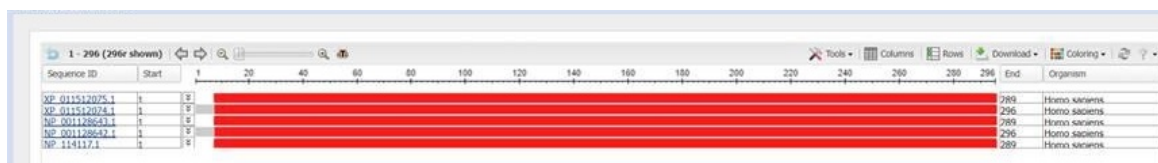
CTRP6 ima 11 transkriptov in 11 proteinov. Drugi transkript NM_182486 kodira izoformo 2 in je dolg 1609 baznih parov in ima nekaj manj 5' UTR (neprevajanih regij) kot transkript 1 NM_031910, ki je dolg 2893 baznih parov in kodira izoformo 1. Tretji transkript NM_001365878.1 pa je še daljši, saj ima 3,286 baznih parov in ravno

tako kodira izoformo 1. Ostalih 8 transkriptov je le računalniško predvidenih (imajo do 6,361 bp). Sam protein ima 2 izoformi: izoforma 2 NP_001352807.1 je dolga 259 aminokislin, izoforma 1 pa je dolga 278 aminokislin in ima dve varianti (NP_872292.1, NP_114116.3), ki se razlikujeta na 3' UTR.



Slika 3: Prikazuje transkripte CTRP6, v vsaki vrstici je svoj transkript, z rdečo barvo je označena ohranjenost med vsemi transkripti, s sivo barvo pa razlike v transkriptih

CTRP7 ima 5 transkriptov – 3 validirane in 2 predvidena. Transkript varianta 1 je najdaljši NM_001135170 4466 baznih parov in kodira najdaljšo izoformo. Transkript varianti 2 in 3 (NM_001135171.2, NM_031911.5) pa kodirata isto izoformo, in sicer zaradi uporabe iniciacijskega kodona na 5' delu, kar rezultira v izoformi s krajšim N delom. Zato ima izoforma a (NP_001128642.1) 296 aminokislin, izoforma b (NP_114117.1) pa 289 aminokislin.



Slika 4: Prikazuje transkripte CTRP7, v vsaki vrstici je svoj transkript, z rdečo barvo je označena ohranjenost med vsemi transkripti, s sivo barvo pa razlike v transkriptih

CTRP8 ima tri transkripte – 2 predvidena in 1 validiranega. To rezultira v enem validiranem NP_997302.2 proteinu in enem predvidenem, oba imata 252 aminokislini.

CTRP9A ima 3 transkripte in 3 proteine. Transkript 1 NM_001303137 1908 baznih parov je najdaljši. Transkriptu 2 (NM_178540.5, 1824 baznih parov) manjka alternirajoči ekson na 5' UTR delu, medtem ko transkript 3 (NM_001303138, 1850 baznih parov) uporabi alternirajoči ekson 1 na 5' UTR, v primerjavi s transkriptom 1. Proteini so vsi enaki, dolgi 333 aminokislinae.

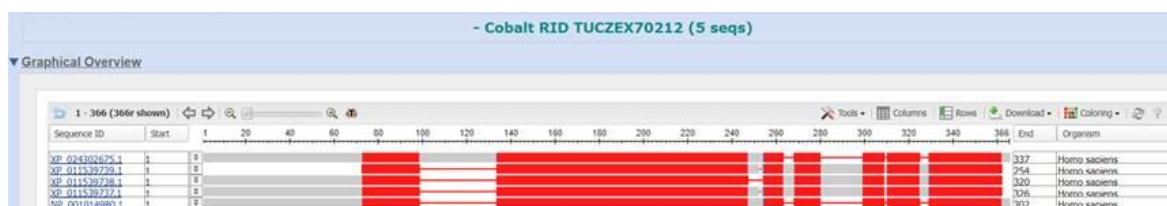
CTRP9B ima 2 transkripta in 2 proteina. Transkript 1 NM_001007537.2 ima 1229 baznih parov, je daljši in kodira protein. Transkript 2 NR_104426 905 baznih parov ne

kodira proteina, ker mu manjka velik del kodirajoče sekvence variante 1 (spremenjeni eksoni 5' in 3' dela). Protein je eden, dolg 333 aminokislina.

CTRP10 ima en transkript in en protein NP_872334 z 287 aminokislina.

CTRP11 ima dva transkripta in dva proteina, prvi ima (NP_001008224) 238 aminokislina in je validiran kot prekursor, drugi pa ima (XP_011536572) 227 aminokislina in je predviden iz avtomatske računalniške analize.

CTRP12 ima 5 transkriptov in 5 proteinov; od tega so 4 predvideni in eden je prekursor adipolina validiran.



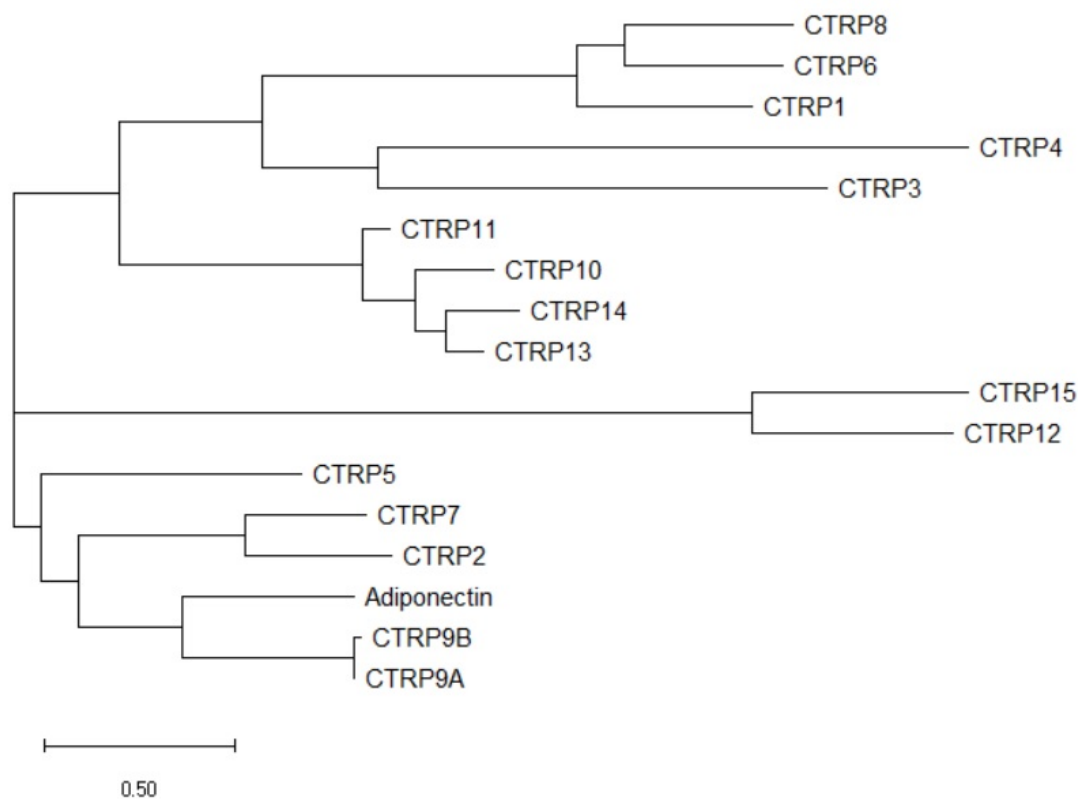
Slika 5: Prikazuje transkripte CTRP12, v vsaki vrstici je svoj transkript, z rdečo barvo je označena ohranjenost med vsemi transkripti, s sivo barvo pa razlike v transkriptih

CTRP13 ima en transkript in en protein NP_001010908 z 255 aminokislina.

CTRP14 ima en transkript NM_006688.5 1527 baznih parov in en protein.

CTRP15 ima en transkript NM_001291832 2939 baznih parov in en protein s 354 aminokislina.

4.4 Primarna struktura in filogenetska povezanost proteinov CTRP



Slika 6: Filogenetsko drevo CTRP narejeno s pomočjo programa MEGA

Na sliki 6 je prikazano filogenetsko drevo z metodo največjega verjetja (maximum likelihood tree) iz družine človeških proteinov CTRP. Prikazuje nam, kako so si posamezni proteini CTRP po strukturi med seboj podobni. Vidimo, da je drevo razdeljeno v tri ločene skupine, ki se naprej ločujejo na veje in liste. Nas na sliki najbolj zanima adiponektin. Vidimo, da sta mu najbolj podobna CTRP9 in CTRP9B, sledita mu CTRP7, CTRP2, ki sta na sosednji veji, in nato še CTRP5.

Pri pregledovanju molekularnih funkcij proteinov skupine CTRP sem ugotovila, da so najbolj pogoste naslednje funkcije: vezava na identični protein (ki se pojavlja pri proteinih 1, 3, 5, 6, 9A, 10, 11, 13 in 15) in hormonska aktivnost (9A, 12, 15). Funkcije in drevo sovpadajo pri hormonski aktivnosti CTRP12 in CTRP15.

Proteini CTRP1, CTRP6 in CTRP8 so skupaj na filogenetskem drevesu in so si med seboj podobni po tem, da vsebujejo hidrofobne His in Tyr ostanke in so tesno povezani. Poleg tega pa CTRP1 in CTRP8 vsebujeta sekvenco peptida, ki na sebe veže relaksin receptor RXFP1. Na grafu so skupaj tudi Adiponectin, CTRP9A, CTRP9B, CTRP2

in CTRP7. To so proteini CTRP, ki so adiponektinu najbolj sorodni. Protein CTRP9 in CTRP2 (43 %) je po aminokislinskem zaporedju najbolj podoben adiponektinu v globularni C1q domeni [21, 33].

4.5 Predvidena sekundarna struktura

Tabela 3: Predvidene sekundarne strukture proteinov CTRP, ki so glede na filogenetsko drevo najbližje adiponektinu, ter adiponektin. Ti podatki so pridobljeni s pomočjo metode SOPMA. Lahko pa bi tudi sešteli število posameznih struktur glede na zaporedja, ki so na slikah 7, 8, 9.

Sekundarne strukture	CTRP2	CTRP7	CTRP9A	CTRP9B	Adiponektin
Alfa vijačnica – Hh	14 %	5 %	3 %	1 %	2 %
Podaljšana veriga – Ee	22 %	26 %	19 %	19 %	25 %
Beta zavoji – Tt	8 %	7 %	5 %	4 %	5 %
Naključni klobčič – Cc	56 %	62 %	73 %	76 %	68 %

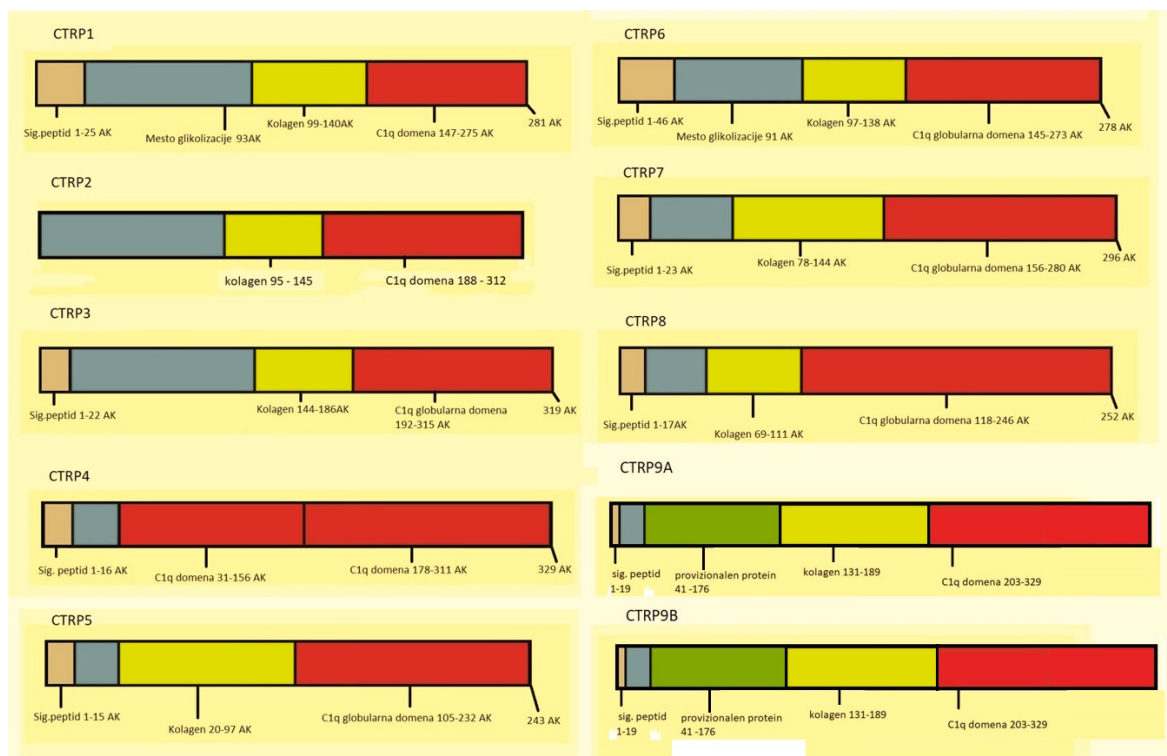
Iz zgornje tabele lahko razberemo, da je v predvidenih sekundarnih strukturah prisotnih največ naključnih klobčičev in podaljšanih verig, vsebujejo pa tudi manjši delež alfa vijačnic in aminokislin, ki so urejene v beta ravnine. Iz literature vemo, da se kot alfa vijačnice uredi kolagenski del proteina in da je večina C1q domene v obliki beta ravnin.



Slika 7: Predvidena sekundarna struktura Adiponektina – prevladujejo naključni klobčiči cc ter podaljšane verige, označene z ee

4.6 Terciarna 3D struktura

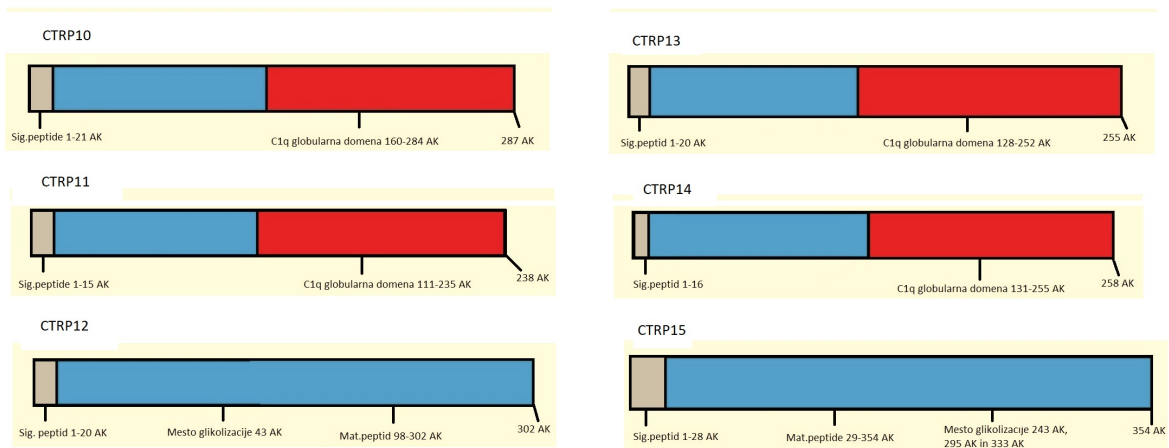
Spodaj so prikazane slike vseh domen proteinov CTRP. Na slikah je s sivo barvo označena regija signalnega peptida, z modro je označena variabilna regija, z rumeno kolagen, z zeleno dezorientiran protein, z rdečo pa je označena C1q globularna domena. Pri nekaterih proteinih CTPR obstajajo tudi mesta glikolizacije, ki so prisotna v zrelem peptidu in omogočajo postranslacijsko modifikacijo proteina.



Slika 10: Družina CTRP – ureditev različnih domen – pridobljeno s spletne strani <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/>

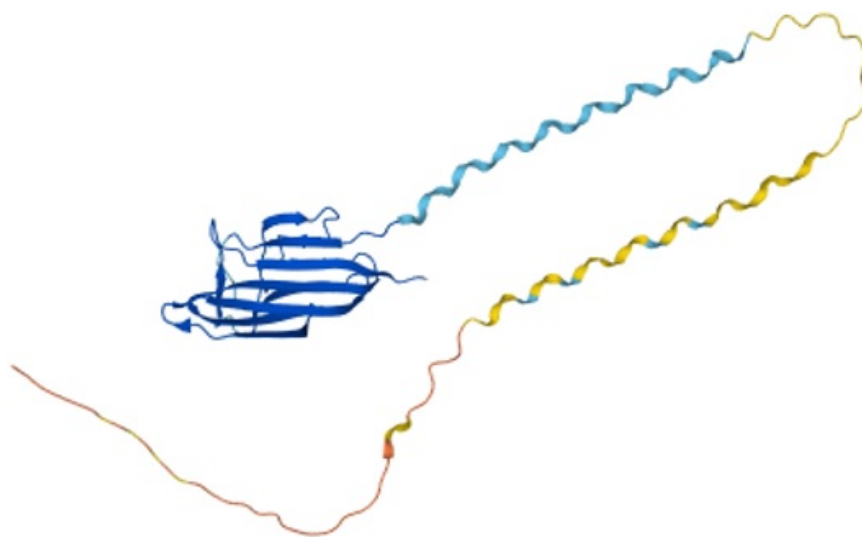
Terciarne strukture nam pokažejo podobnosti družine proteinov CTRP. Na sliki 10 vidimo strukturo proteinov CTRP od 1 do 9. Skoraj vsi so sestavljeni iz signalnega peptida, kolagenske domene in C1q domene. Pri CTRP2 pa vidimo, da ni signalega peptida, CTRP4 vsebuje namesto kolagenske domene dve C1q domeni, CTRP9A pa ne vsebuje kolagenske domene, ampak ima namesto nje provizionalen protein.

Na sliki 11 imamo strukturo proteinov CTRP nad 10. Za to skupino sem ugotovila, da jo poimenujejo tudi C1QL skupina. V skupino C1QL spadajo CTRP10 ali C1QL2, CTRP11 ali C1QL4, CTRP13 ali C1QL3 in CTRP14 ali C1QL1. V njihovi strukturi ni prisotna kolagenska domena. Potem pa imamo še FAM132A ali CTRP12 in FAM132B ali CTRP15, ki v primarni strukturi ne vsebujejo niti kolagenske domene niti C1q. Pri pregledovanju drugih baz sem ugotovila, da CTRP12 in CTRP15 v bazi podatkov



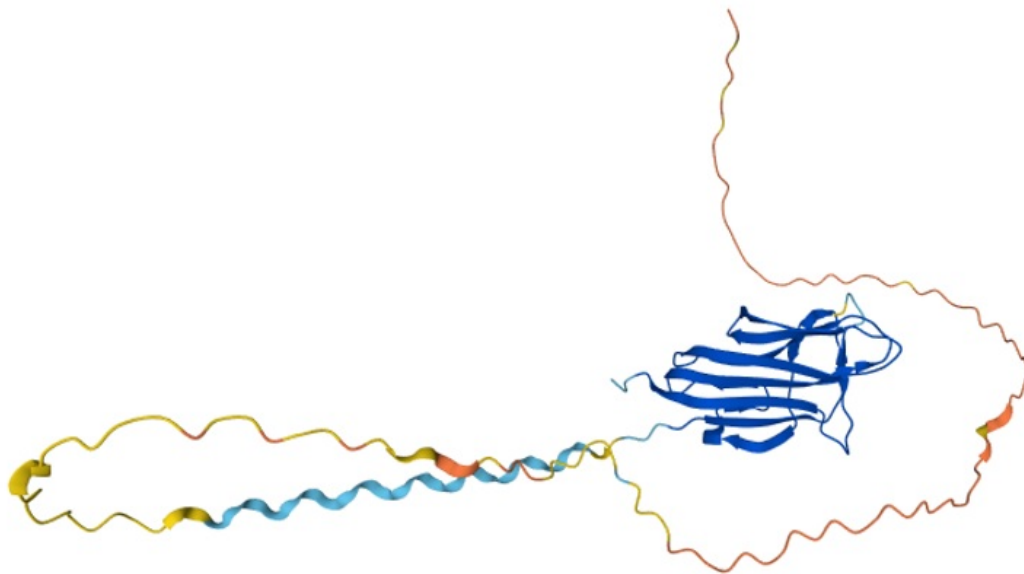
Slika 11: C1QL – prisotnost domen – <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/>

UNIPROT vsebujeta domeno C1q. Iz tega lahko predvidevamo, da najbrž v bazi podatkov NCBI niso posodobili in dodali te domene, saj sodi v skupino proteino CTRP, v kateri imajo vsi proteini C1q domeno. Drugače ju ne bi mogli uvrstiti v to skupino proteinov, saj si z njo ne bi bila dovolj podobna.



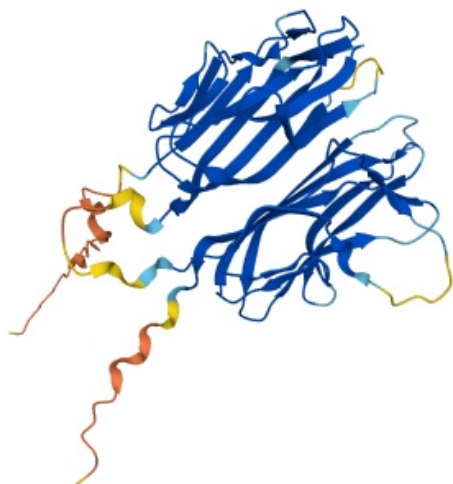
Slika 12: 3D struktura Adiponektina

Na sliki je prikazana 3D struktura Adiponektina (slika 12), CTRP1 (slika 13), CTRP4 (slika 14), CTRP5 (slika 15) in CTRP15 (slika 16), ki so pridobljene iz alpha-Fold. Te 3D strukture so narejene s pomočjo alfafold metode in so le predvidene.

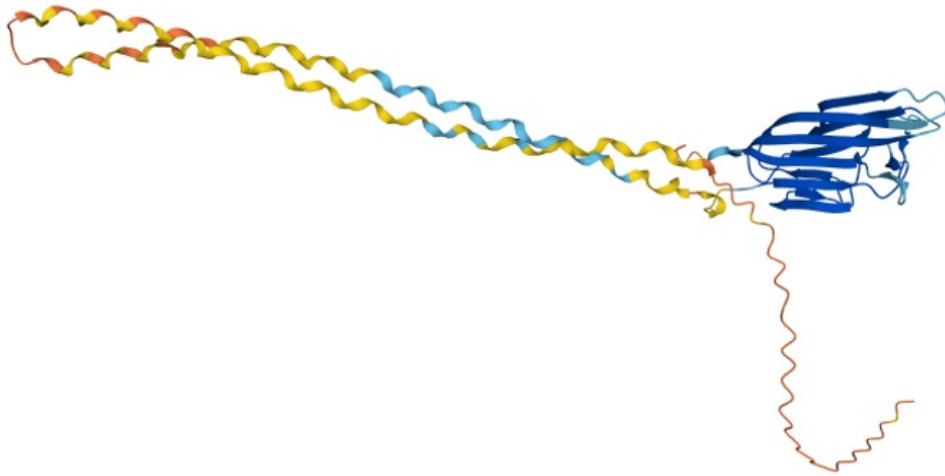


Slika 13: 3D struktura CTRP1

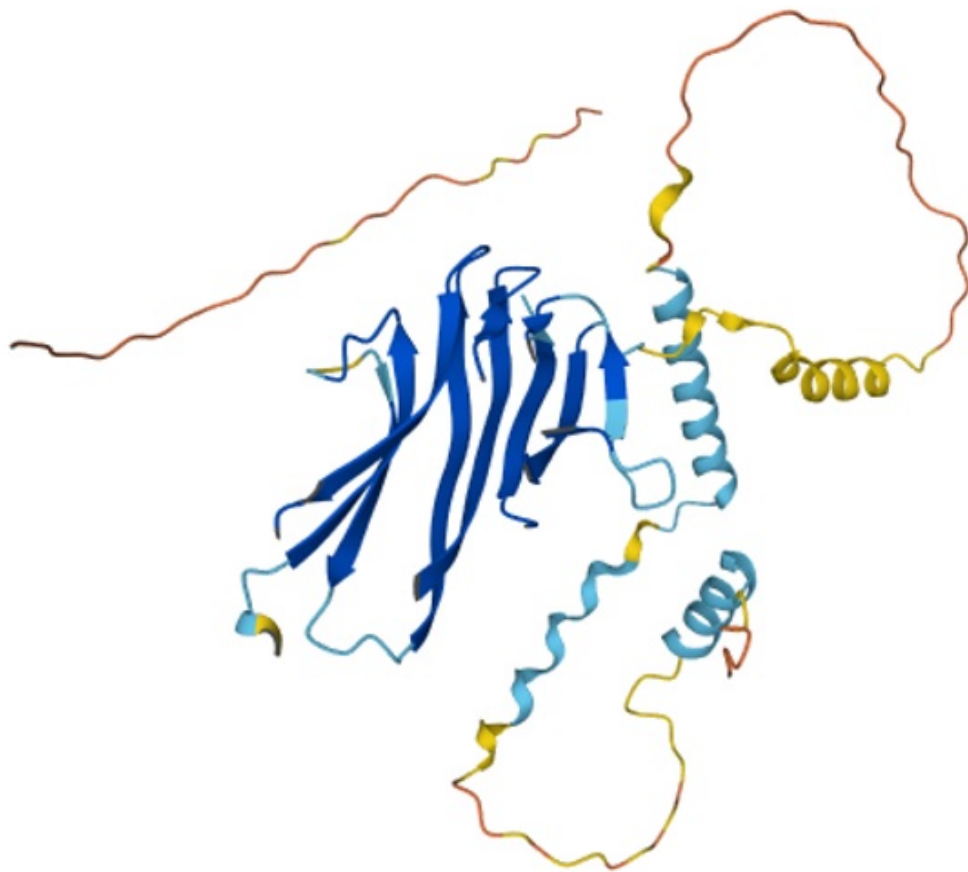
S slike lahko lepo vidimo C1q domeno, ki ji sledi veriga različnih aminokislin, kar lahko vidimo pri vseh 3D strukturah. Lepo se vidi razlika med ostalimi proteini CTRP in CTRP4, ki ima namesto kolagenske domene dve C1q domeni.



Slika 14: 3D struktura CTRP4



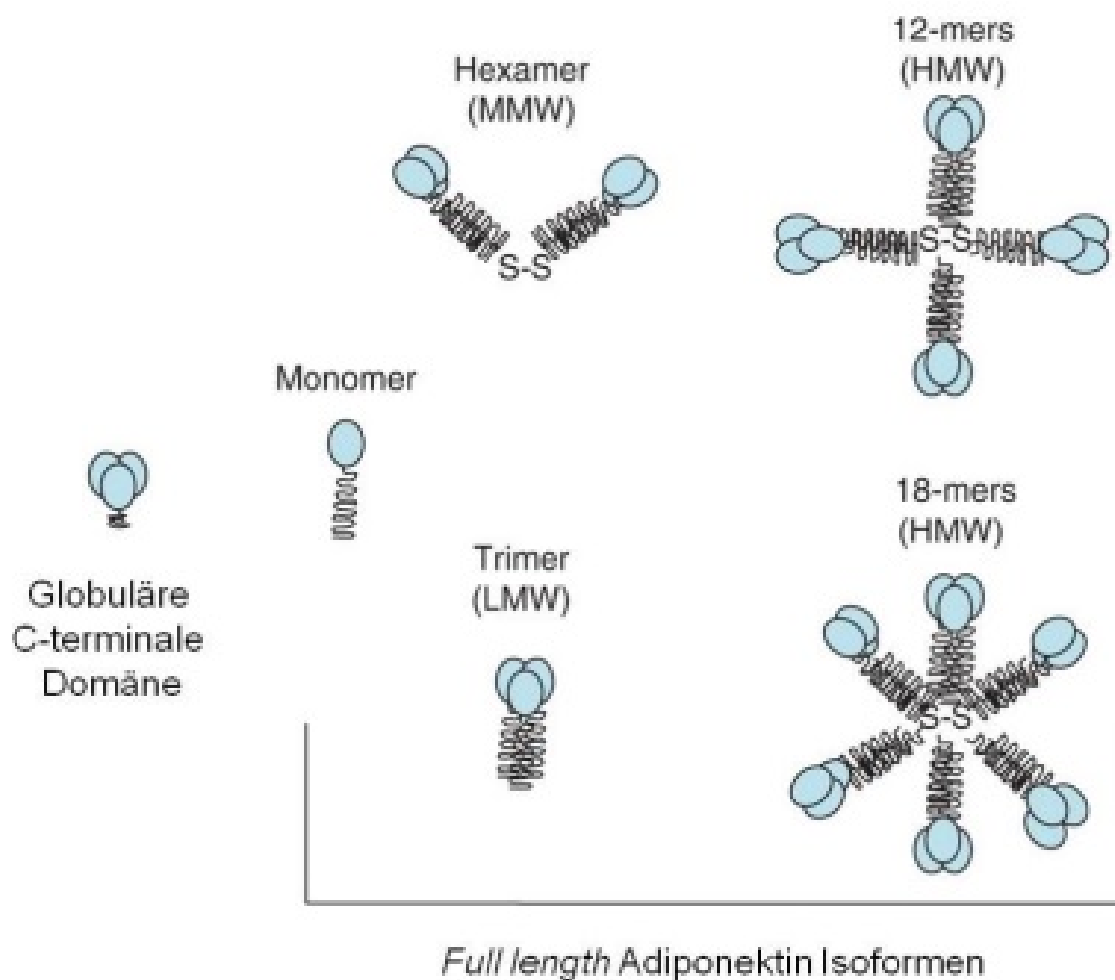
Slika 15: 3D struktura CTRP5



Slika 16: 3D struktura CTRP15

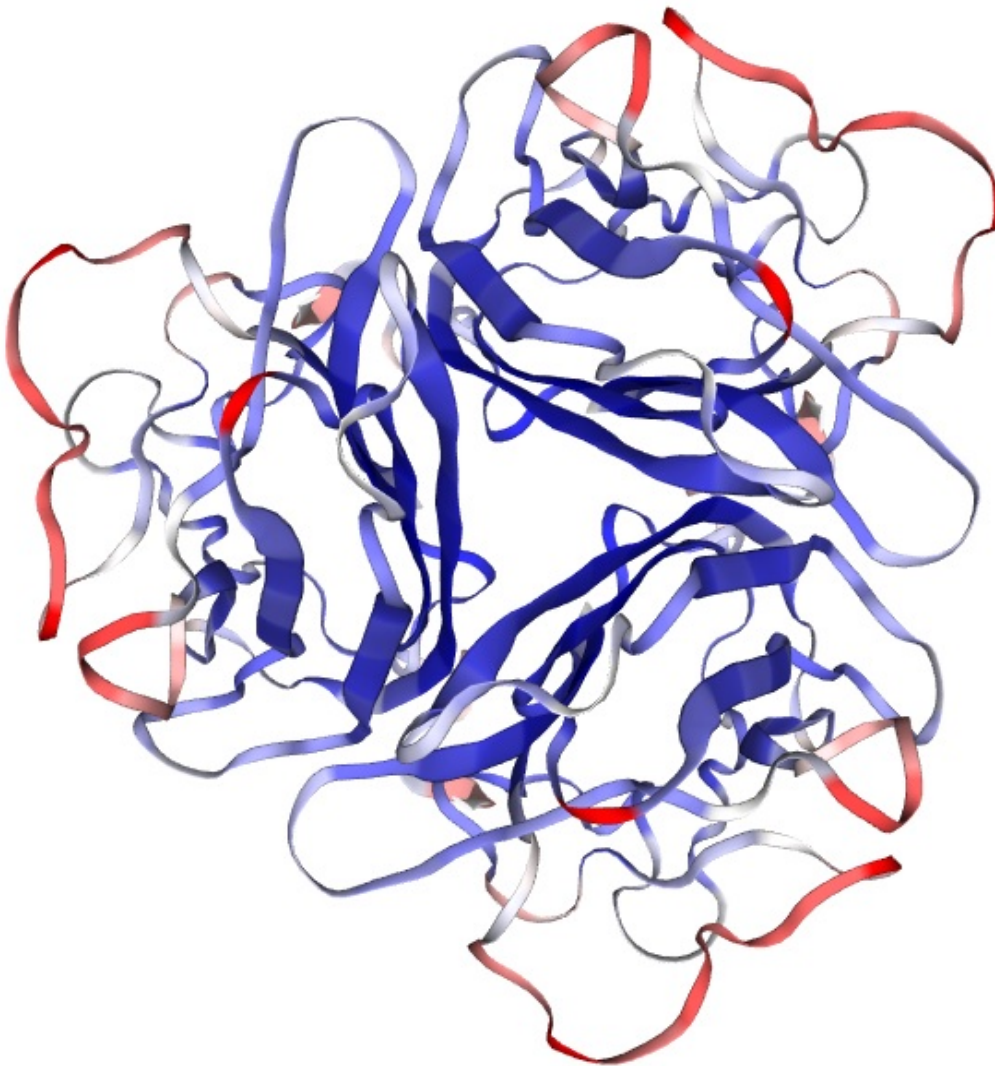
4.7 Kvartarna struktura

Kvartarna struktura je struktura, ki je sestavljena iz več proteinskih podenot v proteinski kompleks. Nekateri proteini imajo manjše število podenot in jih zato imenujemo oligomeri, tisti, ki pa jih imajo več, pa so multimeri. Proteini na slikah 18, 19, 20 so multimeri oz. homomultimeri, saj so sestavljeni iz več enakih polipeptidnih verig. Večina proteinov družine CTRP obstaja kot homotrimeri, nekateri (CTRP8, CTRP9B) pa tudi kot heksaheteromeri. [8] Posamezne enote so v multimerne povezane s kovalentnimi disulfidnimi vezmi. Kvartarne strukture so pridobljene s strani <https://swissmodel.expasy.org>.



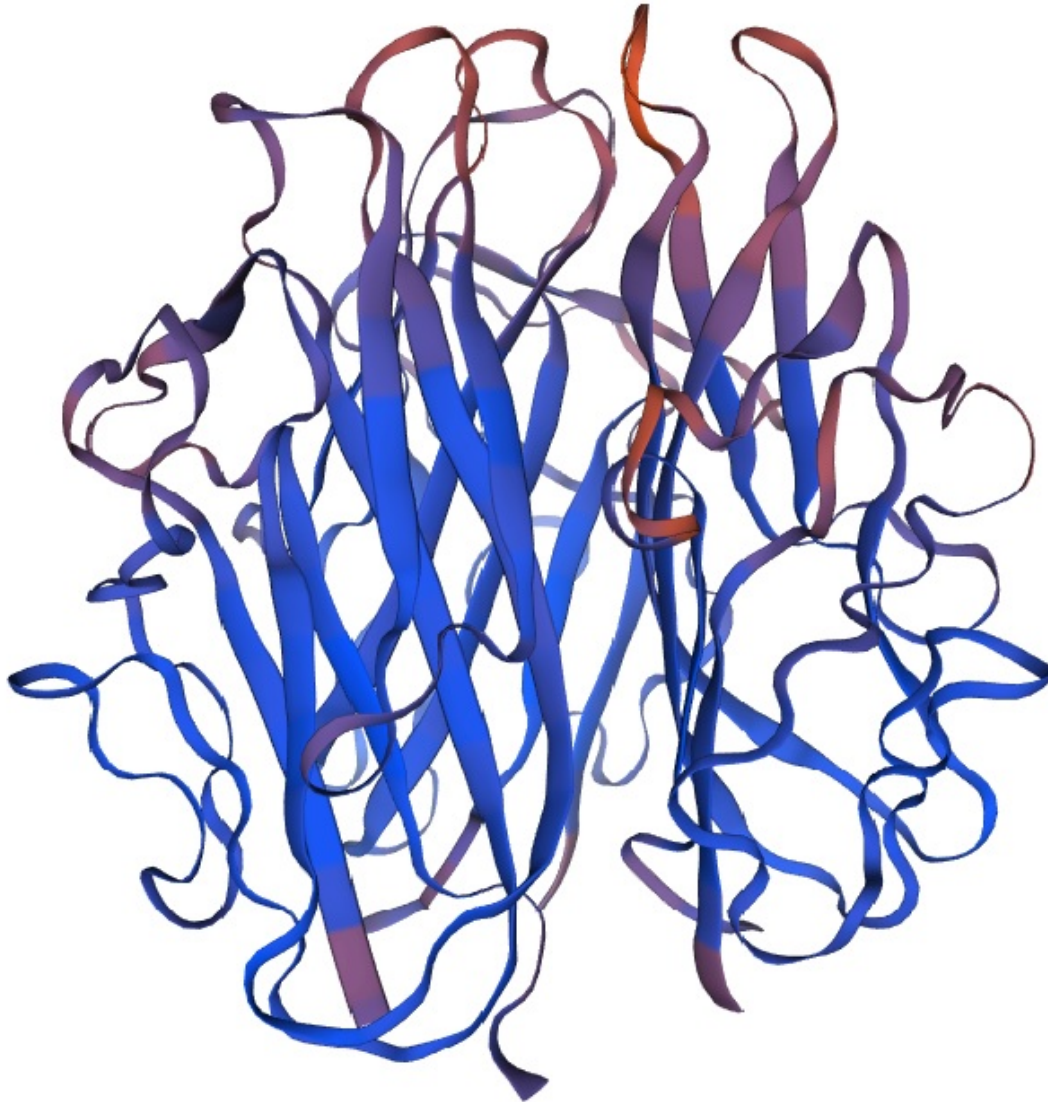
Slika 17: Povezovanje multimerov, pridobljeno iz doktorske disertacije Molekulare und funktionelle Charakterisierung des Adipokins C1q/TNF-related protein-3

Na sliki 18 vidimo kristalno strukturo trimerne gC1q domene od človeškega CTRP5, ki je povezana s pozno degeneracijo mrenice, in je bila narejena s pomočjo rentgenske difrakcije leta 2012. To kvartarno strukturo so v podatkovni bazi pdb označili kot 4F3J, poznamo pa še eno eksperimentalno strukturo od CTRP5 s pdb oznako 4nn0. Vse kvartarne strukture od CTRP5 so homotrimeri.



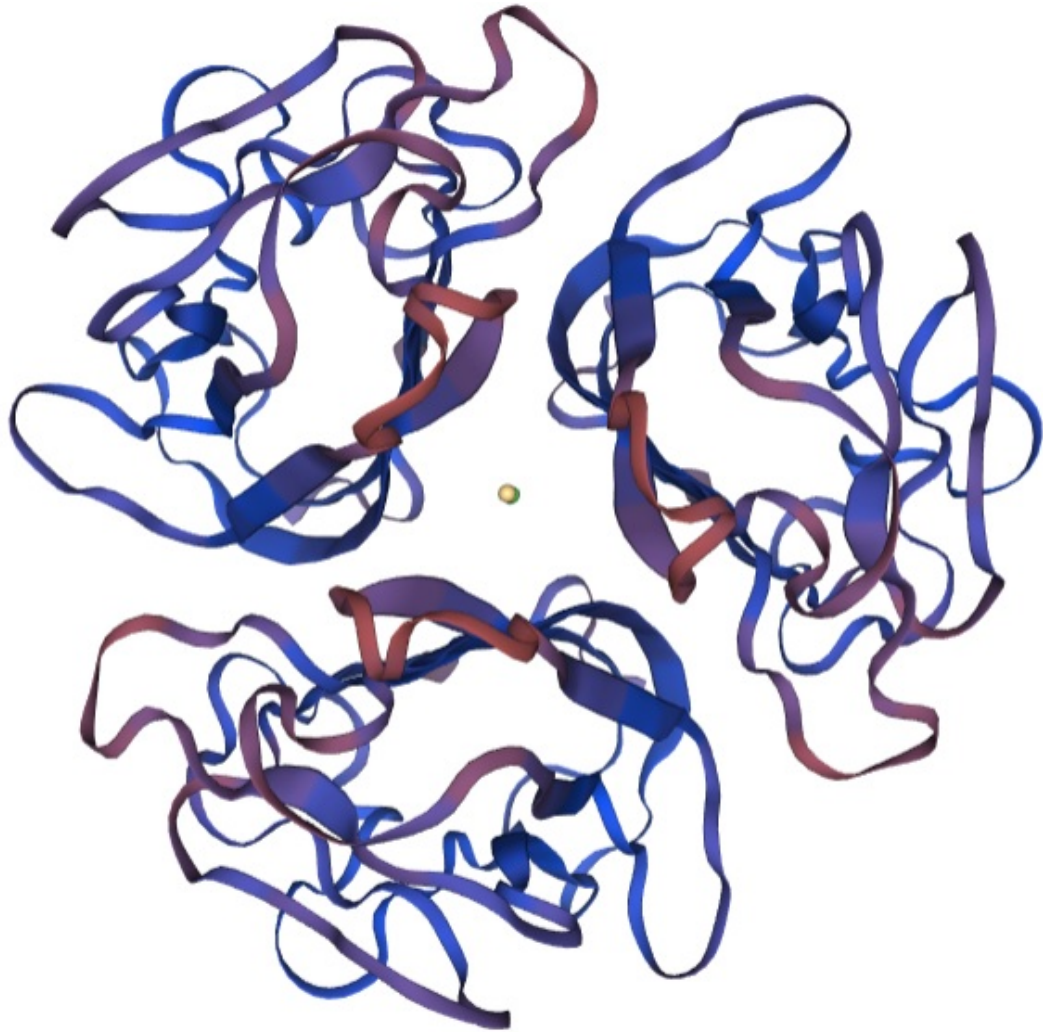
Slika 18: Kvartarna struktura CTRP5 s pdb oznako 4F3J

Na sliki 19 je swis-model kvartarne strukture človeškega CTRP13, ki je zasnovan na podlagi 5ybz.1.A SMTL verzija 2022 je homotrimerna struktura in prikazuje le komplemetarni del strukture CTRP13 in vsebuje en ligand.



Slika 19: Kvartarna struktura CTRP13

Na sliki 20 je swis-model kvartarne strukture človeškega CTRP14, ki je zasnovan na 4d7y.1.C SMTL verzija 2022 je homotrimerna struktura in prikazuje le komplementarni del. Vsebuje štiri ligande: dva kadmijeva in dva nikljeva iona.



Slika 20: Kvartarna struktura CTRP14

5 Zaključek

Družina proteinov CTRP je sestavljena iz 18 proteinov, ki so sestavljeni iz C1q globularne domene in kolagenske domene. Najbolj izstopa CTRP4, saj je sestavljen iz dveh C1q domen in ne vsebuje kolagenske domene. Poseben je še gen za CTRP5, ki je bicistronski, torej znotraj gena kodira dva proteina za CTRP5 in daljši MFRP. Primerjava med človeškimi in mišjimi CTRPji je narejena na podlagi primerjave aminokislin v proteinskem zaporedju in je največja pri CTRP12 (99 %) in najmanjša pri CTRP6 (67 %). Mišji CTRP8 in CTRP9A ne obstajata, tako da ni bilo narejene primerjave. Največ transkriptov imajo CTRP1 (10 transkriptov), CTRP6 (11 transkriptov), ter CTRP2 in CTRP7 (5 transkriptov). Izoforma je set podobnih proteinov, ki izvirajo iz enega gena ali genske družine. Pri družini CTRP ima CTRP1 tri izoforme, CTRP2 in CTRP7 pa imata dve izoformi. CTRP6 ima dve izoformi, ki sta dolgi 259 ak in 278 ak. Adiponektin je najbolj znan protein iz skupine proteinov CTRP in je po filogenetskem drevesu najbolj podoben CTRP9A in CTRP9B. Pri terciarni strukturi smo razdelili skupino proteinov CTRP na dve podskupini: tiste, ki vsebujejo C1q domeno, to so CTRP od 1 do 9B, ter tiste, ki jih imenujemo tudi C1QL, ali tiste, ki so jim podobni, saj ne vsebujejo kolagenske domene, to so CTRP10 do CTRP15. Proteini družine CTRP se združujejo v kvartarno strukturo v trimere in heksamere. Večina proteinov se združuje v homotrimere, nekateri pa tudi v heksaheteromere.

6 Literatura

- [1] *Gene family*, https://en.wikipedia.org/wiki/Gene_family. (Datum ogleda: 10. 2. 2022.) (*Citirano na strani 2.*)
- [2] *Protein family*, https://en.wikipedia.org/wiki/Protein_family. (Datum ogleda: 20. 2. 2022.) (*Citirano na strani 2.*)
- [3] L.P. IÑIGUEZ in G. HERNÁNDEZ, The Evolutionary Relationship between Alternative Splicing and Gene Duplication. *Frontiers in Genetics* 8(14) (2017) . (*Citirano na strani 2.*)
- [4] *Protein isoform*, https://en.wikipedia.org/wiki/Protein_isoform. (Datum ogleda: 15. 2. 2022.) (*Citirano na strani 2.*)
- [5] G. PALIDWOR, E.G. REYNAUD in M.A. ANDRADE, Taxonomic colouring of phylogenetic trees of protein sequences. *BMC Bioinformatics* 7 (2006) . (*Citirano na strani 2.*)
- [6] A. SALAZAR, *Advanced Chordate Zoology*, Ed - Tech Press, 2021. (*Citirano na strani 2.*)
- [7] J.L. GITTLEMAN, *phylogeny (biology)*, <https://www.britannica.com/science/phylogeny>. (Datum ogleda: 2. 9. 2022.) (*Citirano na strani 2.*)
- [8] J.M. PETERSON, Z. WEI in G.W. WONG, CTRP8 and CTRP9B are novel proteins that hetero-oligomerize with C1q/TNF family members. *Biochem Biophys Res Commun* 388(2) (2009) 360–365. (*Citirano na straneh 2, 3, 7 in 25.*)
- [9] T. THANASUPAWAT, A. GLOGOWSKA1, M. BURG, G.W. WONG, C. HOANG-VU, S. HOMBACH-KLONISCH in T. KLONISCH, RXFP1 is targeted by complement C1q tumor necrosis factor-related factor 8 in brain cancer. *Front Endocrinol (Lausanne)* 13 (2015) 127. (*Citirano na straneh 2 in 7.*)

- [10] Y. LI, G.L. WRIGHT in J.M. PETERSON, C1q/TNF-Related Protein 3 (CTRP3) Function and Regulation. *Compr Physiol* 7(3) (2017) 863–878. (*Citirano na strani 2, 5 in 6.*)
- [11] Y. SI, W. FAN in L. SUN, A Review of the Relationship Between CTRP Family and Coronary Artery Disease. *Vascular Biology J. Hamilton* 6 (2020) . (*Citirano na strani 3.*)
- [12] T. KLONISCH, A. GLOGOWSKA, T. THANASUPAWAT, M. BURG, J. KRCEK, M. PITZ, A. JAGGUPILLI, P. CHELIKANI, G.W. WONG in S. HOMBACH-KLONISCH, Structural commonality of C1q TNF-related proteins and their potential to activate relaxin/insulin-like family peptide receptor 1 signalling pathways in cancer cells. *British J. of Pharmacology* 174 (2017) 1025–1033. (*Citirano na strani 3.*)
- [13] G.W. WONG, S.A. KRAWCZYK, C. KITIDIS-MITROKOSTAS, T. REVETT, R. GIMENO in H.F. LODISH, Molecular, biochemical and functional characterizations of C1q/TNF family members. *Biochem J. Author Manuscript* 416(2) (2008) 161–177. (*Citirano na strani 3.*)
- [14] C.K. SMITH, J.M. WITHKA in L. REGAN, A Thermodynamic Scale for the β -Sheet Forming Tendencies of the Amino Acids. *Biochemistry* 33(18) (1994) 5510–5517. (*Ni citirano.*)
- [15] M.M. SELDIN, S.Y. TAN in G. WILLIAM WONG, Metabolic function of the CTRP family of hormones. *Reviews in endocrine & metabolic disorders* 15(2) (2014) 111–23. (*Citirano na strani 3.*)
- [16] S. PARIDA, S. SIDDHARTH in D. SHARMA, Adiponectin, Obesity, and Cancer: Clash of the Bigwigs in Health and Disease. *Int J Mol Sci* 20(10) (2019) 2519. (*Citirano na strani 3.*)
- [17] *Adiponektin-human*, <https://www.uniprot.org/uniprotkb/Q15848/entry>. (Datum ogleda: 29. 10. 2021.) (*Citirano na strani 4.*)
- [18] L. SHEN, S. WANG, Y. LING in W. LIANG, Association of C1q/TNF-related protein-1 (CTRP1) serum levels with coronary artery disease. *J Int Med Res* 47(6) (2019) 2571–2579. (*Citirano na strani 5.*)
- [19] L. CHALUPOVA, L. HALUPOVA, A. ZAKOVSKA, G. KREJCI, M. SVESTAK in D. STEJSKAL, CTRP1: A Molecule Link between Obesity and Hypertension. *J. Mol. Biomark Diagn.* 7 (2016) . (*Citirano na strani 5.*)

- [20] J.D. JANOWSKA, C1q/TNF-related Protein 1, a Multifunctional Adipokine: An Overview of Current Data. *Am J Med Sci* 360(3) (2020) 222–228. (*Citirano na strani 5.*)
- [21] X. LEI in G.W. WONG, C1q/TNF-related protein 2 (CTRP2) deletion promotes adipose tissue lipolysis and hepatic triglyceride secretionCTRP2 is required for lipid homeostasis. *JBC* 294(43) (2019) 15638–15649. (*Citirano na straneh 5, 12 in 19.*)
- [22] L. WANG, CTRP4: a new member of the adipocytokine family. *Cellular & Molecular Immunology* 14 (2017) 868–870. (*Citirano na strani 6.*)
- [23] L. CAO, W. TAN, W. CHEN, H. HUANG, M. HE, Q. LI. X. ZHU in L. WANG, CTRP4 acts as an anti-inflammatory factor in macrophages and protects against endotoxic shock. *Euro of Immunology* 51(2) (2020) 380–392. (*Citirano na strani 6.*)
- [24] M.S. BYERLY, P.S. PETERSEN, S. RAMAMURTHY, M.M. SELDIN, X. LEI, E. PROVOST, Z. WEI, G.V. RONNETT in G.W. WONG, C1q/TNF-related protein 4 (CTRP4) is a unique secreted protein with two tandem C1q domains that functions in the hypothalamus to modulate food intake and body weight. *J Biol Chem* 289(7) (2014) 4055–69. (*Citirano na strani 6.*)
- [25] J. WU, Q. LI, W. XI, X. CHEN, W. WANG, T. ZHANG, A. YANG in T. WANG, Ctrp4, a new adipokine, promotes the differentiation of osteoblasts. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 512(2) (2019) 224–229. (*Citirano na strani 6.*)
- [26] Z. MAJIDI, S. EMAMGHOLIPOUR, A. OMIIDIFAR, S.R. FARD, H. POUSTCHI in M. SHANAKI , The circulating levels of CTRP1 and CTRP5 are associated with obesity indices and carotid intima-media thickness (cIMT) value in patients with type 2 diabetes: a preliminary study. *Diabetology & Metabolic Syndrome* 13(14) (2021) . (*Citirano na straneh 6 in 12.*)
- [27] K.J. MIYAGISHIMA, R. SHARMA, M. NIMMAGADDA, K. CLORE-GRONENBORN, Z. QURESHY, D. ORTOLAN, D. BOSE, M. FARNOODIAN, C. ZHANG, A. FAUSEY, Y.V. SERGEEV, M. ABU-ASAB, B. JUN,5 K.V. DO, M.-A.K. GUERIN, J. CALANDRIA, A. GEORGE, B. GUAN, Q. WAN, R.C. SHARP, C. CUKRAS, P.A. SIEVING, R.B. HUFNAGEL, N.G. BAZAN, K. BOESZE-BATTAGLIA, S. MILLER in K. BHARTI, AMPK modulation ameliorates dominant disease phenotypes of CTRP5 variant in retinal degeneration. *Commun Biol.* 1360 (2014) . (*Citirano na strani 6.*)

- [28] M.A. MURAYAMA, S. KAKUTA, A. INOUE, N. UMEDA, T. YONEZAWA, T. MARUHASHI, K. TATEISHI, H. ISHIGAME, R. YABE, S. IKEDA, A. SENO, H. CHI, Y. HASHIGUCHI, R. KURATA, T. TADA, S. KUBO, N. SATO, Y. LIU, M. HATTORI, S. SAIJO, M. MATSUSHITA, T. FUJITA, T. SUMIDA in Y. IWAKURA, CTRP6 is an endogenous complement regulator that can effectively treat induced arthritis. *Nat. Commun.* 6 (2015) . (*Citirano na strani 6.*)
- [29] M.M. SELDIN, X. LEI, H.C. LITTLE, N. CHOY, T. KLONISCH in G.W. WONG, C1q/TNF-related protein 6 (CTRP6) links obesity to adipose tissue inflammation and insulin resistance. *J Biol Chem* 292(36) (2017) 14836–14850. (*Citirano na strani 6.*)
- [30] P.S. PETERSEN, X. LEI, R.M. WOLF, S. RODRIGUEZ, S.Y. TAN, H.C. LITTLE, M.A. SCHWEITZER, T.H. MAGNUSON, K.E. STEELE in G.W. WONG, CTRP7 deletion attenuates obesity-linked glucose intolerance, adipose tissue inflammation, and hepatic stress. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 312(4) (2014) E309–E325. (*Citirano na straneh 7 in 12.*)
- [31] W. HU, B. ZHAN, Q. LI, G. YANG, M. YANG, M. TAN, S. GENG, H. LIU, C. CHEN, D. LIU in L. LI, Circulating CTRP7 Is a Potential Predictor for Metabolic Syndrome. *Front Endocrinol (Lausanne)* 12 (2021) . (*Citirano na strani 7.*)
- [32] A. GLOGOWSKA, T. THANASUPAWAT, M. BURG, J. KRCEK, J. BEIKO, M. PITZ, G.J. ZHANG, S. HOMBACH-KLONISCH in T. KLONISCH, C1q/TNF-related peptide 8 (CTRP8) promotes temozolomide resistance in human glioblastoma. *Molecular Oncology* 12(9) (2018) 1464–1479. (*Citirano na strani 7.*)
- [33] G.W. WONG, S.A. KRAWCZYK, C. KITIDIS-MITROKOSTAS, G. GE, E. SPONER, C. HUG, R. GIMENO in H.F. LODISH, Identification and characterization of CTRP9, a novel secreted glycoprotein, from adipose tissue that reduces serum glucose in mice and forms heterotrimers with adiponectin. *FASEB J.* 23(1) (2009) 241–258. (*Citirano na straneh 7, 12 in 19.*)
- [34] R.M. WOLF, K.E. STEELE, L.A. PETERSON, X. ZENG, A.E. JAFFE, M.A. SCHWEITZER, T.H. MAGNUSON in G.W. WONG, C1q/TNF-Related Protein-9 (CTRP9) Levels Are Associated With Obesity and Decrease Following Weight Loss Surgery. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 101(5) (2016) 2211–2217. (*Citirano na strani 7.*)
- [35] A. REZABAKHSH, Y. SADEGHPOUR, S. GHADERI, R. RAHBARGHAZI in M.H. GERANMAYEH, CTRP9: An emerging potential anti-aging molecule in brain. *Cellular Signalling* 73 (2020) . (*Citirano na strani 7.*)

- [36] A. SCHAFFLER in C. BUECHLE, CTRP family: linking immunity to metabolism. *Dep. of Internal Med.* 23 (2012) 194–204. (*Citirano na straneh 7 in 8.*)
- [37] K. MATSUDA, T. BUDISANTOSO, N. MITAKIDIS, Y. SUGAYA, E. MIURA, W. KAKEGAWA, M. YAMASAKI, K. KONNO, M. UCHIGASHIMA, M. ABE, I. WATANABE, M. KANO, M. WATANABE, K. SAKIMURA, A.R. ARICESCU in M. YUZAKI, Transsynaptic Modulation of Kainate Receptor Functions by C1q-like Proteins. *Neuron* 90(4) (2016) 752–767. (*Citirano na strani 7.*)
- [38] Z. WEI, M.M. SELDIN, N. NATARAJAN, D.C. DJEMAL, J.M. PETERSON in G.W. WONG, C1q/Tumor Necrosis Factor-related Protein 11 (CTRP11), a Novel Adipose Stroma-derived Regulator of Adipogenesis. *J. Biol. Chem.* 288(15) (2013) 10214–10229. (*Citirano na straneh 7 in 8.*)
- [39] F. LIU, A. TAN, R. YANG, Y. XUE, M. ZHANG, L. CHEN, L. XIAO, X. YANG in Y. YU, C1ql1/Ctrp14 and C1ql4/Ctrp11 promote angiogenesis of endothelial cells through activation of ERK1/2 signal pathway. *Molecular and Cellular Biochemistry* 424 (2017) 57–67. (*Citirano na strani 7.*)
- [40] Z. WEI, J.M. PETERSON, X. LEI, L. CEBOTARU, M.J. WOLFGANG, G.C. BALDEVIANO in G.W. WONG, C1q/TNF-related protein-12 (CTRP12), a novel adipokine that improves insulin sensitivity and glycemic control in mouse models of obesity and diabetes. *J Biol Chem* 287(13) (2012) 10301–10315. (*Citirano na strani 8.*)
- [41] A. OMIDIFAR, K. TOOLABI, A. RAHIMPOUR, S. EMAMGHOLIPOUR in M. SHANAKI, The gene expression of CTRP12 but not CTRP13 is upregulated in both visceral and subcutaneous adipose tissue of obese subjects. *Diabetes Metab Syndr* 13(4) (2019) 2593–2599. (*Citirano na strani 8.*)
- [42] A. FADAEI, N. MORADI, T. KAZEMI, E. CHAMANI, N. AZDAKI, S.A. MOEZIBADY, S. SHAHMOHAMADNEJAD in S. FALLAH, Decreased serum levels of CTRP12/adipolin in patients with coronary artery disease in relation to inflammatory cytokines and insulin resistance. *Clinical Trial Cytokine* 113 (20189) 326–331. (*Citirano na strani 8.*)
- [43] C. WANG, Y. CHAO, W. XU, M. LIANG, S. DENG, D. ZHANG in K. HUANG, CTRP13 Preserves Endothelial Function by Targeting GTP Cyclohydrolase 1 in Diabetes. *Diabetes* 69(1) (2020) 99–111. (*Citirano na strani 8.*)
- [44] A. AFROOKHTEH, S. EMAMGHOLIPOUR, B. ALIPOOR, N. MORADI, R. MESHKANI, E. NASLI-ESFAHANI, A. RAHIMPOUR in M. SHANAKI, The Circulating

- Levels of Complement-C1q/TNF-Related Protein 13 (CTRP13) in Patients with Type 2 Diabetes and its Association with Insulin Resistance. *Clin Lab* 63(2) (2017) 327-333. (*Citirano na strani 8.*)
- [45] W. KAKEGAWA, N. MITAKIDIS, E. MIURA, M. ABE, K. MATSUDA, Y.H. TAKEO, K. KOHDA, J. MOTOHASHI, A. TAKAHASHI, S. NAGAO, S. MURAMATSU, M. WATANABE, K. SAKIMURA, A.R. ARICESCU in M. YUZAKI, Anterograde C1q11 Signaling Is Required in Order to Determine and Maintain a Single-Winner Climbing Fiber in the Mouse Cerebellum. *Neuron* 85(2) (2015) 316–329. (*Citirano na strani 8.*)
- [46] M.M. SELDIN, J.M. PETERSON, M.S. BYERLY, Z. WEI in G.W. WONG, Myonectin (CTRP15), a novel myokine that links skeletal muscle to systemic lipid homeostasis. *J Biol Chem* 287(15) (2012) 11968-11980. (*Citirano na strani 8.*)
- [47] D.N. SROLE in T. GANZ, Erythroferrone structure, function, and physiology: Iron homeostasis and beyond. *Cellular Physiology* 236(7) (2021) 4888–4901. (*Citirano na strani 8.*)
- [48] M.R. TENNANT, *Phylogenetics Resources*,
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Class/NAWBIS/modules.html>. (Datum ogleda: 17. 10. 2019.) (*Citirano na strani 9.*)
- [49] T. ZHANG, P. HAWS in Q. WU, Multiple Variable First Exons: A Mechanism for Cell- and Tissue-Specific Gene Regulation. *Genome Res.* 14(1) (2004) 79–89. (*Citirano na strani 11.*)
- [50] W. MAKALOWSKI, J. ZHANG in M.S. BOGUSKI, Comparative analysis of 1196 orthologous mouse and human full-length mRNA and protein sequence. *Genome Res* 6(9) (1996) 846–857. (*Citirano na strani 14.*)
- [51] A. KOPP, *Molekulare und funktionelle Charakterisierung des Adipokins C1q/TNF-related protein-3*, Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften. (*Ni citirano.*)