

UNIVERZA NA PRIMORSKEM
FAKULTETA ZA MATEMATIKO, NARAVOSLOVJE IN
INFORMACIJSKE TEHNOLOGIJE

ZAKLJUČNA NALOGA

SERUMSKI AMILOID A PRI *Mus musculus* –
STRUKTURE IN FUNKCIJE IZOTIPOV TER PRIKAZ
EVOLUCIJSKEGA RAZVOJA SAA Z
BIOINFORMATIČNIMI PODATKOVNIMI BAZAMI IN
ORODJI

UNIVERZA NA PRIMORSKEM
FAKULTETA ZA MATEMATIKO, NARAVOSLOVJE IN
INFORMACIJSKE TEHNOLOGIJE

Zaključna naloga

**Serumski amiloid A pri *Mus musculus* – strukture in funkcije izotipov ter
prikaz evolucijskega razvoja SAA z bioinformatičnimi podatkovnimi
bazami in orodji**

(Serum amyloid A in *Mus musculus* – structure and function of isotypes and
presentation of SAA evolutionary development using bioinformatic databases
and tools)

Ime in priimek: Urša Mihevc

Študijski program: Bioinformatika

Mentorica: izr. prof. dr. Snežna Sodin-Šemrl

Somentorica: doc. dr. Katja Lakota

Koper, december 2018

Ključna dokumentacijska informacija

Ime in PRIIMEK: Urša MIHEVC

Naslov zaključne naloge: Serumski amiloid A pri *Mus musculus* – strukture in funkcije izotipov ter prikaz evolucijskega razvoja SAA z bioinformatičnimi podatkovnimi bazami in orodji

Kraj: Koper

Leto: 2018

Število listov: 71 Število slik: 35 Število preglednic: 19

Število prilog: 4 Št. strani prilog: 4

Število referenc: 45

Mentorica: izr. prof. dr. Snežna Sodin-Šemrl

Somentorica: doc. dr. Katja Lakota

Ključne besede: serumski amiloid A, bioinformatične podatkovne baze in orodja, strukture in funkcije proteinov, SAA izotipi, evolucija

Izvleček:

V zaključni nalogi so bile s pomočjo bioinformatičnih podatkovnih baz in orodij določene strukturne razlike izotipov serumskega amiloida A 1–4 na vseh strukturnih nivojih. Primerjali smo aminokislinske sestave SAA 1–4 ter s pomočjo filogenetskega drevesa predstavili evolucijo SAA in pokazali, da so se geni *Saa* razvili v treh skupinah. Človeška in mišja izotipa *Saa3* ter človeška in mišja izotipa *Saa4* so si med seboj podobni in tvorijo vsak svojo skupino. Podobnost pa je večja med mišjima *Saa1* in *Saa2*, ki tvorita svoj takson, ter človeškima *Saa1* in *Saa2*, ki prav tako tvorita svoj takson.

Key words documentation

Name and SURNAME: Urša MIHEVC

Title of the final project paper: Serum amyloid A in *Mus musculus* – structure and function of isotypes and presentation of SAA evolutionary development using bioinformatic databases and tools

Place: Koper

Year: 2018

Number of pages: 71

Number of figures: 35

Number of tables: 19

Number of appendix: 4

Number of appendix pages: 4

Number of references: 45

Mentor: Assoc. Prof. Snežna Sodin-Šemrl, PhD

Co-Mentor: Assist. Prof. Katja Lakota, PhD

Keywords: Serum amyloid A, Bioinformatic databases and tools, structures and functions of proteins, SAA isotypes, evolution

Abstract: Structural differences of SAA isotypes at each level were determined using bioinformatic databases and tools. We compared the amino acid composition of SAA1–4. The evolution of SAA isotypes was presented using a phylogenetic tree, and we showed that *Saa* genes developed in three groups. The human and mouse *Saa3* isotype and human and mouse *Saa4* isotype are similar to each other and form each their own group. The similarity is greater between mouse *Saa1* and *Saa2*, which form their own taxon and human *Saa1* and human *Saa2*, which also form their own taxon.

ZAHVALA

Iskreno se zahvaljujem mentorici, izredni profesorici dr. Snežni Sodin-Šemrl, za prijazno, potrpežljivo in strokovno usmerjanje pri izdelavi zaključne naloge. Hvala, da v vseh teh letih niste obupali nad mano in ste me podpirali do zaključka naloge. Zahvaljujem se tudi doc. dr. Katji Lakoti za podana strokovna mnenja in popravke.

Najlepša hvala staršem za podporo in pomoč v vseh letih študija – oba sta bila zelo potrpežljiva pri čakanju na mojo zaključno nalogo.

KAZALO VSEBINE

1 UVOD	1
1.1 Serumski amiloid A pri <i>Mus musculus</i>	1
1.2 Izotipi SAA pri <i>Mus musculus</i>	2
1.3 Gensko ustvarjene miške uporabljene pri raziskovanju	3
2 NAMEN DELA	9
3 METODE DELA	10
4 REZULTATI IN DISKUSIJA	13
4.1 Primarne strukture SAA pri <i>Mus musculus</i>	13
4.1.1 Primarna stuktura SAA1 (<i>Mus musculus</i>)	13
4.1.2 Primarna struktura SAA2 (<i>Mus musculus</i>)	15
4.1.3 Primarna struktura SAA3 (<i>Mus musculus</i>)	16
4.1.4 Primarna struktura SAA4 (<i>Mus musculus</i>)	18
4.1.5 Nukleotidno zaporedje Saa-ps (<i>Mus musculus</i>)	19
4.1.6 Primerjave aminokislinskih zaporedij SAA, kodiranih v različnih genih	20
4.1.6.1 Primerjava zaporedij SAA1-SAA2	21
4.1.6.2 Primerjava zaporedij SAA1-SAA3	22
4.1.6.3 Primerjava zaporedij SAA1-SAA4	23
4.1.6.4 Primerjava zaporedij SAA2-SAA3	23
4.1.6.5 Primerjava zaporedij SAA2-SAA4	24
4.1.6.6 Primerjava zaporedij SAA3-SAA4	24
4.1.6.7 Medsebojna primerjava zaporedij SAA1, SAA2, SAA3 in SAA4	25
4.2 Sekundarne strukture SAA pri <i>Mus musculus</i>	26
4.2.1 Sekundarna stuktura SAA1 (<i>Mus musculus</i>)	26
4.2.2 Sekundarna stuktura SAA2 (<i>Mus musculus</i>)	28
4.2.3 Sekundarna stuktura SAA3 (<i>Mus musculus</i>)	29
4.2.4 Sekundarna stuktura SAA4 (<i>Mus musculus</i>)	31
4.2.5 Medsebojne primerjave sekundarnih struktur SAA proteinov pri <i>Mus musculus</i>	32
4.3 Terciarnne strukture SAA pri <i>Mus musculus</i>	33
4.3.1 Sekundarne strukture, pomembne za terciarno strukturo	33
4.4 Kvartarne strukture serumskega amiloida A pri <i>Mus musculus</i>	35
4.5 Funkcije mišjih SAA	38
4.6 Evolucija SAA	42
4.6.1 Poravnava zaporedij SAA <i>Homo sapiens</i> in <i>Mus musculus</i>	43
4.6.1.1 Filogenetsko drevo izotipov SAA <i>Homo sapiens</i> in <i>Mus musculus</i>	44
4.6.2 Poravnava zaporedij različnih živalskih vrst	45
4.6.2.1 Filogenetsko drevo	47

4.6.3 Poravnava zaporedij različnih živalskih vrst (po raziskavi Santiaga in sodelavcev 2010)	48
5 ZAKLJUČEK.....	50
6 LITRATURA IN VIRI.....	51

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Nomenklatura genske družine <i>Saa</i> pri miših po novih smernicah »SAA Subcommittee of the Amyloidosis Nomenclature Committee, 1999 [35]«. V oglatih oklepajih so zapisana stara nomenklatura imena.	2
Preglednica 2: Seznam najbolj znanih laboratorijev, ki se ukvarjajo z vzrejo miši.	3
Preglednica 3: Najbolj pogoste mutacije na genih <i>Saa</i>	7
Preglednica 4: Uporabljena bioinformatična orodja in portali	10
Preglednica 5: Aminokislinska sestava SAA1	14
Preglednica 6: Aminokislinska sestava SAA2	16
Preglednica 7: Aminokislinska sestava SAA3	17
Preglednica 8: Aminokislinska sestava SAA4	19
Preglednica 9: Aminokislinska sestava proteinov SAA 1–4.....	20
Preglednica 10: Deleži podobnosti in identičnosti proteinov SAA pri <i>Mus musculus</i>	25
Preglednica 11: Deleži sekundarnih struktur v SAA1 v odstotkih (%).....	28
Preglednica 12: Deleži sekundarnih struktur v SAA2 v odstotkih (%).....	29
Preglednica 13: Deleži sekundarnih struktur v SAA3 v odstotkih (%).....	30
Preglednica 14: Deleži sekundarnih struktur v SAA4 v odstotkih (%).....	32
Preglednica 15: Napovedi deležev sekundarnih struktur za posamezni izotip serumskega amiloida A v odstotkih (%)	32
Preglednica 16: Sestava kvartarne strukture SAA3	36
Preglednica 17: GeneRifs (ang. Gene Reference Into Function) funkcije, procesi, lokalizacija ter interakcije posameznih izotopov SAA.....	39
Preglednica 18: Klasifikacija proteina SAA3 s CATH	42
Preglednica 19: Izbrana aminokislinska zaporedja SAA različnih živalskih vrst.....	45

KAZALO SLIK

Slika 1: Primarna struktura SAA1 <i>Mus musculus</i>	13
Slika 2: Grafična predstavitev proteina SAA1 <i>Mus musculus</i>	13
Slika 3: Primarna struktura SAA2 <i>Mus musculus</i>	15
Slika 4: Grafična predstavitev proteina SAA2 <i>Mus musculus</i>	15
Slika 5: Primarna struktura SAA3 <i>Mus musculus</i>	16
Slika 6: Grafična predstavitev proteina SAA3 <i>Mus musculus</i>	17
Slika 7: Primarna struktura SAA4 <i>Mus musculus</i>	18
Slika 8: Grafična predstavitev proteina SAA4 <i>Mus musculus</i>	18
Slika 9: Nukleotidno zaporedje Saa-ps (<i>Mus musculus</i>)	20
Slika 10: Lokalna poravnava SAA1 in SAA2	21
Slika 11: Lokalna poravnava SAA1 in SAA3	22
Slika 12: Lokalna poravnava SAA 1 in SAA4	23
Slika 13: Lokalna poravnava SAA2 in SAA3	23
Slika 14: Lokalna poravnava SAA2 in SAA4	24
Slika 15: Lokalna poravnava SAA3 in SAA4	24
Slika 16: Poravnava zaporedij SAA1, SAA2, SAA3 in SAA4	25
Slika 17: Napoved sekundarne strukture SAA1 <i>Mus musculus</i> s spletnim orodjem SOPMA	27
Slika 18: Napoved sekundarne strukture SAA2 <i>Mus musculus</i> s spletnim orodjem SOPMA	29
Slika 19: Napoved sekundarne strukture SAA3 <i>Mus musculus</i> s spletnim orodjem SOPMA	30
Slika 20: Napoved sekundarne strukture SAA4 <i>Mus musculus</i> s spletnim orodjem SOPMA	31
Slika 21: Sekundarna struktura SAA1 z grafično razvidnimi alfa vijačnicami	33
Slika 22: Sekundarna struktura SAA2 z grafično razvidnimi alfa vijačnicami	34
Slika 23: Sekundarna struktura Saa3 z grafično razvidnimi alfa vijačnicami	34
Slika 24: Sekundarna struktura SAA4 z grafično razvidnimi alfa vijačnicami	35
Slika 25: Kristalna struktura proteina SAA3)	35
Slika 26: Slika dimerov kristalne strukture proteina SAA3	36
Slika 27: Poravnava mišjih in človeških zaporedij SAA	37
Slika 28: (A) Struktura monomera SAA3 (stranski pogled) z označenimi heliksi in označenima N- in C-koncem. (B) Tetramer proteina SAA3. Verige, ki tvorijo dimerne pare, so označene z rožnato in modro barvo [12]	38
Slika 29: Poravnava človeških in mišjih proteinov SAA	43
Slika 30: Filogenetsko drevo poravnave humanih in mišjih izotipov SAA po metodi najbližjega sosedu	44
Slika 31: Poravnava zaporedij SAA različnih živalskih vrst	46
Slika 32: Deleži podobnosti med posameznimi živalskimi vrstami	46
Slika 33: Filogenetsko drevo različnih živalskih vrst	47
Slika 34: Poravnava zaporedij SAA različnih živalskih vrst	48

Slika 35: Filogenetsko drevo različnih živalskih vrst	49
---	----

KAZALO PRILOG

Priloga A: Ekspresija *Saa1* v mišjih tkivih

Priloga B: Ekspresija *Saa2* v mišjih tkivih

Priloga C: Ekspresija *Saa3* v mišjih tkivih

Priloga D: Ekspresija *Saa4* v mišjih tkivih

SEZNAM KRATIC

ApoA-1	Apolipoprotein 1
SAA	Serumski amiloid A
A – SAA	Akutno fazni serumski amiloid A
C – SAA	Konstitutivno izraženi serumski amiloid A
HDL	Protein z visoko gostoto
HDL3	Tretja frakcija proteina z visoko gostoto
hSAA1	Humani serumski amiloid A 1
hSAA2	Humani serumski amiloid A 2
IDs	Identifikacijske številke
LPS	Lipopolisaharidi
mRNA	Informacijska ribonukleinska kislina
mSaa1	Mišji serumski amiloid A 1
mSaa2	Mišji serumski amiloid A 2
mSaa3	Mišji serumski amiloid A 3
NF- κ B	<i>Nuclear factor-κB</i> /Jedrni faktor kappa B
PTH	<i>Parathyroid hormone</i> /Obščitnični hormon
Sbjct	Predmet proučevanja
TLR-4	<i>Toll-like receptor 4</i> /Toll-podoben receptor 4
Query	Poizvedba

1 UVOD

1.1 Serumski amiloid A pri *Mus musculus*

Proteinsko družino serumskega amiloida A (SAA) sestavljajo različno izraženi apolipoproteini – akutno fazni SAA (ang. acute-phase SAAs ali A-SAAs) in konstitutivno izraženi SAA (ang. constitutive SAAs ali C-SAAs) [10, 41]. Koncentracija akutno faznega SAA se v krvi med vnetjem poveča lahko tudi do 1000-krat [4, 6, 18, 22, 26, 28, 41]. Informacijske ribonukleinske kisline (mRNA) akutno faznih SAA, ki so jih do sedaj odkrili pri različnih vrstah sesalcev (pri človeku, miših, konjih, hrčkah, zajcih, psih, kravah, ovcah) kot tudi pri vrečarjih in ribah, so se evolucijsko zelo malo spremenile, kar dokazuje, da so biološke funkcije njihovih proteinov izredno pomembne [31, 41]. Med vnetjem se akutno fazni SAA poveže predvsem s tretjo frakcijo proteina z visoko gostoto – HDL3 (ang. High density lipoprotein), kjer zamenja apolipoprotein A-1 (ApoA-1), ki je prevladujoč apolipoprotein na tem delcu [7, 41] in povzroči, da delec postane provnetni. Konstitutivno izraženi SAA so bili do sedaj odkriti le pri človeku in miškah. Za razliko od akutno faznih SAA so konstitutivno izraženi SAA le minimalno povišani med akutno faznim odzivom in se povezujejo z normalnim in akutno faznim HDL [41].

Sinteza SAA poteka primarno v jetrih kot odziv na citokine, ki jih izločajo celice imunskega sistema kot odgovor na različne infekcije [26]. Pri nekaterih sesalcih so raziskovalci odkrili sintezo SAA tudi v drugih tkivih in celicah zunaj jeter. Izražanje mRNA serumskega amiloida A pri miših je bila odkrita v pljučih, ledvicah, črevesu, vranici in srcu kot tudi v makrofagih. Sinteza in izločanje SAA pa sta bila odkrita med drugim tudi v človeških črevesnih epiteljskih celicah in v primarnih humanih endoteljskih celicah koronarne arterije [20, 26, 30, 31].

Družina genov *Saa* je najbolj raziskana pri človeku in miših. Prva obsega 4 gene, druga pa 5 genov. Za ugotavljanje ekspresije genov *Saa* je bil uporabljen spletni portal BioGPS (ang. Gene portal system). Portal je dostopen na spletnem naslovu <http://biogps.org/> in nam omogoča vpogled v opise ter karakterizacijo genov in proteinskih funkcij. Izražanje *Saa1* v mišjih tkivih je najbolj intenzivno v debelem in tankem črevesu, trebuhu, ledvicah in jetrih normalnih vnetno nestimuliranih tkivih (Priloga A). Izražanje *Saa2* v mišjih tkivih je najbolj intenzivno v ledvicah, debelem in tankem črevesu, v trebušni votlini in v jetrih normalnih vnetno nestimuliranih tkivih (Priloga B). *Saa3* izražanje je najvišje pri makrofagih, stimuliranih z lipopolisaharidi (LPS), v mikrogliji ter osteoblastih (Priloga C). *Saa4* je najbolj zvišan v jetrih, medtem ko je v drugih tkivih zelo nizko izražen (Priloga D).

Do sedaj so raziskovalci pokazali veliko klinično pomembnih vlog SAA. Je odličen kazalnik vnetja pri mnogih boleznih, kot so na primer kardiovaskularna obolenja, vpleten pa je tudi v nastanek in razvoj boleznih, kot so na primer aterosklerozna, revmatoidni artritis, sarkoidoza in rak [3, 5, 15, 41]. SAA sodeluje pri prenosu in metabolizmu lipidov [26].

1.2 Izotipi SAA pri *Mus musculus*

Pri *Mus musculus* najdemo pet genov serumskega amiloida A (*Saa1*, *Saa2*, *Saa3*, *Saa-ps1* in *Saa4*). Geni se nahajajo na kromosomu 7 [41]. Geni so bili sprva poimenovani po vrstem redu, kot so jih raziskovalci odkrili. Posledično nomenklatura v literaturi ni natančno sledila homolognim genom med vrstami. Raziskovalci so leta 1999 predlagali novo nomenklaturu, da bi lažje sledili homolognim genom med vrstami [35, 41, Preglednica 1].

Preglednica 1: Nomenklatura genske družine *Saa* pri miših po novih smernicah »SAA Subcommittee of the Amyloidosis Nomenclature Committee, 1999 [35]«. V oglatih oklepajih so zapisana stara nomenklatura imena.

Gen	Protein
<i>Saa1</i> [<i>Saa2</i>]	SAA1 [SAA2] (A-SAA)
<i>Saa2</i> [<i>Saa1</i>]	SAA2 [SAA1] (A-SAA)
<i>Saa3</i>	SAA3
<i>Saa4</i> [<i>Saa5</i>]	SAA4 [SAA5] (C-SAA)
<i>Saa-ps1</i> [<i>Saa4</i>]	pseudogen

Gena *Saa1* in *Saa2* kodirata akutno fazni serumski amiloid A. Oba gena imata skoraj identično sekvenco in organizacijo. Med akutno faznim odgovorom se izražanje obeh genov močno poveča, njuni proteinski sekvenci pa sta po literaturi identični v 90 % [7, 22, 28, 41, 48]. Gen *Saa3* pri miših prav tako kodira A-SAA, vendar se njegov protein razlikuje od SAA1 in SAA2. Protein SAA3 je bil identificiran kot izločni produkt makrofagov [41]. Človeški izotip SAA3 je bil do nedavnega poznan kot pseudogen, po najnovjših raziskavah pa so mnenje spremenili, saj so ga izledili v epiteljskih celicah mlečne žleze in materinem mleku [19, 21]. Izotip SAA3 pri miših je do sedaj veljal za »ekstrahepatični« SAA, ki ima podobne proinflatorne vloge v makrofagih in maščobnem tkivu miši kot človeška SAA1 in SAA2. Novejša študija pa je pokazala, da je SAA3 prisoten v cirkulaciji, vezan na HDL, prav tako pa je del SAA3 v plazmi prisoten tudi v obliki brez lipida [38]. Hranjenje miši s hrano z visoko vsebnostjo maščob in visoko vsebnostjo saharoze z dodanim holesterolom ali brez njega povzroča debelost in sistemsko vnetje, povečuje pa tudi ekspresijo *Saa3* v maščobnem tkivu in vsebnost makrofagov [11]. J. L. Ather in sodelavci so ustvarili miši brez gena *Saa3*, da bi ocenili prispevek *Saa3* pri imunsko pogojenih boleznih, in odkrili, da miši brez gena *Saa3* razvijejo debelost v odraslosti ter presnovno disfunkcijo skupaj z napakami pri prirojenem imunskem razvoju [1].

Četrty član družine *Saa* pri *Mus musculus* je pseudogen. Zato ga po novi nomenklaturi označujejo z oznako *Saa-ps*. Humani gen *Saa4* in mišji gen *Saa4* (prej poznan kot *Saa5*) sta edina konstitutivno izražena gena, opisana do sedaj [2, 8]. Glede na karakteristike njune izraženosti, sekvence in pozicije ju prištevamo med evolucijske homologe [2, 4 1].

1.3 Gensko ustvarjene miške uporabljene pri raziskovanju

V laboratorijih po svetu se ukvarjajo z vzrejo miši s specifično gensko sestavo. Vsaka taka sestava ustreza določeni bolezni ali motnji pri ljudeh. Vzreja miši se je močno povečala po določitvi človeškega in mišjega genoma, ki je potrdila veliko gensko podobnost med vrstama. Hitra reprodukcija in hitra zrelost postavlja miši na prvo mesto ustreznih in ekonomičnih kandidatov za znanstvene študije na sesalcih, kot je razvidno iz Preglednice 2.

Preglednica 2: Seznam najbolj znanih laboratorijev, ki se ukvarjajo z vzrejo miši.

Ime laboratorija	Dostop na internetu
The Jackson Laboratory	https://www.jax.org/
Charles River	https://www.criver.com/
Taconic Farms	https://www.taconic.com/
Harlan Laboratories	https://www.envigo.com/

Miši, vzgojene v laboratoriju, se zaradi genetskih mutacij in polimorfizmov med seboj razlikujejo glede na imunski odziv. Pri gensko spremenjenih miših (ang. Genetically engineered mice – GEM) uporabljajo embrionalne izvorne celice (ang. Embryonic stem cells – ES cells) za targetiranje genov, da bi lahko pridobili določen fenotip, podoben bolezni, ki jo proučujejo, ali da bi proučevali vlogo specifičnega gena [34]. Pri študijah z gensko spremenjenimi mišmi moramo tako upoštevati specifične komponente imunskega sistema ter imunski odzive posamezne linije miši, ne le gena, ki ga preiskujemo [34].

V raziskavah struktur mišjih proteinov SAA so najpogosteje uporabljene miši linije BALB/c [7, 24].

V raziskavah sprememb *Saa*, ki so bile izbrane za izdelavo zaključne naloge, so najpogosteje uporabljene naslednje linije miši: CBA/J, A/J, C57BL/6, C3H/HeJ, BALB/c.

Ime: C57BL/6J

Druga imena: B6, B6J, Black 6, C57 Black

Laboratorij: The Jackson Laboratory

Inbridirana linija

Značilnosti: miši linije C57BL/6J uporabljajo v raziskavah v imunologiji, pri raku in študijah biomarkerjev. C57BL/6J je najbolj pogosto uporabljena linija in prva, katere genom je bil sekvenciran. Miši C57BL/6J, visoko dovzetne za debelost, povzročeno z dieto, diabetes tipa 2 in aterosklerozo, imajo relativno nizko gostoto kosti in razvijejo starostno izgubo sluha. Pogosto jih uporabljajo v študijah, povezanih z nevrodegenerativnimi motnjami in gostoto kosti (<https://www.jax.org/strain/000664>, 5. 4. 2018).

Ime: BALB/cJ

Druga imena: BALBc, C

Laboratorij: The Jackson Laboratory

Inbridirana linija

Značilnosti: miši linije BALB/C so albine, laboratorijsko vzgojene miši, lahke za vzrejo. Med osebki moškega in ženskega spola prihaja do minimalnih razlik v teži. Miši linije BALB/c so najpogosteje uporabljene v raziskavah raka in imunologije (<https://www.labome.com/method/Laboratory-Mice-and-Rats.html>, 26. 4. 2018).

Ime: A/J

Druga imena: A, AJ

Laboratorij: The Jackson Laboratory

Inbridirana linija

Značilnosti: miši A/J uporabljajo pri raziskavah raka zaradi njihove dovzetnosti za karcinogeno inducirane tumorje. Uporabljajo jih tudi za raziskavo imunoloških aplikacij, kardiovaskularnih obolenj ter v raziskavah razvojne biologije (<https://www.jax.org/strain/000646>, 6. 5. 2018).

Ime: CBA/J

Druga imena: CBA Jackson

Laboratorij: The Jackson Laboratory

Inbridirana linija

Značilnosti: miši CBA/J so pogosto uporabljena vrsta laboratorijskih miši. Nosijo gen za mutacijo *Pde6b^{rd1}*, ki povzroča slepoto. Uporabljajo jih pri raziskovanju imunologije in

vnetnih procesov, metabolizma, sluha in kohlearne funkcije, nalezljivih bolezni in raziskavah razvoja ploda (<https://www.jax.org/strain/000656>, 5. 4. 2018).

Ime: C3H/HeJ

Druga imena: C3H, C3, C3H Heston

Laboratorij: The Jackson Laboratory

Inbridirana linija

Značilnosti: miši linije C3H/HeJ uporabljajo pri raziskavah raka, nalezljivih bolezni, senzonevralnih in kardiovaskularnih raziskavah. Miši linije C3H/HeJ so razvile spontano mutacijo *Tlr4* na lokusu za lipopolisaharidni odziv, kar je povzročilo odpornost na endotoksine, ki so glavni gradnik celične stene *gramnegativnih* bakterij in so odgovorni za nastanek številnih bolezni (<https://www.jax.org/strain/000659>, 5. 4. 2018).

Vse zgoraj opisane linije miši so inbridirane linije. Inbridirana linija pomeni homozigotne osebkke, ki so parjeni v ožjem sorodstvu (brat x sestra, izjemoma starši x potomci) in so zaradi tega genetsko identični z izjemo razlik med spoloma. Inbridirana linija nastane po vsaj 20 zaporednih generacijah medsebojnega razmnoževanja iz enega izvornega para. Znotraj inbridiranih linij naj bi bila genetska variabilnost minimalna, zato je tudi fenotipska variabilnost za večino lastnosti bistveno manjša kot pri genetsko variabilnih osebkkih, še posebno za lastnosti, ki so značilne za posamezno linijo. Zato lahko opredelimo za linijo značilen fenotip: poznana življenjska doba ter glavne patološke, imunološke, fiziološke, vedenjske in biokemične značilnosti posamezne linije. Kljub temu lahko prihaja med osebki znotraj inbridirane linije do genetskega razhajanja in posledično nastanka novih linij oziroma podlinij [29].

Knock-out (KO) miši so gensko spremenjene miši (*Mus musculus*), v katerih so raziskovalci inaktivirali obstoječi gen z zamenjavo ali prekinitvijo z umetnim delom DNK. Pomembne so za proučevanje vloge genov, ki so sekvencionirani, a njihove funkcije še niso bile določene. Prednost miši KO je v tem, da z določitvijo specifičnega gena, ki je neaktiven v miših, in opazovanjem razlik med normalnim vedenjem ali fiziologijo raziskovalci lahko sklepajo, kakšna je funkcija določenega gena v živem sesalskem organizmu ob upoštevanju interakcij med celicami, tkivi in organi pri normalnih boleznih, poškodbah in stresnih situacijah [13].

Za študije vloge serumskega amiloida A pri posredovanju sprememb v nalaganju in metabolizmu HDL med vnetjem so raziskovalci ustvarili miši, ki so jim izbili glavni dve akutno fazni obliki serumskega amiloida A, SAA1.1 in SAA 2.1. Uporabili so miši tipa C57BL/6N. Miši so poimenovali SAA knockout (SAAKO) in jih izpostavili akutni fazi za primerjavo razlik lipidov in apolipoproteinov v miših z izbitim genom in normalnih miših (ang. Wild type – WT) [9]. V raziskavi so de Beer in raziskovalci (2010) ugotovili, da SAA ne vpliva na stanje apoA-I. Upad izražanja apoA-I in apoA-II v jetrih in stanje HDL in plazmatskih trigliceridov, ki so sledili dodajanju lipopolisaharidov, se med obema skupinama

raziskovanih miši ni razlikoval. Pričakovani porast akutno faznega HDL so presenetljivo ugotovili pri obeh tipih miši [9]. V svoji raziskavi so de Beer in drugi zaključili, da SAA pri miših ne vpliva na stanje HDL, odstranjevanje apoA-I iz cirkulacije ali na velikost HDL med akutno fazo ter da je velikost akutno faznega HDL pri miših povezana z naraslo količino površinskih lipidov, predvsem fosfolipidov, in ne površinskih proteinov [9].

V svoji raziskavi so miši SAAKO uporabili tudi M. H. Kim in sodelavci. Za boljše razumevanje metabolizma akutno faznih izoform SAA in njihovega vpliva na velikost, sestavo in katabolizma HDL so ustvarili miši brez SAA1.1 ali SAA2.1, rezultate pa so nato primerjali z mišmi WT. Rezultati raziskave so pokazali, da prihaja do razlik v izražanju izoform. mRNA izoforme SAA1.1 v jetrih je bila manj izražena kot mRNA izoforme SAA2.1, kar nakazuje, da se gena, čeprav sta koordinirano regulirana, razlikujeta ali v hitrosti transkripcije ali stabilnosti njune mRNA [18]. Plazemske koncentracije SAA so bile nižje pri obeh tipih miši SAAKO v primerjavi z mišmi WT, kar kaže na to, da v akutni fazi odsotnost ene izoforme ne povzroči kompenzacijskega povečanja druge izoforme. Še več, sposobnost jetrnih celic za transkripcijo, translacijo in sekrecijo ene akutno fazne izoforme očitno ni odvisna od izražanja druge izoforme [18].

Chiba in sodelavci (2011) so v svoji raziskavi preučevali spremembe pri miših z odstranjenim genom SAA1.1 in SAA2.1 in kontrolno skupino miši, ki jih povzročajo injecirani bakterijski lipopolisaharidi (LPS). Po injeciranju lipopolisaharidov se je povečalo izražanje mRNA SAA v jetrih in koncentracije plazmatskih SAA so močno narasle v miših tipa C57BL/6, čeprav se koncentracija holesterola HDL ni spremenila. Masna spektrometrična analiza je pokazala, da je HDL iz kontrolnih miši, vbrizganih z LPS, imel visoke ravni SAA1.1/2.1 in zmanjšane ravni apoA-I. HDL iz kontrolnih miši, vbrizganih z LPS, je pokazal visoko afiniteto, ki veže biglikan v primerjavi z normalnim mišjim HDL. Nasprotno pa je HDL iz miši SAAKO, injeciranih z LPS, pokazal zelo malo vezave na biglikan [4]. Biglikan je majhen in z levcini bogat proteoglikan. Najdemo ga v zunajceličnem matriksu različnih tkiv – pogost je v kosteh, hrustancu in tetivah. Ima pomembno vlogo pri mineralizaciji in tvorbi kolagenskih fibril, domneva pa se, da z vezavo na TGF- β 1 (transformirajoči rastni dejavnik beta 1) posredno uravnava imunski sistem. Z vključitvijo v signalne poti TLR2 in TLR4 vpliva na sintezo TNF- α (dejavnik tumorske nekroze alfa), kar kaže, da je biglikan signalna molekula, ki ima pomembno vlogo v vnetnem procesu [35]. Chiba in raziskovalci so ugotovili, da ima obogatitev HDL pod vnetnimi pogoji pri SAA pomembno vlogo pri vezavi HDL na žilne proteoglikane [4].

Sellers in sodelavci so v svoji raziskavi opisali različne imunske variacije med običajnimi imbridiranimi linijami laboratorijskih miši ter njihove odzive na patogene celične poškodbe in dovzetnost do avtoimunskih bolezni. Razumevanje in uporaba teh razlik med linijami lahko izboljša razumevanje delovanja imunskih reakcij [34]. Na žalost je genetska zgodovina gensko spremenjenih miši pogosto dvoumna ali pa celo nedosegljiva. Mnogi raziskovalci se zato odločajo za uporabo miši z mutacijo ali pa »wild-type« miši, pri čemer izgubijo vrednost

prave kontrolne skupine [34]. Bistvenega pomena pri raziskavah je, da raziskovalci zberejo čim več genetske zgodovine miši, ki jih proučujejo [34].

Na spletni strani <http://www.findmice.org/> lahko dostopamo do podatkovne baze International Mouse Strain Resource (IMSR). IMSR je podatkovna baza več institucij, ki je bila ustvarjena za podporo raziskovalcem, ki uporabljajo miši kot modele za raziskovanje človeške biologije in bolezni. Na spletni strani MGI izberemo gen, ki nas zanima. V podkategoriji mutacije, aleli in fenotipi lahko dostopamo do podatka, koliko različnih mutacij gena obstaja. S klikom na mutacijo pridobimo podrobne podatke o izbrani mutaciji (opis mutacije, nomenklatura, fenotip, reference). Tam pa lahko dostopamo do podatkov spletne strani IMSR, ki nam poda število dostopnih linij, ki nosijo to mutacijo.

Mutacije SAA 1, 2, 3, 4 na sevu C57BL niso smrtne, povzročajo pa nenormalno homeostazo holesterola, spremembe vrednosti cirkulirajočega holesterola in cirkulirajočih fosfolipidov, nenormalne vrednosti cirkulirajočega SAA, spremembe vrednosti cirkulirajočega LDL, trigliceridov, znižano težo jeter, znižano dovzetnost do z dieto povzročene debelosti, normalen fenotip homeostaze/metabolizma ter spremembe velikosti belih maščobnih celic. Mutacija SAA3 na sevu BRJ pa je smrtna za vse miši pred odraslostjo (Preglednica 3).

Preglednica 3: Najbolj pogoste mutacije na genih Saa

Simbol	Ime	Sev miši, pri katerih so naredili mutacijo	Posledice, ki jih mutacija povzroča	Referenca
Saa1/Saa2^{tm1It1}	Serum amyloid A 1; targeted mutation 1, inGenious Targeting Laboratory / tm1=delecija	(C57BL/6NTac x 129S6/SvEvTac) F1	Abnormalna homeostaza holesterola, povišane vrednosti cirkulirajočega holesterola, povišane vrednosti cirkulirajočih fosfolipidov.	http://www.informatics.jax.org/reference/J:165605

Saa3^{17R3-1R}	Serum amyloid A 3; 1 Oak Ridge	BJR	Smrt vseh organizmov danega genotipa pri populaciji med oploditvijo in starostjo za odstavitvev (Mus: približno 3–4 tedne starosti).	http://www.informatics.jax.org/reference/J:73982
Saa3^{17R3-2R}	Serum amyloid A 3; 2 Oak Ridge	BJR	Smrt vseh organizmov danega genotipa pri populaciji med oploditvijo in starostjo za odstavitvev (Mus: približno 3–4 tedne starosti).	http://www.informatics.jax.org/reference/J:73982
Saa3^{tm1(KOMP)Vlcg}	Serum amyloid A 3; targeted mutation 1, Velocigene / tm1=delecija	C57BL/6 NTac	Znižane vrednosti cirkulirajočega LDL, abnormalne vrednosti cirkulirajočega SAA, nižane cirkulirajočega holesterola, trigliceridov, nižana teža jeter, nižana doznost do z dieto povzročene debelosti, normalen fenotip homeostaze/metabolizma, povečane velikosti belih maščobnih celic.	http://www.informatics.jax.org/reference/J:220630
Saa4^{tm1(KOMP)Vlcg} Celične linije	Serum amyloid A 4; targeted mutation 1, Velocigene / tm1=delecija	C57BL/6 NTac	Insercija Velocigene cassette ZEN-Ub1 povzroči delecijo velikosti 2207bp med pozicijama 53984857-53987063 na kromosomu 7.	http://www.informatics.jax.org/reference/J:136110

2 NAMEN DELA

Namen naloge je s pomočjo bioinformatičnih podatkovnih baz in orodij določiti primarno, sekundarno in terciarno strukturo različnih oblik SAA pri miših, jih primerjati ter pridobiti vpogled v njihove morebitne funkcije. S pomočjo filogenetskega drevesa bo predstavljena evolucija SAA različnih živalskih vrst in človeka ter ocenjeno, kako blizu so mišje izoforme človeškim.

SPECIFIČNI CILJI naloge so:

1. Določiti primarno strukturo SAA1, SAA2, SAA3, SAA-ps1 ter SAA4 in jih primerjati po zaporedju ter po aminokislinski sestavi.
2. Določiti sekundarno strukturo SAA1, SAA2, SAA3 SAA-ps1 ter SAA4 in primerjati njihove deleže α -vijačnic, β -struktur in naključnih zank.
3. Določiti terciarno strukturo SAA1, SAA2, SAA3 in SAA-ps1 ter SAA4.
4. S pomočjo filogenetskega drevesa predstaviti evolucijo SAA ter pokazati, kako blizu so mišje izoforme SAA človeškim.

3 METODE DELA

Za karakterizacijo strukturnih in funkcijskih lastnosti mišjih SAA je bilo uporabljeno več različnih bioinformatičnih portalov, podatkovnih baz in bioinformatičnih orodij (Preglednica 4).

Preglednica 4: Uporabljena bioinformatična orodja in portali

Portali		
Ime	Spletna povezava	Lastnosti portala
PubMed NCBI	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/	PubMed vsebuje več kot 28 milijonov citatov literature iz Biomedicine (MEDLINE, znanstvenih revij in spletnih knjig).
ExPASy	https://www.expasy.org/	ExPASy je bioinformatični portal virov SIB (Swiss Institute of Bioinformatics), ki nam omogoča dostop do znanstvenih baz in programskih orodij v različnih znanstvenih področjih, kot so na primer genetika, genomika, transkriptomika, proteomika, filogenija, sistemska biologija, populacijska biologija med drugimi. Na tem portalu lahko najdemo različne vire skupin SIB kot tudi zunanjih institucij.
BioGSP	http://biogps.org/	Portal za opis in karakterizacijo genov in proteinskih funkcij.
Bioinformatične podatkovne baze		
Ime	Spletna povezava	Opis
Uniprot	http://www.uniprot.org/	Uniprot je prosto dostopna in visokokakovostna baza podatkov proteinskih zaporedij in funkcijskih informacij.
GenBank	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/	GenBank je podatkovna baza vseh javno dostopnih genskih zaporedij DNA in je del Nacionalnega centra za

		biotehnološko informacijo (NCBI).
MGI – Mouse Genome Informatics	http://www.informatics.jax.org/	MGI je mednarodna podatkovna baza vseh laboratorijskih miši, ki zagotavlja integrirane genetske, genomske in biološke podatke z namenom lažjega proučevanja zdravja in bolezni ljudi.
International Mouse Strain Resource (IMSR)	http://www.findmice.org	IMSR je podatkovna baza več institucij, ki je bila ustvarjena za podporo raziskovalcem, ki uporabljajo miši kot modele za raziskovanje človeške biologije in bolezni.
Bioinformatična orodja		
Sekundarna in terciarna struktura		
Ime	Spletna povezava	Opis
SOPMA	https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=/NPSA/npsa_sopma.html	SOPMA je samooptimizirana določevalna metoda sekundarnih struktur s poravnami.
Phyre2	http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2/html/page.cgi?id=_index	Phyre2 je bioinformatično orodje za analizo proteinov, napovedovanje strukture, funkcij in mutacij proteinov.
Yaspin	http://www.ibi.vu.nl/programs/yaspinwww/	Je spletno orodje skrite nevronske mreže (HNN – Hidden Neural Network), ki uporablja algoritem PSI-BLAST, ki izdelava matriko PSSM (Position-Specific scoring matrix), s katero pridobimo napoved sekundarne strukture [23].
APSSP: Advanced Protein Secondary Structure Prediction Server	http://crdd.osdd.net/raghava/apssp/	Spletni strežnik APPSPT nam omogoča določevanje sekundarne strukture proteina na podlagi aminokislinskega zaporedja.
Ezmol	http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/~ezmol/	Program za prikaz 3D-proteinskih struktur.
Poravnava zaporedij		
NCBI Blast	https://blast.ncbi.nlm.nih.g	Je orodje za lokalne poravnave.

	ov/Blast.cgi	Program omogoča poravnavo nukleotidnih ali proteinskih zaporedij.
Clustal Omega	https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/	Je orodje za poravnavo 3 ali več zaporedij.
Izris filogenetskih dreves		
Clustal Omega	https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/	Je orodje za poravnavo 3 ali več zaporedij, ki omogoča tudi izris filogenetskega drevesa z metodo najbližjega soseda.

4 REZULTATI IN DISKUSIJA

4.1 Primarne strukture SAA pri *Mus musculus*

Primarna struktura proteina je zaporedje aminokislin v proteinu. Iz nje lahko razberemo aminokislinsko sestavo in dolžino proteina.

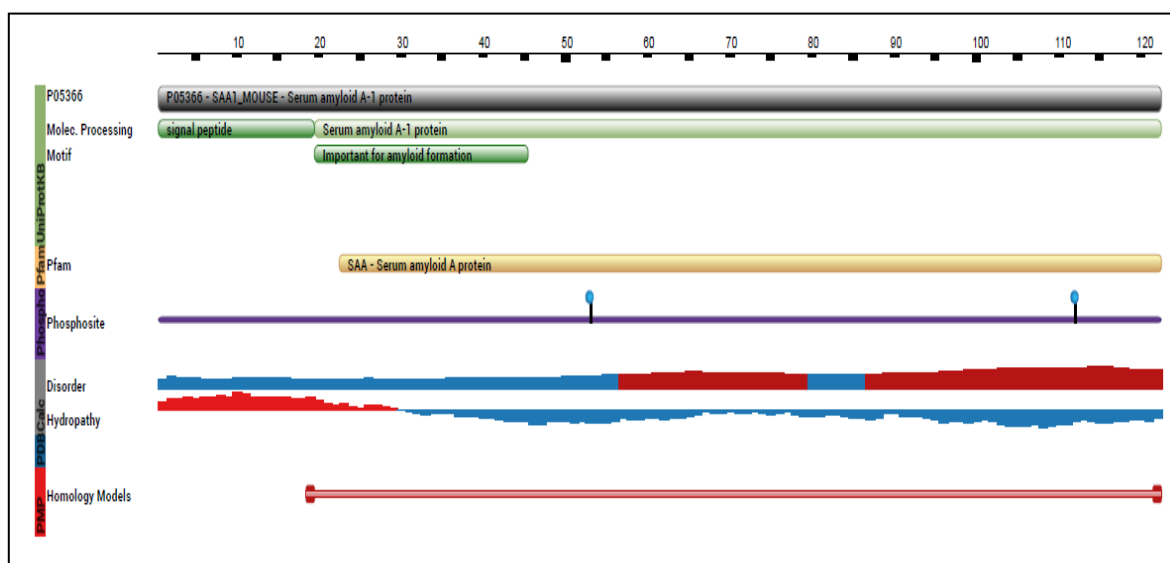
4.1.1 Primarna stuktura SAA1 (*Mus musculus*)

Primarna struktura SAA1 je pridobljena s spletne strani Uniprot (<http://www.uniprot.org>). (Slika 1). Grafična struktura protein SAA1 je pridobljena s spletne strani <http://www.rcsb.org/pdb/protein/P05366> (Slika 2).

Simbol: SAA1	Protein kodirajoč gen	IDs: MGI: 98221
Ime: Serumski amiloid A1		NCBI Gene: 20208
Sinonim: Saa-1		Uniprot: P05366

10	20	30	40	50
MKLLTSLVFC	SLLLGVCHGG	FFSFVHEAFQ	GAGDMWRAYT	DMKEANWKNS
60	70	80	90	100
DKYFHARGNY	DAAQRGPGGV	WAAEKISDGR	EAQEFFFRG	HETIADQEA
110	120			
NRHGRSGKDP	NYYRPPGLPD	KY		

Slika 1: Primarna struktura SAA1 *Mus musculus* (Vir: <http://www.uniprot.org/uniprot/P05366>)



Slika 2: Grafična predstavitev proteina SAA1 *Mus musculus*. Legenda: podatki v zelenem okvirju so pridobljeni s spletne strani UniProtKB – prikazujejo nam zgradbo proteina, lokacijo

signalnega peptida, pomembna mesta v proteinu, podatki v zelenem okvirju kažejo tudi ne-genetske variacije s spletnih strani ExPASy in dbSNP, podatki v rumenem okvirju so s spletne strani Pfam v povezavi s spletno stranjo HMMER3, podatki v vijoličnem so pridobljeni s spletne stani Phosphosite in kažejo mesta fosforilacije proteina, podatki v sivem so izračunani s pomočjo programa BioJava: rdeča barva označuje regije, ki so potencialno strukturno neurejene, modra barva pa označuje regije, ki so urejene v sekundarne strukture. Rdeča barva pri »hydropathy« označuje hidrofobne regije proteina, modra barva pa hidrofobne regije proteina. Podatki v rdečem okvirju nam prikazujejo modele homologije s spletnih strani SBKB in Protein Model Portal.

Preglednica 5: Aminokislinska sestava SAA1

Aminokislina	število aminokislin
Metionin (M)	3
Lizin (K)	7
Levcin (L)	7
Treonin (T)	3
Serin (S)	6
Valin (V)	4
Fenilalanin (F)	9
Cistein (C)	2
Glicin (G)	15
Histidin (H)	5
Glutaminska kislina (E)	7
Alanin (A)	12
Glutamin (Q)	4
Asparaginska kislina (D)	9
Triptofan (W)	3
Arginin (R)	8
Tirozin (Y)	6
Asparagin (N)	5
Izolevcin (I)	1
Prolin (P)	5

Aminokislinsko zaporedje SAA1 [*Mus musculus*] z Uniprot ID-številko P05366 sestavlja vseh dvajset aminokislin. Največji delež predstavljajo glicin (12,3 %), alanin (9,84 %), fenilalanin (7,38 %) in asparaginska kislina (7,38 %) (Preglednica 5).

4.1.2 Primarna struktura SAA2 (*Mus musculus*)

Primarna struktura SAA2 je pridobljena s spletne strani Uniprot (<https://www.uniprot.org>) (Slika 3). Grafična struktura protein SAA2 je pridobljena s spletne strani <http://www.rcsb.org/pdb/protein/P05367> (Slika 4).

Simbol: SAA2 Ime: Serumski amiloid A2 Sinonim: Saa-2	Protein kodirajoč gen	IDs: MGI: 98222 NCBI Gene: 20209 Uniprot: P05367
--	-----------------------	--

10	20	30	40	50
MKLLTSLVFC	SLLLVGCHGG	FFSFIGEAFQ	GAGDMWRAYT	DMKEAGWKDG
60	70	80	90	100
DKYFHARGNY	DAAQRGPGGV	WAAEKISDAR	ESFQEFFGRG	HEDTMADQEA
110	120			
NRHGRSGKDP	NYYRPPGLPA	KY		

Slika 3: Primarna struktura SAA2 *Mus musculus* (Vir: <http://www.uniprot.org/uniprot/P05367>)



Slika 4: Grafična predstavitev proteina SAA2 *Mus musculus*

Preglednica 6: Aminokislinska sestava SAA2

Aminokislina	# aminokislin
Metionin (M)	4
Lizin (K)	7
Levcin (L)	7
Treonin (T)	3
Serin (S)	6
Valin (V)	3
Fenilalanin (F)	9
Cistein (C)	2
Glicin (G)	17
Histidin (H)	4
Glutaminska kislina (E)	7
Alanin (A)	13
Glutamin (Q)	4
Asparaginska kislina (D)	9
Triptofan (W)	3
Arginin (R)	8
Tirozin (Y)	6
Asparagin (N)	3
Izolevcin (I)	2
Prolin (P)	5

Aminokislinsko zaporedje SAA2 [*Mus musculus*] z Uniprot ID-številko P05367 sestavlja vseh dvajset aminokislin. Največji delež predstavljajo glicin (13,93 %), alanin (10,66 %), fenilalanin (7,38 %) in asparaginska kislina (7,38 %) (Preglednica 6).

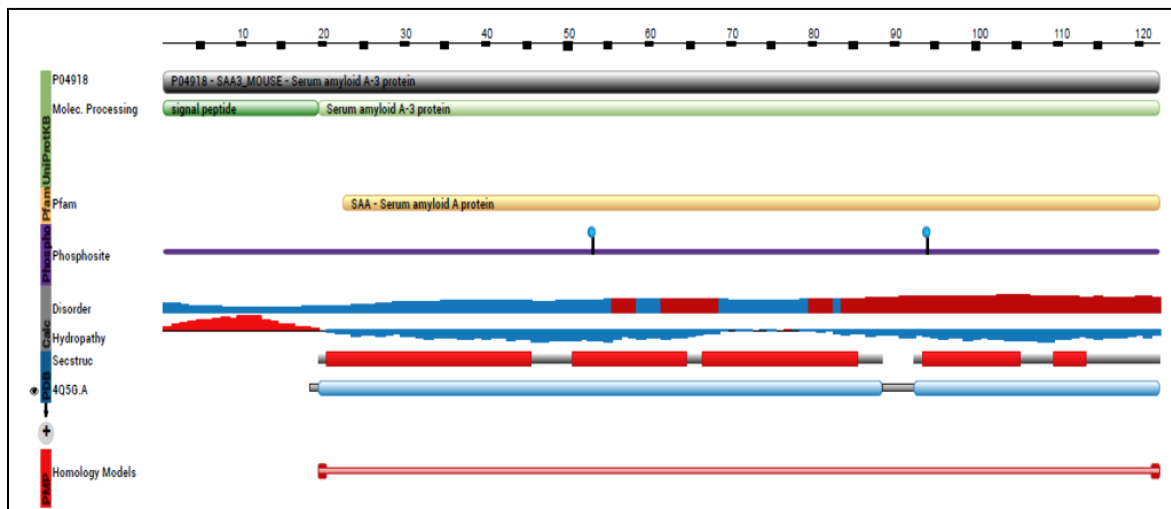
4.1.3 Primarna struktura SAA3 (*Mus musculus*)

Primarna struktura SAA3 je pridobljena s spletne strani Uniprot (<https://www.uniprot.org>) (Slika 5). Grafična struktura protein SAA3 je pridobljena s spletne strani <http://www.rcsb.org/pdb/protein/P04918> (Slika 6).

Simbol: SAA3	Protein kodirajoč gen	IDs: MGI: 98223
Ime: Serumski amiloid 3		NCBI Gene: 20210
Sinonim: I7R3, Saa-3		Uniprot: P04918

10	20	30	40	50
MKPSIAIILC	ILILGVDSQR	WVQFMKEAGQ	GSRDMWRAYS	DMKKANWKNS
60	70	80	90	100
DKYFHARGNY	DAARRGPGGA	WAAKVISDAR	EAVQKFTGHG	AEDSRADQFA
110	120			
NEWGRSGKDP	NHFRPAGLPK	RY		

Slika 5: Primarna struktura SAA3 *Mus musculus* (Vir: <http://www.uniprot.org/uniprot/P04918>)



Slika 6: Grafična predstavitev proteina SAA3 *Mus musculus*

Preglednica 7: Aminokislinska sestava SAA3

Aminokislina	# aminokislin
Metionin (M)	4
Lizin (K)	10
Levcin (L)	4
Treonin (T)	1
Serin (S)	8
Valin (V)	4
Fenilalanin (F)	5
Cistein (C)	1
Glicin (G)	12
Histidin (H)	3
Glutaminska kislina (E)	4
Alanin (A)	16
Glutamin (Q)	5
Asparaginska kislina (D)	9
Triptofan (W)	5
Arginin (R)	11
Tirozin (Y)	4
Asparagin (N)	5
Izolevcin (I)	6
Prolin (P)	5

Aminokislinsko zaporedje vzorca SAA3 [*Mus musculus*] z Uniprot ID-številko P04918 sestavlja vseh dvajset aminokislin. Največji delež predstavljajo alanin (13,11 %), glicin (9,84 %), arginin (9,02 %) in lizin (8,2 %) (Preglednica 7).

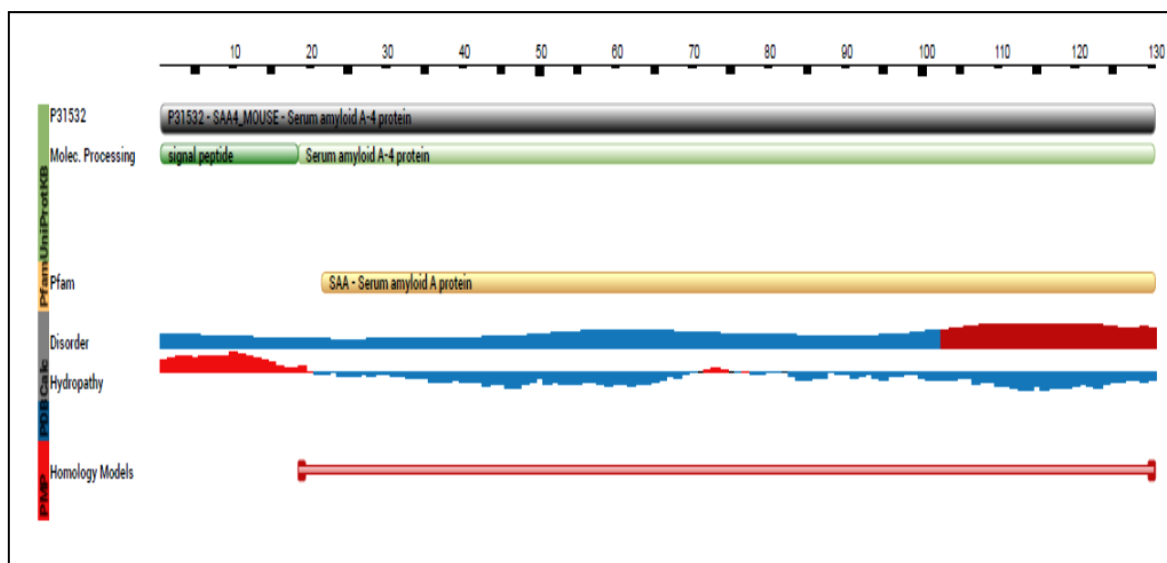
4.1.4 Primarna struktura SAA4 (*Mus musculus*)

Primarna struktura SAA4 je pridobljena s spletne strani Uniprot (<https://www.uniprot.org>) (Slika 7). Grafična struktura protein SAA4 je pridobljena s spletne strani <http://www.rcsb.org/pdb/protein/P31532>) (Slika 8).

Simbol: SAA4	Protein kodirajočega gena	IDs: MGI: 98224
Ime: Serumski amiloid 4		NCBI Gene: 20211
Sinonim: Saa-4, Saa-5		Uniprot: P31532

10	20	30	40	50
MRLATVIVLC	SLFLGVSGDG	WYFFREAVQ	GTWDLWRAYR	DNLEANYQNA
60	70	80	90	100
DQYFYARGNY	EAQQRGSGGI	WAAKIISTR	KYFQGLLNRY	YFGIRNHGLE
110	120	130		
TLQATQKAE	WGRSGKNPNH	FRPEGLPEKF		

Slika 7: Primarna struktura SAA4 *Mus musculus* (Vir: <http://www.uniprot.org/uniprot/P31532>)



Slika 8: Grafična predstavitev proteina SAA4 *Mus musculus*

Preglednica 8: Aminokislinska sestava SAA4

Aminokislina	# aminokislin
Metionin (M)	1
Lizin (K)	5
Levcin (L)	11
Treonin (T)	5
Serin (S)	7
Valin (V)	4
Fenilalanin (F)	8
Cistein (C)	1
Glicin (G)	14
Histidin (H)	2
Glutaminska kislina (E)	8
Alanin (A)	11
Glutamin (Q)	8
Asparaginska kislina (D)	4
Triptofan (W)	5
Arginin (R)	11
Tirozin (Y)	9
Asparagin (N)	8
Izolevcin (I)	5
Prolin (P)	3

Aminokislinsko zaporedje vzorca SAA4 [*Mus musculus*] z Uniprot ID-številko P31532 je sestavljeno iz vseh dvajsetih aminokislin. Največji delež predstavljajo glicin (10,77 %), alanin, arginin in lizin z enakim deležem (8,46 %) (Preglednica 8).

4.1.5 Nukleotidno zaporedje Saa-ps (*Mus musculus*)

DNA-nukleotidna struktura serumskega amiloida A – pseudogena (Saa-ps) je pridobljena s spletne strani Pubmed (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>) (Slika 9).

Simbol: Saa-ps Ime: serumski amiloid A, pseudogen Sinonim: Saa pseudogen, ENSMUSG00000061933	Pseudogen	IDs: MGI: 108518 NCBI Gene: <u>20207</u> GenBank: NG_001455
--	-----------	---

```

ORIGIN

  1 tgcacagtga tggtcataact aacacaacac aggagtagtc cctaatagagt cagcttcaaa
 61 actggacaga ccatgtagaa tcagacagtg ttctttctcta tcatgatctc aggctgctat
121 gatcacaggg tcaagccatg agtgcttttc atctttttca acattactaa gacatgggca
181 gagtcttttag ggtcatgttc ctgtggtcct tcccatccag gtgcttgggg aaggaagaca
241 gctggaaaaa ttcagacaaa tacttccatg ctcggggaac tatgatgctg cccaagggg
301 tatcagggga gcctggggcg ctgaagtcac caggtaacac agatagctgg gacactgggc
361 ctggtttgca ggggtgactc tcctcggaga ccaaagagc cctagagaaa gtcttgccag
421 cttgtgcccc accccctctt gctaatagcag ttacttctc catctctgct cagtgtagat
481 cctgtgttat gggcagagac agtacacagc tcatgctggg caggcctgcc tccaaatgca
541 gacagagtaa ttctcagtcc tgcctatctg gtgattcaca ataggggtgac cagcttgacc
601 taagcaggac tgtgcctggc aagatcaagg ttccagccct ccacccctt cctggcaatt
661 tctggttctc cctaaagcca tcccatgcaa tgaggaaact gggagggtag actgtgtcca
721 tagagcttgg tgactgatct cctgtgtgtc tgtttcttct agtgatgcaa aagagggcat
781 tcaggcattc ttcagcagtg gacacaagga ctccatggct gatcaggaag ccaacagaca
841 tgactgcagt ggcaaggacc ccaatcacta cagacctgct ggctgctg acaaatactg
901 agtgctctcc tattagctca ggaagctgtg ctgggggctt gaggacacag cctgagtttt
961 gtaccacag cacttattag atgacacata ttaggtgtgt aataaacaca tataagaaca
1021 aataacttgc aactgtgtga tttttcacac agaggggagg ggggatgtct aatacaaaaag
1081 catatggaag aaagag
//
    
```

Slika 9: Nukleotidno zaporedje Saa-ps (*Mus musculus*) (Vir: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NG_001455)

Saa-ps je pseudogen. Pseudogeni so geni, ki so zelo podobni drugemu znanemu genu na drugem lokusu in so postali nefunkcionalni skozi evolucijo zaradi delecij, kar preprečuje normalno transkripcijo in tudi translacijo.

4.1.6 Primerjave aminokislinskih zaporedij SAA, kodiranih v različnih genih

Po aminokislinski sestavi sta si najbolj podobna SAA1 in SAA2, in sicer z največjo vsebnostjo glicina, alanina, asparaginske kisline ter fenilalanina. SAA3 ima največ lizina ter serina, SAA4 pa največjo vsebnost levcina in tirozina od vseh mišjih SAA (Preglednica 9).

Preglednica 9: Aminokislinska sestava proteinov SAA 1–4

Aminokislina	število aminokislin SAA1	število aminokislin SAA2	število aminokislin SAA3	število aminokislin SAA4
Metionin (M)	3	4	4	1
Lizin (K)	7	7	10	5
Levcin (L)	7	7	4	11
Treonin (T)	3	3	1	5
Serin (S)	6	6	8	7
Valin (V)	4	3	4	4
Fenilalanin (F)	9	9	5	8
Cistein (C)	2	2	1	1

Glicin (G)	15	17	12	14
Histidin (H)	5	4	3	2
Glutaminska kislina (E)	7	7	4	8
Alanin (A)	12	13	16	11
Glutamin (Q)	4	4	5	8
Asparaginska kislina (D)	9	9	9	4
Triptofan (W)	3	3	5	5
Arginin (R)	8	8	11	11
Tirozin (Y)	6	6	4	9
Asparagin (N)	5	3	5	8
Izolevcin (I)	1	2	6	5
Prolin (P)	5	5	5	3

Za primerjavo aminokislinskih zaporedij je bilo uporabljeno orodje BLAST (ang. Align sequences protein blast). Prvi izbrani izotip je izbran kot proizvedovalno zaporedje (angl. Query), drugi pa kot predmet (angl. Subject).

BLAST je spletna aplikacija, ki je brezplačno dostopna na spletnem naslovu <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>.

Program BLAST primerja nukleotidno ali proteinsko zaporedje z zaporedji iz podatkovnih baz genomskih knjižnic in statistično izračuna obseg ujemanja med izbranimi zaporedji. Program se lahko uporablja tudi za določanje funkcionalnih in evolucijskih odnosov med izbranimi zaporedji ter za določanje, v katero družino genov spada izbrano nukleotidno oz. aminokislinsko zaporedje (povzeto po: <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>, 4. 5. 2017).

4.1.6.1 Primerjava zaporedij SAA1-SAA2

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps	Frame
240 bits(613)	6e-89()	Compositional matrix adjust.	113/122(93%)	117/122(95%)	0/122(0%)	
Features:						
Query	1	MKLLTSLVFCSLLLGVCHGGFFSFVHEAFQAGDMWRAYTDMKEANWKNSDKYFHARGNY				60
Sbjct	1	MKLLTSLVFCSLLLGVCHGGFFSF+ EAFQAGDMWRAYTDMKEA WK+ DKYFHARGNY				60
Query	61	DAAQRGPGGVWAAEKISDGREAFQEFFGRGHEDTIADQEANRHGRSGKDPNYYRPPGLPD				120
Sbjct	61	DAAQRGPGGVWAAEKISD RE+FQEFFGRGHEDT+ADQEANRHGRSGKDPNYYRPPGLP				120
Query	121	KY	122			
Sbjct	121	KY	122			

Slika 10: Lokalna poravnava SAA1 in SAA2 (zaporedje SAA1 je Query, zaporedje SAA2 Subject, vmesna vrstica predstavlja primerjavo, če je v vmesni vrstici zapisana črka aminokislina, to pomeni, da imata zaporedji na tistem mestu enako aminokislino – ang.

Identities, s + so označene podobne aminokislino, to so aminokislino, ki imajo podobno kemijsko sestavo – ang. Positives, s praznim prostorom pa so označena tista mesta, na katerih

aminokislina niso ne identične in ne podobne. Z oznako – so v zaporedju označene vrzeli – ang. Gaps.)

Zaporedji SAA1 in SAA2 (Slika 10) sta si popolnoma enaki v 93 % aminokislin. Razlike se pojavijo na aminokislinskih mestih: 25, 26, 46, 49, 50, 79, 82, 95, 120. Zaporedji sta homologni v 95 %. Homologija predstavlja evolucijsko povezanost dveh zaporedij. Homologni proteini so se razvili iz skupnega prednika, podobnost pa je med različnimi družinami homolognih proteinov različno ohranjena. Razlikujeta se na mestih 26, 46, 50, 79, 120, na teh mestih aminokislina niso ne podobne ne identične oz. se na tistih mestih pojavijo vrzeli.

4.1.6.2 Primerjava zaporedij SAA1-SAA3

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps	Frame
152 bits(384)	5e-54()	Compositional matrix adjust.	79/122(65%)	95/122(77%)	0/122(0%)	
Features:						
Query	1	MKLLTSLVFCSELLLGVCHGGFFSEVHEAFQAGDMWRAYTDMKEANWKNSDKYFHARGNY				60
Sbjct	1	MK +++ C L+LGV + F+ EA QG+ DMWRAY+DMK+ANWKNSDKYFHARGNY				60
Query	61	DAAQRGPGGVWAAEKISDGREAFQEFFGRGHEDTIADQEANRHGRSGKDPNYYRPPGLPD				120
Sbjct	61	DAA+RGPGG WAA+ ISD REA Q+F G G ED+ ADQ AN GRSGKDPN++RP GLP				120
Query	121	KY	122			
Sbjct	121	+Y	RY	122		

Slika 11: Lokalna poravnava SAA1 in SAA3

Zaporedji SAA1 in SAA3 (Slika 11) sta si popolnoma enaki v 65 % aminokislin. Razlike se pojavijo na mestih: 3–9, 11,13,17–23, 25, 26, 29, 32, 33, 40, 44, 64, 70, 74, 75, 79, 84, 85, 87, 89, 91, 94, 95, 99, 102, 103, 112, 113, 116, 120, 121. Zaporedji sta homologni v 77 %. Razlike so na mestih: 3–5, 9, 11, 17–20, 22, 23, 26, 29, 33, 70, 75, 79, 83, 87, 89, 91, 95, 99, 102, 103, 116, 120.

4.1.6.3 Primerjava zaporedij SAA1-SAA4

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps	Frame
138 bits(348)	2e-48()	Compositional matrix adjust.	68/130(52%)	88/130(67%)	8/130(6%)	
Features:						
Query	1	MKLLTSLVFCSLLLGVCHGGFFSFVHEAFQAGDMWRAYTDMKEANWKNSDKYFHARGNY	60			
Sbjct	1	M+L T +V CSL LGV G++SF EA QG D+WRAY D EAN++N+D+YF+ARGNY	60			
Query	61	DAAQRGPGGVWAAEKISDGREAFQEFFGR-----GHEDTIADQEANRHGRSGKDPNY	112			
Sbjct	61	+A QRG GG+WAA+ IS R+ FQ R G E A Q+A GRSGK+PN+ EAQQRGSGGIWAAKIISTSRKYFQGLLNRYFYGIRNHGLETQLQATQKAEEWGRSGKPNH	120			
Query	113	YRPPGLPKY 122				
Sbjct	121	+RP GLP+K+ FRPEGLPEKF 130				

Slika 12: Lokalna poravnava SAA 1 in SAA4

Zaporedji SAA1 in SAA4 (Slika 12) sta si popolnoma enaki v 52 % aminokislin. Razlike se pojavijo na mestih: 2, 4, 6, 7, 9,13, 17–19, 21, 22, 25, 26, 29, 32, 33, 35, 40, 42, 43, 47, 48, 50, 52, 55, 61, 63, 67, 70, 74, 75, 78, 79, 81, 82, 85–88, 90–97, 99, 101–103, 105, 107, 109–111, 117, 120, 121, 124, 128, 130. Zaporedji sta homologni v 67 %. Razlike so na mestih: 4, 6, 9, 13, 17–19, 25, 26, 29, 32, 33, 40, 42, 43, 63, 67, 75, 78, 79, 82, 85–88, 90–97, 99, 101–103, 105, 109–111, 124.

4.1.6.4 Primerjava zaporedij SAA2-SAA3

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps	Frame
147 bits(370)	6e-52()	Compositional matrix adjust.	76/122(62%)	94/122(77%)	0/122(0%)	
Features:						
Query	1	MKLLTSLVFCSLLLGVCHGGFFSFVHEAFQAGDMWRAYTDMKEAGWKDGDYFHARGNY	60			
Sbjct	1	MK +++ C L+LGV + F+ EA QG+ DMWRAY+DMK+A WK+ DKYFHARGNY	60			
Query	61	DAAQRGPGGVWAAEKISDARESFQEFFGRGHEDTMADQEANRHGRSGKDPNYYRPPGLPA	120			
Sbjct	61	DAA+RGPGG WAA+ ISDARE+ Q+F G G ED+ ADQ AN GRSGKDPN++RP GLP DAARRGPGGAWAAKVISDAREAVQKFTGHGAEDSRADQFANEWGRSGKDPNHFPAAGLPK	120			
Query	121	KY 122				
Sbjct	121	+Y RY 122				

Slika 13: Lokalna poravnava SAA2 in SAA3

Zaporedji SAA2 in SAA3 (Slika 13) sta si popolnoma enaki v 62 % aminokislin. Razlike se pojavijo na mestih: 3–9, 11, 13, 17–20, 21–23, 25 26, 29, 32, 33, 40, 44, 46, 49, 50, 64, 70, 74, 75, 82, 83, 85, 87, 89, 91, 94, 95, 99, 102, 103, 112, 113, 116, 120, 121. Zaporedji sta homologni v 77 %. Razlike so na mestih: 3–5, 9, 11, 17–20, 22, 23, 26, 29, 33, 46, 50, 70, 75, 83, 87, 89, 91, 95, 99, 102, 103, 116, 120.

4.1.6.5 Primerjava zaporedij SAA2-SAA4

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps	Frame
134 bits(336)	1e-46()	Compositional matrix adjust.	66/130(51%)	86/130(66%)	8/130(6%)	
Features:						
Query	1	MKLLTSLVFCSLLLGVCHGGFFSFIGEAFQAGDMWRAYTDMKEAGWKDGDYFARGNY				60
Sbjct	1	MRLATVIVLCSLFLGVSGDGWYSFFREAVQGTWDLWRAYRDNLEANYQNADQYFYARGNY				60
Query	61	DAAORGGVWAAEKISDARESFQEFFGR-----GHEDTMADQEANRHGRSGKDPNY				112
Sbjct	61	EAQQRGSGGIWAAKIISTSRKYFQGLLNRYFFGIRNHGLETQLQATQKAEWGRSGKPNH				120
Query	113	YRPPGLPAKY				122
Sbjct	121	FRPEGLPEKF				130

Slika 14: Lokalna poravnava SAA2 in SAA4

Zaporedji SAA2 in SAA4 (Slika 14) sta si popolnoma enaki v 51 % aminokislin. Razlike se pojavijo na mestih: 2, 4, 6, 7, 9, 13, 17–19, 21, 22, 25, 26, 29, 32, 33, 35, 40, 42, 43, 46–50, 52, 55, 61, 63, 67, 70, 74, 75, 78, 79, 81, 82, 85–88, 90–97, 99, 101–103, 105, 107, 109–111, 117, 120, 121, 124, 128, 130. Zaporedji sta homologni v 66 %. Razlike se pojavijo na mestih: 4, 6, 9, 13, 17–19, 25, 26, 29, 32, 33, 40, 42, 43, 46, 50, 63, 67, 75, 78, 82, 85–88, 90–97, 99, 101–103, 105, 109–111, 124, 128.

4.1.6.6 Primerjava zaporedij SAA3-SAA4

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps	Frame
141 bits(355)	2e-49()	Compositional matrix adjust.	66/130(51%)	88/130(67%)	8/130(6%)	
Features:						
Query	1	MKPSIAIILCILILGVDSQRWVQFMKEAGQSRDMWRAYSMDKKNWKNDSKYFHARGNY				60
Sbjct	1	MRLATVIVLCSLFLGVSGDGWYSFFREAVQGTWDLWRAYRDNLEANYQNADQYFYARGNY				60
Query	61	DAARRGGAWAAKVISDAREAVQKFT-----GHGAEDSRADQFANEWGRSGKDPNH				112
Sbjct	61	EAQQRGSGGIWAAKIISTSRKYFQGLLNRYFFGIRNHGLETQLQATQKAEWGRSGKPNH				120
Query	113	FRPAGLPKRY				122
Sbjct	121	FRPEGLPEKF				130

Slika 15: Lokalna poravnava SAA3 in SAA4

Zaporedji SAA3 in SAA4 (Slika 15) sta si popolnoma enaki v 51 % aminokislin. Razlike se pojavijo na mestih: 2–6, 8, 11, 13, 17–20, 22, 23, 25, 26, 29, 32, 33, 35, 40, 42–44, 47, 48, 50, 52, 55, 61, 63, 64, 67, 70, 75, 78, 79, 81–83, 85–96, 99, 101–103, 105, 107, 109, 117, 124, 128–130. Zaporedji sta homologni v 67 %. Razlike se pojavijo na mestih: 3, 5, 6, 11, 13, 17–20, 22, 23, 25, 29, 33, 40, 42, 43, 63, 67, 70, 78, 79, 82, 83, 85–96, 99, 101, 102, 105, 107, 109, 124.

4.1.6.7 Medsebojna primerjava zaporedij SAA1, SAA2, SAA3 in SAA4

Poravnava aminokislinskih zaporedij različnih izotipov nam pokaže pregled nad podobnostmi in razlikami med zaporedji. Najbolj podobna sta si izotipa SAA1 in SAA2. Njuna identičnost je kar 93-odstotna. Od njiju se najmanj razlikuje SAA3, ki je z SAA1 in SAA2 homologen v 77 %. Pri identičnosti v relacijah SAA1/SAA3 in SAA2/SAA3 pa prihaja do majhnih razlik. SAA1 in SAA3 sta identična v 65 %, SAA2 in SAA3 pa sta identična v 62 % (Preglednica 10).

Preglednica 10: Deleži podobnosti in identičnosti proteinov SAA pri *Mus musculus*

		Identičnost			
podobnost homologija	%	SAA1	SAA2	SAA3	SAA4
	SAA1		93	65	52
	SAA2	95		62	51
	SAA3	77	77		51
	SAA4	67	66	67	

SAA4 je od vseh treh ostalih proteinov večji za 8 aminokislin. Iz poravnave vseh štirih zaporedij opazimo, da odsek NRYYFGIR ni prisoten drugje (Slika 16). Pri primerjavi identičnosti in homologije SAA4 z ostalimi proteini pa prihaja do minimalnih razlik (1 %) Njegovo zaporedje je še najbolj podobno zaporedju SAA1, z 52-odstotno identičnostjo in z 67-odstotno homologijo.

```

CLUSTAL O(1.2.4) multiple sequence alignment

sp|P31532|SAA4_MOUSE      MRLATVIVLCSLFLGVSGDGWYSFFREAVQGTWDLWRAYRDNLEANYQNADQYFYARGNY  60
sp|P04918|SAA3_MOUSE      MKPSIAIILCILILGVDSQRWVQFMKEAGQGSRDMWRAYSMDKKNWKNSDKYFHARGNY  60
sp|P05366|SAA1_MOUSE      MKLLTSLVFCSLLLGVCHGGFFSFVHEAFQAGDMWRAYTDMKEANWKNSDKYFHARGNY  60
sp|P05367|SAA2_MOUSE      MKLLTSLVFCSLLLGVCHGGFFSFVHEAFQAGDMWRAYTDMKEAGWKDGDKYFHARGNY  60
*:      ::* *:* **   : .* ** ** : :**** *  :*.:.:*:*:*****

sp|P31532|SAA4_MOUSE      EAQQRGSGGIWAAKIISTSRKYFQGLLNRYYFGIRNHGLETLQATQKAEWGRSGKPNH  120
sp|P04918|SAA3_MOUSE      DAARRGPGGAWAAKVISDAREAVQKFT-----GHGAEDSRADQFANEWGRSGKDPNH  112
sp|P05366|SAA1_MOUSE      DAAQRGPGGVWAAEKISDGREAFQEFF-----GRGHEDTIADQEANRHGRSGKDPNY  112
sp|P05367|SAA2_MOUSE      DAAQRGPGGVWAAEKISDARES FQEFF-----GRGHEDTMADQEANRHGRSGKDPNY  112
:* :** ** ** : ** .* : * :      : * * * * * : * : * : * :

sp|P31532|SAA4_MOUSE      FRPEGLPEKF      130
sp|P04918|SAA3_MOUSE      FRPAGLPKRY      122
sp|P05366|SAA1_MOUSE      YRPPGLPKY       122
sp|P05367|SAA2_MOUSE      YRPPGLPAKY      122
:* ** ** :
    
```

Slika 16: Poravnava zaporedij SAA1, SAA2, SAA3 in SAA4 (Vir: <https://www.ebi.ac.uk/Tools/services/web/toolresult.ebi?jobId=clustalo-I20180427-092926-0766-33773401-pg&analysis=alignments>); znak * pomeni, da je aminokislina v vseh zaporedjih enaka; znaka . oz. : ponazarjata podobne aminokisliline, pri čemer znak : pomeni večjo podobnost kot znak ., prazen prostor pa označuje mesta, na katerih se aminokisliline med seboj razlikujejo.

Odsotnost odseka zaporedja aminokislin NRYFFGIR pri SAA1, SAA2 in SAA3 bi lahko pomenila, da je v preteklosti prišlo do razvoja genov *Saa* iz enega samega gena. Delecije v zaporedjih so pogostejše od insercij, substitucij in podvojitvev, zato lahko sklepamo, da je SAA4 z daljšim zaporedjem aminokislin (v našem primeru SAA4) najstarejši znotraj družine SAA.

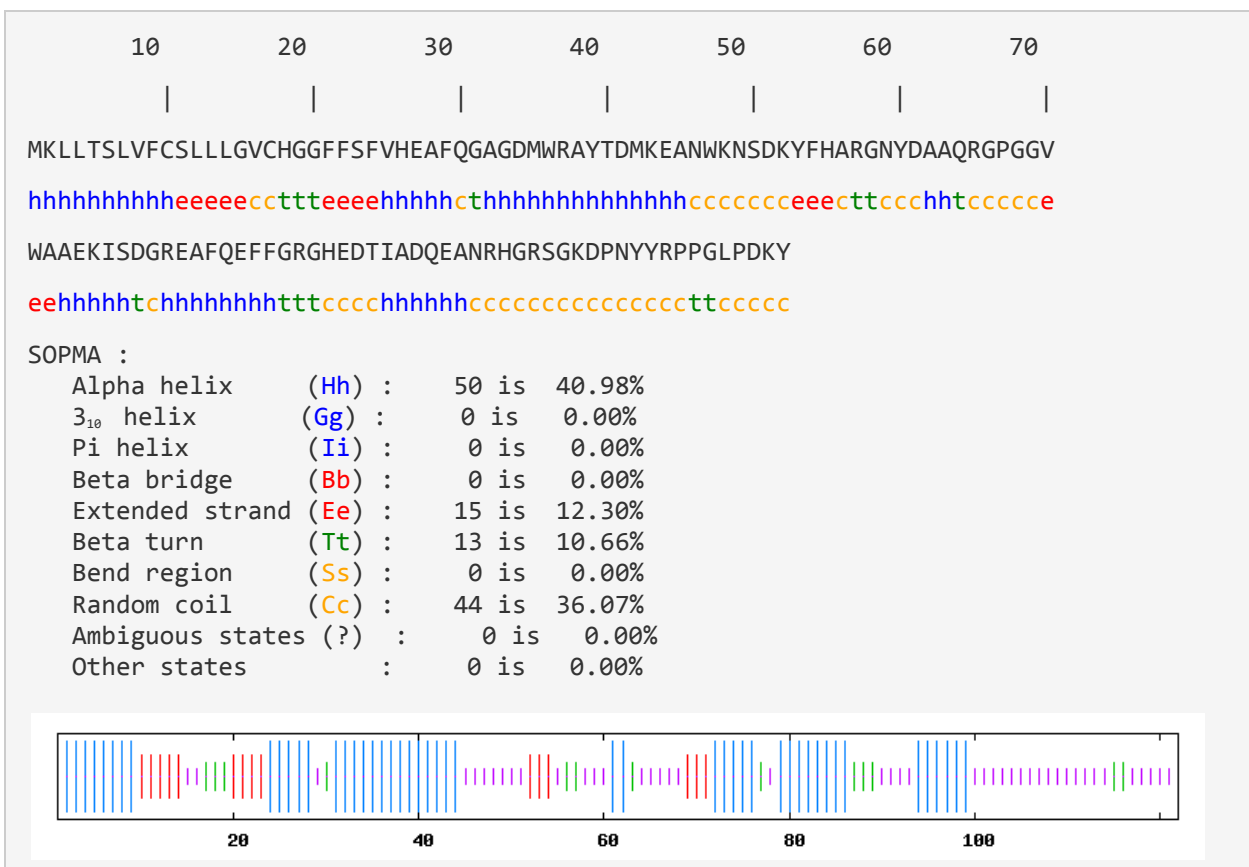
4.2 Sekundarne strukture SAA pri *Mus musculus*

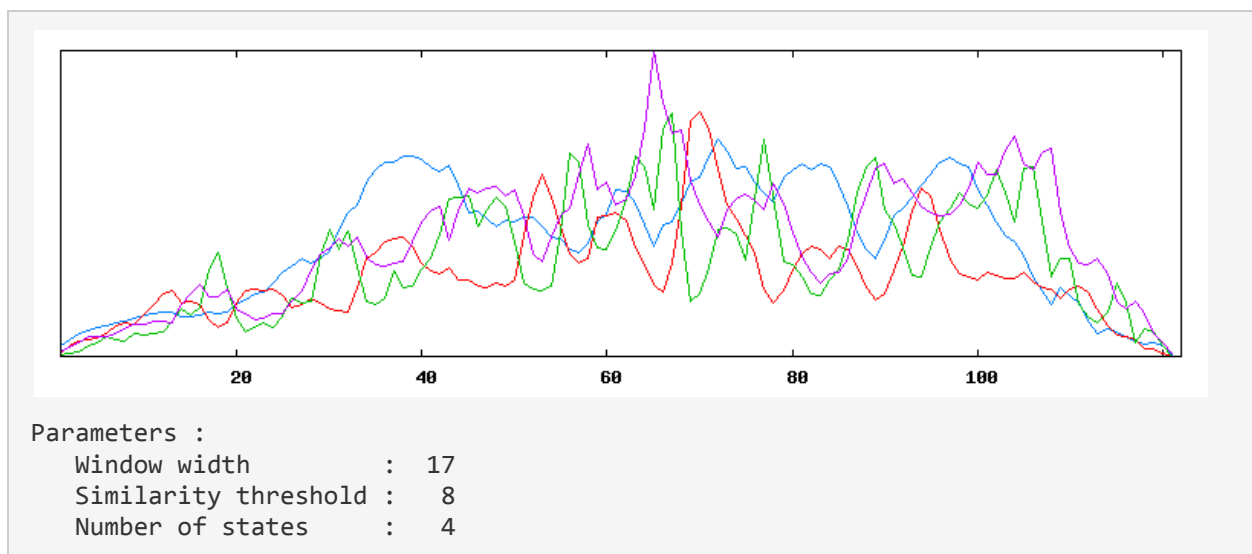
Sekundarna struktura proteina nam predstavlja drugi nivo strukture proteinov in nam prikazuje lokalno konformacijo segmentov proteina. Posamezne aminokisliline se med seboj povežejo z različnimi kemijskimi vezmi (ionske, vodikove, kovalentne). Sekundarne strukturne elemente predstavljajo alfa vijačnice, beta strukture in naključne zanke.

Za pridobitev sekundarnih struktur proteinov je bilo uporabljeno orodje SOPMA (ang. Self-Optimized Prediction Method with Alignment), ki je brezplačno dostopna spletna aplikacija na spletnem naslovu

https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=/NPSA/npsa_sopma.html.

4.2.1 Sekundarna struktura SAA1 (*Mus musculus*)





Slika 17: Napoved sekundarne strukture SAA1 *Mus musculus* s spletnim orodjem SOPMA (Vir: <https://npsa-prabi.ibcp.fr/tmp/b8f0f85947b7.sopma>; ID: b8f0f85947b7)

Spletno orodje SOPMA (ID: b8f0f85947b7) nakazuje, da naj bi struktura SAA1 vsebovala: 50 aminokislinskih mest, ki predstavljajo alfa vijačnice, kar predstavlja 40,98-odstotni delež celotnega zaporedja, 44 aminokislinskih mest, ki predstavljajo naključne zanke, kar predstavlja 36,07-odstotni delež celotnega zaporedja, 28 aminokislinskih mest, ki predstavljajo beta strukture, kar predstavlja 22,96-odstotni delež celotnega zaporedja (Slika 17).

Poleg spletnega orodja SOPMA je bilo uporabljeno še spletno orodje Yaspin (SAA1 jobID: 7d0d56624dca977d1884f0899151b20, SAA2jobID: 4abd7feab0f05a598134eb7fe5eb78f6, SAA3 jobID: d4ec6aedf2f3681b4d745a29a85d1834, SAA4 jobID: bc83812fbceb9098094b667f18c99189) in spletno orodje APSSP (SAA1 jobID:18376, SAA2 jobID:13073, SAA3 job ID:61818, SAA4 jobID: 11928) (ang. Advanced Protein Secondary Structure Prediction Server).

S pomočjo Googlovega Učenjaka (https://scholar.google.si/schhp?hl=sl&as_sdt=0,5) je bila preverjena še citiranost orodij za določevanje sekundarnih struktur:

Orodje SOPMA: članek citiran 1253-krat, vir iz leta 1995 (G. Deleage 1995).

Orodje Yaspin: članek citiran 257-krat, vir iz leta 2005 (K. Lin 2005).

Orodje APSSP: članek citiran 64-krat, vir iz leta 1993 (T. Yi, 1993).

Rezultati posameznih spletnih orodij so prikazani (Preglednica 11). Za vsako sekundarno strukturo je bilo izračunano povprečje. Rezultati kažejo, da je SAA1 sestavljen večinoma iz alfa vijačnic (47,0 %) in naključnih zank (34,1 %). Beta strukture predstavljajo 18,9 % celotnega mišjega SAA1.

Number of states : 4

Slika 18: Napoved sekundarne strukture SAA2 *Mus musculus* s spletnim orodjem SOPMA (Vir: <https://npsa-prabi.ibcp.fr/tmp/cfc57bf5bab3.sopma>; (ID: cfc57bf5bab3))

Spletno orodje SOPMA (ID: cfc57bf5bab3) nakazuje, da naj bi struktura SAA2 vsebovala: 52 aminokislinskih mest, ki predstavljajo alfa vijačnice, kar predstavlja 42,62-odstotni delež celotnega zaporedja, 40 aminokislinskih mest, ki predstavljajo naključne zanke, kar predstavlja 32,79-odstotni delež celotnega zaporedja, 30 aminokislinskih mest, ki predstavljajo beta strukture, kar predstavlja 24,59-odstotni delež celotnega zaporedja (Slika 18).

Poleg spletnega orodja SOPMA sta bili uporabljeni še spletni orodji Yaspin in APSSP. Rezultati posameznih spletnih orodij so prikazani (Preglednica 12). Za vsako sekundarno strukturo sem izračunala povprečje. Rezultati kažejo, da je SAA2 sestavljen večinoma iz alfa vijačnic (43,5 %) in naključnih zank (37,1 %). Beta strukture predstavljajo 19,4 % celotnega mišjega SAA2.

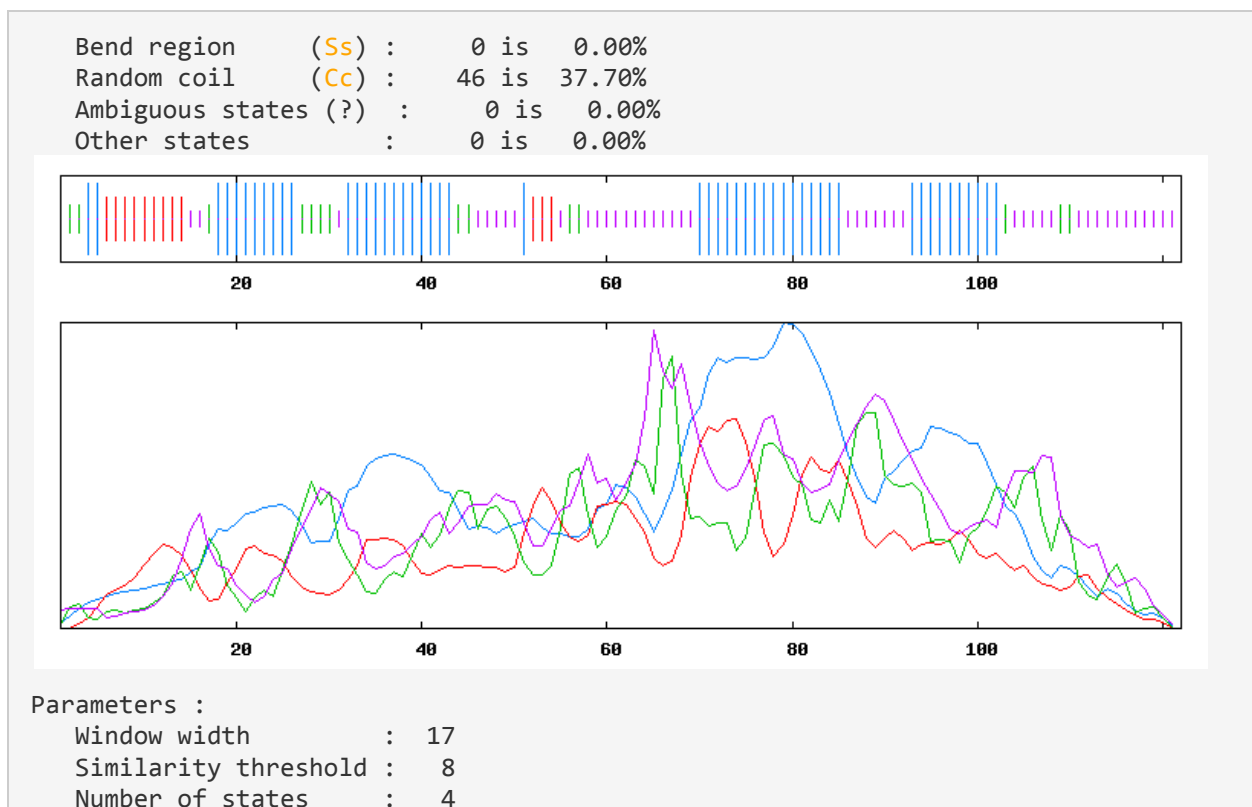
Preglednica 12: Deleži sekundarnih struktur v SAA2 v odstotkih (%)

	Alfa vijačnica (α)	Beta struktura (β)	Naključna zanka
SOPMA	42,6	24,6	32,8
Yaspin	41,0	22,1	36,9
APSSP	47,0	11,6	41,5
Povprečje	43,5	19,4	37,1

4.2.3 Sekundarna struktura SAA3 (*Mus musculus*)

```

    10      20      30      40      50      60      70
    |       |       |       |       |       |       |
MKPSIAIILCILILGVDSQRWVQFMKEAGQGSRDWRAYSDMKKANWKNSDKYFHARGNYDAARRGPGGA
cctthheeeeeeeecctthhhhhhhhttttchhhhhhhhhhhhtcccccheeecttcccccccccccc
WAAKVISDAREAVQKFTGHGAEDSRADQFANEWGRSGKDPNHFRPAGLPKRY
hhhhhhhhhhhhhhhhhhccccchhhhhhhhhhtcccccttccccccccccc
Sequence length : 122
SOPMA :
Alpha helix      (Hh) : 50 is 40.98%
310 helix      (Gg) : 0 is 0.00%
Pi helix        (Ii) : 0 is 0.00%
Beta bridge     (Bb) : 0 is 0.00%
Extended strand (Ee) : 12 is 9.84%
Beta turn       (Tt) : 14 is 11.48%
```



Slika 19: Napoved sekundarne strukture SAA3 *Mus musculus* s spletnim orodjem SOPMA (Vir: <https://npsa-prabi.ibcp.fr/tmp/a4a9e3768c34.sopma>; ID: a4a9e3768c34)

Spletno orodje SOPMA (ID: a4a9e3768c34) nakazuje, da naj bi struktura SAA3 vsebovala: 50 aminokislinskih mest, ki predstavljajo alfa vijačnice, kar predstavlja 40,98-odstotni delež celotnega zaporedja, 46 aminokislinskih mest, ki predstavljajo naključne zanke, kar predstavlja 37,70-odstotni delež celotnega zaporedja, 26 aminokislinskih mest, ki predstavljajo beta strukture, kar predstavlja 21,32-odstotni delež celotnega zaporedja (Slika 19).

Poleg spletnega orodja SOPMA sta bili uporabljeni še spletni orodji Yaspin in APSSP. Rezultati posameznih spletnih orodij so prikazani (Preglednica 13). Za vsako sekundarno strukturo je bilo izračunano povprečje. Rezultati kažejo, da je SAA3 sestavljen večinoma iz alfa vijačnic (41,1 %) in naključnih zank (39,5 %). Beta strukture predstavljajo 19,2 % celotnega mišjega SAA3.

Preglednica 13: Deleži sekundarnih struktur v SAA3 v odstotkih (%)

	Alfa vijačnica (α)	Beta struktura (β)	Naključna zanka
SOPMA	40,1	21,3	37,7
Yaspin	36,1	24,6	39,3
APSSP	47	11,6	41,5
Povprečje	41,1	19,2	39,5

predstavljajo beta strukture, kar predstavlja 23,08-odstotni delež celotnega zaporedja (Slika 20).

Poleg spletnega orodja SOPMA sta bili uporabljeni še spletni orodji Yaspin in APSSP. Rezultate posameznih spletnih orodij za SAA4 so prikazani (Preglednica 14). Za vsako sekundarno strukturo je bilo izračunano povprečje. Rezultati kažejo, da je SAA4 sestavljen večinoma iz alfa vijačnic (45,4 %) in naključnih zank (34,9 %). Beta strukture predstavljajo 18,8 % celotnega mišjega SAA4.

Preglednica 14: Deleži sekundarnih struktur v SAA4 v odstotkih (%)

	Alfa vijačnica (α)	Beta struktura (β)	Naključna zanka
SOPMA	53,1	23,1	23,6
Yaspin	36,1	22,3	39,2
APSSP	47,1	11,0	41,9
Povprečje	45,4	18,8	34,9

4.2.5 Medsebojne primerjave sekundarnih struktur SAA proteinov pri *Mus musculus*

Za ocenitev sekundarnih struktur SAA je bilo uporabljenih več spletnih orodij. Vsi proteini SAA so si po deležu posameznih sekundarnih struktur zelo podobni (Preglednica 15).

SAA1 izstopa po deležu alfa vijačnic za približno 2–6 % (47 %), vsebuje pa najnižji delež naključnih zank (34,1 %), ki je za vsaj 1–5 % nižji v primerjavi z ostalimi. Najnižji delež alfa vijačnic vsebuje SAA3, in sicer 41,1 %. SAA2 vsebuje največji delež beta struktur (19,4 %) med vsemi proteini. SAA3 pa vsebuje največji delež naključnih zank (39,5 %) med izbranimi proteini. Glavne spremembe aminokislin med SAA1, SAA2 in SAA3 se pojavljajo znotraj alfa vijačnic, kar ima velik vpliv na strukturo. Različne aminokisliline imajo različne lastnosti tvorjenja alfa vijačnic. Aminokisliline metionin, alanin, levcin, glutaminska kislina in lizin imajo lastnosti za tvorjenje alfa vijačnic, prolin in glicin pa po navadi ne tvorita alfa vijačnic, ker ne moreta donirati amidne vodikove vezi (https://en.wikipedia.org/wiki/Alpha_helix).

Preglednica 15: Napovedi deležev sekundarnih struktur za posamezni izotip serumskega amiloida A v odstotkih (%)

	Alfa vijačnice	Beta strukture	Naključna zanka	Σ
SAA1	47,0	18,9	34,1	100,0
SAA2	43,5	19,4	37,1	100,0
SAA3	41,1	19,2	39,5	99,8
SAA4	45,4	18,8	34,9	99,1

4.3 Terciarne strukture SAA pri *Mus musculus*

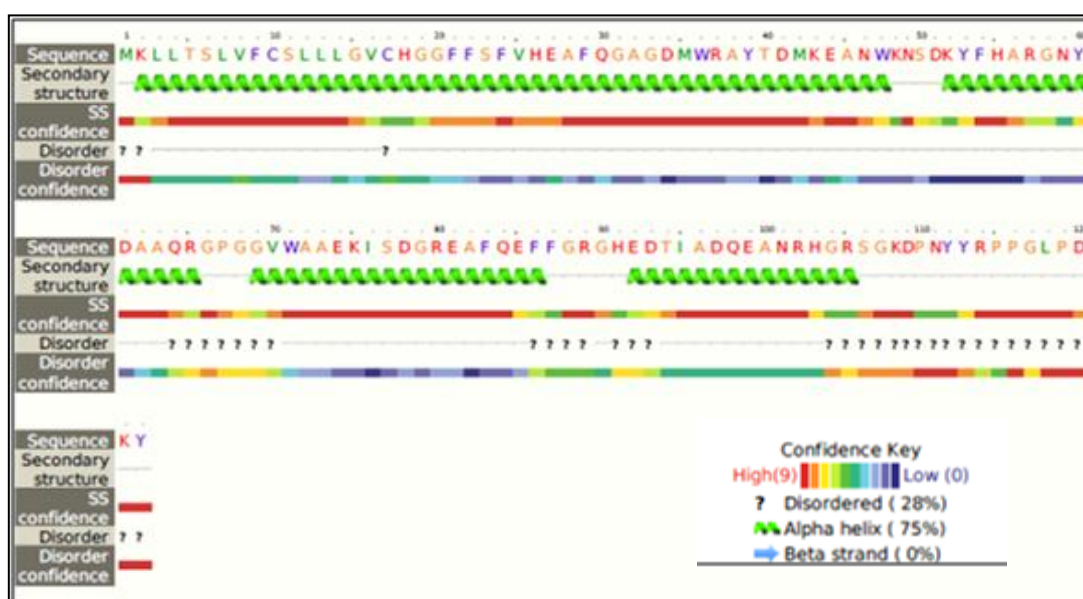
Terciarna struktura predstavlja prostorsko organizacijo polipeptidne verige. Struktura je stabilizirana s hidrofobnimi interakcijami med nepolarnimi stranskimi verigami aminokislin v jedru proteina. Protein se zvije tako, da v notranjost skriva nepolarne ostanke, polarni pa bodo na zunanji strani tvorili vodikove vezi s polarnimi aminokislinskimi stranskimi verigami.

Za pridobitev terciarnih struktur proteinov sem uporabila orodje PHYRE2 (**P**rotein **H**omology/analog**Y** **R**ecognition **E**ngine). Phyre 2 je spletno orodje, ki je dostopno brezplačno na spletnem naslovu: <http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2/html/page.cgi?id=index>.

4.3.1 Sekundarne strukture, pomembne za terciarno strukturo

SAA1

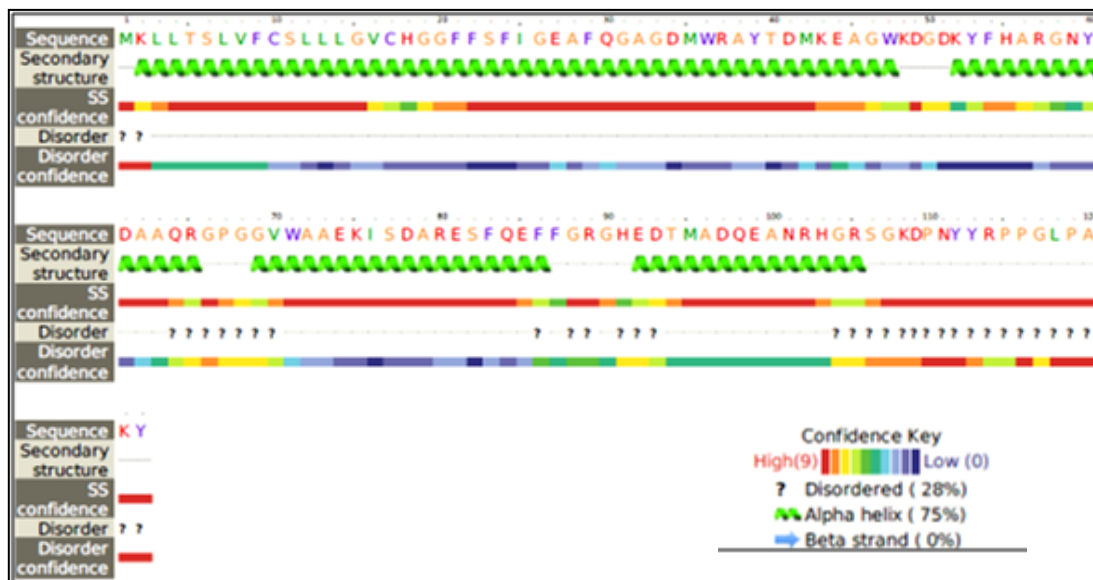
SAA1 naj bi bil po napovedih orodja Phyre 2 (JobID: cb595412abe9ef4) sestavljen iz snopa 4 alfa vijačnic. Prva vijačnica je dolžine 46 aminokislin (od 2. do 47. mesta v zaporedju) (Slika 21). Signalni peptid poteka od 1 do 19 (dolžine 19 AK).



Slika 21: Sekundarna struktura SAA1 z grafično razvidnimi alfa vijačnicami (Phyre 2; jobID: 0cb595412abe9ef4)

SAA2

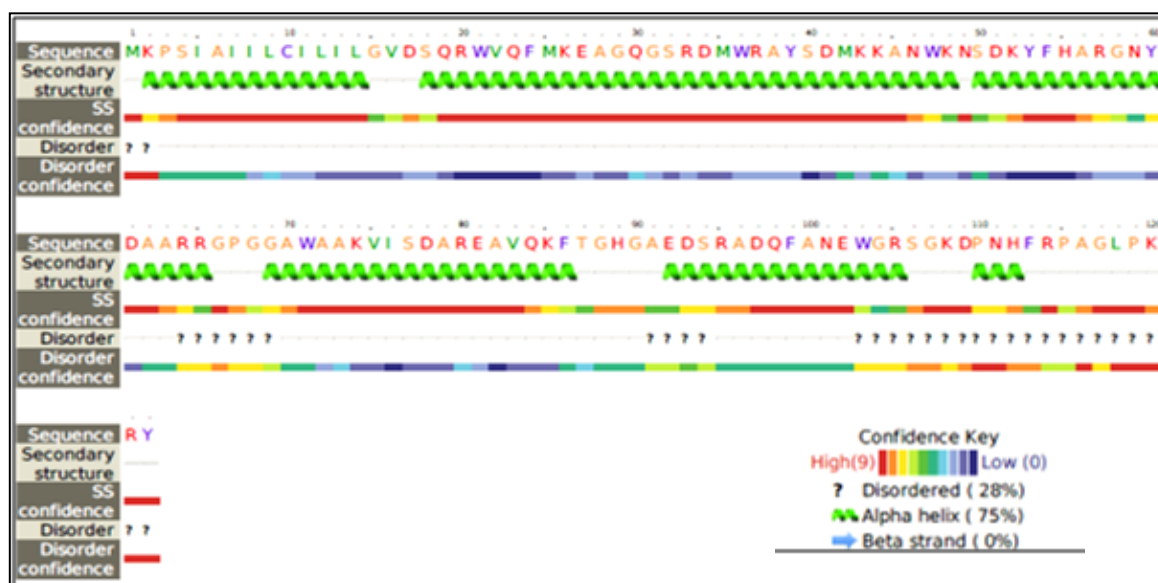
SAA2 naj bi bila po napovedi orodja Phyre 2 (job ID: 726c2ed1117d14ba) sestavljena iz snopa 4 alfa vijačnic. Signalni peptid poteka od 1. do 19. mesta zaporedja in je dolg 19 AK (Slika 22).



Slika 22: Sekundarna struktura SAA2 z grafično razvidnimi alfa vijačnicami (Phyre 2; jobID: 726c2ed1117d14ba)

SAA3

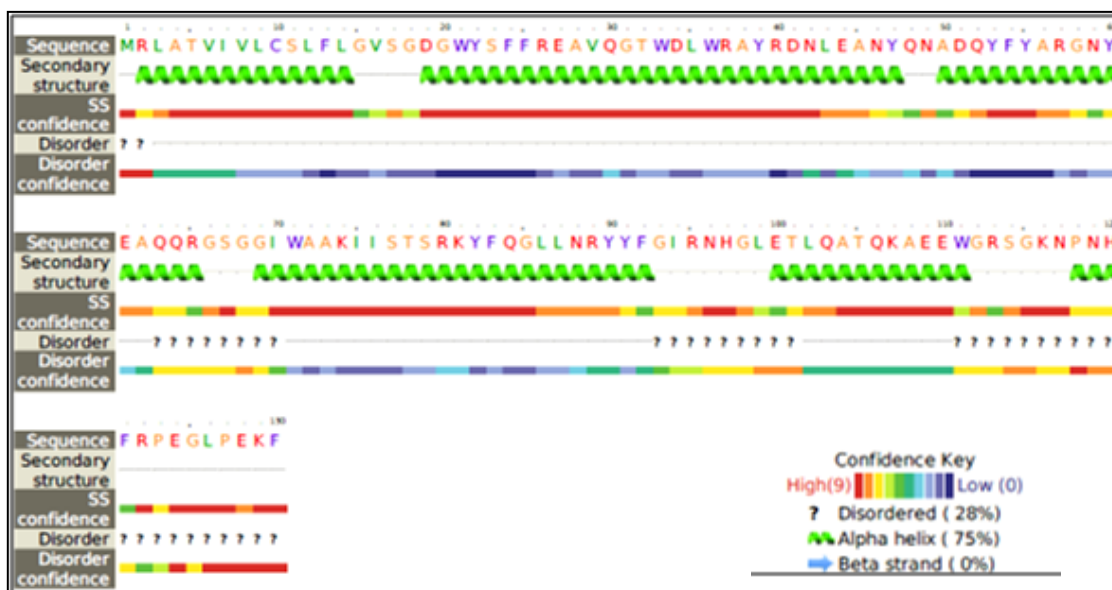
SAA3 naj bi bil po napovedi orodja Phyre 2 (job ID: 29d4b2c22be56849) sestavljen iz snopa 5 alfa vijačnic. Signalni peptid poteka od 1. do 19. mesta zaporedja in je dolg 19 AK (Slika 23).



Slika 23: Sekundarna struktura Saa3 z grafično razvidnimi alfa vijačnicami (Phyre 2; jobID: 29d4b2c22be56849)

SAA4

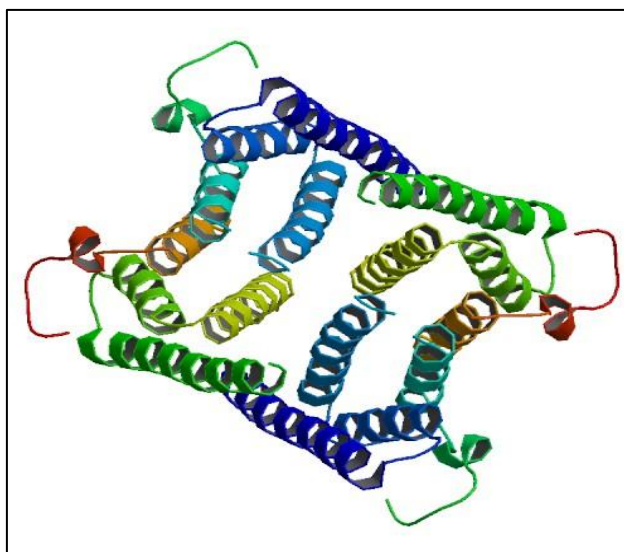
SAA4 naj bi bila po napovedi orodja Phyre 2 (job ID: 29d4b2c22be56849) sestavljena iz snopa 5 vijačnic. Signalni peptid poteka od 1. do 18. mesta zaporedja in je dolg 18 AK (Slika 24).



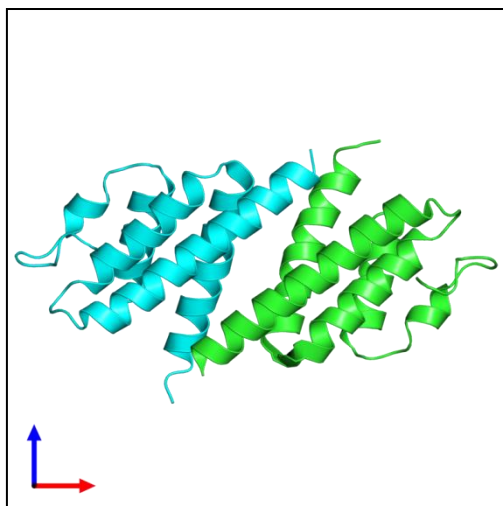
Slika 24: Sekundarna struktura SAA4 z grafično razvidnimi alfa vijačnicami (Phyre 2; jobID: 753258fd1e43fa62)

4.4 Kvartarne strukture serumskega amiloida A pri *Mus musculus*

Na svetovnem spletu je do sedaj objavljena le kristalna struktura proteina SAA3 pri *Mus musculus*. Kvartarna struktura proteina SAA3 je sestavljena iz štirih monomerov, kjer je vsak sestavljen iz snopa štirih alfa vijačnic (Slika 25, Slika 26, Slika 27, Preglednica 16).



Slika 25: Kristalna struktura proteina SAA3 (Vir: <https://www.rcsb.org/structure/4Q5G>, 23. 6. 2018)



Slika 26: Slika dimerov kristalne strukture proteina SAA3
(Vir: <https://www.ebi.ac.uk/pdbe/entry/pdb/4q5g/analysis>, 31. 7. 2018)

Preglednica 16: Sestava kvartarne strukture SAA3

SAA3	Vir:	Število AK	Sestava
Monomer A	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/859067102	104 AK	3–27 α -vijačnica 1 33–46 α -vijačnica 2 49–68 α -vijačnica 3 78–88 α -vijačnica 4
Monomer B	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/859067103	104 AK	5–27 α -vijačnica 5 33–45 α -vijačnica 6 49–68 α -vijačnica 7 78–88 α -vijačnica 8
Monomer A_1	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/859067102	104 AK	3–27 α -vijačnica 1 33–46 α -vijačnica 2 49–68 α -vijačnica 3 78–88 α -vijačnica 4
Monomer B_1	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/859067103	104 AK	5–27 α -vijačnica 5 33–45 α -vijačnica 6 49–68 α -vijačnica 7 78–88 α -vijačnica 8

mSaa3	19	QRWVQFMKEAGQGS	SRDMWRAYS	DMKKANWKNS	DKYFHARGNYDAA	RRGPGGA	70
mSaa1	20	-GFFSFVHEAFQ	GAGDMWRAYT	DMKEANWKNS	DKYFHARGNYDAA	QRGPGGV	70
mSaa2	20	-GFFSFIGEAFQ	GAGDMWRAYT	DMKEAGWKDG	DKYFHARGNYDAA	QRGPGGV	70
hSAA1	19	RSFFSFLGEAFD	GARDMWRAYS	SDMREANYIGS	DKYFHARGNYDAA	KRGPGGA	70
hSAA2	19	RSFFSFLGEAFD	GARDMWRAYS	SDMREANYIGS	DKYFHARGNYDAA	KRGPGGA	70
mSaa3	71	WAAKVISDAREAV	QKFTGHGAEDS	RADQFANEWGRSGK	DPNHFRPAGLP	PKRY	122
mSaa1	71	WAAEKISDGREAF	QEFFGRGHEDT	IADQEANRHGRSGK	DPNYRPPGLP	DKY	122
mSaa2	71	WAAEKISDARES	FQEFFGRGHEDT	MADQEANRHGRSGK	DPNYRPPGLP	PAKY	122
hSAA1	71	WAAEVISDARENI	QRFFGHGAEDS	LADQAANEWGRSGK	DPNHFRPAGLP	PEKY	122
hSAA2	71	WAAEVISNARENI	ORLTGHGAEDS	LADQAANKWGRSGR	DPNHFRPAGLP	PEKY	122

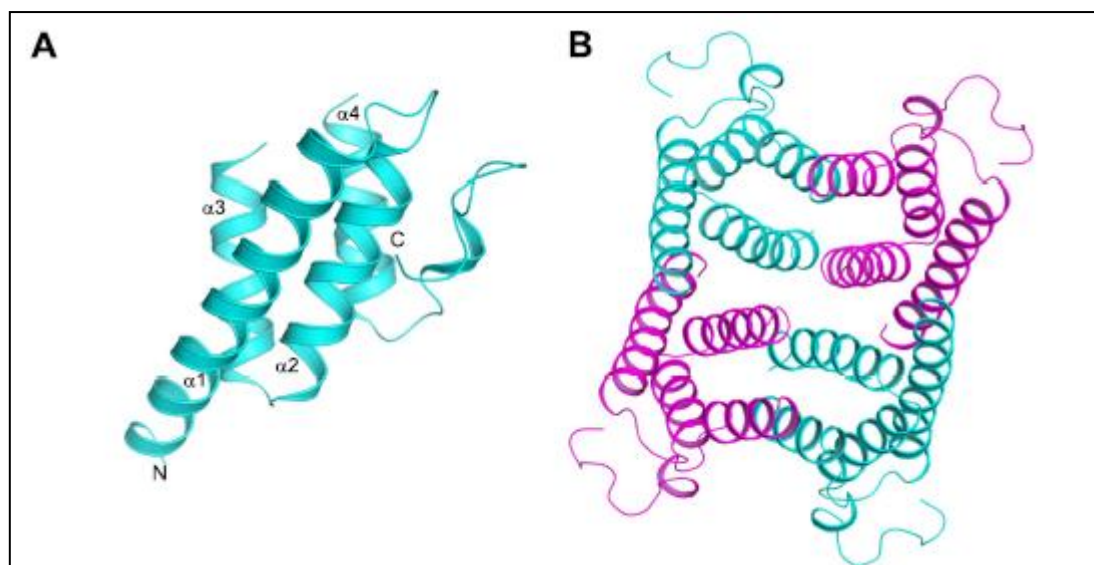
Slika 27: Poravnava mišjih in človeških zaporedij SAA – z rdečo odebeljeno črto so označene A-vijačnice, s črno tanko črto pa so označene ostale sekundarne strukture proteinov (Vir: <https://elifesciences.org/articles/03206#fig4s1>, 31. 7. 2018)

V zadnjih desetletjih je bilo veliko objav v zvezi s potencialnimi vlogami proteinov SAA [10, 37, 44]. Med zelo zanimivimi in pomembnimi vlogami je gotovo vezava SAA z retinolom in posledično možna zaščitna vloga pri infekcijah.

Retinol, ki ga poznamo tudi kot vitamin A1, ima pomembno vlogo pri imunskem odzivu ob infekciji. Pomanjkanje vitamina A zmanjšuje prirojeno imunost s preprečevanjem normalne regeneracije sluzničnih ovir, poškodovanih zaradi okužbe, in z zmanjševanjem delovanja nevtrofilcev, makrofagov in naravnih celic ubijalk. Vitamin A je potreben tudi za prilagodljivo imunost in ima vlogo pri razvoju obeh T-helper (Th) celic in B-celic [36]. Ker nivo proteinov družine SAA med infekcijo naraste, so raziskovalci začeli ugotavljati potencialno vlogo proteinov SAA pri odzivu na infekcijo. Derebe in sodelavci so odkrili, da miši, hranjene po dieti z malo vitamina A, proizvedejo manj proteinov SAA v jetrnih in črevesnih celicah. Vendar pa celice začnejo znova proizvajati proteine SAA, če jih tretiramo z retinolom. Prav tako so odkrili povezavo proteinov SAA in retinola v krvnih vzorcih mišk, ki so bile okužene s salmonelo [12].

Derebe in sodelavci so leta 2014 razrešili tudi kristalno strukturo mišjega proteina SAA in dokazali, da štiri med seboj povezane molekule SAA tvorijo hidrofobni »žep«, ki zadrži molekulo retinola [12]. Monomer mišjega proteina SAA3 je stabiliziran z mrežo vodikovih vezi med ohranjenimi aminokislinami in vodnimi molekulami v monomeru. C-terminalni ostanek se ovije okoli heliksov, kar povzroči nastanek številnih interakcij vodikovih vezi, ki še dodatno pripomorejo k stabilnosti monomera. Tetramer mišjega proteina SAA3 je sestavljen iz dveh sklopov tesnih dimerov, označenih z $\alpha 1$ - $\alpha 2$ in $\alpha 3$ - $\alpha 4$, povezanih s kratko zanko (Slika 28 A). Interakcije, ki so rezultat tesno zvitega $\alpha 3$ -heliksa, ki je primarno sestavljen iz nepolarnih aminokislin, med dimeri povzročijo, da v tetrameru nastane prazen notranji »žep« tetramera, ki ga obdajajo preostali heliksi, ki ustvarjajo hidrofobno notranjost,

zaščiten pred zunanjim, hidrofilnim okoljem. Retinol, ki je nepolarna lipidna molekula, pa za transport med tkivi in celicami potrebuje nepolarno, hidrofobno okolje [12].



Slika 28: (A) Struktura monomera SAA3 (stranski pogled) z označenimi heliksi in označenima N- in C-koncem. (B) Tetramer proteina SAA3. Verige, ki tvorijo dimerne pare, so označene z rožnato in modro barvo [12]

4.5 Funkcije mišjih SAA

Različne funkcije proteinov SAA so iz literature povzete v posodobljenih preglednih člankih [10, 37, 44], vendar nam lahko Portal NCBI in bioinformatična orodja in podatkovne baze nudijo tudi zbirko podatkov o posameznih genih Saa. Za vsak gen posebej so zbrani podatki o lokaciji gena, njegovi ekspresiji, podatki o genski ontologiji in homologiji. Zbrani so tudi osnovni podatki o proteinu, ki ga kodira gen, ter bibliografija, kje je gen omenjen (Preglednica 17).

Preglednica 17: GeneRifs (ang. Gene Reference Into Function) funkcije, procesi, lokalizacija ter interakcije posameznih izotopov SAA

	SAA1	Vir:
GeneRIFs (ang. References Functions) Gene Into	<ul style="list-style-type: none"> - Združevanje SAA1 v celičnem modelu moti celovitost vezikularnih membran ter vodi do lizosomskega uhajanja in apoptotične smrti. (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28637682) - A-SAA so lahko pomemben kazalnik izpostavitve ozonu. (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28533327) - SAA in TLR4 imata pomembno vlogo pri kožnih vnetjih. (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27502577) - Prekomerno izražen SAA1 povroči depresivno obnašanje pri miših. (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27608955) - Amiloidno odlaganje SAA1, pod dolgotrajno dieto z visoko vsebnostjo maščob, je povezano s komplikacijami debelosti, ki jo povzroča prehrana z visoko vsebnostjo maščob, in presnovnimi motnjami. (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27218680) 	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/20208#summary
Funkcije	<ul style="list-style-type: none"> - Vezava na receptorje, vezane na G-protein, - kemoatraktantska aktivnost, - vezava heparina. 	
Procesi	<ul style="list-style-type: none"> - Akutno fazni odziv, - celična kemotaksa, - metabolični proces holesterola, - odziv na bakterijo. 	
Lokalizacija	<ul style="list-style-type: none"> - Citoplazemska, mikrotubuli, - ekstracelularna regija, - ekstracelularni prostor, - lipoproteinski delec z visoko gostoto. 	
Interakcije	SAA1 sodeluje v interakcijah s 33 markerji.	
	SAA2	
GeneRIFs	<ul style="list-style-type: none"> - Miši CE/J imajo funkcionalne gene Saa1 in Saa2 z identičnim aminokislinskim zaporedjem. (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24228751) - Raznolikost in kompleksnost mišjih genov Saa1 in Saa2. (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24521869) - Odsotnost endogenega SAA1.1 in 2.1 ne vpliva na odlaganje aterosklerotičnih lipidov v miših z defolucijo apolipoproteina E, ki se hranijo bodisi normalno bodisi z 	https://www.ncbi.

	<p>»zahodno« dieto. (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24265416) - Visoka raven ekspresije SAA inducira amiloidozo pri vseh miših po kratkem, nekoliko spremenljivem zamiku. (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23959890)</p>	<p>nml.nih.gov/gene?LinkName=nucleore_gene&from_uid=254750736</p>
Funkcije	<p>- Vezava na receptorje, vezane na G-protein, - kemoatraktantska aktivnost.</p>	
Procesi	<p>- Akutno fazni odziv, - celična kemotaksa, - odziv na stilbenoide.</p>	
Komponente	<p>- Citoplazmatski mikrotubul, - ekstracelularna regija, - ekstracelularni prostor, - delec lipoproteina z visoko gostoto.</p>	
Interakcije	<p>SAA2 sodeluje v interakcijah s 14 markerji.</p>	
	<p>SAA3</p>	
GeneRIFs	<p>- Endogeni SAA3 modulira presnovno in imunsko homeostazo. (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29351990) - Indukcija Saa3 s PTH lahko razloži supresijo nastanka kosti, kadar se PTH kontinuirano uporablja, in je lahko nova terapevtska tarča za osteoporozo. (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26703472) - SAA3 vpliva na ekspresijo SAA1/2, značilno za jetra, in ima večjo vlogo pri odzivu na akutno fazo, kot so mislili v preteklosti. (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25251243) - Izražanje SAA3 v osteoblastih pozitivno korelira s povečanim celičnim zorenjem proti fenotipu osteocitov. (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25491310) - Serumski amiloid A je vezni protein za retinol, ki transportira retinol med bakterijskimi okužbami. (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25073702)</p>	<p>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene?LinkName=nucleore_gene&from_uid=118130197</p>
Funkcije	<p>- Vezava na Toll-like receptor 4, - kemoatraktantska aktivnost.</p>	
Procesi	<p>- I-KB-fosforilacija, - akutno fazni odziv - celična kemotaksa, - celični odziv na interleukin-1, - odziv na bakterije, - odziv na stilbenoide.</p>	
Komponente	<p>- Ekstracelularna regija, - ekstracelularni prostor, - delec lipoproteina z visoko gostoto.</p>	
Interakcije	<p>SAA3 sodeluje v interakcijah z 8 markerji.</p>	

	SAA4	
GeneRIFs	/	
Funkcije	- Kemoatraktantska aktivnost.	
Procesi	- Akutno fazni odziv, - celična kemotaksa.	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene?LinkName=nucleore_gene&from_uid=1062594049
Komponente	- Ekstracelularna regija, - ekstracelularni prostor, - delec lipoproteina z visoko gostoto.	
Interakcije	SAA4 sodeluje v interakcijah s 190 markerji.	

Podatki v preglednici 17 nam kažejo, da vsi štirje proteini sodelujejo pri kemoatrakciji. Torej zagotavljajo okoljski signal, ki sproži usmerjeno premikanje celic proti višji koncentraciji tega signala. SAA1 in SAA2 imata funkcijo vezave na receptorje, vezane na G-protein (ang. G protein-coupled receptors), ki predstavljajo veliko družino receptorskih proteinov, ki zaznavajo molekule zunaj celic in aktivirajo poti notranje transdukcije signala in, končno, celične odzive. Saa3 je edini gen, ki ima funkcijo vezave proteina Toll-like receptorja 4 (TLR-4, ang. Toll-like receptor 4), katerega aktivacija vodi do intracelularne signalne poti nuklearnega faktorja κ -verige B-celic (NF- κ B) in produkcije vnetnih citokinov in je odgovorna za aktiviranje prirojenega imunskega sistema.

Podatki iz preglednice 17 kažejo podatke o procesih, v katerih sodelujejo geni SAA1–4, in da prav vsi proteini sodelujejo v akutno faznem odzivu. Prav tako vsi proteini sodelujejo pri celični kemotaksi, procesu, kjer fagocitne celice privlači okolica vdirajočih patogenov. SAA1 sodeluje v metaboličnem procesu holesterola, SAA3 pa sodeluje v procesu fosforilacije I-kappaB ter v procesu celičnega odziva na interleukin-1.

Podatkovna baza NCBI navaja zunajcelično lokalizacijo vseh proteinov SAA 1–4 ter lokalizacijo z lipoproteini visokih gostot delcev. SAA1 in SAA2 pa sta navedena tudi kot komponenti citoplazemskih mikrotubulov.

V največjem številu interakcij sodeluje SAA4 (interakcija s 190 markerji), najmanj pa SAA3, ki sodeluje v interakciji z le osmimi markerji.

CATH-klasifikacija proteina SAA3

Podatkovna baza CATH je prosto dostopna spletna baza, ki nam nudi informacije o evolucijskih odnosih proteinskih domen. Dostopna je na spletni strani <http://www.cathdb.info/>. Eksperimentalno določene tridimenzionalne strukture proteinov pridobijo iz proteinskih podatkovnih baz in določijo njihove proteinske domene. Domeno nato uvrstijo v strukturno hierarhijo CATH: na ravni razreda (C) so domene razdeljene glede na njihovo vsebino sekundarne strukture; na ravni arhitekture (A) se za klasifikacijo

uporabljajo informacije o strukturi sekundarne strukture v tridimenzionalnem prostoru; na ravni topologije (T) se uporabljajo informacije o tem, kako urejeni so elementi sekundarne strukture; homologne superdružine (H) pa nam podajo podatek, če obstajajo dobri dokazi, da so področja povezana z evolucijo, tj. so homologna (Preglednica 18).

Preglednica 18: Klasifikacija proteina SAA3 s CATH

Razred	Cath koda	Opis
C	1	Večinoma α
A	1.10	Ortogonalni »sveženj« (ang. Orthogonal Bundle)
T	1.10.132	Topoizomeraza I, Veriga A, domena 4
H	1.10.132.110	Superdružina PF00277

4.6 Evolucija SAA

Na spletni strani evropskega bioinformatičnega inštituta (EMBL-EBI) (<https://www.ebi.ac.uk/>) lahko dostopamo do različnih podatkov in rezultatov znanstvenih eksperimentov, izvedemo osnovna poizvedovanja in biološke računalniške izračune, prav tako pa nam nudijo razširjene programe za usposabljanje uporabnikov. EBI je del Evropskega laboratorija za molekularno biologijo.

Na spletni strani <https://www.orthodb.org/> je omogočen dostop do podatkovne baze OrthoDB, ki je celovit katalog ortologov, genov, ki opravljajo isto funkcijo v različnih organizmih. Ortologi geni so temelj za primerjalne študije in omogočajo nastanek hipotez o dedovanju genskih funkcij. Bolj tesno so povezane vrste, bolj natančno so določene genske ortologije. S poizvedbo o družini proteinov SAA

(Vir: <https://www.orthodb.org/?level=&species=&query=EOG09370ZO6>, 31. 7. 2018) dobimo podatek, da za gen *Saa* prepoznamo 228 sekvenc 127 različnih živalskih vrst.

Santiago in sodelavci so odkrili visoko stopnjo homologije med vretenčarskimi in nevretenčarskimi živalskimi vrstami. Poravnava zaporedja morske kumare (*Holothuria glaberrima*) z vretenčarskimi živalskimi vrstami nam dokazuje visoke stopnje ohranjenosti proteinov med sicer filogenetsko oddaljenimi skupinami [31]. Prisotnost proteinov pri iglokožcih, ki so sicer klasični kazalniki antiinflamatornih odzivov pri vretenčarjih, nam kaže, da so se ti mehanizmi pojavili pred strunarji ter da so se iglokožci odcepili od skupnega prednika (angl. Deuterstoma) pred 500–650 milijoni let in se ohranili skozi evolucijo [31]. Santiago in sodelavci so v svoji raziskavi odkrili, da povišano ekspresijo SAA pri iglokožcih lahko (vsaj delno) sprožijo tudi morfogogenetsko povezani procesi [32]. V nalogi je bilo najprej poravnano zaporedje človeških in mišjih SAA ter izrisano filogenetsko drevo, ki pokaže shematsko predstavitev evolucijske zgodovine in sorodnosti skupin organizmov. Nato so bila

poravnana zaporedja različnih živalskih vrst, ki so jih v svoji raziskavi uporabili Santiago in sodelavci, in izrisano filogenetsko drevo tudi za ta primer.

4.6.1 Poravnava zaporedij SAA Homo sapiens in *Mus musculus*

S pomočjo orodja Clustal Omega sta bili poravnani zaporedji človeških in mišjih SAA. Zaporedje humanega SAA3 je bilo s spletne strani Uniprot, pod identifikacijsko številko P22614, izbrisano dne 13. 6. 2012, zato je bilo zaporedje SAA3 pridobljeno iz arhiva spletne strani, z oznako SEQDB ID: 1604225A.

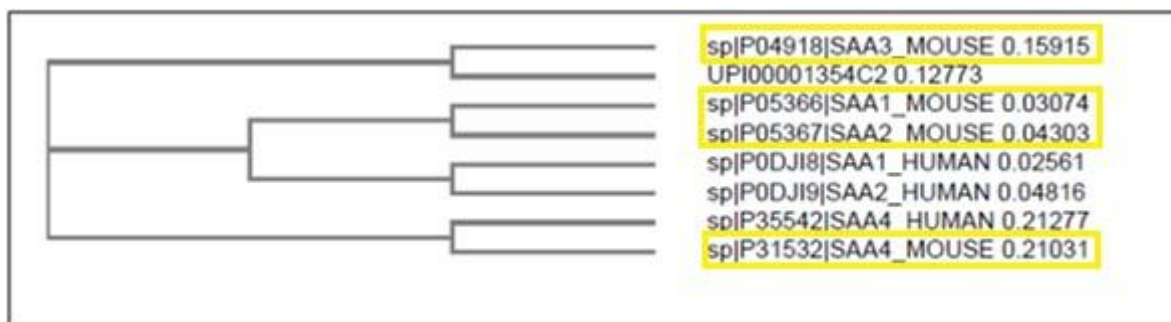
sp P04918 SAA3_MOUSE	MKPSIAIILCILILGVDSQRWVQFMKEAGQGS RDMWRAYS DMKKANWKNSDKYFHARGNY	60
sp P05366 SAA1_MOUSE	MKLLTSLVFCSLLLGVCHGGFFSFVHEAFQAGDMWRAYTDMKEANWKNSDKYFHARGNY	60
sp P05367 SAA2_MOUSE	MKLLTSLVFCSLLLGVCHGGFFSFIGEAFQAGDMWRAYTDMKEAGWKDGDYFHARGNY	60
sp P00J18 SAA1_HUMAN	MKLLTGLVFCSLVLGVSSRSFFSFLGEAFDGDMDWRAYS DMREANYIGSDKYFHARGNY	60
sp P00J19 SAA2_HUMAN	MKLLTGLVFCSLVLSVSSRSFFSFLGEAFDGDMDWRAYS DMREANYIGSDKYFHARGNY	60
UPI00001354C2	MKLLTGLVFCSLVLSVSSRSFFSFLGEAFDGDMDWRAYS DMREANYIGSDKYFHARGNY	60
sp P35542 SAA4_HUMAN	MRLFTGIVFCSLVMGVTSESWSRFFKEALQGVGMGRAYWDIMISNHQNSRYLYARGNY	60
sp P31532 SAA4_MOUSE	MRLATVIVLCSLFLGVSGDGYWYFFREAVQGTWDLWRAYRDNLEANYQNADQYFYARGNY	60
	: :: *..* : * . * : * * * * :. :..:*****	
sp P04918 SAA3_MOUSE	DAARRGPGGAWAAKVISDAREAVQKFT-----GHGAEDSRADQFANEWGRSGKDPNH	112
sp P05366 SAA1_MOUSE	DAAQRGPGGVWAAEKISDGREAFQEFF-----GRGHEDTIADQEANRHGRSGKDPNY	112
sp P05367 SAA2_MOUSE	DAAQRGPGGVWAAEKISDARESFEFF-----GRGHEDTMADQEANRHGRSGKDPNY	112
sp P00J18 SAA1_HUMAN	DAARRGPGGAWAAEKISDARENIQKFT-----GHGAEDSLADQAANEWGRSGKDPNH	112
sp P00J19 SAA2_HUMAN	DAARRGPGGAWAAEVISNARENIRQLT-----GRGAEDSLADQAANKWGRSGRDPNH	112
UPI00001354C2	DAVQRGPGGVWATEVISDARENIRQLT-----GDHAEDSLAQATNKWGRSGKDPNH	112
sp P35542 SAA4_HUMAN	DAAQRGPGGVWAAKLSRSRVYLGFLIDCYLFGNSSTVLEDSKSNEKAEWGRSGKDPDR	120
sp P31532 SAA4_MOUSE	EAQRGSGGIWAAKIISTSRKYFQGLLNRYFYGIRNHGLETLQATQKAEWGRSGKDPNH	120
	:* : ** * * : : * * . * . : . * : : : : * : * * : : *	
sp P04918 SAA3_MOUSE	FRPAGLPKRY	122
sp P05366 SAA1_MOUSE	YRPPGLPKY	122
sp P05367 SAA2_MOUSE	YRPPGLPAKY	122
sp P00J18 SAA1_HUMAN	FRPAGLPEKY	122
sp P00J19 SAA2_HUMAN	FRPAGLPEKY	122
UPI00001354C2	FRPAGLPEKY	122
sp P35542 SAA4_HUMAN	FRPDGLPKY	130
sp P31532 SAA4_MOUSE	FRPEGLPEKF	130
	: ** * * * : :	

Slika 29: Poravnava človeških in mišjih proteinov SAA (Results for job clustalo-I20180608-195429-0005-75570022-p2m; z oznako UPI00001354c2 je označen človeški protein SAA3, z rumenim okvirjem so poudarjeni mišji proteini SAA)

Poravnava zaporedij človeških in mišjih proteinov SAA (Slika 29) nam pokaže, da se zaporedja na kar 39 mestih popolnoma ujemajo. Obe zaporedji SAA4 se od drugih zaporedij razlikujeta za 8 aminokislin.

4.6.1.1 Filogenetsko drevo izotipov SAA *Homo sapiens* in *Mus musculus*

Filogenija pomeni evolucijsko zgodovino bioloških vrst, ki povezuje recentno biološko vrsto s predniškimi biološkimi vrstami v kontinuirane evolucijske linije. S tem lahko ustvarimo rekonstrukcijo evolucije določene vrste. Filogenetsko drevo prikazuje sorodstvene odnose med organizmi v obliki dvodimenzionalnega grafa. Vsako nukleotidno zaporedje je na drevesu predstavljeno kot takson oziroma biološka vrsta. Korenina predstavlja skupnega prednika vseh taksonov, ki so na danem drevesu, vsako razvejišče pa predstavlja skupnega prednika oz. neko predniško stanje, iz katerega sta se razvili novi, med seboj različni vrsti, ki sta reproduktivno izolirani [39]. Nekoreninjeno drevo nam poda informacije samo o odnosih med skupinami. Poznamo kladograme, ki so filogenetska drevesa in določajo le odnose med vrstami/DNA, ne povedo pa ničesar o časovnem odnosu, in filograme, ki so filogenetska drevesa, ki prikazujejo tudi časovni odnos med taksoni z različnimi dolžinami črt, ki povezujejo taksone.



Slika 30: Filogenetsko drevo poravnave humanih in mišjih izotipov SAA po metodi najbližjega sosedu

Filogenetsko drevo humanih in mišjih izotipov *Saa* nam pokaže, da so se izotipi *Saa* razvili v treh skupinah. Človeški in mišji izotipi *Saa3* ter človeški in mišji izotipi *Saa4* so si med seboj podobni in tvorijo vsak svojo skupino. Podobnost pa je večja med mišjim *Saa1* in mišjim *Saa2*, ki tvorita svoj takson, ter človeškim *Saa1* in *Saa2*, ki tvorita svoj takson. Ta dva taksona pa izhajata iz skupnega prednika. Človeški ter mišji geni *Saa1* in *Saa2* kodirajo akutno fazne SAA (Slika 30). Uhlar in sodelavci so v svoji raziskavi zapisali, da je nemogoče določiti medvrstne evolucijske odnose teh individualnih SAA samo glede na nukleotidno ali proteinsko sekvenco. Znotraj vsake vrste imata ta dva gena skoraj identično sekvenco in organizacijo, kar kaže, da so bili geni *A-Saa* izpostavljeni nedavnim dogodkom genske pretvorbe znotraj vsake evolucijske linije [40]. Mišji SAA3 je bil identificiran kot izločni produkt makrofagov [27], človeški SAA3 pa je bil do nedavnega poznan kot pseudogen. Mnenje o tem pa se je spremenilo, saj so odkrili koncentracije tudi v materinem mleku [17, 19, 21]. Človeški in mišji *Saa4* sta oba konstitutivna izražena gena *Saa*. Na podlagi njune ekspresije, sekvenc in lokalizacije ju uvrščamo med evolucijske homologe [41]. Oba proteina

SAA4 sta za 8 aminokislin daljša kot ostali A-SAA-ji. Tako insercijo oktopeptida lahko opazimo tudi v zaporedju pri drugih živalskih vrstah (pes, European mink *Mustela lutreola*; American mink *Neovison vison*; konj), insercijo nonapeptida pa opazimo pri kravi in ovci. Distribucija teh sekvenčnih elementov znotraj družine SAA je evolucijski paradoks, katerega funkcionalna pomembnost je še vedno neraziskana [41, 42].

4.6.2 Poravnava zaporedij različnih živalskih vrst

S pomočjo orodja Clustal Omega so bila poravnana zaporedja SAA različnih živalskih vrst (Slika 31). Uporabljeni so bili različni proteini SAA iz osmih živalskih vrst. (Preglednica 19)

Preglednica 19: Izbrana aminokislinska zaporedja SAA različnih živalskih vrst

Protein SAA	Živalska vrsta latinsko (angleško)	Uniprot ID:
SAA1	<i>Canis lupus familiaris</i> (Dog)	P19708
SAA2	<i>Neovison vison</i> (American mink)	P02739
SAA1	<i>Homo sapiens</i> (Human)	P0DJI8
SAA3	<i>Mesocricetus auratus</i> (Golden hamster)	P19453
SAA	<i>Anas platyrhynchos</i> (Mallard)	P02740
SAA	<i>Yprinus carpio</i> (Common carp)	Q9YIA4
SAA2	<i>Mus musculus</i> (Mouse)	P05367
SAA	<i>Holothuria glaberrima</i> (Brown rock sea cucumber)	Q9GSP8

```

CLUSTAL O(1.2.4) multiple sequence alignment

sp|P19453|SAA3_MESAU      MKPFLAIIFCFLILGV---DSORWFOFMKEAGOGSTDMWRAYSMDREANWKNSDKYFHA      56
sp|P05367|SAA2_MOUSE     MKLLTSLVFCSLLLGV---CHGGFFSFIGEAFQAGDMWRAYTDMKEAGWKDGKYFHA      56
sp|P00JI8|SAA1_HUMAN     MKLLTGLVFCSLVLGV---SSRSFFSLGEAFDGARDMWRAYSMDREANYIGSDKYFHA      56
sp|P19708|SAA_CANLF      MKLFPGLLFCSLVLGV---SG-QWYSFVSEAAQGAWDMWRAYSMDREANYKNSDKYFHA      55
sp|P02739|SAA2_NEOVI     MKLFTGLIFCFLVLGV---SS-QWYSFIGEAVQGAWDMWRAYSMDREANYKNSDKYFHA      55
tr|Q9YIA4|Q9YIA4_CYPCA  MKLILAVLVLALVLVV---ETQAWHRYPGQAIIGGAKDPMWRAYRDMRKANWKGADKYFHA      57
sp|P02740|SAA_ANAPL      MRLCICFVLLAVIVCASADNPFTRGGRFVLDAAAGAWDMWRAYSMDREANWIGADKYFHA      60
tr|Q9GSP8|Q9GSP8_HOLGL  MKLLLAGLVLILIVET----HAQWYRRPVAAQGAIDMARAYSMDREANYRNSDKYFHA      55
                          *:  .:  .::  .  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *

sp|P19453|SAA3_MESAU      RGNYYDAAKRGGPGGAWAAKVISDAREGTORF-----TGRGAADSRADOFANKWGRSGK      108
sp|P05367|SAA2_MOUSE     RGNYYDAARGGPGGWAAEKISDARESFQEF-----FGRGHEDTMADQEAANRHGRSGK      108
sp|P00JI8|SAA1_HUMAN     RGNYYDAAKRGGPGGWAAEAISDARENTRQF-----FGHGAEDSLADQAANEWGRSGK      108
sp|P19708|SAA_CANLF      RGNYYDAARGGPGGAWAAKVISDARENSQRITDLRFQDQSGHGAEDSKADQAANEWGRSGK      115
sp|P02739|SAA2_NEOVI     RGNYYDAARGGPGGAWAAKVISDARENSQRVTDLRFKYDQSGHGVEDSKADQAANEWGRSGK      115
tr|Q9YIA4|Q9YIA4_CYPCA  RGNYYDAARGGPGGWAAKVISNGREALQG-----LSRRGNSDAAADQAANRWGRNGG      109
sp|P02740|SAA_ANAPL      RGNYYDAARGGPGGAWAARVISDARENWQGG-----VSGRGAEDTRADQEAANWGRNGG      113
tr|Q9GSP8|Q9GSP8_HOLGL  RGNYYDAARGGPGGWAAEVLSDAREGWQGT-----YSGRQYEDTADQAANLHGRNGG      108
                          *****:*****  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *

sp|P19453|SAA3_MESAU      DPNHFRPAGLPSKY      122
sp|P05367|SAA2_MOUSE     DPNYYRPPGLPAKY      122
sp|P00JI8|SAA1_HUMAN     DPNHFRPAGLPEKY      122
sp|P19708|SAA_CANLF      DPNHFRPAGLPDKY      129
sp|P02739|SAA2_NEOVI     DPNHFRPSGLPDKY      129
tr|Q9YIA4|Q9YIA4_CYPCA  NPNRYRPRGLPKKY      123
sp|P02740|SAA_ANAPL      DPNRYRPPGLPSKY      127
tr|Q9GSP8|Q9GSP8_HOLGL  DPNVYRPPGLPSKY      122
                          :*  *  *  *  *  *
    
```

Slika 31: Poravnava zaporedij SAA različnih živalskih vrst (jobID: clustalo-120180427-083604-0960-34877452-p2m)

Zaporedja se popolnoma ujemajo na kar 55 mestih. Poravnava zaporedij SAA različnih živalskih vrst (Slika 31) (sesalcev, vretenčarjev in nevretenčarjev) nam pokaže neverjetno ohranjenost med filogenetično ločenimi živalskimi vrstami [31].

Percent Identity Matrix - created by Clustal2.1

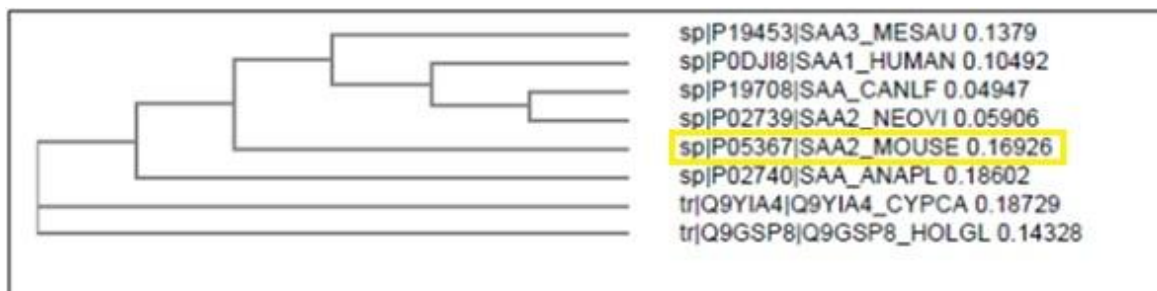
1:	sp P19453 SAA3_MESAU	100.00	64.75	72.95	76.03	75.21	59.50	59.84	63.64
2:	sp P05367 SAA2_MOUSE	64.75	100.00	73.77	67.77	69.42	57.02	58.20	62.81
3:	sp P00JI8 SAA1_HUMAN	72.95	73.77	100.00	80.99	80.17	57.85	59.84	61.16
4:	sp P19708 SAA_CANLF	76.03	67.77	80.99	100.00	89.15	61.98	62.30	67.77
5:	sp P02739 SAA2_NEOVI	75.21	69.42	80.17	89.15	100.00	61.16	59.02	66.12
6:	tr Q9YIA4 Q9YIA4_CYPCA	59.50	57.02	57.85	61.98	61.16	100.00	62.60	66.94
7:	sp P02740 SAA_ANAPL	59.84	58.20	59.84	62.30	59.02	62.60	100.00	66.39
8:	tr Q9GSP8 Q9GSP8_HOLGL	63.64	62.81	61.16	67.77	66.12	66.94	66.39	100.00

Slika 32: Deleži podobnosti med posameznimi živalskimi vrstami (Vir: <https://www.ebi.ac.uk/Tools/services/rest/clustalo/result/clustalo-120180427-083604-0960-34877452-p2m/pim>)

Na sliki 32 lahko opazimo, da sta si zaporedji ameriškega minka (*Neovison vison*) in hrčka (*Mesocricetus auratus*) identična kar v 89,15 %, velika podobnost je tudi med zaporedjem

človeškega SAA1 in zaporedjem SAA psa (*Canis lupus familiaris*) (80,99 %). Zaporedji SAA psa (*Canis lupus familiaris*) in SAA3 hrčka (*Mesocricetus auratus*) sta identični v 76,03 %. Najmanjša podobnost je med človeškim SAA1 in SAA-jem raka (57,85 %).

4.6.2.1 Filogenetsko drevo

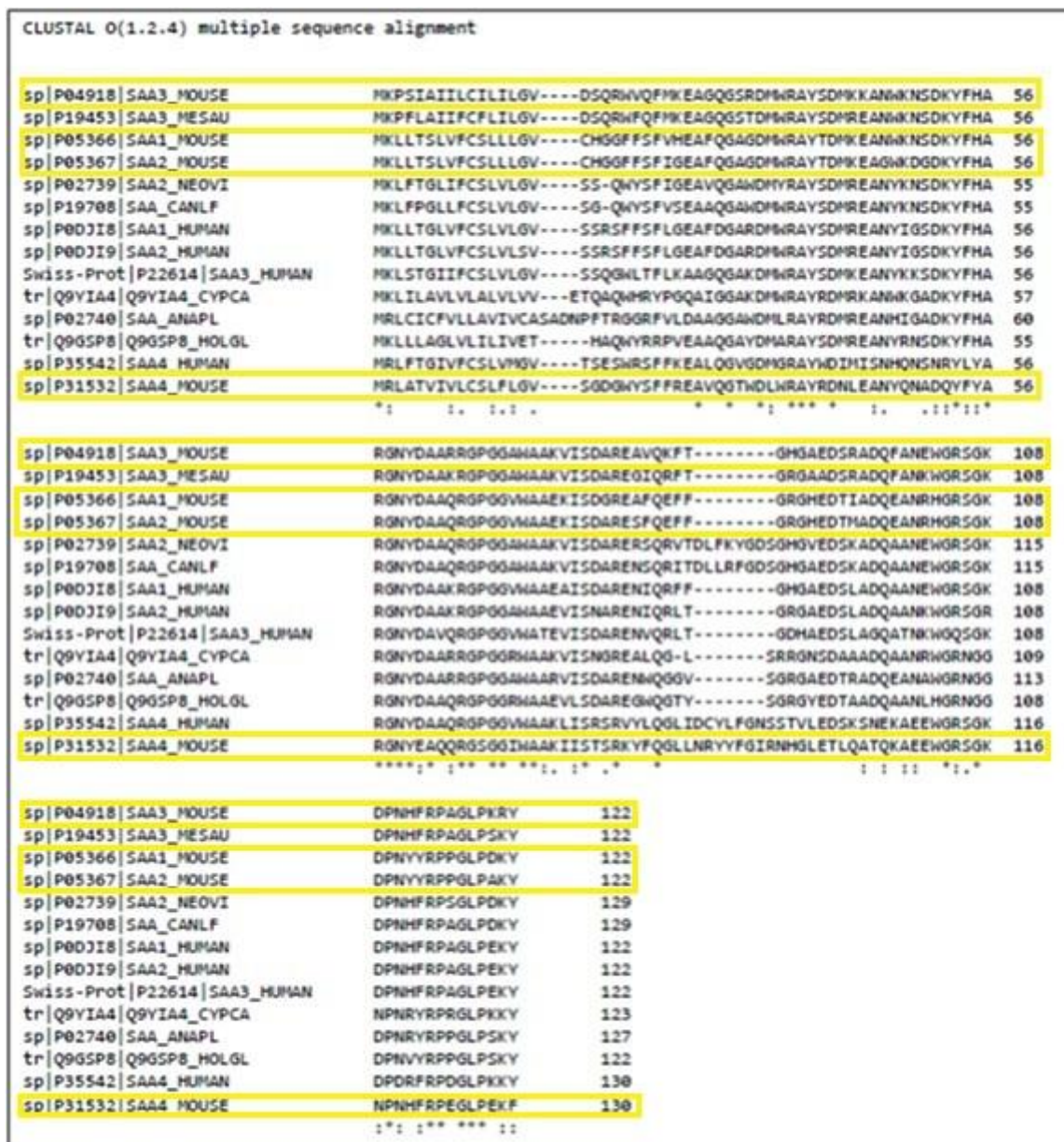


Slika 33: Filogenetsko drevo različnih živalskih vrst (Vir: https://www.ebi.ac.uk/Tools/services/web/toolresult.ebi?jobId=simple_phylogeny--083604-0960-34877452-p2m-p1m)

Na osnovi izrisa filogenetskega drevesa različnih živalskih vrst (Slika 33) lahko ugotovimo, da sta zaporedji SAA *Holothuria glaberrima* ter SAA *Yprinus carpio* najbolj različni od ostalih živalskih vrst. SAA *Canis lupus familiaris* in *Neovison vison* sta sestrski taksoma, ki sta si evolucijsko najbližja in si delita skupnega prednika s človeškim SAA1, vsi skupaj pa imajo skupnega prednika z SAA-jem *Mesocricetus auratus*. Vsi skupaj se povezujejo s kladom mišjega SAA2, njihov sestrski takson pa je SAA *Anas platyrhynchos*. Šele na tej stopnji se ostali taksoni pridružijo taksonomu SAA *Holothuria glaberrima* ter SAA *Yprinus carpio*.

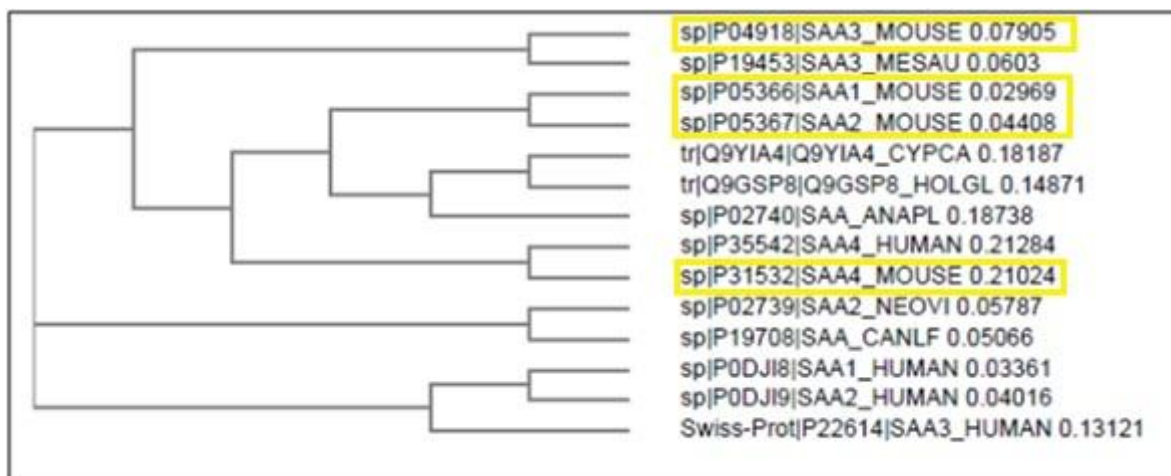
4.6.3 Poravnava zaporedij različnih živalskih vrst (po raziskavi Santiago in sodelavcev 2010)

Za primerjavo so bili poravnani tudi vsi človeški in mišji proteini SAA z SAA-ji ostalih živalskih vrst, podobno kot so to naredili v raziskavi Santiago in sodelavci (Slika 34).



Slika 34: Poravnava zaporedij SAA različnih živalskih vrst
https://www.ebi.ac.uk/Tools/services/rest/clustalo/result/clustalo-I20180624-075342-0106-8143460-p1m/aln-clustal_num

Zaporedja se popolnoma ujemajo na kar 32 mestih.



Slika 35: Filogenetsko drevo različnih živalskih vrst (Vir: <https://www.ebi.ac.uk/Tools/services/rest/clustalo/result/clustalo-I20180624-075342-0106-8143460-p1m>)

Zgornje filogenetsko drevo (Slika 35) nam kaže, da se je v preteklosti evolucija SAA med izbranimi zaporedji razdelila na tri veje. Na prvi veji opazimo človeški SAA1 in SAA2, ki imata skupnega prednika z SAA3. Drugo vejo sestavljata SAA-ja *Canis lupus familiaris* in *Neovison vison*. Tretja veja ima več skupnih prednikov. SAA *Holothuria glaberrima* ter SAA *Yprinus carpio* sta sestrski taksona, ki se povezujeta z SAA-jem *Anas platyrhynchos*. Vsi trije imajo skupnega prednika z mišjima SAA1 in SAA2. Ta celotna skupina SAA-jev ima skupno izhodišče s človeškim in mišjim SAA4. Tukaj pa se jim pridružita še SAA3 miši in *Mesocricetus auratus*, ki sta tudi sestrski taksona.

5 ZAKLJUČEK

V diplomski nalogi smo z uporabo različnih bioinformatičnih baz in orodij prišli do naslednjih zaključkov:

1. SAA1 in SAA2 sta si po primarni strukturi najbolj podobna. Njuna identičnost je kar 93-odstotna. Od njiju se najmanj razlikuje SAA3, ki je z SAA1 in SAA2 homologen v 77 %. SAA4 je od ostalih treh večji za 8 aminokislin.

2. Po aminokislinski sestavi sta si najbolj podobna SAA1 in SAA2 z največjo vsebnostjo glicina, alanina, asparaginske kisline ter fenilalanina, medtem ko ima SAA3 največ lizina ter serina, SAA4 pa največjo vsebnost levcina in tirozina od vseh mišjih SAA.

3. Mišji SAA 1–4 so si po deležu sekundarnih struktur zelo podobni. SAA1 ima največji delež alfa vijačnic (za približno 2–6 % več od ostalih SAA), vsebuje pa za 1–5 % nižji delež naključnih zank v primerjavi z ostalimi proteini. SAA2 vsebuje največji delež beta struktur (19,4 %), SAA3 pa od vseh SAA vsebuje največji delež naključnih zank (39,5 %).

4. Z orodjem Phyre 2 je napovedana sestava SAA1 in SAA2 iz 4 alfa vijačnic, medtem ko imata SAA3 in SAA4 napovedanih 5 alfa vijačnic.

5. Pregled podatkovne baze GeneRIFs pokaže, da vsi štirje mišji proteini SAA1–4 sodelujejo pri kemoatraktantski aktivnosti. Razlike so vidne med SAA1/SAA2, ki se vežeta na receptorje, vezane na G-protein, in SAA3, ki se veže na Toll-podobni receptor 4.

6. S poizvedbo za SAA v OrthoDB (podatek pridobljen 31. 7. 2018) dobimo 228 sekvenc SAA v 127 različnih živalskih vrstah.

7. Filogenetsko drevo človeških in mišjih izotipov *Saa* kaže, da so se *Saa* razvili v treh skupinah. Človeška in mišja izotipa *Saa3* ter človeška in mišja izotipa *Saa4* so si med seboj podobni in tvorijo vsak svojo skupino. Podobnost pa je večja med mišjim *Saa1* in mišjim *Saa2*, ki tvorita svoj takson, ter človeškim *Saa1* in *Saa2*, ki tudi tvorita samostojni takson.

6 LITRATURA IN VIRI

- [1] J. L. Ather. and M. E. Poynter, Serum amyloid A3 is required for normal weight and immunometabolic function in mice, *PLoS One* 13(2) (2018) e0192352.
- [2] A. Butler and A. S. Whitehead, Structure of the mouse serum amyloid A 5 (Saa5) gene: relationship to other members of the serum amyloid A family, *Scand J Immunol* 45(2) (1997), 160–165.
- [3] E. S. Chen et al., Serum amyloid A regulates granulomatous inflammation in sarcoidosis through Toll-like receptor-2, *Am J Respir Crit Care Med* 181(4) (2010), 360–373.
- [4] T. Chiba et al., Serum amyloid A facilitates the binding of high-density lipoprotein from mice injected with lipopolysaccharide to vascular proteoglycans, *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 31(6) (2011), 1326–1332.
- [5] G. Cunnane et al., Serum amyloid A in the assessment of early inflammatory arthritis, *J Rheumatol* 27(1) (2000), 58–63.
- [6] M. C. de Beer et al., Identification of a novel serum amyloid A protein in BALB/c mice, *Biochem J* 280 (Pt 1) (1991), 45–49.
- [7] M. C. de Beer et al., Mouse serum amyloid A protein. Complete amino acid sequence and mRNA analysis of a new isoform, *Biochem J* 283 (Pt 3) (1992), 673–678.
- [8] M. C. de Beer et al., Mouse serum amyloid A protein (SAA5) structure and expression, *J Biol Chem* 269(6) (1994), 4661–4667.
- [9] M. C. de Beer et al., Impact of serum amyloid A on high density lipoprotein composition and levels, *J Lipid Res* 51(11) (2010), 3117–3125.
- [10] M. De Buck et al., Structure and Expression of Different Serum Amyloid A (SAA) Variants and their Concentration-Dependent Functions During Host Insults, *Curr Med Chem* 23(17) (2016), 1725–1755.

- [11] L. J. den Hartigh et al., Deletion of serum amyloid A3 improves high fat high sucrose diet-induced adipose tissue inflammation and hyperlipidemia in female mice, *PLoS One* 9(9) (2014), e108564.
- [12] M. G. Derebe et al., Serum amyloid A is a retinol binding protein that transports retinol during bacterial infection, *Elife* 3 (2014), e03206.
- [13] T. Doetschman, Interpretation of phenotype in genetically engineered mice, *Lab Anim Sci* 49(2) (1999), 137–143.
- [14] C. Geourjon and G. Deleage, SOPMA: significant improvements in protein secondary structure prediction by consensus prediction from multiple alignments, *Comput Appl Biosci* 11(6) (1995), 681–684.
- [15] G.S. Getz et al., Serum amyloid A and atherosclerosis, *Curr Opin Lipidol* 27(5) (2016), 531–535.
- [16] L. E. Jensen and A. S. Whitehead, Regulation of serum amyloid A protein expression during the acute-phase response, *Biochem J* 334 (Pt 3) (1998), 489–503.
- [17] B. Kaplan et al., Isolation and purification of two major serum amyloid A isotypes SAA1 and SAA2 from the acute phase plasma of mice, *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 704(1-2) (1997), 69–76.
- [18] M. H. Kim et al., Impact of individual acute phase serum amyloid A isoforms on HDL metabolism in mice, *J Lipid Res* 57(6) (2016), 969–979.
- [19] O. Knee et al., The acute-phase protein SAA3 is present in the preterm human colostrum and breast milk, *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 100(4) (2015), F369–371.
- [20] K. Lakota et al., Serum Amyloid A Activation of Inflammatory and Adhesion Molecules in Human Coronary Artery and Umbilical Vein Endothelial Cells, *European Journal of Inflammation* 5(2) (2007), 73–81.
- [21] M. A. Larson et al., Induction of human mammary-associated serum amyloid A3 expression by prolactin or lipopolysaccharide, *Biochem Biophys Res Commun* 301(4) (2003), 1030–1037.

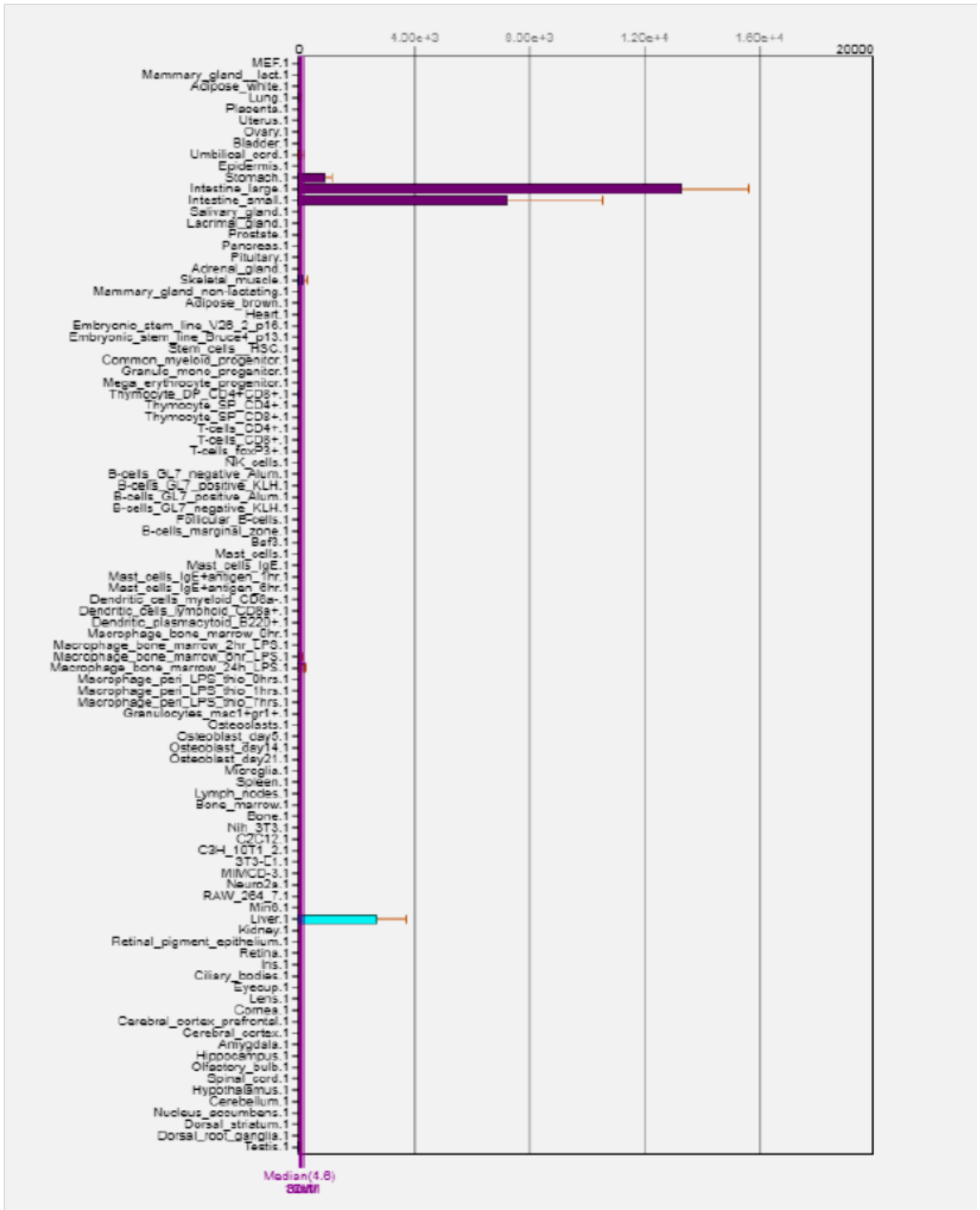
- [22] F. Liao et al., Serum amyloid A protein family. Differential induction by oxidized lipids in mouse strains, *Arterioscler Thromb* 14(9) (1994), 1475–1479.
- [23] K. Lin et al., A simple and fast secondary structure prediction method using hidden neural networks, *Bioinformatics* 21(2) (2005), 152–159.
- [24] C. A. Lowell et al., Structure of the murine serum amyloid A gene family. Gene conversion, *J Biol Chem* 261(18) (1986), 8442–8452.
- [25] G. Marsche et al., The lipidation status of acute-phase protein serum amyloid A determines cholesterol mobilization via scavenger receptor class B, type I, *Biochem J* 402(1) (2007), 117–124.
- [26] R. L. Meek and E. P. Benditt, Amyloid A gene family expression in different mouse tissues, *J Exp Med* 164(6) (1986), 2006–2017.
- [27] R. L. Meek et al., Murine serum amyloid A3 is a high density apolipoprotein and is secreted by macrophages, *Proc Natl Acad Sci U S A* 89(17) (1992), 7949–7952.
- [28] M. Mori et al., Diversity and complexity of the mouse Saa1 and Saa2 genes, *Exp Anim* 63(1) (2014), 99–106.
- [29] M. Perse et al., Genetski nadzor inbridiranih linij, *Acta agriculturae Slovenica* 90(2) (2007).
- [30] G. Ramadori et al., Expression and regulation of the murine serum amyloid A (SAA) gene in extrahepatic sites, *J Immunol* 135(6) (1985), 3645–3647.
- [31] P. Santiago et al., Serum amyloid A protein in an echinoderm: its primary structure and expression during intestinal regeneration in the sea cucumber *Holothuria glaberrima*, *J Exp Zool* 288(4) (2000), 335–344.
- [32] P. G. Santiago-Cardona et al., Lipopolysaccharides induce intestinal serum amyloid A expression in the sea cucumber *Holothuria glaberrima*, *Dev Comp Immunol* 27(2) (2003), 105–110.

- [33] L. Schaefer et al., The matrix component biglycan is proinflammatory and signals through Toll-like receptors 4 and 2 in macrophages, *J Clin Invest* 115(8) (2005), 2223–2233.
- [34] R. S. Sellers et al., Immunological variation between inbred laboratory mouse strains: points to consider in phenotyping genetically immunomodified mice, *Vet Pathol* 49(1) (2012), 32–43.
- [35] J. Sipe, Revised nomenclature for serum amyloid A (SAA). Nomenclature Committee of the International Society of Amyloidosis. Part 2, *Amyloid* 6(1) (1999), 67–70.
- [36] J. D. Sipe et al., Characterization of the inbred CE/J mouse strain as amyloid resistant, *Am J Pathol* 143(5) (1993), 1480–1485.
- [37] C. B. Stephensen, Vitamin A, infection, and immune function, *Annu Rev Nutr* 21 (2001), 167–192.
- [38] L. Sun and R. D. Ye, Serum amyloid A1: Structure, function and gene polymorphism, *Gene* 583(1) (2016), 48–57.
- [39] L. R. Tannock et al., Serum amyloid A3 is a high density lipoprotein-associated acute-phase protein, *J Lipid Res* 59(2) (2018), 339–347.
- [40] P. Trontelj, Filogenetske osnove biološke sistematike, Biodiverziteta – raznolikost živih sistemov. Mednarodni posvet Biološka znanost in družba. Zbornik prispevkov: 29–35 (2009).
- [41] C. M. Uhlar et al., Evolution of the serum amyloid A (SAA) protein superfamily, *Genomics* 19(2) (1994), 228–235.
- [42] C. M. Uhlar and A. S. Whitehead, Serum amyloid A, the major vertebrate acute-phase reactant, *Eur J Biochem* 265(2) (1999), 501–523.
- [43] A. S. Whitehead et al., Identification of novel members of the serum amyloid A protein superfamily as constitutive apolipoproteins of high density lipoprotein, *J Biol Chem* 267(6) (1992), 3862–3867.
- [44] K. Yamamoto et al., Structural diversity of murine serum amyloid A genes. Evolutionary implications, *J Immunol* 139(5) (1987), 1683–1688.

- [45] R. D. Ye. and L. Sun, Emerging functions of serum amyloid A in inflammation, *J Leukoc Biol* 98(6) (2015), 923–929.

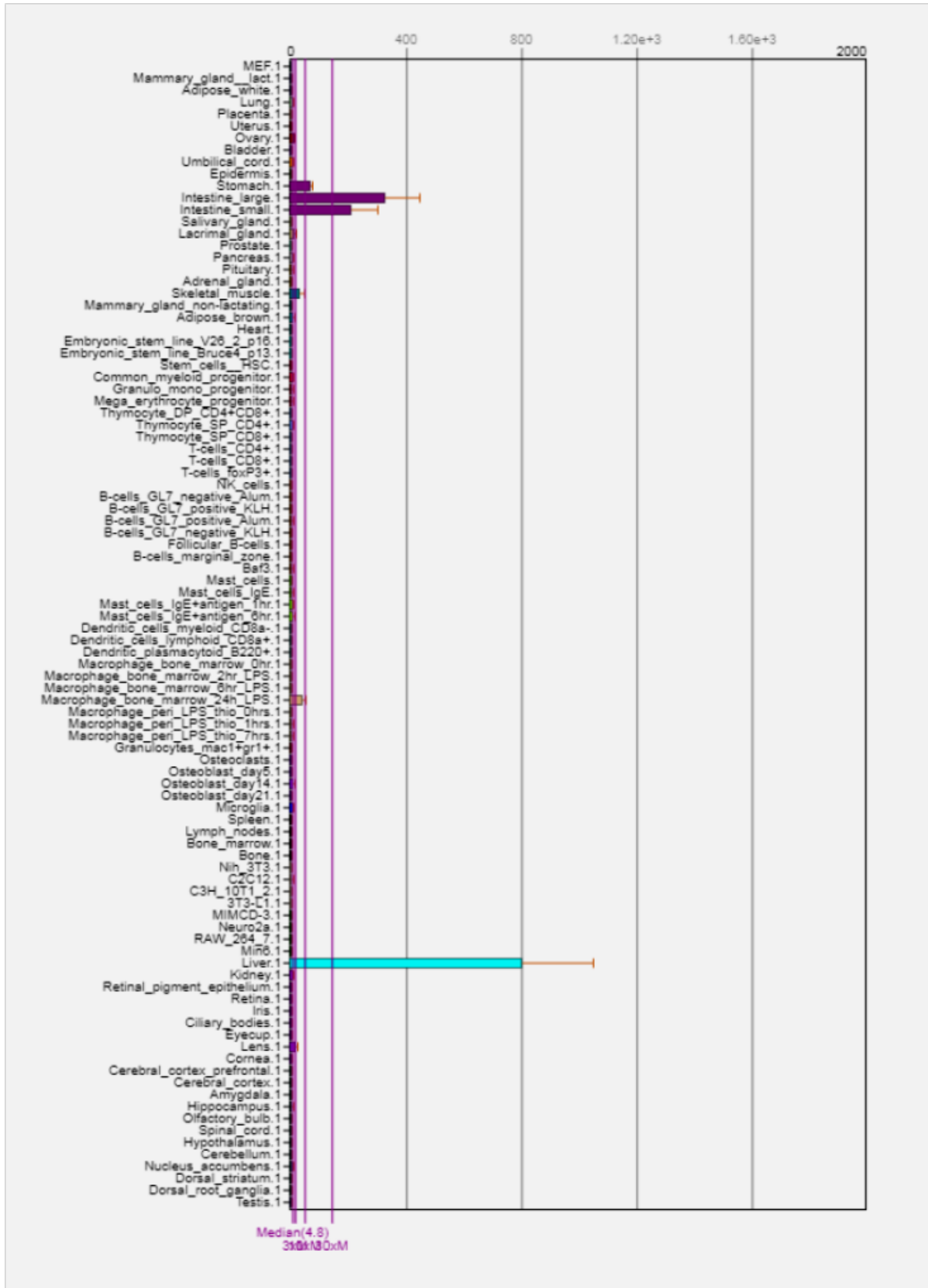
PRILOGA A: Ekspresija *Saal* v mišjih tkivih

Ekspresija *Saal* v mišjih tkivih je najbolj intenzivna v debelem in tankem črevesu, trebuhu, ledvicah in jetrih normalnih vnetno nestimuliranih tkivih (Vir: <http://biogps.org/#goto=genereport&id=20208>).



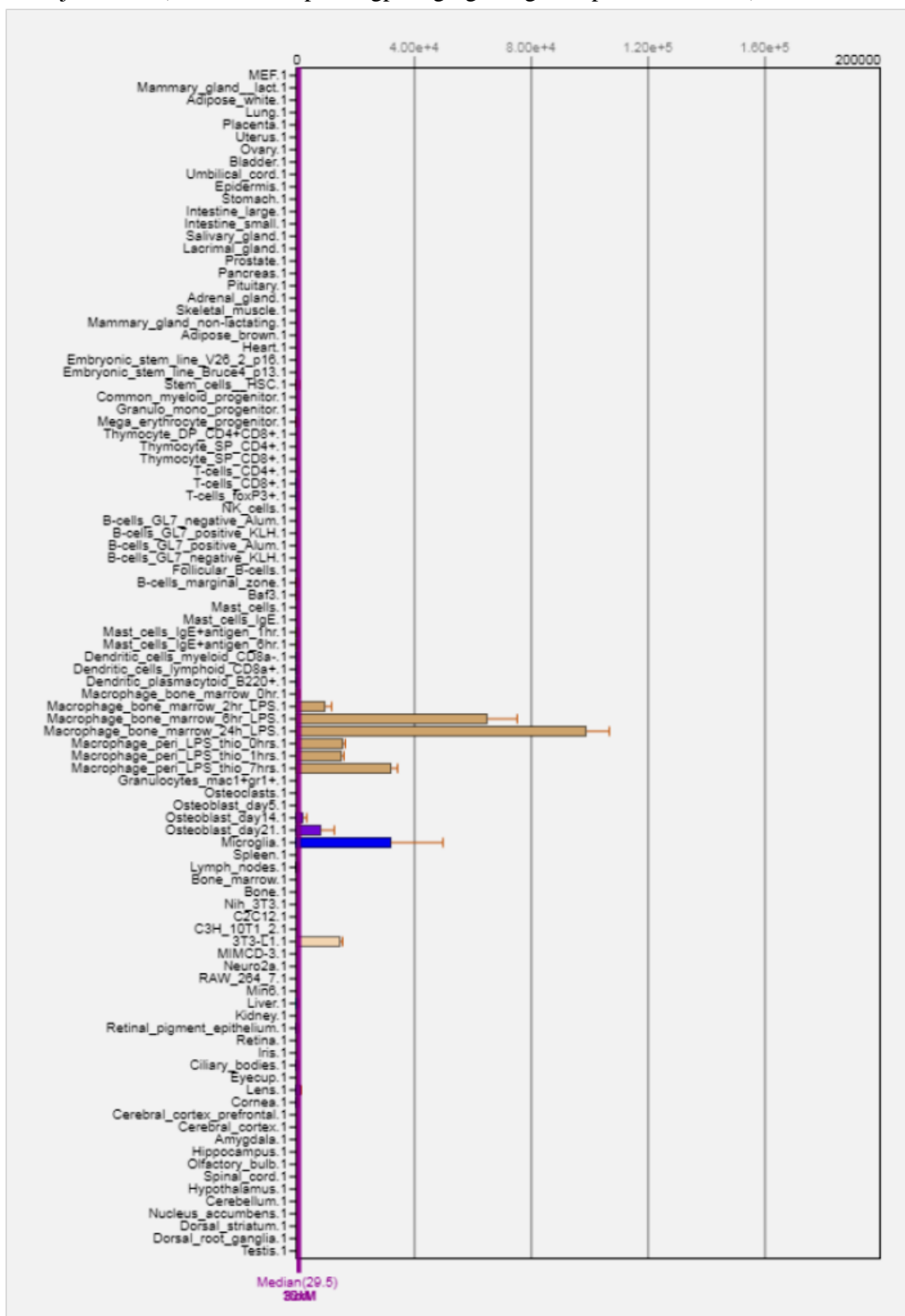
PRILOGA B: Ekspresija *Saa2* v mišjih tkivih

Ekspresija *Saa2* v mišjih tkivih je najbolj intenzivna v ledvicah, debelem in tankem črevesu, v trebušni votlini in v jetrih normalnih vnetno nestimuliranih tkivih (Vir: <http://biogps.org/#goto=genereport&id=20209>).



PRILOGA C: Ekspresija *Saa3* v mišjih tkivih

Ekspresija *Saa3*, verjetno samo *Saa3* in ne tudi *Saa4*, v normalnih vnetno nestimuliranih mišjih tkivih (Vir: *Saa3*, <http://bioGPS.org/#goto=genereport&id=20210>).



PRILOGA D: Ekspresija *Saa4* v mišjih tkivih

Saa4 je najvišje zvišan v jetrih, medtem ko je v drugih tkivih zelo nizko izražen
(Vir: *Saa4*, <http://biogps.org/#goto=genereport&id=20211>).

