

# PROTEOMSKO PROFILIRANJE SERUMA I JETRE JELENA OBIČNOG (CERVUS ELAPHUS) PRIMJENOM SPEKTROMETRIJE MASA

---

Šimonji, Karol

Doctoral thesis / Disertacija

2023

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Veterinary Medicine / Sveučilište u Zagrebu, Veterinarski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:178:710458>

Rights / Prava: [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-09-05**



Repository / Repozitorij:

[Repository of Faculty of Veterinary Medicine -  
Repository of PHD, master's thesis](#)





Sveučilište u Zagrebu

VETERINARSKI FAKULTET

Karol Šimonji

**PROTEOMSKO PROFILIRANJE SERUMA I JETRE  
JELENA OBIČNOG (*CERVUS ELAPHUS*)  
PRIMJENOM SPEKTROMETRIJE MASA**

DOKTORSKI RAD

Zagreb, 2023.



University of Zagreb

VETERINARY FACULTY

Karol Šimonji

**PROTEOMIC PROFILING OF SERUM AND LIVER IN  
RED DEER (*CERVUS ELAPHUS*) BY MASS  
SPECTROMETRY**

DOCTORAL THESIS

Zagreb, 2023



Sveučilište u Zagrebu

VETERINARSKI FAKULTET

Karol Šimonji

**PROTEOMSKO PROFILIRANJE SERUMA I JETRE  
JELENA OBIČNOG (*CERVUS ELAPHUS*)  
PRIMJENOM SPEKTROMETRIJE MASA**

DOKTORSKI RAD

Mentorica:  
dr. sc. Josipa Kuleš

Zagreb, 2023.



University of Zagreb

VETERINARY FACULTY

Karol Šimonji

**PROTEOMIC PROFILING OF SERUM AND LIVER IN  
RED DEER (*CERVUS ELAPHUS*) BY MASS  
SPECTROMETRY**

DOCTORAL THESIS

Supervisor:  
Josipa Kuleš, PhD

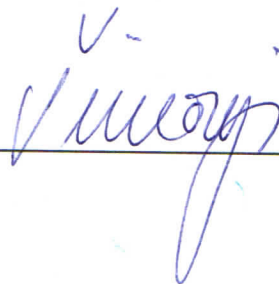
Zagreb, 2023



Sveučilište u Zagrebu  
VETERINARSKI FAKULTET

## IZJAVA

Ja, KAROL ŠIMONJI, potvrđujem da je ovaj doktorski rad izvorni rezultat mojeg rada te da se u njegovoj izradi nisam koristio/-la drugim izvorima do onih navedenih u radu.

  
\_\_\_\_\_  
(potpis studenta)

Zagreb, 2023.

Doktorski rad izrađen je na Klinici za unutarnje bolesti Veterinarskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

Mentorica:

dr. sc. Josipa Kuleš

Predstojnica:

doc. dr. sc. Iva Šmit

Doktorski rad ima:

102 stranice,

22 slike,

9 tablica.

## INFORMACIJE O MENTORICI

Dr. sc. Josipa Kuleš, mag. med. biokem., zaposlena je kao poslijedoktorand na Zavodu za kemiju i biokemiju Veterinarskog fakulteta, Sveučilište u Zagrebu. Dr. sc. Kuleš završila je studij medicinske biokemije 2008. godine na Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu u Zagrebu, a doktorirala na Veterinarskom fakultetu u Zagrebu 2014. godine. Njezini znanstveni interesi su istraživanja zoonoza i primjena omika tehnologija u veterinarskoj medicini. Tijekom doktorskog studija usavršavala se u području proteomike kroz nekoliko višemjesečnih boravaka u Glasgowu (Ujedinjeno Kraljevstvo) i Murciji (Španjolska). Nakon stjecanja doktorata zaposlena je kao iskusni istraživač na EU FP7 projektu VetMedZg („Upgrading the research performance in molecular medicine at the Faculty of Veterinary Medicine University of Zagreb”). Sudjelovala je na više međunarodnih i nacionalnih znanstvenih projekata. Dr. sc. Kuleš tehnička je urednica znanstvenog časopisa iz biomedicinskog područja *Biochemia Medica*, te članica znanstvenog uredničkog odbora Veterinarskog glasnika. Dobitnica je godišnje nagrade za najboljeg mladog znanstvenika, za znanstveni rad u 2014-oj i 2016-oj godini, od strane Hrvatskog društva za medicinsku biokemiju i laboratorijsku medicinu. Autorica je više od 50 znanstvenih radova i preko 40 sažetaka na međunarodnim i nacionalnim znanstvenim skupovima.

Poveznica na radove:

<https://www.bib.irb.hr/pretraga?operators=and|Kule%C5%A1,%20Josipa%20%2824556%29|text|profile>



## ZAHVALE

*Zahvaljujem neizmjerljivo mentorici, dr. sc. Josipi Kuleš i izvanrednom profesoru Deanu Konjeviću, na ukazanom povjerenju, na ljudskoj podršci, strpljenju i vremenu koje su mi pružili za vrijeme provedbe istraživanja i izradi ove disertacije.*

*Gospođi Vedrani Pšenici na iskazanoj profesionalnosti i dostupnosti, svim nastavnicima i djelatnicima Veterinarskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu kao i svim suradnicima s Klinike za unutarnje bolesti koji su mi svojim radom na Klinici omogućili nesmetano odvijanje istraživanja i izradu doktorskog rada. Također, ovim putem, zahvaljujem svim prijateljima i kolegama koji su na bilo koji način doprinijeli ostvarenju ovog rada.*

*Posebno zahvaljujem prijateljima Ivanu Kreziću i Ivanu Gržibovskom na pomoći i požrtvornosti u laboratorijskim istraživanjima provedenim na Medicinskom fakultetu kao i pomoći pri administrativnim poslovima.*

*Na kraju, veliko hvala profesoru Konjeviću koji je nesebično pomogao pri prikupljanju uzoraka i osiguravanju sredstava za izradu doktorata u sklopu HRZZ projekta: IP8963: Interakcija nositelj-parazit: odnos tri različita nositelja prema invaziji metiljem *Fascioloides magna*".*

*Veliko hvala profesoru Vladimiru Mrljku na ustupanju proteomskog laboratorija za potrebe ovog istraživanja.*

## POPIS PRILOGA - SLIKE

**Slika 1.** Raspodjela haplogrupa jelena običnoga u Europi (izvor: MACKIEWICZ i sur. (2022.)).

**Slika 2.** Jelen obični u farmskom uzgoju, mužjaci s rastućim rogovljem u bastu. (foto: D. Konjević)

**Slika 3.** Jelen obični u farmskom uzgoju, u prvom planu košute, a u drugom odjeljku jelen. (foto: D. Konjević)

**Slika 4.** Primjer hodograma proteomskog istraživanja (slika: J. Kuleš).

**Slika 5.** Distribucija sisavaca s dostupnim setovima proteomskih i genomskih podataka prema javno dostupnim bazama (PRIDE, GenBank i RefSeq iz 2020. godine). Odozgo prema gore prikazani su: parnoprsti kopitari, mesožderi, pangolini, neparnoprsti kopitari, šišmiši, kukcojedi, glodavci, zečevi, primati, leteći lemuri, rovke, mravojedi i ljenjivci, armadilos, slonovi, morske krave i dugoni, slonove rovke, zlatne krtice, tenreci, aardvarkovi, tobolčari biljojedi, torbari mesojedi, oposumi i sisavci koji polažu jaja (izvor: HECK i NEELY, 2020).

**Slika 6.** Prikaz različite zastupljenosti proteina između kontrolne skupine i skupine invadirane metiljem *F. magna*, nakon FDR korekcije p-vrijednosti. (izvor: ŠIMONJI i sur., 2022.). Crvene točkice predstavljaju proteine s značajno većom relativnom zastupljenošću u invadiranoj skupini u odnosu na kontrolnu skupinu, a plave s značajno manjom zastupljenošću.

**Slika 7.** Grafički prikaz prvih 20 pojmova genske ontologije za biološke procese u koje su uključeni proteini seruma jelena običnog. Boja i veličina kružića odgovara broju gena uključenih u odgovarajući proces.

**Slika 8.** Grafički prikaz prvih 20 pojmova genske ontologije za staničnu lokalizaciju proteina seruma jelena običnog. Boja i veličina kružića odgovara broju gena uključenih u odgovarajući stanični odjeljak.

**Slika 9.** Grafički prikaz prvih 20 pojmova genske ontologije za molekularnu funkciju proteina seruma jelena običnog. Boja i veličina kružića odgovara broju gena uključenih u odgovarajuću funkciju.

**Slika 10.** Prikaz bioloških puteva s najmanje 10 gena/putu povezanih s proteomom seruma jelena običnog, napravljen pomoću alata Reactome.

**Slika 11.** Prvih 20 pojmova genske ontologije za biološke procese u proteomu seruma s najnižom vrijednošću FDR i najvećim faktorom obogaćenja (engl. *fold enrichment*). Boja odgovara veličini faktora obogaćenja, a veličina kružića odgovara broju gena uključenih u odgovarajući proces.

**Slika 12.** Prikaz najvažnijih pojmova vezanih uz proteom seruma jelena običnog dobiven pretraživanjem KEGG baze podataka.

**Slika 13.** Mrežni prikaz najznačajnijih pojmova genske ontologije u proteomu seruma jelena običnog. Dva pojma (čvora) su povezana ukoliko dijele 20% ili više gena. Tamniji čvorovi su značajnije obogaćeni skupovi gena, veći čvorovi predstavljaju veće skupove gena, a deblje linije između čvorova predstavljaju više preklapajućih gena. Slika je izrađena u programu ShinyGO.

**Slika 14.** Grafički prikaz prvih 20 pojmova genske ontologije za biološke procese u koje su uključeni proteini jetre jelena običnog. Boja i veličina kružića odgovara broju gena uključenih u odgovarajući proces.

**Slika 15.** Grafički prikaz prvih 20 pojmova genske ontologije za staničnu lokalizaciju proteina jetre jelena običnog. Boja i veličina kružića odgovara broju gena uključenih u odgovarajući stanični odjeljak.

**Slika 16.** Grafički prikaz prvih 20 pojmova genske ontologije za molekularnu funkciju proteina jetre jelena običnog. Boja i veličina kružića odgovara broju gena uključenih u odgovarajuću funkciju.

**Slika 17.** Prikaz značajnih bioloških puteva s najmanje 30 gena/putu povezanih s proteomom jetre jelena običnog, napravljen pomoću alata Reactome.

**Slika 18.** Prvih 20 pojmova genske ontologije za biološke procese u proteomu jetre s najnižom vrijednošću FDR i najvećim faktorom obogaćenja (engl. *fold enrichment*). Boja odgovara veličini faktora obogaćenja, a veličina kružića odgovara broju gena uključenih u odgovarajući proces.

**Slika 19.** Mrežni prikaz najznačajnijih pojmova genske ontologije u proteomu jetre jelena običnog. Dva pojma (čvora) su povezana ako dijele 20% ili više gena, tamniji čvorovi predstavljaju značajnije obogaćene skupove gena, veći čvorovi predstavljaju veće skupove gena, a deblje linije predstavljaju više preklapajućih gena. Slika je izrađena u programu ShinyGO.

**Slika 20.** Raspodjela proteina identificiranih LC-MS/MS pristupom u serumu i jetri jelena običnog prikazana Vennovim dijagramom.

**Slika 21.** Toplinska mapa relativne zastupljenosti proteina seruma (zeleni panel gore) i jetre (crveni panel gore). Uzorci i proteini rangirani su prema relativnoj zastupljenosti s euklidskom mjerom udaljenosti i Wardovim algoritmom za grupiranje; crvena boja označava veću zastupljenost pojedinog proteina, dok plava boja označava manju zastupljenost. Puni nazivi gena odnosno proteina nalaze se u Tablicama 2 i 6.

**Slika 22.** Validacija proteomskih rezultata Western blotom. Prikaz membrane i relativna zastupljenost A) transferina (TF) i B) alfa-4 aktinina (ACTN4) u uzorcima jetre jelena običnog. U prvu jažicu na gelu nanesen je molekularni marker, a u ostale ekstrakti proteina jetre jelena običnog (J1-J10). Proteini na membrani inkubirani su s odgovarajućim protutijelima te su detektirani kemiluminiscentno.

## POPIS PRILOGA - TABLICE

**Tablica 1.** Kromatografski uvjeti gradijentnog eluiranja korištenog za razdvajanje peptida LC-MS/MS pristupom. A – pokretna faza A (0,1% mravlja kiselina u vodi). B – pokretna faza B (0,1% mravlja kiselina u 80%-om acetonitrilu).

**Tablica 2.** Popis proteina identificiranih i kvantificiranih pomoću LC-MS/MS pristupa u serumu jelena običnog. Prikazana je jedinstvena oznaka proteina (iz baze UniProt), oznaka gena za *Cervus elaphus*, oznaka gena za *Bos taurus* (dobivena BLAST analizom), broj identificiranih jedinstvenih peptida, a zastupljenost pojedinog proteina prikazana je kao medijan i interkvartilni raspon (Q1 – Q3) u arbitrarnim (proizvoljnim) jedinicama.

**Tablica 3.** Analiza genske ontologije (GO) za biološke procese u serumu jelena običnog. Prikazan je naziv i oznaka procesa, broj i oznake uključenih gena. Puni nazivi gena odnosno proteina nalaze se u Tablici 2.

**Tablica 4.** Analiza genske ontologije (GO) za staničnu lokalizaciju proteina u serumu jelena običnog. Prikazan je naziv i oznaka GO, broj i oznake uključenih gena. Puni nazivi gena odnosno proteina nalaze se u Tablici 2.

**Tablica 5.** Analiza genske ontologije (GO) za molekularne funkcije proteina seruma jelena običnog. Prikazan je naziv i oznaka procesa, broj i oznake uključenih gena. Puni nazivi gena odnosno proteina nalaze se u Tablici 2.

**Tablica 6.** Popis proteina identificiranih i kvantificiranih pomoću LC-MS/MS pristupa u jetri jelena običnog. Prikazana je jedinstvena oznaka proteina (iz baze UniProt), oznaka gena za *Cervus elaphus*, oznaka gena za *Bos taurus* (dobivena BLAST analizom), broj identificiranih jedinstvenih peptida, a zastupljenost pojedinog proteina prikazana je kao medijan i interkvartilni raspon (Q1 – Q3) u arbitrarnim (proizvoljnim) jedinicama.

**Tablica 7.** Analiza genske ontologije (GO) za biološke procese u jetri jelena običnog. Prikazan je naziv i oznaka procesa, broj i oznake uključenih gena. Puni nazivi gena odnosno proteina nalaze se u Tablici 6.

**Tablica 8.** Analiza genske ontologije (GO) za staničnu lokalizaciju proteina jetre jelena običnog. Prikazan je naziv i oznaka GO, broj i oznake uključenih gena. Puni nazivi gena odnosno proteina nalaze se u Tablici 6.

**Tablica 9.** Analiza genske ontologije (GO) za molekularne funkcije u jetri jelena običnog. Prikazan je naziv i oznaka procesa, broj i oznake uključenih gena. Puni nazivi gena odnosno proteina nalaze se u Tablici 6.

## SAŽETAK

Proteomika temeljena na spektrometriji masa predstavlja snažan alat u globalnom istraživanju biološke funkcije pojedinih tipova stanica i tkiva životinja. Iako su proteomska istraživanja uvelike zastupljena u domaćih životinja, u divljih su još uvijek razmjerno rijetka. U ovom presječnom istraživanju prikupljena su ukupno 22 uzorka jetre i 26 uzoraka seruma, od klinički zdravih jelena netom po odstrjelju, odnosno uzorci jetre tijekom odrobljavanja jedinke. Proteomska analiza seruma i tkiva provedena je semi-kvantitativnim proteomskim pristupom primjenom vezanog sustava tekućinske kromatografije i tandemne spektrometrije masa. Funkcionalna analiza genske ontologije i analiza bioloških puteva provedena je pomoću alata ShinyGO. Svi dobiveni rezultati imali su postotak krivih očitavanja (FDR)  $< 0,05$ , gdje je nominalna P vrijednost dobivena na temelju hipergeometrijskog testa. Za validaciju odabranih proteina korišten je Western blot.

Većina proteina u serumu usko je povezana s imunosnim sustavom i obrambenim odgovorom organizma. Najveći broj proteina seruma pripada regulatorima molekularnih funkcija, odnosno zaduženi su za regulaciju enzimskih aktivnosti, te sudjeluju u vezanju na signalne receptore, lipide i ostale molekule. Rezultati analize genske ontologije za proteine jetre pokazali su da najviše proteina ima porijeklo iz mitohondrija i endoplazmatskog retikuluma. Vezano uz funkciju proteina, najzastupljenije su oksidoreduktaze, a najveći broj proteina uključen je u metaboličke procese, translaciju i elongaciju, te biološke oksidacije. Sedamnaest proteina pokazalo se zajedničkim u proteomu seruma i jetre. Iz svega navedenog proizlazi da je istraživanje potvrdilo početne pretpostavke: u serumu jelena običnog prevladavaju proteini koji sudjeluju u imunološkom odgovoru zbog specifičnosti vrste i životnih uvjeta; dok u jetri prevladavaju proteini s metaboličkom ulogom. Analiza proteoma otkriva mnoge važne funkcije organizma, stoga će daljnja istraživanja proteoma divljih životinja biti primarni fokus postgenomske ere.

**Ključne riječi:** jelen obični, proteomika, proteom seruma, proteom jetre, metabolizam, imunosni sustav

## **EXTENDED ABSTRACT**

### **INTRODUCTION**

Red deer (*Cervus elaphus*) is economically and culturally one of the most important wildlife and game species, not only in Croatia, but also in the world context. From a scientific point of view, red deer is particularly interesting in terms of phylogenetic analyses, especially in case of decreasing populations, the settlement of other individuals with different genetic characteristics, but also through the anthropogenic impact on the original populations. In addition, the deer occupies a special place in terms of the production of high-valuable meat and velvet antlers, both due to their medicinal potential and as a potential model for the study of tumors. Finally, scientists are also interested in deer from the point of infectious and parasitic diseases, and of other diseases that potentially can be transmitted to humans and domestic animals. With the advancement of molecular methods, it is understandable that proteomic research becomes increasingly used in the previously mentioned research on animals. The largest part of these studies has been done on the proteome of growing antlers, followed by research on diseases and meat. Knowledge of proteomes of a healthy population is a prerequisite for all these studies. This is especially important if known that the implementation of classic research on wild animals with the creation of control and experimental (case) groups is extremely difficult, especially when it comes to a large animal model. Precisely for the stated reason, it is expected that this research will offer a basis for further studies in the field of deer proteomics, where initial data of serum and liver proteomes are necessary.

### **REVIEW OF THE CURRENT KNOWLEDGE**

According to scientific classification, red deer (*Cervus elaphus*), belongs to the order Artiodactyla (ungulates), suborder Ruminantia (ruminants), family Cervidae (deer, red deer), genus *Cervus* (deer) and species *Cervus elaphus*. From a molecular point of view, the classification is somewhat different, so deer are included in the superorder Laurasiatheria, the order Cetartiodactyla and the family Cervidae. In addition, deer are divided into true and false deer, and can be classified into four subfamilies: Hydropotinae (monotypic species), Capreolinae (roe deer, white-tailed deer, reindeer and elk), Muntinacinae (mullet), Cervinae (axis deer, red deer, sika...). Historically speaking, red deer appeared in Europe most likely in the Middle Pleistocene, that is, some 800,000 years ago. Those early forms are classified in the paleosubspecies *Cervus elaphus acoronatus*. In addition to this, some other species are known



from the Middle Pleistocene period, so *Cervus elaphus rianensis* lived in today's Italy, and *Cervus elaphus siciliae* lived in Sicily in the late Pleistocene. More recent studies, which are based on genetic features, classify European deer into two lineages, western deer (elaphoid) and eastern (maraloid). Geographically, we find the western line in the area of most of Europe, North Africa and the western part of Asia. The eastern line lives in North America and the eastern part of Asia. Studies on mitochondrial DNA revealed the existence of three clusters made up of haplogroups A, B and C. Of these, haplogroup C inhabits mostly the Balkans. Although there are reports of the presence of the so-called Pannonian deer (*C. e. pannoniensis*) in the area of Slavonia and Baranja, recent studies show that the differences between the western and eastern parts of Croatia are minimal. Red deer is one of the largest deer species that can grow 170 to 250 cm in length, and reaches 120 to 150 cm in height. Body mass is between 140 and 300 kg. Females are smaller than males. Dental formula is I 0/3, C 1(0)/1, P 3/3, M 3/3, comprising 34 permanent teeth in total (preceded by 22 deciduous teeth). Upper canines are present only in males. The summer coat is reddish in colour, while ventral part of the abdomen is whitish. The winter coat is thicker and darker (usually dark brown) in colour. The main characteristics of this family are antlers, which are built entirely like bone. Antlers, with the exception of reindeer/caribou, are worn exclusively by males, and only exceptionally by females. Under the influence of hormones, the antlers grow and are shed every year, and this cycle is strictly periodic in deer of temperate areas. Deer antlers are true, solid bone, made of spongiosa and compacta. Antlers are growing from bony outgrowths on the forehead, which we call pedicles. While growing, the antlers are covered with a specific skin (velvet). Following the mineralization of the antlers, this skin is removed. As the age of the deer increases, the antlers become larger, richer in tines, more massive and heavier, until the age of full maturity, which according to older literature is around 12-14 years. Hinds are reaching sexual maturity at the age of two. Pregnancy lasts 240-260 days. Before calving, the hinds separates from the herd and usually gives birth to one calf with an average weight of around 15 kg, and returns to the herd in about two weeks. Calves are born with spots that disappear by the end of summer. A deer lives over 20 years in captivity, and about 10 to 12 years in nature. In habitats with fewer predators, they can live more than 15 years.

The term "proteomics" appears officially for the first time in 1995, and is defined as a comprehensive characterization and analysis of gene expression and the entire set of proteins found in cells, tissue or organism called proteome. The growth of proteomics is based on the development of DNA and protein sequence databases, advances in protein separation methods,

field of mass spectrometry, and the development of computer algorithms for searching databases. Proteomics is based on the global analysis of all proteins within the system at once, as well as on the possibility of studying the complex interactions of proteins. The proteome is a dynamic and complex system subject to qualitative and quantitative changes. Therefore, the study of the proteome becomes necessary for the understanding of biological systems and their functioning. Proteomics combines knowledge on molecular biology, biochemistry and bioinformatics. Mass spectrometry (MS) is an analytical method that provides information about the mass of peptides or their fragments based on the ratio of mass and charge, and provides the base for protein identification. Qualitative protein analysis determines the primary amino acid sequence of a protein, while the quantitative analysis determines the representation of a particular protein in the sample. Finally, proteomics provides a good insight into the biology of an organism, given that the representation of proteins, for example, does not necessarily correspond to the transcription and representation of genes. Also, the dynamics of proteins during the life are not the same, nor are their turnover, interactions, placement, etc. All of the above indicates that the various combinations and interactions of proteins on which the phenotype depends are not always noticeable through the observation of the individual's genome.

So far, a relatively small number of proteomic studies on deer tissues is available in the scientific literature, mainly dealing with meat quality and antler growth cycle. In the case of antlers, the aim of studies was mainly to determine their regeneration potential, the role of stem cells in that process, and the role of environmental factors in their growth and development. A smaller proportion of studies was oriented on the reproductive cycle and diseases. A recent study analysed changes in the liver proteome of red deer after infection with large American fluke (*Fascioloides magna*) on a sample of 25 livers. In that research, 234 proteins were identified with different representation between the control and experimental groups. According to the authors, the research results point to the fact this infection is associated with changes in fatty acid metabolism, oxidative stress and fibrosis.

## **HYPOTHESIS AND AIMS OF THE RESEARCH**

The hypothesis of the research is that the application of the proteomic approach with the help of mass spectrometry of high precision and sensitivity will enable the generation and analysis of the serum and liver proteomic profile in a healthy red deer population. The

hypothesis is that proteins participating in the immune response will predominate in the serum due to the specificity of the species and living conditions; while proteins with a metabolic role will predominate in the liver.

The main aims of the research are:

- a) to perform a qualitative and semi-quantitative analysis of serum and liver proteins of red deer (*Cervus elaphus*)
- b) to characterise serum and liver proteins using bioinformatics methods (functional analysis and classification of identified proteins with the help of a proteomic/genomic databases)
- c) to compare serum and liver proteomes.

## **MATERIAL AND METHODS**

The study was funded by the Croatian Science Foundation project IP 8963 "Host-parasite interaction: the relationship between three different hosts and *Fascioloides magna* infection". The Committee for Ethics in Veterinary Medicine approved the research (Class: 640-01118-17/60, Reg. number: 251-61-44-18-02)

In this cross-sectional study, the sample size was calculated based on the meta-analysis of literature data using online available statistical calculators. The database for cattle (*Bos taurus*) was searched, as a ruminant model most closely related to deer, with well-researched and edited gene databases. The health status of the deer was assessed based on the external appearance, fattening condition, the appearance of the hair cover and behaviour of the individual before the actual shooting, and after the shooting based on the presence of any visible wounds, discharge from natural openings and after opening the individual based on the macroscopic appearance of the organs. Only individuals that were declared healthy according to the mentioned criteria were included in the further research. Blood samples (from large veins of the neck or heart) and liver of red deer were collected immediately after the hunt, or, in the shortest possible time. Blood was centrifuged directly in the field using a portable centrifuge, and serum was separated and stored at -80 °C until analysis. Liver samples were collected during evisceration of the animals. For further analysis, tissues were sampled only from those livers in which no signs of invasion were observed. Tissue samples were labelled and stored at -80 °C until further analysis.

Proteomic analysis of serum and liver tissues was performed using a semi-quantitative proteomic approach with isobaric tags that enable multiplexing - simultaneous analysis of six samples according to the previously described protocol. Samples labelled with tandem mass tags (TMT) were analysed using Dionex UltiMate 3000 RSLCnano system coupled to a Q Exactive Plus mass spectrometer with a hybrid quadrupole and Orbitrap mass analyser by the data dependent acquisition (DDA) procedure, in accordance with previous descriptions. The SEQUEST algorithm within the software Proteome Discoverer was used for protein identification and relative quantification. The *Cervus elaphus* database downloaded from UniprotKB, which contained 19,262 entries, was searched according to the following parameters: two missed trypsin cleavage sites allowed, an error tolerance of the measured mass of precursors and fragments of 10 ppm and 0.05 Da, carbamidomethyl as a fixed peptide modification, oxidation and TMT sixplex as dynamic peptide modifications. The percentage of false discovery rate (FDR) during peptide identification was calculated using the Percolator algorithm within the Proteome Discoverer. Proteins with at least two unique peptides and 1% FDR were considered reliably identified and were used in further analyses. Proteins that were present in at least 50% of the samples were included in statistical analysis. Since the majority of identified proteins did not follow a normal distribution (as determined by the Shapiro-Wilk test), the relative protein abundance is presented as median and interquartile range (1st and 3rd quartiles). For bioinformatic analysis, the unique protein ID was first converted to the official gene symbol using the UniProtKB ID mapping tool. Proteins for which there was no red deer gene annotation or were listed as “uncharacterized protein” were replaced using the UniProt BLAST tool with the closest matching ortholog from the *Bos taurus* database (at least 70% match). Gene Ontology (GO) functional analysis and Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) biological pathway analysis were performed using the ShinyGO tool. All obtained terms had  $FDR < 0.05$ , where the nominal P value was obtained based on the hypergeometric test. Analysis of biological pathways associated with the liver and serum proteome was performed using the Reactome tool with the human genome as background and pathways with  $FDR < 0.05$  were selected as significant. The fold enrichment factor was defined as the ratio of identified genes that belong to a certain GO term and the total number of genes in the background. Western blot was used for the validation of selected proteins.

## RESULTS

In total, 234 proteins were identified in deer serum using at least two unique peptides and with 1% FDR. Only proteins that were present in at least 50% of the samples, i.e. 87 of them, were included in the further statistical and bioinformatic processing. According to the gene ontology for biological processes, the largest number of genes (N = 31) is included in the process of "response to external stimulus", followed by (N = 29) "immunological response" and "proteolysis". Most biological processes are closely related to the immune system. Gene ontology for cellular localization showed that the vast majority of proteins belong to the extracellular region (N = 56) or the extracellular space (N = 44). Individual proteins attached to the cell membrane, respective parts of lipoprotein particles, complexes with fibrinogen and hemoglobin, and the content of alpha granules of platelets secreted into the circulation were also identified. The largest number of proteins belongs to the regulators of molecular functions (N = 23), that is, to the regulation of enzymatic activities (N = 22), namely peptidases (N = 18) and inhibitors of (endo)peptidases (N = 17). In addition to enzymatic regulation, serum proteins participate in binding to signal receptors (N = 13), lipids (N = 9), and other molecules (glycosaminoglycans, heparin, phospholipids and others). The Reactome analysis showed that 53 biological pathways are statistically significant (FDR < 0.05). After determining the additional criterion that at least 10 genes are present in each biological pathway, this number was reduced to 14. Most of the proteins identified and quantified in the serum proteome are involved in the immune system (N = 68), i.e. the innate immune system (N = 43). Identified proteins were further included in complement cascade (N = 24), degranulation of platelets (N = 21) and neutrophils (N = 16), regulation of insulin-like growth factor (IGF) transport and uptake (N = 18), and others. Some of the proteins are related to haemostasis (N = 34), such as platelet adhesion, activation and aggregation (N = 21) and coagulation cascade (N = 12). Eleven proteins are involved in the processes of binding and taking up ligands using scavenger receptors. Fibrinolysis, complement activation, humoral immune response and humoral immune response mediated by circulating immunoglobulins, regulation of coagulation and hemostasis are distinguished as significantly enriched biological processes (based on the fold enrichment) in the serum. Most of the enriched biological processes are related to the immune system and the immune system response. KEGG database analysis determined that the majority of proteins are related to the complement and coagulation cascade (N = 29).

Using a proteomic approach based on TMT labelling, 22 liver samples from healthy deer were analysed. Analysis showed that a total of 493 proteins were identified using at least

two unique peptides and with 1% FDR. Only proteins present in at least 50% of the samples, i.e. 387 of them, were included in further statistical and bioinformatic processing. Gene ontology for biological processes determined that the largest number of genes is involved in the metabolism of small molecules (N = 110), metabolism of organic acids (N = 82), catabolic processes (N = 74) and lipid metabolism (N = 53). It should also be noted the processes of transport of organic substances (N = 41), and the creation of precursors of metabolites and energy (N = 35). The results of the gene ontology analysis for cellular localization showed that most proteins originate from mitochondria (N = 73) and endoplasmic reticulum (N = 54). The Reactome analysis showed that 66 biological pathways were statistically significant (FDR < 0.05). With the criterion that there are at least 30 genes in each pathway, the number of significant biological pathways was reduced to 19. The largest number of liver proteins is involved in metabolic processes (N = 234), metabolism of amino acids and derivatives (N = 66), biological oxidation (N = 48), neutrophil degranulation (N = 45) and translation (N = 41). Based on the fold enrichment, the significantly enriched biological processes in the liver are the metabolic/catabolic processes of amino acids, small molecules and fatty acids, as well as nucleotides, and compounds with purine nucleobases. Finally, seventeen proteins were found to be common to serum and liver.

## DISCUSSION

The majority of the proteins in the deer serum are involved in the immune response, especially in the part of non-specific (innate) immunity. Among the serum proteins, acute phase proteins were also found, representing a nonspecific and complex reaction of the organism to infections, injuries, inflammatory processes, etc. Despite the uniform nature of the acute phase response, there are numerous different features between various animal species. Diagnostically, the most important acute phase proteins in ruminants are haptoglobin (Hp) and serum amyloid A, followed by fibrinogen, ceruloplasmin, alpha-1-acid glycoprotein, alpha-1 antitrypsin, lactoferrin, and as acute phase negative proteins - albumin, transferrin and transthyretin. Studies on the acute-phase response in reindeer are relatively rare, and include reports on elevated concentrations of fibrinogen in diseased reindeer, which is in line with studies on red deer, where its role as an acute-phase reactant was also observed. In addition, the serum Hp of red deer showed a high predictive value in the diagnosis of proliferative tuberculosis. In the case of other deer species, the determination of the physiological values of red deer Hp and fallow deer fibrinogen should be highlighted. Some of the identified acute phase proteins in the serum

proteome inhibit proteases released by phagocytes or pathogens in order to reduce damage to healthy tissue ( $\alpha$ 1-anti-trypsin,  $\alpha$ 2- macroglobulin). Others, such as haptoglobin, have the ability to scavenge and bind metabolites that are released by cellular decomposition, while for example alpha-1-acid glycoproteins has antibacterial activity.

The second most abundant protein system in deer serum is related to haemostasis. Thus, coagulation factors, anticoagulants, components of the fibrinolytic system and vascular endothelium are present in the serum proteome. Processes such as fibrinolysis, complement activation, humoral immune response and response mediated by circulating immunoglobulins, regulation of coagulation and haemostasis were shown to be significantly enriched biological processes in red deer serum. Finally, changes in the composition of the blood can also indicate environmental pollution. Biochemical analysis of doe serum showed exposure to pesticides and artificial fertilizers used in agriculture. Therefore, the living conditions and habitat of red deer determine the dominance of immune system-related proteins in the serum proteome.

The results of gene ontology analysis for liver proteins showed that most of the proteins originate from mitochondria and endoplasmic reticulum. The most represented are oxidoreductases, while largest proportion of proteins is involved in metabolic processes, translation and elongation, and biological oxidation. Metabolism is the most dominant category present in the red deer liver proteome. Thus, proteins participating in the metabolism were identified. A large part of the red deer liver proteome consists also of ribosomal proteins (10 proteins of the small 40S ribosomal subunit and 11 proteins of the large 60S ribosomal subunit), nucleosome components (histones H2B and H3), ribonucleoproteins (HNRNPA3, HNRNPL, HNRNPH1), proteasome subunits (PSMB4, PSMB6), elongation factors, proteins associated with ubiquitination (USP5, UBA1). In the red deer liver proteome, several members of the heat shock protein family that play a role in enhancing the host's immune response have been identified, which was also shown in the response to infection with *Fascioloides magna* fluke. Among the proteins significantly represented in the liver proteome, members of the cytochrome P450 system with other proteins are responsible for the detoxification of xenobiotics. Enzymes involved in the metabolism of xenobiotics were shown to be significantly altered in deer infected with *F. magna*. Additionally, in the liver proteome, a multitude of proteins related to the immune response were identified, and 45 of them are included in the prominent biological pathway "neutrophil degranulation". Among them are acute phase proteins (haptoglobin, alpha-1-acid glycoprotein, A1BG, transferrin, ceruloplasmin), components of the antioxidant system (peroxiredoxins, glutathione-S-transferase, glutathione reductase, superoxide dismutase,

cytochrome P450, paraoxonase), and other proteins that act on the modulation of the immune response.

In conclusion, proteomic analysis of liver and serum can contribute to a better characterization of the red deer proteome, identification of biomarkers and molecular description of organ specialization. While the serum proteome is the most informative from a medical point of view, because almost all cells directly or indirectly communicate with the blood, and many after damage or death release their contents into the bloodstream; the liver proteome, as the main chemical factory of the organism, provides important information about metabolic changes in animals.

**Key words:** red deer, proteomics, serum proteome, liver proteome, metabolism, immune system



## SADRŽAJ

|   |     |
|---|-----|
| 1. UVOD   | 1   |
| 2. PREGLED DOSADAŠNJIH SPOZNAJA   | 3   |
| 2.1. JELEN OBIČNI ( <i>Cervus elaphus</i> L.)   | 3   |
| 2.2. ISTRAŽIVANJE PROTEOMA I RAZVOJ PROTEOMIKE  | 10  |
| 2.3. PROTEOMSKA ISTRAŽIVANJA U JELENA   | 13  |
| 3. PRETPOSTAVKA I CILJEVI ISTRAŽIVANJA  | 19  |
| 4. MATERIJAL I METODE   | 20  |
| 4.1. DIZAJN ISTRAŽIVANJA I UZORKOVANJE  | 20  |
| 4.2. PROTEOMSKE ANALIZE SERUMA I JETRENOG TKIVA                                       | 21  |
| 4.2.1. PRIPREMA UZORAKA ZA PROTEOMSKU ANALIZU   | 21  |
| 4.2.2. ANALIZA UZORAKA LC-MS/MS PRISTUPOM   | 22  |
| 4.2.3. STATISTIČKE I BIOINFORMATIČKE ANALIZE  | 24  |
| 4.2.4. VALIDACIJE ODABRANIH PROTEINA WESTERN BLOTOM                                   | 25  |
| 5. REZULTATI  | 26  |
| 5.1. REZULTATI PROTEOMSKE ANALIZE SERUMA JELENA OBIČNOG<br>PRIMJENOM TEHNIKA LC-MS/MS | 26  |
| 5.1.1. FUNKCIONALNA ANALIZA PROTEINA SERUMA JELENA OBIČNOG                            | 33  |
| 5.1.2. ANALIZA BIOLOŠKIH PUTEVA POVEZANIH S PROTEINIMA<br>SERUMA                      | 40  |
| 5.1.3. ANALIZA ZNAČAJNO OBOGAĆENIH BIOLOŠKIH PROCESA U SERUMU                         |     |
| 5.2. REZULTATI PROTEOMSKE ANALIZE JETRE JELENA OBIČNOG<br>PRIMJENOM TEHNIKA LC-MS/MS  | 44  |
| 5.2.1. FUNKCIONALNA ANALIZA PROTEINA JETRE JELENA OBIČNOG                             | 59  |
| 5.2.2. ANALIZA BIOLOŠKIH PUTEVA POVEZANIH S PROTEINIMA JETRE                          | 69  |
| 5.2.3. ANALIZA ZNAČAJNO OBOGAĆENIH BIOLOŠKIH PROCESA<br>U JETRI                       | 70  |
| 5.3. USPOREDBA PROTEOMA SERUMA I JETRE  | 72  |
| 5.4. VALIDACIJA POMOĆU WESTERN BLOTA  | 73  |
| 6. RASPRAVA   | 75  |
| 7. ZAKLJUČCI  | 85  |
| 8. LITERATURA   | 86  |
| 9. ŽIVOTOPIS  | 101 |

## 1. UVOD

Jelen obični je ekonomski i kulturološki gledano jedna od najznačajnijih vrsta divljih životinja i divljači, ne samo u Hrvatskoj, već i u svijetu. Sa znanstvenog stajališta, jelen obični je posebno zanimljiv u pogledu filogenetskih analiza i to osobito u pogledu lokalnih nestanaka pojedinih populacija, naseljavanja drugih jedinki s različitim genskim značajkama, ali i antropogenog utjecaja na izvorne populacije. Pored toga posebnu zanimljivost predstavlja potencijal ove divljači u lovnom turizmu, gdje "naša" populacija primarno na području istočne Hrvatske, Slavonije i Baranje, posjeduje iznimne trofejne potencijale i poslužila je čak za osnivanje farmskih uzgoja na području Novoga Zelanda. Upravo je farmski uzgoj drugo bitno područje proučavanja ove divljači i to primarno sa stajališta unaprjeđenja dobrobiti, ali i praćenja kvalitete mesa, uzgojnih performansi s dodatnim naglaskom na križanje različitih vrsta (posebice jelena običnoga i wapiti jelena) te mogućnosti smanjenja upotrebe anthelmintika kroz modifikacije pašnih sustava u smislu primjene korektivnih mjera i sjetve biljaka s antiparazitskim potencijalom. Ipak, možda i najveću zanimljivost za znanstvenike predstavlja ciklus rasta rogovlja. Naime, jelensko rogovlje je jedini organ sisavaca sposoban za potpunu regeneraciju, i to ne jednom, već svake godine ponovno. Čak i nije riječ isključivo o regeneraciji, već je rogovlje svake godine sve jače do trenutka kada jelen ulazi u vrhunac razvoja, odnosno postiže takozvanu lovnogospodarsku dob. Osim što je rogovlje jedini organ sisavaca sposoban za potpunu regeneraciju, ono je znanstvenicima zanimljivo i zbog brzine rasta. Stoga niti ne čudi kako je upravo najveći broj istraživanja na ovoj divljači vezan uz ciklus rasta rogovlja. Naravno, i sa stajališta invazijskih i parazitskih bolesti jelen predstavlja značajnu divljač, kako zbog pitanja zdravlja samih jelena, tako i zbog potencijalnog prijenosa bolesti u sučelju divljač – domaće životinje – ljudi.

Proteomika je definirana kao opsežna karakterizacija i analiza proteoma - cijelog seta proteina koji se nalaze u stanicama, tkivu ili organizmu. Osnovni metodološki pristup tijekom proteomske analize čini niz postupaka: izolacija proteina iz biološkog materijala, kvalitativna i/ili kvantitativna analiza proteomskog profila spektrometrijom masa, te bioinformatička analiza podataka. Napredovanjem molekularnih metoda razumljivo je i da proteomska istraživanja imaju sve veću primjenu u prethodno spomenutim istraživanjima jelena. Tako i u ovome dijelu najveći dio zauzimaju upravo istraživanja proteoma rogovlja, a slijede istraživanja bolesti i mesa. Kako bi se određena stanja mogla usporediti i prepoznati u odnosu na zdravi organizam, neophodno je istražiti zdravu populaciju koja će onda služiti kao temelj za daljnja istraživanja. Ovo je posebice od značaja ukoliko se ima na umu da je provedba

klasičnoga istraživanja na divljim životinjama uz postojanje kontrolnih i pokusnih (slučaj) skupina iznimno teško, poglavito kako je riječ o velikom životinjskom modelu. Upravo iz navedenoga razloga očekuje se da će ovo istraživanje ponuditi temelj za daljnja istraživanja u području proteomike jelena, gdje je karakterizacija proteoma seruma i jetre neophodna za razumijevanje bioloških procesa (i fizioloških i patoloških).

## 2. PREGLED DOSADAŠNJIH SPOZNAJA

### 2.1. JELEN OBIČNI (*Cervus elaphus* L.)

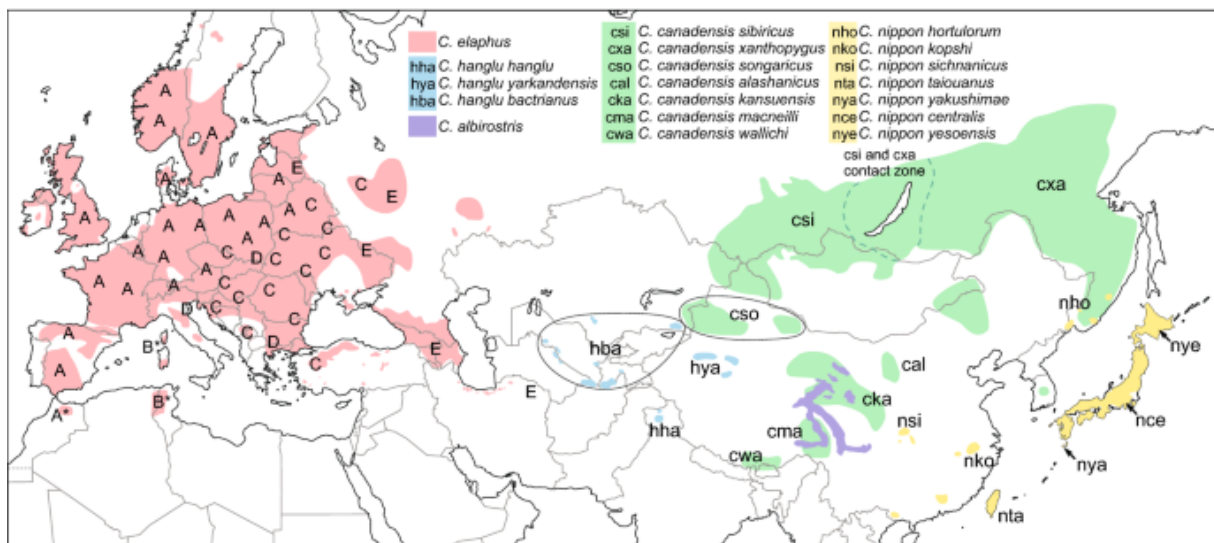
Jelen obični (*Cervus elaphus*) ili kako ga još u doslovnom prijevodu s engleskoga jezika nazivaju „crveni jelen“, (engl. *red deer*), prema znanstvenom razvrstavanju ubraja se u:

|           |                                      |
|-----------|--------------------------------------|
| Carstvo:  | Animalia (životinjsko)               |
| Koljeno:  | Chordata (kralješnjaci)              |
| Razred:   | Mammalia (sisavci)                   |
| Red:      | Artiodactyla (parnoprstaši, papkari) |
| Podred:   | Ruminantia (preživači)               |
| Porodica: | <i>Cervidae</i> (jeleni, punorošci)  |
| Rod:      | <i>Cervus</i> (jeleni)               |

Istraživanja na području molekularne biologije ukazuju na nešto drukčije razvrstavanje, pri čemu se jeleni ubrajaju u nadred Laurasiatheria, red Cetartiodactyla i porodicu *Cervidae* (HU i sur., 2012.). Ipak, unatoč svemu ovakva sistematika još nije opće prihvaćena. Dodatno, jeleni se mogu podijeliti na prave i neprave jelene, pri čemu od vrsta koje obitavaju u našem području jelen obični, jelen lopatar i jelen aksis ulaze u grupu pravih jelena, a srna obična u grupu nepravih (JANICKI i sur., 2007.). SCHOCH i sur. (2020.) jelene razvrstavaju u četiri podporodice: *Hydropotinae* (monotipična vrsta), *Capreolinae* (srne, bjelorepi jeleni, sob i los), *Muntinacinae* (muntjak), *Cervinae* (jelen axis, obični jelen, sika, lopatar,...).

CROITOR (2018.) navodi da se jelen u Europi pojavio u srednjem Pleistocenu, odnosno pred nekih 800 000 godina. Ti rani oblici su svrstani u paleopodvrstu *Cervus elaphus acoronatus*. Pored ove, poznato je još paleopodvrsta jelena, od kojih su neke iz razdoblja srednjeg Pleistocena na području današnje Italije (*Cervus elaphus rianensis*) te razdoblja kasnog Pleistocena na području današnje Sicilije (*Cervus elaphus siciliae*). Još od davnina jeleni su imali važnu ulogu u ljudskoj povijesti, ne samo kao hrana, već i kao motiv za umjetnost. Na takvim umjetničkim djelima ih nalazimo u brojnim europskim špiljama. Tako su primjerice na europskim prapovijesnim nalazištima nađeni crteži divovskog jelena

(*Megaloceros giganteus*), a starost nekih djela se procjenjuje na više od 30 000 godina (VALLADAS i sur., 2001.). Novijim istraživanjima utvrđeno je da se jeleni u Europi na temelju genskih značajki mogu u grubim crtama podijeliti u dvije linije, zapadnog jelena (elafoidni) i istočnog (maraloidni) (MACKIEWICZ i sur., 2022.). Prema njima, zapadnu liniju jelena možemo naći na području većeg dijela Europe, sjeverne Afrike i zapadnog dijela Azije. Istočna linija pak obitava u sjevernoj Americi i istočnom dijelu Azije. Istraživanjem mitohondrijske DNA, MACKIEWICZ i sur. (2022.) utvrdili su postojanje tri grozda sačinjena od haplogrupe A, B i C (Slika 1). Upravo haplogrupa C najvećim dijelom obitava na području Balkana. Ovo je najvjerojatnije posljedica prodora maraloidnog tipa jelena duž rijeke Dunav i međusobnog preklapanja područja rasprostranjenosti s elafoidnim tipom. Tvrdnje o utjecaju maraloidnog tipa mogu se dodatno pronaći u radovima iz razdoblja Holocena na području Srbije. Sve navedeno rezultiralo je prijedlogom nove podvrste u Dunavskom slivu nazvane *Cervus elaphus pannoniensis* (BANWELL, 1997.). Ipak, prirodne migracije jelena kao i antropogeni unos jedinki s ciljem poboljšanja trofejne i tjelesne strukture rezultirali su zasigurno miješanjem genskih značajki različitih podvrsta i za sada je teško govoriti o dodatnim podvrstama, odnosno puno teže o njihovom očuvanju do današnjeg vremena (MANOJLOVIĆ i sur., 2022.). Djelomičnu potvrdu današnjoj pomiješanosti jelenskih podvrsta daje i MARMAN (2021.) koji na adekvatnom uzorku rogovlja jelena iz panonskog i gorskog područja Hrvatske nije utvrdio statistički znakovite razlike u mjernim elementima prema CIC sustavu.



**Slika 1.** Raspodjela haplogrupa jelena običnoga u Europi (izvor: MACKIEWICZ i sur. (2022.)).

Tjelesno gledano, jelena običnog možemo svrstati među veće jelene, s obzirom da su od njega, unutar porodice, u Europi i sjevernoj Americi krupniji los (*Alces alces*), u sjevernoj Americi elk ili wapiti (*Cervus elaphus canadensis*) te u jugoistočnoj Aziji sambar (*Rusa unicolor*). Oblik tijela mu je skladan i mišićav (Slika 2). Grebenom nadvisuje križa. Noge su duge i snažne, prilagođene dugom trčanju i skokovima (JANICKI i sur., 2007.). Mužjaci narastu u duljinu (od vrha nosa do korijena repa) od 170 do 250 cm, u grebenu mogu biti visoki od 120 do 150 cm, a tjelesna masa im se kreće od 140 do 300 kg (JANICKI i sur., 2007.). Rep je dugačak 15 – 25 cm. Kako je u jelena izražen spolni dimorfizam, košute su tjelesno nježnije od mužjaka te narastu 160 – 210 cm u duljinu i obično teže od 90 do 140 kg. Jelen obični ima 34 trajna zuba, koji nasljeđuju 22 mliječna (HILLSON, 2005.). Trajni zubi u potpunosti zamijene mliječne u dobi od 30 do 34 mjeseca (WAGENKNECHT, 1984.). Zubna formula je: I 0/3, C 1(0)/1, P 3/3, M 3/3. Donji očnjak je inciziforman te ima izgled i funkciju sjekutića i vrlo često ga se s njima i mijenja. Gornji očnjaci nazivaju se biserci i predstavljaju lovačke ukrase, a mogu se naći samo u mužjaka (JANICKI i sur., 2007.).



**Slika 2.** Jelen obični u farmskom uzgoju, mužjaci s rastućim rogovljem u bastu. (foto: D. Konjević)

Boja dlake im je ljeti crvenkasta, a trbuh je bijelo žute boje. Zimska dlaka je gušća i duža, u pravilu tamnosmeđe do sivo smeđe boje (JANICKI i sur., 2007.). Ova boja varira u nijansi od staništa do staništa. Sedamdesetih godina prošloga stoljeća provedeno je više

istraživanja dlačnoga pokrova jelena u ovisnosti o dnevnom ciklusu i godišnjem dobu (RYDER i KAY, 1973.; KAY i RYDER, 1978.). Odrasli mužjaci na vratu imaju dužu dlaku koju nazivamo grivom, a daju vratu jelena masivniji izgled i razvijenija je što je jelen stariji. Košute nemaju grivu.

Jeleni imaju nekoliko mirisnih žlijezda, od kojih se ističe duboka udubina ispod očiju koju nazivamo suzište i imaju je oba spola, te mirisna žlijezda na korijenu repa jelena, odnosno na čelu košute. Na vanjskoj strani skočnog zgloba također se nalaze mirisne žlijezde. Jelene još nazivamo i punorošcima. Razlog tomu je činjenica da je glavna značajka ove porodice rogovlje koje je u potpunosti građeno kao kost. Rogovlje se nalazi na glavi mužjaka, osim u slučaju irvasa/karibua gdje i ženke imaju rogovlje, odnosno u ženki drugih vrsta u slučaju hormonalnih poremetnji i drugih poremećaja (JANICKI i sur., 2007.). Rogovlje prvenstveno služi za impresioniranje ženki, za potrebe borbi kojima se stječe pravo parenja, kao i za obranu harema od izazivača te za obranu od predatora. Rogovlje se pod utjecajem hormona odbacuje svake godine nakon sezone parenja, odnosno u jelena običnoga u pravilu tijekom veljače. Po odbacivanju, odmah počinje rasti novo rogovlje, da bi do doba parenja bilo potpuno razvijeno. Rogovi jelena su prava, puna kost, građena od spongioze i kompakte, a rastu iz koštanih izraslina na čelu koja nazivamo rožište. Dok rastu (i po 2,5 cm dnevno), rogovi su prekriveni kožom s kratkim i gustim dlakama (bast, čupa, velvet) koja služi prvenstveno kao zaštita rastućeg roga od vanjskih utjecaja, infekcija i invazija. Po dostizanju pune mase i veličine rogova počinje njihova mineralizacija pa odumiranjem vanjskog krvotoka dolazi i do odumiranja ove kože te ju životinja skida struganjem o raslinje (JANICKI i sur., 2007.). Porastom dobi jelena rogovlje postaje sve veće, bogatije parošcima, masivnije i teže, do dobi pune zrelosti što je prema starijoj literaturi u dobi oko 12 – 14 godina (DARABUŠ i JAKELIĆ, 2002.). Ovu dob nazivamo i lovnogospodarskom dobi. Nakon nje, masa rogovlja kao i tijela počinje opadati. Svaki dio roga ima svoj naziv pa tako glavnu os roga nazivamo granom, a proširenje grane roga uz samo rožište zovemo vijenac. Prvi parožak roga je nadočnjak, a odmah iznad njega je parožak ledenjak (DARABUŠ i JAKELIĆ, 2002.; JANICKI i sur., 2007.). Ledenjak nije obvezan parožak, a u prirodi se prvi puta pojavljuje u pravilu u dobi od pet godina. Iznad ledenjaka dolazi srednjak, a potom može i ne mora biti prisutan parožak vučjak (JANICKI i sur., 2007.). Na vrhu grane roga nalaze se parošci vrha roga. Njih može biti jedan (šiljak), dva (rašlja) ili tri i više (kruna).

Ponašanje i aktivnost jelena diktira dužina i intenzitet sunčeve svjetlosti (SIBBALD, 1994.; BERGER i sur., 2002.). Kada je dan kraći i sa slabijim sunčevim svjetlom, jeleni ostaju

dulje aktivni i danju, a za ljetnih dugih dana glavna aktivnost odvija se noću. Jaki socijalni nagon vidljiv je u načinu života košuta koje su u krdima cijelo vrijeme. To su krda sa teladi i mladim jelenima do 2 godine starosti. Mužjaci formiraju svoja krda koja su manja i slabije povezana, a jeleni u njima su raznodobni (DARABUŠ i JAKELIĆ, 2002.). Posve odrasli mužjaci najčešće žive samotnjačkim načinom života. Jeleni se pare u nizinama u kolovozu i rujnu, a u planinama u rujnu i listopadu (JANICKI i sur., 2007.). Mužjaci tada počinju pokazivati interes za ženke i natječu se za pravo parenja. Ovo razdoblje još nazivamo i „rikom“, zbog specifičnog načina glasanja mužjaka. Rika se najčešće čuje u ranu zoru i kasnije navečer. Jeleni mogu po dubini tona rike izazivača procijeniti dob i snagu potencijalnog protivnika te da li će se upuštati u nadmetanje ili ne. Prema lovačkim predajama moguće je razlikovati riku dominantnog mužjaka (bojovnika) od nedominantnog (nuzljuba) (DARABUŠ i JAKELIĆ, 2007.). Kada se izazivači približe, hodaju jedan kraj drugoga odmjeravajući veličinu rogovlja i ukoliko niti jedan ne odstupi doći će do stvarne borbe. Za vrijeme parenja, uslijed slabijeg hranjenja i velike aktivnosti oko održavanja harema mužjaci mogu izgubiti na masi i do 30 kg što predstavlja izazov za preživljavanje tijekom zime (JANICKI i sur., 2007.). Harem najčešće osvajaju i vode dominantni mužjaci u dobi od 8 do 10 godina. Mladi jeleni i oni stariji od 11 godina se u pravilu drže na periferiji većih harema tijekom cijele sezone parenja.

Košute dosegnu spolnu zrelost s dvije godine starosti. U drugoj jeseni života mogu ostati bređe, noseći jednoga, odnosno rjeđe dva mladunca. Period od začeca do teljenja traje 240 - 260 dana (JANICKI i sur., 2007.). Prije teljenja košuta se odvaja od krda i teli najčešće jedno tele prosječne mase oko 15 kg, te se za otprilike dva tjedna vraća u krdo (WARD i TOWEILL, 1982.). Telad se rađa s pjegama, što je zajedničko svim jelenima, a te pjege se izgube do kraja ljeta (GEIST, 1998.). Jelen u zatočeništvu živi preko 20 godina, a u prirodi u pravilu od 10 do 12 godina. U staništima s manje grabežljivaca mogu doživjeti i više od 15 godina.

Jeleni se mogu prilagoditi malom staništu, ali su sezonske migracije ipak znatno češći oblik ponašanja. Tako jeleni, poglavito mužjaci, imaju jaki nagon migriranja u druga područja, posebice tijekom sezone parenja (horizontalne migracije), dok je u gorskim staništima izrazita potreba za migriranjem ljeti u više, a zimi u niže predjele (vertikalna migracija) (JANICKI i sur., 2007.). U višim predjelima je stanište bogatije travom odnosno boljom hranom koja im je potrebna za zahtjevno razdoblje teljenja i othrane teladi. Nekada su migrirali uz velike rijeke, a danas te migracije izgledaju znatno drukčije, dobrim dijelom uslijed svakodnevnih promjena u staništu i njegove fragmentacije, zbog izgradnje prometnica, ograda i naselja, a posebice u



posljednje vrijeme gradnjom ograda s ciljem sprječavanja kretanja migranata (TROUWBORST i sur., 2016.; POKORNY i sur., 2017.). Danas je jelen obični rasprostranjen u cijeloj Europi. Živi u šumskim predjelima oko velikih vodotoka i močvara pa sve do planina. Može ga se naći od Portugala i Španjolske na zapadu pa sve do Kaspijskog jezera na istoku, odnosno, od Norveške, Irske i Škotske na sjeveru pa do Bugarske i čak Male Azije na jugoistoku. Pored toga, europskog jelena ima i u predjelima sjeverozapadne Afrike u gorju Atlas (engl. *barbary deer*) (ZACHOS i HARTL, 2011.).

Europski jelen je tijekom vremena unesen u Australiju, Novi Zeland, SAD, Kanadu, Peru, Argentinu, Čile i Urugvaj. Prema IUCN-u, u Argentini i Čileu je imao potencijalno nepovoljan utjecaj na autohtonog južnoandskog jelena (*Hippocamelus bisulcus*). Ovo ipak nije u potpunosti razjašnjeno do danas (FLUECK, 2010.). Na Novom Zelandu je u razdoblju od 1927. do 1975. odstranjivan uz novčanu nagradu na državnoj zemlji po odluci državne šumarske službe, s obzirom da je dugo vremena smatran štetnom vrstom (FIGGINS i HOLLAND, 2012.). U zapisima je navedeno da je u tom periodu odstrinjeno 1.124,297 jelena, a kao dokaz za isplatu je bilo dovoljno dostaviti samo rep.

U Hrvatskoj jelen obični je rasprostranjen po gotovo cijeloj zemlji s izuzetkom otoka i dijela priobalnog područja. Uglavnom nastanjuje staništa oko rijeka Drave, Save i Dunava (Baranja i Slavonija), u brdsko planinskim područjima Gorskog kotara i Like, a u posljednje vrijeme zbog određenih promjena u lovištima, kao i vjerojatno dijelom zbog ograda prema susjednim državama (prvenstveno Mađarskoj), jelena se viđa sve češće i tamo gdje nekada nije obitavao. Mnogi čimbenici danas diktiraju način gospodarenja jelenom na nekom području, no najvažniji motivi su uglavnom sukobljeni. S jedne strane je želja za smanjenjem šteta na poljoprivrednim usjevima i šumskim sastojinama, dok se s druge strane nalazi potreba lovnog gospodarenja s ciljem očuvanja, pa i povećanja broja jedinki na određenom području. Upravo zbog toga, a i s ciljem što boljeg gospodarenja jelenom nastale su i smjernice uzgoja jelena u Hrvatskoj (GRUBEŠIĆ, 2006.). Važnost jelena za regionalno gospodarstvo kroz lovni turizam i zdravlje domaćih životinja, zbog potencijalnog križanja puteva s pašno držanim domaćim životinjama, potaknula je istraživanje kako bi se odredili temeljni mehanizmi kontrole zdravlja bilo u smislu genetskih analiza, fiziologije i/ili sklonosti zaraznim i invazijskim bolestima. Isto tako, treba uzeti u obzir da subjekti koji imaju koristi od jelena kao prirodnog resursa u vidu turizma bilo koje naravi (lovnog ili izletničko-estetskog) te iskorištavanju mesa, ne moraju osjetiti štetne učinke njihove nazočnosti u staništu (Slika 3). Antropogeni utjecaj na uzgoj jelena očituje se kroz držanje životinja u ograđenom prostoru, selekcijski odstrjel, redukcijski

ili regulacijski odstrjel sa svrhom smanjenja brojnosti i održavanja spolnog omjera, kao i unos jedinki u zavičajne populacije zbog poboljšanja kvalitete trofeja. Takva aktivnost uvelike je utjecala na promjenu genskog materijala i proteinsku ekspresiju u jelenskoj populaciji (GYLLENSTEN i sur., 1983.; HARTL i sur., 2003.). Na temelju molekularnih istraživanja uzoraka tkiva (krv, jetra), dokazane su promjene genoma na razini mikro- i makroregije (KOLLARS i sur., 2004.; RADKO i sur., 2014.).



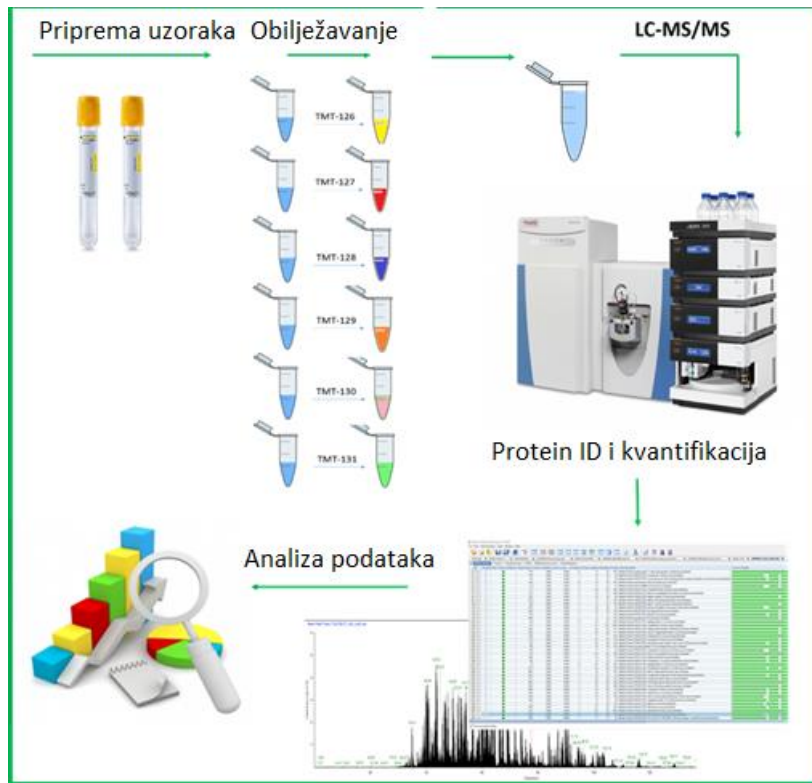
**Slika 3.** Jelen obični u farmskom uzgoju, u prvom planu košute, a u drugom odjeljku jelen. (foto: D. Konjević)

## **2.2. ISTRAŽIVANJE PROTEOMA I RAZVOJ PROTEOMIKE**

Poznato je da su proteini nositelji svih životnih funkcija unutar organizma i da imaju neizmjerljivo važnu ulogu u orkestriranju bioloških procesa kako bi se odredio fenotip stanice i organizma. Pojedini proteini mogu samostalno obavljati funkcije u živim stanicama ili mogu kroz interakcije stvarati strukture višeg reda i/ili mreže koje djeluju sinergijski unutar složenog sustava. Struktura i funkcija proteina mijenjaju se post-translacijskim modifikacijama, interakcijama protein-protein, njihovim položajem u stanici, te kao posljedica sinteze i

razgradnje napredovanjem bioloških procesa, poput proliferacije, migracije ili razvoja stanica. Kako bi se razumio temeljni mehanizam fizioloških procesa, ključno je identificirati i kvantificirati proteine i njihove interakcije unutar ovih dinamičkih sustava (AEBERSOLD i MANN, 2003.).

Izraz „proteomika“ se prvi put spominje 1995. godine, a definiran je kao opsežna karakterizacija i analiza ekspresije gena i cijelog seta proteina koji se nalaze u stanicama, tkivu ili organizmu pod nazivom proteom (WASINGER i sur., 1995.). Proteomika se razvila zahvaljujući bazama podataka sekvenci DNA i proteina, naprecima u metodama separacije proteina i području spektrometrije masa te razvitku računalnih algoritama za pretraživanje baza podataka (GRAVES i HAYSTEAD, 2002.). Cilj proteomike nije isključivo identifikacija svih proteina u stanici, nego i prikaz njihove međusobne povezanosti. Za razliku od genoma koji ostaje konzerviran tijekom cijelog života, proteom je dinamičan i složen sustav podložan kvalitativnim i kvantitativnim promjenama. Zbog toga, proučavanje proteoma postaje neophodno za razumijevanje bioloških sustava i njihovog funkcioniranja. S obzirom na složenost istraživanja, u ovim analizama potrebna su znanja iz molekularne biologije, biokemije i bioinformatike. Osnovna razlika između proteomike i klasičnih molekularnih metoda analize proteina je u tome što se proteomika temelji na globalnoj analizi svih proteina unutar sustava odjednom, a ne na analizi pojedinačnih proteina, te na mogućnosti proučavanja složenih međudjelovanja velikog broja proteina. Upravo su nove metode spektrometrije masa zaslužne za brzu identifikaciju proteina u analiziranom uzorku. Spektrometrija masa (engl. *mass spectrometry*, MS) je analitička metoda koja pruža informacije o masi peptida ili fragmentima istih temeljem omjera mase i naboja, a time se, uz pomoć proteinskih i nukleotidnih baza podataka, može identificirati protein (GRAVES i HAYSTEAD, 2002.; APWEILER i sur., 2004.). Također, pomoću ove metode mogu se odrediti mjesto i vrsta proteinskih modifikacija. Kvalitativnom analizom proteina određuje se primarni slijed aminokiselina nekog proteina na temelju kojeg je moguće odrediti gen koji kodira informaciju za sintezu tog proteina, a postupkom kvantitativne analize određuje se zastupljenost pojedinog proteina. Osnovni metodološki pristup tijekom proteomske analize čini niz postupaka: izolacija proteina iz biološkog materijala, kvalitativna i/ili kvantitativna analiza proteomskog profila spektrometrijom masa, te bioinformatička analiza podataka (BODZON-KULAKOWSKA i sur., 2007.; YATES i sur., 2009.) (Slika 4).



**Slika 4.** Primjer hodograma proteomskog istraživanja (slika: J. Kuleš).

Analiza kompletnog proteoma višestaničnih organizama zahtjevan je zadatak. Sa sve većim stupnjem genske složenosti, životinje dobivaju širi repertoar mogućnosti za suočavanje s izazovima koje donosi okoliš. Proteomska istraživanja u veterinarskoj medicini još uvijek zaostaju za proteomikom u humanoj medicini i u modelnih organizama, međutim sve je više istraživanja kod domaćih životinja i kućnih ljubimaca (BILIĆ i sur., 2018.). Stanice sisavaca sadrže stotine i tisuće različitih proteina s predviđenim dinamičkim rasponom do deset redova veličine, što zahtijeva ciljane analitičke strategije za detaljnu analizu proteoma. Proteomski profil specifičnog tkiva i/ili tjelesne tekućine omogućuje usporedbu između različitih tipova stanica i molekularni opis organa i njegovih specifičnih funkcija.

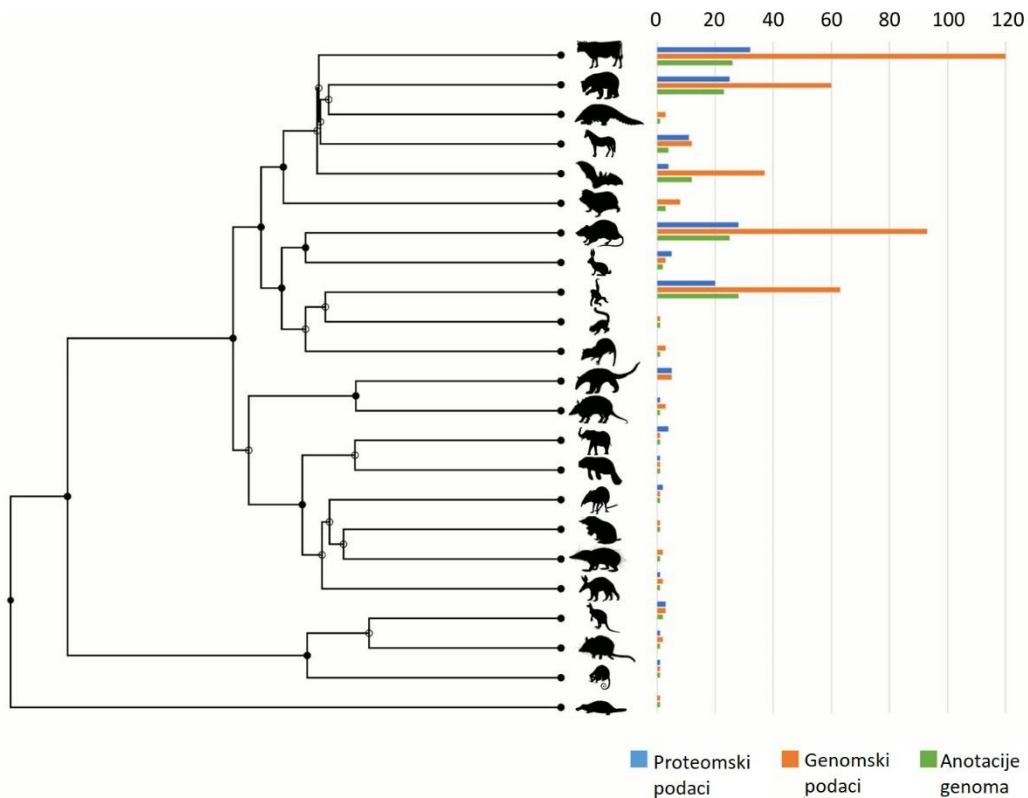
Razumijevanje bioloških procesa u organizmu predstavlja temelj za sva daljnja proučavanja odnosa u zdravom organizmu u pogledu uzgojnih i selekcijskih mjera, ali i prepoznavanje i istraživanje bolesnih stanja. Razvojem modernih tehnologija poput genomike i proteomike, otvoren je put za primjenu složenih istraživanja uz minimalno korištenje modelnih organizama (HECK i NEELY, 2020.). Prema GOLDSTEIN i sur. (2016.) te RUSSEL i sur. (2017.), unatoč činjenici da su upravo modelne vrste poput primjerice manjih vrsta riba, laboratorijskih miševa i štakora, gujavica i sl. bili predvodnici istraživanja zbog lakog uzgoja, brzog obrta generacija i standardiziranih molekularnih metoda, danas je za

očekivati da će moderna znanost pomaknuti granice istraživanja i na ne-modelne vrste. Upravo spomenuta proteomika nudi potencijalno olakšavanje provedbe takvih studija i njihovo ubrzavanje, u različitim poljima znanosti, od veterinarske medicine, poljoprivrede, sigurnosti namirnica i zdravlja. Takav pristup omogućava provedbu istraživanja i na drugim vrstama koje se uobičajeno ne svrstavaju u modelne vrste, a koje omogućavaju stjecanje spoznaja o brojnim temeljnim procesima u organizmu koji se pojavljuju prirodno tijekom čitavog evolucijskog razdoblja, a koji su primjenjivi i na ljude, poput primjerice genskih poremećaja ili novotvorenina (STENVINKEL i sur., 2018., 2020.). Jedan od takvih primjera je svakako i jelensko rogovlje koje potencijalno ima odgovore na pitanja regeneracije organa (LI i sur., 2014.; DONG i sur. 2020.). Sukladno tome, iako su modelni organizmi iznimno značajni, ne-modelni organizmi pružaju brojne druge mogućnosti, čak i izravno primjenjivije u budućim aplikativnim istraživanjima. Jedan od takvih primjera jest i još prisutni slučaj bolesti COVID-19 koji je posebno naglasio mogućnosti primjene ne-modelnih vrsta u istraživanju zoonoza (LI, 2013.; BECKER i sur., 2022.). Prema pojedinim autorima, upravo su istraživanja odnosa proteina na primjeru interakcije domaćin-uzročnik bolesti postavila temelje za razumijevanje nekih bolesti, odnosno obrambenih sposobnosti organizma (BATRA i sur., 2018.; SHAH i sur., 2018.).

Naravno da se za razliku od modelnih vrsta, proteomika u istraživanju ne-modelnih vrsta još uvijek susreće s brojnim poteškoćama od kojih u prvi plan dolazi dostupnost podataka u postojećim bazama (Slika 5). Sukladno tome, i dobiveni podaci mogu biti više ili manje iskoristivi. Kako bi se premostio postojeći problem, jedna od mogućnosti je i konvertiranje rezultata prema vrsti koja je već korištena kao model, za što se obično primjenjuje program BLAST. I u takvim slučajevima obično sam program nije dostatan, već je potrebno detaljno analizirati dobivene rezultate s obzirom na potencijalne brojne sličnosti među različitim proteinima. Nakon ovakve konverzije moguća je provedba daljnje bioinformatičke analize ili analize signalnih putova, što će omogućiti donošenje potencijalnih zaključaka i samim time provedbu smislenih istraživanja.

Analizom proteomskih podataka dobivamo listu gena koje možemo povezati s molekularnim i biološkim putevima te funkcionalnim kategorijama kao što je genska ontologija (GO, engl. *gene ontology*) (GE i sur., 2020). Genska ontologija je zapravo katalogizacija određenog gena, a pojmovi se dijele u tri ontologije koje predstavljaju različite biološke aspekte: molekularna funkcija (MF, engl. *molecular function*), biološki proces (BP, engl. *biological proces*) i stanična komponenta (CC, engl. *cellular component*). Analiza

bioloških puteva povezanim s proteomom sustavno povezuje proteine s molekularnim funkcijama, te je prvi izbor za dobivanje uvida u temeljne međuodnose identificiranih proteina. Baze poput Reactome-a i KEGG-a služe kao arhiva opisa bioloških procesa, ali i alati za otkrivanje novih funkcionalnih odnosa u istraživanim proteomskim podacima (GILLESPIE i sur., 2021.).



**Slika 5.** Distribucija sisavaca s dostupnim setovima proteomskih i genomskih podataka prema javno dostupnim bazama (PRIDE, GenBank i RefSeq iz 2020. godine). Odozgo prema gore prikazani su: parnoprsti kopitari, mesožderi, pangolini, neparnoprsti kopitari, šišmiši, kukcojedi, glodavci, zečevi, primati, leteći lemuri, rovkve, mravojedi i ljenjivci, armadilos, slonovi, morske krave i dugoni, slonove rovkve, zlatne krtice, tenreci, aardvarkovi, tobolčari biljojedi, torbari mesojedi, oposumi i sisavci koji polažu jaja (izvor: HECK i NEELY, 2020).

S obzirom na sve navedeno moguće je postaviti pitanje zbog čega bi uopće trebalo primjenjivati proteomiku u ne-modelnih vrsta. Odgovor je jednostavan, naime, proteomika pruža bolji uvid u pojedine dijelove biologije organizma, s obzirom da zastupljenost proteina primjerice ne mora nužno odgovarati transkripciji i zastupljenosti gena (FOSS i sur., 2007.; LIU i sur., 2016; SALOVSKA i sur., 2020.). Proteomika može nadalje vrlo dobro poslužiti u razumijevanju fenotipa, kao i proteoma bioloških tekućina. U njima primjerice glasnička RNA nije nužno povezana s proteomom biološke tekućine, već je prije u svezi s pripadajućim

organima i potencijalnim patološkim stanjima. Druga bitna stavka je i činjenica kako dinamika proteina tijekom života nije jednaka, kao niti njihov obrtaj, interakcije, lokalizacija i slično (KELMER SACRAMENTO i sur., 2020.). Nadalje, proteomika pruža uvid u količine funkcionalno značajnih endogenih proteina i njihovih oblika (ZHENG i sur., 2012.; BOSCHIERO i sur., 2020.).

Sukladno svemu navedenome, sasvim je logično kako će istraživanje proteomike na primjeru ne-modelnih vrsta zasigurno imati sve veću primjenu u budućnosti, ali za to treba prvo zadovoljiti pojedine prethodno navedene korake. U tome je od posebnoga značaja i suradnja između stručnjaka u području proteomike sa stručnjacima prvenstveno iz područja biomedicinskih, prirodnih i biotehničkih znanosti.

### **2.3. PROTEOMSKA ISTRAŽIVANJA U JELENA**

Cilj proteomike je identifikacija i kvantifikacija te određivanje strukture i funkcije svih proteina u organizmu. Tome se još može pridodati i procjena promjene tih značajki u prostoru, vremenu i fiziološkom statusu istraživanog organizma, odnosno jedinke. Istraživanja proteoma seruma domaćih životinja podosta zaostaje za potpuno mapiranim proteomom ljudskog seruma zbog nepotpune karakterizacije životinjskog genoma i nedostatnih podataka o funkcijama gena (CECILIANI i sur., 2014.). Stoga se u takvim istraživanjima često koriste genomi i proteomi dostupnih, srodnih modelnih vrsta.

S obzirom na značaj goveda u stočarskoj proizvodnji razumljivo je i da je upravo ova vrsta poslužila kao pokretač za čitav spektar istraživanja vezanih uz zdravlje, fiziologiju, proizvodnost i druge značajke farmskih životinja (ROY, 1990.). Sukladno tome, TALAMO i sur. (2003.) su izradili bazu proteina goveda na temelju dvodimenzionalne elektroforeze, koja može poslužiti u identifikaciji promjena na nivou proteina uslijed upalnih stanja, bolesti ili za potrebe drugih analiza vezanih uz uzgoj i proizvodnju. Pored toga, prema TALAMO i sur. (2003.) ovakve referentne baze podataka trebaju omogućiti procjene intenziteta nastalih promjena. BISLEV i sur. (2012.) su analizirali proteom mlijeka i mliječne žlijezde goveda. Identificirali su 1921 protein i 8559 peptida. Na temelju rezultata istraživanja formirali su PeptideAtlas internet sučelje koje omogućava analizu zdravlja mliječne žlijezde, proizvodnje

mlijeka, usporedbe individualnih proteina i peptida, mapiranje genoma i slično. U istraživanju objavljenom 2002. godine, WAIT i sur. (2002.) su izradili referentnu mapu proteina u serumu goveda primjenom proteomike. S obzirom na nekoliko problema tijekom istraživanja WAIT i sur. (2002.) ističu primjenjivost programa FASTS koji omogućava istodobno pretraživanje fragmenata koji nisu dostatno dugi za identifikaciju u programu BLAST.

Neki od primjera primjene proteomike u goveda uključuju istraživanja raznih zaraznih i parazitskih bolesti. Ipak, treba imati na umu da se u početku proteomski pristup na uzorcima seruma ili plazme domaćih životinja primjenjivao prvenstveno zbog istraživanja same dobrobiti životinja, ali ne treba zanemariti i potrebu za smanjenjem potencijalnog negativnog utjecaja životinja i proizvoda životinjskoga podrijetla na ljudsko zdravlje, što je opet rezultiralo koristima u oba smjera. Naime, proučavanjem životinjskog proteoma poboljšana je klinička dijagnostika i praćenje bolesti domaćih životinja, ali i ljudi, a samim time i uspješnost liječenja (DOHERTY i sur., 2008.). Izraz „dobrobit životinja“ podrazumijeva fizičku i psihičku dobrobit životinja. Procjena se, za većinu domaćih životinja, temelji na testovima ponašanja i mjerenjima markera stresa kao što je u većini slučajeva do sada bio kortizol (i jedno i drugo je lako izvesti ili izmjeriti, jedino je u posljednje vrijeme poznato kako kortizol nije isključivi i u potpunosti prikladan pokazatelj stresa), no paneli biomarkera koji bi bili u stanju povezati svako stanje stresa sa životinjskim fizičkim i psihičkim stanjem bili bi korisniji jer bi osigurali širu sliku kroz praćenje stresnih stanja povezanih s načinom držanja i uzgojem životinja. Pretpostavka je da farme s neprimjerenim uvjetima držanja mliječnih ili tovnih goveda stalno stimuliraju stresno stanje koje mijenja hipofizno-nadbubrežnu aktivnost, a time se mijenja ponašanje jedinki, rasplodna sposobnost i na kraju kvaliteta proizvoda koji se koriste za ljudsku hranu (DI GIROLAMO i sur., 2014.).

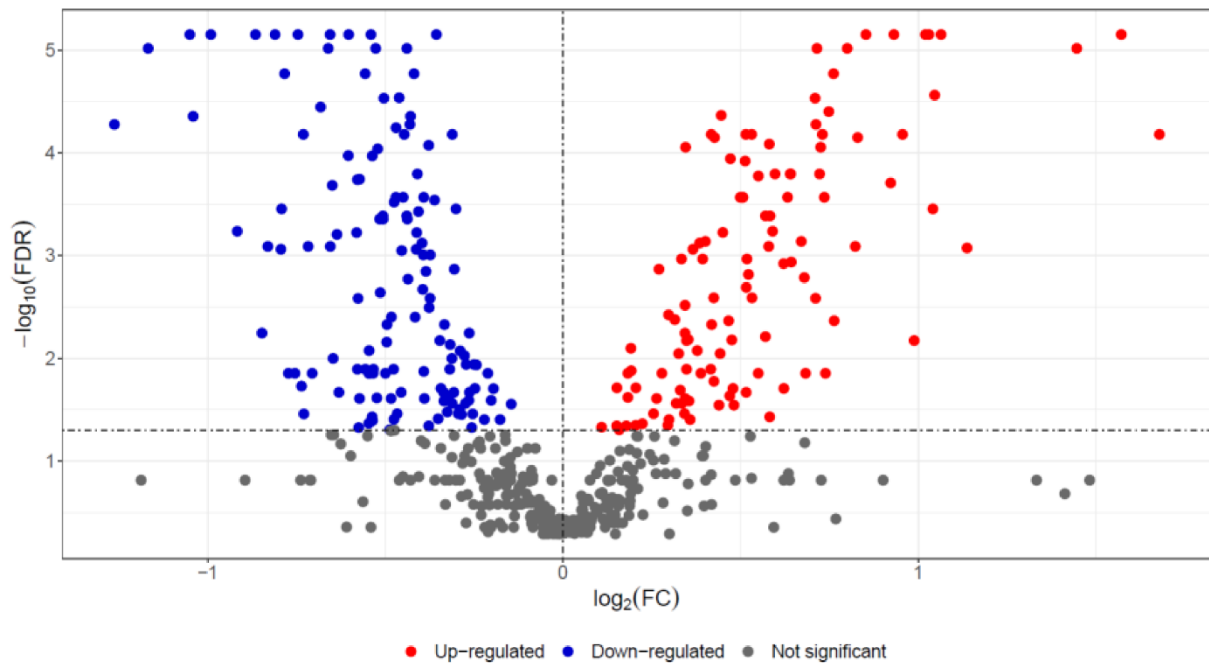
U dosadašnjim istraživanjima proveden je relativno mali broj proteomskih studija na jelenskim tkivima, koje su uglavnom usmjerene na proučavanje razvoja rogovlja i kvalitete mesa. Analizom proteoma mišića jelena dokazani su biomarkeri za određivanje kvalitete mesa (LÓPEZ-PEDROUSO i sur., 2019.). Autori su proveli kvantitativnu proteomsku analizu postupkom podatkovno ovisne akvizicije na 12 uzoraka mesa različite mekoće. Nakon bioinformatičke analize, pokazali su značajne razlike u proteomu mišića, te je za pet (IVD, LAMB1, MYL3, SDHC i SDHA), odnosno šest proteina (FABP4, IVD, LAMB1, MYL3, CRYZ i SERPINB6) utvrđeno da su u snažnoj korelaciji s mekoćom mesa, odnosno količinom mišićne masti u mesu jelena. Najčešći predmet proteomskih istraživanja do sada su bili jelenski rogovi, s ciljem određivanja njihovog regeneracijskog potencijala kao i uloge matičnih stanica



u tom procesu (DONG, 2020.) te uloge čimbenika okoliša u njihovom rastu i razvoju (PARK i sur., 2004.). Naime, jelensko rogovlje je jedini organ sisavaca sposoban za potpunu regeneraciju svake godine, odnosno čak i dva puta godišnje u slučaju Davidovog jelena (*Elaphurus davidianus*). Iako poznat od davnina, ciklus rasta rogovlja oduvijek zaokuplja pozornost velikog broja znanstvenika, ali isto tako i dalje sadrži čitav niz nepoznanica na koje tek treba odgovoriti (KIERDORF i sur., 2007.). Tako su, PARK i sur. (2004.) izradili mapu proteoma jelenskih rogova koristeći dvodimenzionalnu elektroforezu, spektrometriju masa uz matricom pomognutu ionizaciju te desorpciju laserskim zračenjem (engl. *Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization*, MALDI). Analizirano je oko 800 proteinskih spotova i identificirano 130 proteina u rogovima, čiji se proteomski profil razlikovao od ostalih tkiva, ukazujući pretežito na proteine staničnog rasta te proteine povezane sa signalizacijom. Nešto kasnije, GAO i sur. (2010.) su pomoću tekućinske kromatografije visoke učinkovitosti spregnute s tandemskom spektrometrijom masa (engl. *high-performance liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry*, RPLC-ESI-MS/MS) ustanovili čak 416 različitih proteina u rogovlju, a koji su uključeni u različite metaboličke procese, rast, okoštavanje, reakciju na podražaj i sl. Pored toga, relativno rano, FRANCO i sur. (2013.) daju pregledni članak na temu primjene proteomike u istraživanju regeneracije, gdje u jednom od poglavlja spominju i regeneraciju jelenskog rogovlja. SU i sur. (2019.) su primjenom proteomike analizirali razlike u regeneraciji rogovlja između jelena običnoga i sika jelena (*Cervus nippon*). Utvrdili su kako je 36 proteina izrazito izraženo u rogovlju jelena običnoga, dok je njih 144 izraženo u rogovlju sika jelena. LÓPEZ-PEDRUOSO i sur. (2021.) su primjenom proteomike istraživali dva različita dijela rastućeg roga, vrh i središnji dio, koristeći rebra kao kontrolu. Utvrdili su 259 različitih proteina uglavnom povezanih uz antioksidativne procese i Wnt signalni put. S obzirom na narav rasta rogovlja, visoku razinu mijene tvari, kao i posljedični viši rizik od oksidativnog stresa, sasvim je razumljivo da su antioksidativni mehanizmi izrazito dobro razvijeni u rastućem rogovlju te da predstavljaju ključni čimbenik u regeneraciji rogovlja. Također, autori zaključuju i kako dobiveni rezultati mogu biti od koristi za ljudsko zdravlje. CHEN i sur. (2022.) su analizirali proteom i transkriptom hrskavice rastućeg rogovlja Gansu jelena (*Cervus elaphus kansuensis*). Od velikog broja identificiranih gena valja istaknuti da su utvrdili da je gen 13546 zajedno s proteinom rna13546 kojega kodira uključen u Wnt signalni put, te stoga vrlo vjerojatno imaju ulogu u brzini rasta rogovlja. Druga studija primijenila je stabilno izotopsko obilježavanje aminokiselinama u staničnoj kulturi (engl. *stable isotope labeling by amino acids in cell culture*, SILAC) za kvantitativnu proteomsku analizu i usporedbu periostealnih stanica rogova

i periostealnih stanica kostiju lica (SUI i sur., 2020.). Proteomska analiza pokazala je da su proteini sa značajno većom zastupljenošću u periostealnim stanicama rogova uključeni u staničnu proliferaciju, angiogenezu i neurogenezu, pružajući nove uvide u temeljni mehanizam formacije rogova i regeneracije. WANG i sur. (2017.) su pomoću MALDI-TOF-MS spektrometrije masa analizirali razlike između rogovlja tijekom 65. i 75. dana rasta. Pri tome su identificirali 65 proteina povezanih s formiranjem kostiju i angiogenezom, antioksidacijskim stresom, imunskim odgovorom i apoptozom. Utvrđeni proteini imaju ulogu u brojnim funkcijama u rogovlju, uključujući rast rogovlja, metaboličke procese, aktivaciju trombocita, KEGG i PI3K-Akt puteve. Prema WANG i sur. (2017.), rezultati njihove studije ukazuju na značajnu ulogu TTR, RBP4 i CRABP1 u rastu rogovlja između 65. i 75. dana ciklusa rasta. Osim njih, značajnu ulogu u razvoju živaca i sprječavanju upale imaju i GMF $\beta$  i CATHL1. Konačno, utvrdili su povezanost PRDX2, TXNDC5, ERP29, Pdia6 s antioksidativnim stresom i endoplazmatskim retikulumom. S druge strane, kako je rogovlje u bastu jedan od važnijih sastojaka korištenih u tradicionalnoj medicini Dalekoga istoka (SUI i sur., 2014.), jedan dio istraživanja proteoma rogovlja usmjeren je i u ovome pravcu (XUE i sur., 2022.). Tako TANG i sur. (2020.) u svome radu daju pregled primjene proteomike u istraživanju tradicionalne kineske medicine temeljene na proizvodima životinjskog podrijetla. Nešto kasnije XUE i sur. (2022.) su utvrdili ukupno 19 peptidnih markera neophodnih za identifikaciju sedam vrsta jelena od kojih su dobiveni preparati rogovlja u bastu, europskog losa, irvasa, bjelorepana, Toroldovog jelena (*Przewalskium albirostris*), jelena lopatara, sika jelena i jelena običnoga. Također su utvrdili i kako je u slučaju HBBA gena sika, običnoga i wapiti jelena uzgajanih u Kini vidljivo značajno genetsko skretanje. U novije vrijeme ŠIMONJI i sur. (2022.) analizirali su promjene u proteomu jetara jelena običnoga nakon invazije velikim američkim metiljem (*Fascioloides magna*) na uzorku od 25 jetara, od čega je 12 jetara činilo negativnu skupinu, a 13 jetara invadiranu. U tom istraživanju utvrđeno je 234 proteina s različitom zastupljenošću među kontrolnom i pokusnom skupinom (Slika 6). Rezultati istraživanja prema autorima ukazuju na činjenicu da je invazija ovim metiljem povezana s promjenama u metabolizmu masnih kiselina, oksidativnom stresu i fibrozi (ŠIMONJI i sur., 2022.). SOUZA i sur. (2022.) su istraživali razlike u proteomu između malih/srednjih i velikih folikula jajnika južnoameričkog smeđeg jelena (*Mazama gouazoubira*). Pri tome su identificirali ukupno 226 proteina, od kojih je njih 113 bilo zajedničko objema grupama folikula dok ih je 53, odnosno 60 bilo specifično za svaku skupinu. Rezultati istraživanja doprinijeli su poznavanju razvoja folikula te mogu imati primjenu u uzgoju embrija ove vrste. Identificirani proteini su uključeni u procese vezanja proteina, katalitičke aktivnosti, formiranja

izvanvanstaničnog matriksa i slično. S obzirom na sve navedeno treba istaknuti kako u dostupnoj znanstvenoj literaturi nema podataka o proteomu seruma i jetre jelena običnog.



**Slika 6.** Prikaz različite zastupljenosti proteina između kontrolne skupine i skupine invadirane metiljem *F. magna*, nakon FDR korekcije p-vrijednosti. (izvor: ŠIMONJI i sur., 2022.). Crvene točkice predstavljaju proteine s značajno većom relativnom zastupljenošću u invadiranoj skupini u odnosu na kontrolnu skupinu, a plave s značajno manjom zastupljenošću.

### 3. PRETPOSTAVKA I CILJEVI ISTRAŽIVANJA

Pretpostavka istraživanja je da će primjena proteomskog pristupa uz pomoć spektrometrije masa visoke preciznosti i osjetljivosti omogućiti izradu i analizu proteomskog profila seruma i jetre u zdravoj populaciji jelena običnog. Pretpostavka je da će u serumu prevladavati proteini koji sudjeluju u imunološkom odgovoru zbog specifičnosti vrste i životnih uvjeta; dok će u jetri prevladavati proteini s metaboličkom ulogom.

Temeljni ciljevi istraživanja su:

- a) provesti kvalitativnu i semi-kvantitativnu analizu proteina seruma i jetre jelena običnog (*Cervus elaphus*)
- b) analizirati proteine seruma i jetre bioinformatičkim metodama (funkcionalna analiza i skupna klasifikacija identificiranih proteina uz pomoć proteomske/genomske baze podataka)
- c) provesti usporedbu proteoma seruma i jetre

## 4. MATERIJAL I METODE

### 4.1. DIZAJN ISTRAŽIVANJA I UZORKOVANJE

Istraživanje je dizajnirano na primjeru presječne studije gdje je veličina uzorka izračunata na principu meta-analize literaturnih podataka pomoću on-line dostupnih statističkih kalkulatora (RUXTON i COLEGRAVE, 2016.). Pretražena je baza podataka za govedo (*Bos taurus*), koji predstavlja model preživača koji je najrodniji jelenu od svih vrsta s dobro istraženim i uređenim bazama gena. Podatci su analizirani pomoću QuickGO web-alata, te je odabran „biološki proces“ kao aspekt genske ontologije za procjenu zastupljenosti gena/proteina imunskog odgovora i metaboličkih procesa (BINNS i sur., 2009.). Obradeni podaci su zatim analizirani pomoću on-line dostupnoga alata za izračun veličine uzorka (Sample Size Calculator, <https://clincalc.com/stats/samplesize.aspx>). Za procjenu potrebnog broja uzoraka jetre jelena običnog, odabrana je uobičajena razina statističke snage testa u biomedicinskim istraživanjima od 80% uz vjerovatnost statističke pogreške (dozvoljena preciznost) tipa I od 0,05; na temelju pojavnosti proteina s metaboličkim funkcijama (11%, temeljeno na top 100 bioloških procesa genske ontologije) i procijenjene pojavnosti u ispitivanoj skupini (33%). Na temelju navedenih podataka izračunato je da je potreban broj uzoraka u ovom istraživanju 21. Slično tome, za određivanje broja potrebnih uzoraka seruma, na temelju prevalencije proteina koji sudjeluju u imunskom odgovoru (16%) i procijenjene prevalencije u ispitivanoj skupini (38%), dobivena je potrebna veličina uzorka od 26 uzoraka seruma, uz statističku snagu testa od 80% i vjerovatnost statističke pogreške tipa I od 0,05. Kako bi se smanjila mogućnost pogreške uzorkovavane su samo odrasle jedinke ženskoga spola. Ovo ujedno ukazuje na stratificirano nasumično uzorkovanje.

Zdravstveni status jelena procijenjen je na temelju vanjskog izgleda, gojnog stanja, izgleda dlačnog pokrova i ponašanja jedinke prije samog odstrjela, a nakon odstrjela na temelju prisutnosti eventualnih vidljivih rana, iscjetka iz prirodnih otvora te po otvaranju jedinke na temelju makroskopskog izgleda organa. U daljnje istraživanje uključene su samo jedinke koje su prema navedenim kriterijima proglašene zdravima.

Ukupno je za potrebe ovoga istraživanja uzorkovano 26 uzoraka seruma i 22 uzorka tkiva jetre košuta jelena običnoga u dobi od dvije godine ili više. S obzirom na brze procese grušanja krvi i hemolizu kao neželjeni proces u istraživanju, uzorci krvi i jetara jelena običnoga prikupljeni su odmah nakon odstrjela, odnosno u najkraćem mogućem vremenskom roku po

odstrjelu. Uzorci krvi uzeti su iz velikih vratnih vena i/ili srca injekcijskom brizgalicom, koristeći pri tome za svaku jedinku novu iglu i brizgalicu. Nakon zgrušavanja, krv je centrifugirana izravno na terenu pomoću prijenosne centrifuge (Hettich, EBA 20, Merck KGaA, Darmstadt, Njemačka). Nakon centrifugiranja serum je odvojen u Eppendorf epruvete, koje su označene i pohranjene na -80 °C do analize. Uzorci jetara prikupljeni su tijekom odrobljavanja životinja. Svaka jetra je izrezana na otprilike dva centimetra debele isječke i temeljito obostrano pregledana na eventualne znakove prisutnosti metilja *Fascioloides magna* ili *Fasciola hepatica*. Za daljnju analizu su uzorkovana tkiva samo onih jetara u kojima nisu uočeni znakovi invazije. Tako prikupljeni uzorci tkiva označeni su i pohranjeni na -80 °C do izvođenja daljnjih analiza.

Istraživanje je provedeno u okviru projekta Hrvatske zaklade za znanost IP 8963 "Interakcija nositelj-parazit: odnos tri različita nositelja prema invaziji metiljem *Fascioloides magna*". Povjerenstvo za etiku u veterinarstvu odobrilo je istraživanje na 22. redovitoj sjednici održanoj 18. rujna 2018. godine (Klasa: 640-01118-17/60, Ur. broj: 251-61-44-18-02).

## **4.2. PROTEOMSKE ANALIZE SERUMA I JETRENOG TKIVA**

### **4.2.1. PRIPREMA UZORAKA ZA PROTEOMSKU ANALIZU**

Proteomska analiza seruma i tkiva provedena je semi-kvantitativnim proteomskim pristupom pomoću izobarnih privjesaka koji omogućavaju multipleksiranje – istovremenu analizu šest uzoraka (KULEŠ i sur., 2021.). Za određivanje koncentracije ukupnih proteina u uzorcima seruma korišten je test bicinoninske kiseline (engl. *BCA assay*) (Thermo Scientific, Rockford, SAD). Iz svakog uzorka uzet je volumen koji odgovara 35 µg proteina i dopunjen do 50 µl s 0.1 M trietilamonijevim bikarbonatom (TEAB, Thermo Scientific, Rockford, SAD). Uzorci su potom reducirani dodatkom 2.5 µl 200 mM ditiotreitola (60 min, 55 °C) (DTT, Sigma Aldrich, St. Louis, MO, SAD), alkilirani dodatkom 2.5 µl 375 mM jodoacetamida (30 min, na sobnoj temperaturi u mraku) (IAA, Sigma Aldrich, St. Lois, MO, SAD), te taloženi acetonom (300 µl, na 4 °C, preko noći). Nakon centrifugiranja (9000 x g, 4 °C), proteini u talogu se otapaju u 50 µl TEAB-a, te razgrađuju dodatkom 1 µl tripsina (1 mg/mL, Promega, Madison, SAD; inkubacija na 37 °C preko noći). Reagensi s izobarnim privjescima (engl. *Tandem Mass Tag 6plex*, TMT, Thermo Scientific, Rockford, IL, SAD) pripremljeni su prema uputama proizvođača. U svaki uzorak dodano je 19 µl specifičnog privjeska (60 min, na sobnoj temperaturi), a reakcija obilježavanja je zaustavljena dodatkom 8 µl 5% hidrosilamina

(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD). Pet nasumično odabranih obilježenih uzoraka spojeno je s unutarnjim standardom (pool svih uzoraka koji služi za normalizaciju) u jedan uzorak, osušen pomoću vakuum centrifuge te analiziran uz pomoć vezanog sustava tekućinske kromatografije i tandemne spektrometrije masa (engl. *liquid chromatography with tandem mass spectrometry*, LC-MS/MS).

Uzorci tkiva jetre (oko 100 mg) homogenizirani su u 300 µl pufera za lizu (2% natrijev dodecil sulfat u 0.1 M TEAB-u) pomoću Omni TH220 homogenizatora (Omni International, Kennesaw, SAD), zatim sonicirani na ledu (2 ciklusa maksimalne amplitude, 10 s; Qsonica, Newtown, SAD), te centrifugirani (16 000 x g, 4 °C, 20 min). Supernatant je odvojen i premješten u nove tubice i u njemu je određena koncentracija ukupnih proteina pomoću BCA testa. Uzorci su potom pročišćeni pomoću FASP (engl. *Filter-Aided Sample Preparation*) metode komercijalno dostupnim kolonama za ultrafiltraciju (WISNIEWSKI i sur., 2009.). Iz svakog uzorka volumen koji odgovara 35 µg proteina dopunjen je do 200 µl urea puferom (8 M urea u 0.1 M Tris –HCl-u, pH = 8.5), te prenesen na 10 kDa filtere (Microcon YM-10, Merck Millipore). Nakon centrifugiranja (13 000 x g, 20 min, 20 °C) i ponovnog ispiranja urea puferom, proteini su alkilirani (50 mM jodoacetamid, 20 min na sobnoj temperaturi u mraku), dva puta isprani urea puferom, te dva puta pomoću 100 µl TEAB-a. Digestija na filteru provedena je dodatkom tripsina (1 mg/mL, inkubacija na 37 °C preko noći). Idući dan, peptidi su eluirani dodatkom 50 µl TEAB/acetonnitrila (1:1, v/v). Obilježavanje peptida TMT-om provedeno je na isti način kao i za uzorke seruma.

#### **4.2.2. ANALIZA UZORAKA LC-MS/MS PRISTUPOM**

Uzorci obilježeni TMT-om analizirani su pomoću vezanog sustava tekućinske kromatografije i tandemne spektrometrije masa visoke rezolucije postupkom podatkovno ovisne akvizicije (DDA, engl. *Data Dependent Acquisition*), kao što je prethodno opisano u dostupnoj literaturi (HORVATIĆ i sur., 2019.).

LC-MS/MS analiza TMT-om obilježenih peptida provedena je korištenjem Dionex UltiMate 3000 RSLCnano sustava (Thermo Fisher Scientific, Gemering, Njemačka) spregnutog sa spektrometrom masa Q Exactive Plus s hibridnim analizatorom masa kvadrupola i Orbitrapa (Thermo Fisher Scientific, Bremen, Njemačka). Pokretna faza A sastojala se od 0,1% mravlje kiseline u vodi, a pokretna faza B bila je 0,1% mravlja kiselina u 80%-om acetonitrilu (Honeywell, Charlotte, NC, SAD). Peptidi su otopljeni u puferu za nanošenje

uzoraka (2% acetonitril, 0,1% mravlja kiselina) i nanaseni na predkolonu (C18 PepMap100, 5  $\mu\text{m}$ , 100A, 300  $\mu\text{m}\times 5\text{ mm}$ ), prije odjeljivanja na analitičkoj koloni (PepMap™ RSLC C18, 50  $\text{cm}\times 75\ \mu\text{m}$ ). Kromatografski uvjeti gradijentnog eluiranja prikazani su u Tablici 1. Protok pokretne faze bio je 0,3  $\mu\text{L}/\text{min}$ , a ukupno vrijeme analize 155 minuta.

**Tablica 1.** Kromatografski uvjeti gradijentnog eluiranja korištenog za razdvajanje peptida LC-MS/MS pristupom. A – pokretna faza A (0,1% mravlja kiselina u vodi). B – pokretna faza B (0,1% mravlja kiselina u 80%-om acetonitrilu).

| Vrijeme zadržavanja / min | A ( $\varphi$ / %) | B ( $\varphi$ / %) |
|---------------------------|--------------------|--------------------|
| 0                         | 95,0               | 5,0                |
| 12                        | 95,0               | 5,0                |
| 132                       | 45,0               | 55                 |
| 133                       | 5,0                | 95                 |
| 135                       | 5,0                | 95                 |
| 136                       | 95,0               | 5,0                |
| 155                       | 95,0               | 5,0                |

Ionizacija elektroraspršenjem je postignuta korištenjem nanoraspršenja Flex izvora iona (Thermo Fisher Scientific, Bremen, Njemačka), koji sadrži emiter SilicaTip (New Objective) unutarnjeg promjera 10  $\mu\text{m}$ . Spektrometrija masa je provedena u pozitivnom načinu rada spektrometra masa koristeći metodu podatkovno ovisne akvizicije DDA Top8. Napon ionskog izvora za MS je bio + 2.00 kV, a temperatura kapilare za prijenos iona 275 °C. Spektar masa snimljen je u rasponu od 350,0  $m/z$  do 1800,0  $m/z$  pri razlučljivosti od 70 000, vremenu injektiranja od 120 ms, AGC vrijednošću  $1\times 10^6$ , izolacijskom prozoru od  $\pm 2,0\ \text{Da}$  i dinamičkom isključenju od 30 s. Fragmentacija HCD provedena je pri normaliziranoj energiji sudara (NCE) (29% i 35%) s razlučivanjem od 17 500 i ciljnom vrijednošću AGC-a od  $2\times 10^5$ . Ioni prekursori neodređenog naboja, kao i oni s nabojem +1 i više od +7 bili su isključeni iz daljnjeg odabira fragmentacije.



Za identifikaciju i relativnu kvantifikaciju proteina korišten je SEQUEST algoritam unutar računalnog programa Proteome Discoverer (verzija 2.3., Thermo Fisher Scientific). Provedena je pretraga baze podataka *Cervus elaphus* preuzete s UniprotKB 5. srpnja 2022. godine, koja je sadržavala 19 262 unosa, prema sljedećim parametrima: dozvoljena dva promašena mjesta cijepanja tripsinom, tolerancija pogreške izmjerene mase prekursora i fragmenata od 10 ppm i 0,05 Da, karbomidometil (C) kao fiksna modifikacija peptida, oksidacija (M) i TMT 6-pleks (K, peptidni N-kraj) kao dinamičke modifikacije peptida. Postotak krivih očitavanja (engl. *false discovery rate*, FDR) prilikom identifikacije peptida izračunat je putem Percolator algoritma unutar računalnog programa Proteome Discoverer. Proteini s najmanje dva jedinstvena peptida i 1 % FDR smatrani su pouzdano identificiranima te su korišteni u daljnjim analizama.

#### 4.2.3. STATISTIČKE I BIOINFORMATIČKE ANALIZE

Proteini koji su bili prisutni u najmanje 50% uzoraka uključeni su u daljnju statističku analizu. Budući da većina identificiranih proteina nije pratila normalnu distribuciju (kako je utvrđeno Shapiro-Wilkovim testom), relativna zastupljenost proteina prikazana je kao medijan i interkvartilni raspon (1. i 3. kvartila).

Za bioinformatičku analizu, jedinstvena oznaka proteina prvo je pretvorena u službeni simbol gena pomoću alata za mapiranje UniProtKB ID (THE UNIPROT CONSORTIUM 2020). Proteini za koje nije bila dostupna oznaka gena za *Cervus elaphus* ili su bili navedeni kao “nekarakterizirani protein” zamijenjeni su, gdje je bilo primjenjivo, pomoću alata UniProt BLAST s najbližim podudarnim ortologom iz baze *Bos taurus* (najmanje 70% podudarnosti). Funkcionalna analiza genske ontologije (za biološki process, staničnu lokalizaciju i molekularnu funkciju) i Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) analiza bioloških puteva provedena je pomoću alata ShinyGO (GE i sur., 2019.). Svi dobiveni pojmovi imali su  $FDR < 0,05$ , gdje je nominalna P vrijednost dobivena na temelju hipergeometrijskog testa.

Analiza bioloških puteva povezanih s proteomom seruma i jetre jelena običnog napravljena je pomoću alata Reactome koristeći humani genom kao pozadinu i putevi s  $FDR < 0,05$  izdvojeni su kao značajni (GILLESPIE i sur., 2021.).

Faktor obogaćenja (engl. *fold enrichment*) definiran je kao omjer identificiranih gena koji pripadaju određenom pojmu GO i ukupnog broja gena u pozadini (u našem slučaju svi

kodirajući geni za *Bos taurus*). Kao mjera veličine učinka, faktor obogaćenja nam tako ukazuje na značajno obogaćene (“*overrepresented*”) pojmove.

Vennov dijagram za prikaz raspodjele proteina između seruma i jetre napravljen je pomoću on-line alata (<https://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/Venn/>). Hijerarhijsko grupiranje za usporedbu relativne zastupljenosti istih proteina u serumu i jetri, prikazano je u obliku toplinske mape (engl. *heat map*), gdje su uzorci i proteini rangirani prema relativnoj zastupljenosti s euklidskom mjerom udaljenosti i Wardovim algoritmom za grupiranje.

#### 4.2.4. VALIDACIJE ODABRANIH PROTEINA WESTERN BLOTOM

Za validaciju dobivenih rezultata, korištena je Western blot metoda. Korišteni uzorci (supernatanti tkiva jetre) su razrijeđeni na način da su sadržavali ukupno 25 µg proteina u 5 µl dH<sub>2</sub>O. Uzorci su zagrijani 8 minuta na 95 °C uz dodatak 4,75 µl Laemmli pufera i 0,25 µl beta-merkaptoetanolu te nakon zagrijavanja su nanešeni u Mini-Protean® TGX™ poliakrilamidski gel (4-15%) (Bio-Rad, Hercules, USA). Osim uzoraka, u prvu jažicu gela je nanesen i kemiluminiscentni marker vidljiv na 700 nm (LI-COR WesternSure® Pre-stained Chemiluminescent Protein Ladder). Nakon SDS-PAGE elektroforeze (5 min na 50 V, zatim 70 min na 120 V), proteini su transferirani na nitroceluloznu membranu pomoću Trans-Blot Turbo Transfer sustava (Bio-Rad, Hercules, USA) koristeći trominutni program za Mini-Protean® TGX™ gelove. Membrana je zatim obojena Ponceau S bojom za proteine, kako bi bila provjerena uspješnost transfera, te snimana na Odyssey Fc uređaju (LI-COR, Bad Homburg, Germany) koristeći 600 nm kanal. Nakon snimanja, membrana je isprana 3 x 5 min u fosfatnom puferu (PBS) te blokirana bloking puferom (10x, Abcam, Cambridge, UK) 1h na sobnoj temperaturi. Nakon blokiranja, membrana je inkubirana primarnim protutijelom (za transferin: anti-transferin protutijelo konjugirano s peroksidazom hrena (engl. *horseradish peroxidase*, HRP) (Antibodies-online GmbH, Germany, ABIN288479) u koncentraciji 1:10 000; za alfa aktinin: anti-alfa aktinin 4 protutijelo, (Antibodies-online GmbH, Germany, ABIN2775288) u koncentraciji 1:1000) na 4 °C preko noći. Po završenoj inkubaciji, membrane su isprane 3 x 5 min TBST puferom. Membrana inkubirana s anti-alfa aktinin protutijelom je inkubirana s odgovarajućim sekundarnim protutijelom, konjugiranim s HRP-om (goat anti-chicken IgY h&L (HRP) (Abcam, UK, ab97135)), 1h na sobnoj temperaturi. Nakon inkubacije sekundarnim protutijelom, membrana je isprana 3 x 5 min TBST puferom. Kod membrane inkubirane anti-transferin primarnim protutijelom nije bilo potrebe za inkubacijom sekundarnim protutijelom

jer je već primarno protutijelo konjugirano HRP-om. Ciljani protein je vizualiziran primjenom kemiluminiscentnog supstrata (Radiance Plus, Azure Biosystems, USA) na membranu i snimanjem na Odyssey Fc uređaju (LI-COR, Bad Homburg, Germany) koristeći 700 nm i „chemi“ kanal. Rezultati su obrađeni u ImageJ softveru gdje se, kao kontrola punjenja jažica i količine ukupnih proteina, koristila snimka s kanala 600 nm (Ponceau S boja) i s kojom se u omjer stavila jačina signala proteina od interesa dobivenog na kanalu „chemi“.

## 5. REZULTATI

### 5.1. REZULTATI PROTEOMSKE ANALIZE SERUMA JELENA OBIČNOG PRIMJENOM TEHNIKA LC-MS/MS

Proteomskim pristupom temeljenim na obilježavanju TMT-om, analizirano je 26 uzoraka seruma klinički zdravih jelena. Analiza prikupljenih podataka u Proteome Discovereru pokazala je da je ukupno identificirano 234 proteina s pomoću najmanje dva jedinstvena peptida i uz 1% FDR. U daljnju statističku i bioinformatičku obradu uključeni su samo proteini koji su bili prisutni u najmanje 50% uzoraka. Time je ukupan broj identificiranih i kvantificiranih proteina u serumu bio 87. U Tablici 2 prikazan je identifikacijski broj proteina (engl. *accession ID*) iz baze UniProt, oznaka gena, naziv proteina, broj jedinstvenih peptida, te vrijednosti medijana, prve i treće kvartile relativne zastupljenosti za proteine seruma jelena običnog.

**Tablica 2.** Popis proteina identificiranih i kvantificiranih pomoću LC-MS/MS pristupa u serumu jelena običnog. Prikazana je jedinstvena oznaka proteina (iz baze UniProt), oznaka gena za *Cervus elaphus*, oznaka gena za *Bos taurus* (dobivena BLAST analizom), broj identificiranih jedinstvenih peptida, a zastupljenost pojedinog proteina prikazana je kao medijan i interkvartilni raspon (Q1 – Q3) u arbitrarnim (proizvoljnim) jedinicama.

| Jedinstvena oznaka proteina | Oznaka gena ( <i>Cervus elaphus</i> ) | Oznaka gena ( <i>Bos taurus</i> ) | Naziv proteina                               | Broj jedinstvenih peptida | Medijan | Q1    | Q3    |
|-----------------------------|---------------------------------------|-----------------------------------|--|---------------------------|---------|-------|-------|
| A0A212D3W3                  | Celaphus_00015077                     | FN1                               | Fibronektin                                  | 38                        | 1,108   | 0,965 | 1,181 |
| A0A212D5P0                  | Celaphus_00017423                     | ALB                               | Albumin                                      | 37                        | 1,113   | 1,066 | 1,160 |
| A0A212CVI7                  | Celaphus_00005334                     | APOB                              | Apolipoprotein B                             | 33                        | 1,077   | 0,977 | 1,133 |
| A0A212D2K0                  | Celaphus_00003265                     | C3                                | Komponenta komplementa C3                    | 32                        | 1,038   | 0,975 | 1,088 |
| A0A212DD04                  | Celaphus_00004945                     | A1BG                              | Alfa-1-B glikoprotein                        | 18                        | 0,935   | 0,843 | 1,052 |
| A0A212C7P2                  | Celaphus_00019151                     | PLG                               | Plazminogen                                  | 15                        | 0,981   | 0,952 | 1,010 |
| A0A212D4I5                  | Celaphus_00014436                     | CFB                               | Komplement faktor B                          | 14                        | 1,018   | 0,955 | 1,083 |
| A0A212D7B8                  | Celaphus_00001373                     | AOC3                              | Amino oksidaza                               | 11                        | 0,996   | 0,910 | 1,086 |
| A0A212D8R5                  | Celaphus_00000057                     | SERPIND1                          | Serpin D1                                    | 11                        | 1,129   | 0,988 | 1,250 |
| A0A212CMB3                  | Celaphus_00017128                     |                                   | Nekarakterizirani protein                    | 11                        | 0,882   | 0,775 | 0,945 |
| A0A212CD20                  | Celaphus_00013976                     | LOC506828                         | Alfa-2-makroglobulin                         | 11                        | 1,021   | 0,955 | 1,100 |
| A0A212D1V5                  | Celaphus_00003155                     | LOC528040                         | Komponenta komplementa C3                    | 10                        | 0,973   | 0,916 | 1,031 |
| A0A212DHP9                  | Celaphus_00008946                     | APOA1                             | Apolipoprotein A1                            | 10                        | 1,153   | 1,012 | 1,279 |
| A0A212CDE1                  | Celaphus_00013978                     | LOC506828                         | Nekarakterizirani protein                    | 10                        | 1,111   | 1,006 | 1,215 |
| A0A212CQC9                  | Celaphus_00010787                     | CFH                               | Komplement faktor H                          | 9                         | 1,056   | 0,973 | 1,168 |
| A0A212CJ19                  | Celaphus_00013026                     | CP                                | Ceruloplazmin                                | 9                         | 0,986   | 0,884 | 1,113 |
| A0A212CGS2                  | Celaphus_00002058                     | ECM1                              | Protein izvanstaničnog matriksa 1            | 9                         | 1,038   | 0,849 | 1,124 |
| A0A212C922                  | Celaphus_00010455                     | ITIH1                             | Inhibitor inter-alfa-tripsina, teški lanac 1 | 9                         | 1,056   | 1,030 | 1,100 |
| A0A212DAA2                  | Celaphus_00000577                     | FGA                               | Fibrinogen, alfa lanac                       | 8                         | 0,509   | 0,411 | 0,574 |
| A0A212D931                  | Celaphus_00000755                     | VTN                               | Vitronektin                                  | 8                         | 1,066   | 0,973 | 1,125 |
| A0A212D7J2                  | Celaphus_00000576                     | FGB                               | Fibrinogen, beta lanac                       | 8                         | 0,402   | 0,293 | 0,526 |
| A0A212CC12                  | Celaphus_00007451                     | ITIH2                             | Inhibitor inter-alfa-tripsina, teški lanac 2 | 8                         | 1,096   | 1,023 | 1,124 |

| Jedinstvena oznaka proteina | Oznaka gena ( <i>Cervus elaphus</i> ) | Oznaka gena ( <i>Bos taurus</i> ) | Naziv proteina   | Broj jedinstvenih peptida | Medijan | Q1    | Q3    |
|-----------------------------|---------------------------------------|-----------------------------------|--|---------------------------|---------|-------|-------|
| A0A212D686                  | Celaphus_00017425                     | AFM                               | Afamin   | 7                         | 0,989   | 0,928 | 1,088 |
| A0A212CEU4                  | Celaphus_00002492                     | C8B                               | Komponenta komplementa C8B   | 7                         | 0,979   | 0,889 | 1,090 |
| A0A212CMY9                  | Celaphus_00017124                     |                                   | Nekarakterizirani protein  | 7                         | 1,139   | 1,007 | 1,289 |
| A0A212DII4                  | Celaphus_00008943                     | APOA4                             | Apolipoprotein A4  | 7                         | 1,042   | 0,923 | 1,183 |
| A0A212CWU9                  | Celaphus_00005010                     | C8G                               | Komponenta komplementa C8G   | 7                         | 1,060   | 0,910 | 1,140 |
| A0A212D1P2                  | Celaphus_00003051                     | PGLYRP2                           | Protein za prepoznavanje peptidoglikana 2 *                                | 6                         | 0,949   | 0,782 | 1,100 |
| A0A212CIP3                  | Celaphus_00012935                     | TF                                | Transferin   | 6                         | 1,100   | 0,998 | 1,194 |
| A0A212D6R3                  | Celaphus_00001296                     | KRT10                             | Keratin 10   | 6                         | 1,228   | 0,820 | 1,631 |
| A0A220IGB1                  |                                       | HBB                               | Hemoglobin, beta lanac   | 6                         | 0,490   | 0,347 | 0,721 |
| B6D985                      | HP                                    | HP                                | Haptoglobin  | 6                         | 0,394   | 0,296 | 0,721 |
| A0A212CJ25                  | Celaphus_00012585                     | KNG1                              | Bradikinin   | 5                         | 1,047   | 1,006 | 1,121 |
| A0A212CN16                  | Celaphus_00016878                     | GSN                               | Gelsolin   | 5                         | 1,046   | 0,977 | 1,221 |
| A0A212D5R7                  | Celaphus_00017405                     | JCHAIN                            | Imunoglobulin J  | 5                         | 1,091   | 0,963 | 1,204 |
| A0A212CZ15                  | Celaphus_00006764                     | IGFALS                            | Protein koji veže faktor rasta sličan inzulinu, kiselo labilna podjedinica | 5                         | 1,008   | 0,893 | 1,123 |
| A0A212DB05                  | Celaphus_00000976                     | SHBG                              | Globulin koji veže spolne hormone  | 5                         | 0,964   | 0,923 | 1,063 |
| A0A212DA24                  | Celaphus_00001321                     | KRT14                             | Keratin 14 *   | 5                         | 1,460   | 0,981 | 2,741 |
| A0A212CIM7                  | Celaphus_00012584                     | HRG                               | Histidinom bogat glikoprotein  | 5                         | 1,033   | 0,859 | 1,173 |
| A0A212CS37                  | Celaphus_00015504                     | SERPINA1                          | Protein koji sadrži serpin-sličnu domenu                                   | 5                         | 1,031   | 0,935 | 1,194 |
| A0A212DB90                  | Celaphus_00000095                     | F1MLW7                            | Protein koji sadrži Ig-sličnu domenu                                       | 5                         | 0,919   | 0,872 | 0,966 |
| A0A212CQN3                  | Celaphus_00011133                     | SERPINC1                          | Serpin C1  | 5                         | 1,005   | 0,961 | 1,070 |
| A0A212CSZ1                  | Celaphus_00015509                     | SERPINA5                          | Serpin A5  | 4                         | 1,020   | 0,889 | 1,173 |
| A0A212DHZ3                  | Celaphus_00009140                     | HPX                               | Hemopeksin   | 4                         | 0,966   | 0,863 | 1,066 |
| A0A212D8U5                  | Celaphus_00000839                     | SERPINF1                          | Serpin F1  | 4                         | 1,028   | 0,978 | 1,103 |
| A0A212CIC4                  | Celaphus_00012582                     | FETUB                             | Fetuin B   | 4                         | 1,169   | 1,002 | 1,373 |
| A0A212C9J5                  | Celaphus_00010453                     | ITIH3                             | Inhibitor inter-alfa-tripsina, teški lanac 3                               | 4                         | 1,044   | 0,955 | 1,115 |
| A0A212D8V0                  | Celaphus_00000578                     | FGG                               | Fibrinogen, gama lanac   | 4                         | 0,516   | 0,423 | 0,637 |
| A0A212CD10                  | Celaphus_00013938                     | C1S                               | Komponenta komplementa C1R   | 4                         | 0,856   | 0,816 | 0,965 |
| A0A212CZT5                  | Celaphus_00007280                     | AZGP1                             | Alfa-2-glikoprotein 1  | 4                         | 1,039   | 0,785 | 1,134 |

| Jedinstvena oznaka proteina | Oznaka gena ( <i>Cervus elaphus</i> ) | Oznaka gena ( <i>Bos taurus</i> ) | Naziv proteina  | Broj jedinstvenih peptida | Medijan | Q1    | Q3    |
|-----------------------------|---------------------------------------|-----------------------------------|---|---------------------------|---------|-------|-------|
| A0A212CDZ6                  | Celaphus_00013939                     | C1R                               | Komponenta komplementa C1r  | 4                         | 0,982   | 0,862 | 1,039 |
| A0A212C8K5                  | Celaphus_00018032                     | C7                                | Komponenta komplementa C7   | 3                         | 1,020   | 0,963 | 1,069 |
| A0A212D384                  | Celaphus_00014758                     | C1QC                              | Komponenta komplementa C1q, C lanac                               | 3                         | 1,005   | 0,963 | 1,047 |
| A0A212CSM1                  | Celaphus_00015503                     | SERPINA10                         | Seroiin A-10  | 3                         | 1,138   | 1,085 | 1,197 |
| A0A212D2U0                  | Celaphus_00003481                     | F12                               | Koagulacijski faktor XII  | 3                         | 0,900   | 0,764 | 1,013 |
| A0A212C826                  | Celaphus_00018030                     | C6                                | Komponenta komplementa 6  | 3                         | 0,926   | 0,652 | 1,108 |
| A0A212CN42                  | Celaphus_00016906                     | AMBp                              | Alfa-1-mikroglobulin  | 3                         | 0,968   | 0,912 | 1,027 |
| P02191                      | MB                                    | MB                                | Mioglobin   | 3                         | 0,643   | 0,589 | 0,723 |
| A0A212C307                  | Celaphus_00019268                     | KLKB1                             | Kalikrein   | 3                         | 0,945   | 0,872 | 1,317 |
| A0A212CQ82                  | Celaphus_00008486                     | RBP4                              | Retinol-vezajući protein  | 3                         | 1,143   | 1,011 | 1,286 |
| A0A212CA18                  | Celaphus_00010625                     | CLEC3B                            | Član obitelji lektinske domene C-tipa 3 B                         | 3                         | 1,071   | 0,977 | 1,177 |
| A0A212CNC6                  | Celaphus_00016902                     | ORM1                              | Alfa-1-kiseli glikoprotein  | 3                         | 0,788   | 0,668 | 0,833 |
| A0A212CJH6                  | Celaphus_00012933                     | LOC525947                         | Protein koji sadrži domenu sličnu transferinu                     | 3                         | 1,061   | 0,984 | 1,141 |
| A0A212CLX2                  | Celaphus_00018518                     | CFI                               | Komplement faktor I   | 3                         | 0,895   | 0,833 | 0,954 |
| A0A212D467                  | Celaphus_00014759                     | C1QB                              | Komponenta komplementa C1q, beta lanac                            | 3                         | 1,007   | 0,910 | 1,058 |
| A0A212CJ59                  | Celaphus_00012932                     | TF                                | Transferin (fragment)*  | 3                         | 1,015   | 0,902 | 1,074 |
| A0A212CJF4                  | Celaphus_00012588                     | ADIPOQ                            | Adiponektin   | 3                         | 0,796   | 0,691 | 0,904 |
| A0A212CG89                  | Celaphus_00002493                     | C8A                               | Komponenta komplementa 8A   | 3                         | 1,045   | 0,978 | 1,164 |
| Q30352                      |                                       | BoLA                              | Glavni kompleks histokompatibilnosti (MHC) klasa I alel Ceel*03 * | 3                         | 0,880   | 0,758 | 1,126 |
| A0A212C846                  | Celaphus_00018042                     | C9                                | Komponenta komplementa 9  | 3                         | 1,070   | 1,009 | 1,198 |
| A0A212CI11                  | Celaphus_00012581                     | AHSG                              | Alfa-2-HS-glikoprotein  | 3                         | 1,004   | 0,892 | 1,137 |
| A0A212CQV1                  | Celaphus_00010776                     | C4BPA                             | Komponenta komplementa 4 vezujući protein alfa                    | 2                         | 1,069   | 0,908 | 1,142 |
| A0A212CUK9                  | Celaphus_00006415                     | ACTC1                             | Alfa aktin*   | 2                         | 0,696   | 0,637 | 0,936 |
| A0A212CVQ4                  | Celaphus_00005540                     |                                   | Nekarakterizirani protein   | 2                         | 0,848   | 0,538 | 1,044 |
| A0A212C8U9                  | Celaphus_00010456                     | ITIH1                             | Inhibitor inter-alfa-tripsina, teški lanac 1                      | 2                         | 1,165   | 1,041 | 1,240 |
| A0A212CSU9                  | Celaphus_00015517                     | SERPINA3-6                        | Serpin A3-6   | 2                         | 1,025   | 0,882 | 1,184 |
| A0A212DB97                  | Celaphus_00000838                     | SERPINF2                          | Serpin F2   | 2                         | 1,056   | 1,017 | 1,155 |
| A0A212CQ10                  | Celaphus_00010786                     | CFH                               | Komplement faktor H   | 2                         | 1,153   | 0,989 | 1,246 |

| <b>Jedinstvena oznaka proteina</b> | <b>Oznaka gena (<i>Cervus elaphus</i>)</b> | <b>Oznaka gena (<i>Bos taurus</i>)</b> | <b>Naziv proteina</b>                    | <b>Broj jedinstvenih peptida</b> | <b>Medijan</b> | <b>Q1</b> | <b>Q3</b> |
|------------------------------------|--|--|--|----------------------------------|----------------|-----------|-----------|
| A0A212CI17                         | Celaphus_00001862                          | CD5L                                   | CD5 antigen-like                         | 2                                | 1,072          | 0,851     | 1,261     |
| A0A212DGK7                         | Celaphus_00013535                          | SAA1                                   | Serum amiloid A                          | 2                                | 0,889          | 0,715     | 1,307     |
| A0A212D3M2                         | Celaphus_00014757                          | C1QA                                   | Komponenta komplement C1q, podjedinica A | 2                                | 0,924          | 0,878     | 0,946     |
| A0A212CZ96                         | Celaphus_00006696                          | HBA                                    | Hemoglobin, alfa lanac                   | 2                                | 0,536          | 0,287     | 0,754     |
| A0A212D8M7                         | Celaphus_00001705                          | APOH                                   | Apolipoprotein H                         | 2                                | 1,102          | 0,998     | 1,153     |
| A0A212CSM8                         | Celaphus_00015516                          | SERPINA3-8                             | Serpin A3-8                              | 2                                | 0,852          | 0,788     | 1,016     |
| A0A212C0Y9                         | Celaphus_00009908                          | CFP                                    | Properdin                                | 2                                | 0,954          | 0,870     | 1,019     |
| A0A212C6Y8                         | Celaphus_00017633                          | TTR                                    | Transtiretin                             | 2                                | 1,027          | 0,935     | 1,056     |
| A0A212C4I5                         | Celaphus_00016842                          | F10                                    | Koagulacijski faktor VII                 | 2                                | 0,942          | 0,884     | 1,044     |

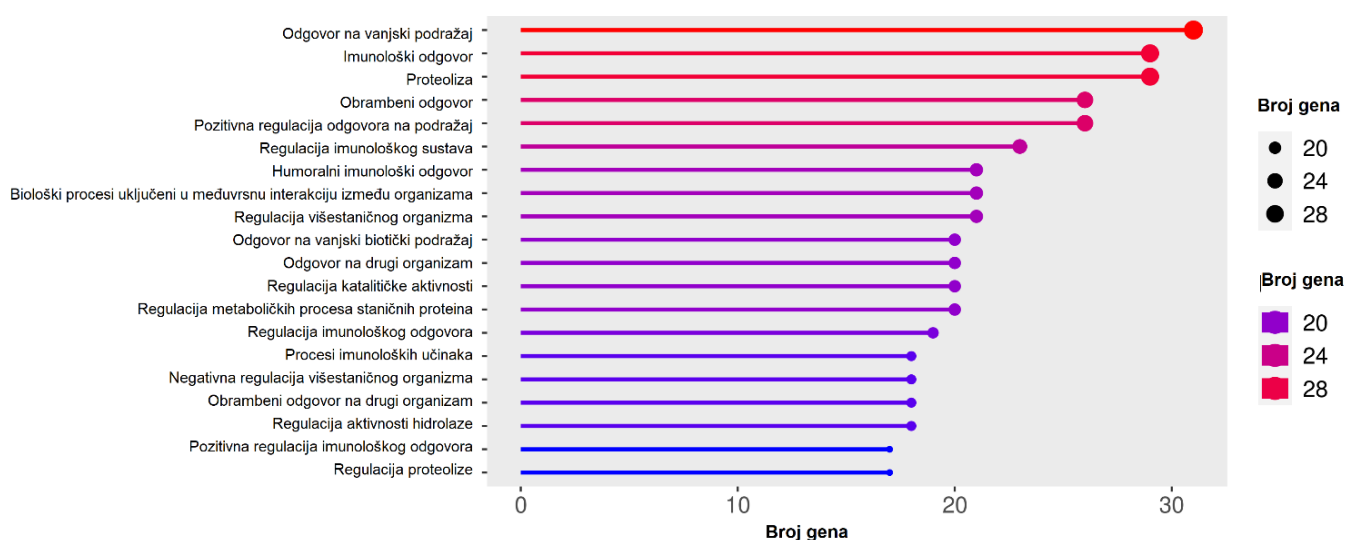
\*nakon BLAST analize



### 5.1.1. FUNKCIONALNA ANALIZA PROTEINA SERUMA JELENA OBIČNOG

Identifikacijski brojevi proteina upareni su s 80 jedinstvenih gena. Analiza genske ontologije napravljena je pomoću bioinformatičkog alata ShinyGO 0.76.3. Za svaku ontologiju prikazano je prvih 20 pojmova koji su uključivali najveći broj gena.

Genska ontologija za biološki proces pokazala je da je najveći broj gena (N = 31) uključen u proces „odgovor na vanjski podražaj“, za kojim slijede (N = 29) „imunološki odgovor“ i „proteoliza“ (Slika 7).



**Slika 7.** Grafički prikaz prvih 20 pojmova genske ontologije za biološke procese u koje su uključeni proteini seruma jelena običnog. Boja i veličina kružića odgovara broju gena uključenih u odgovarajući proces.

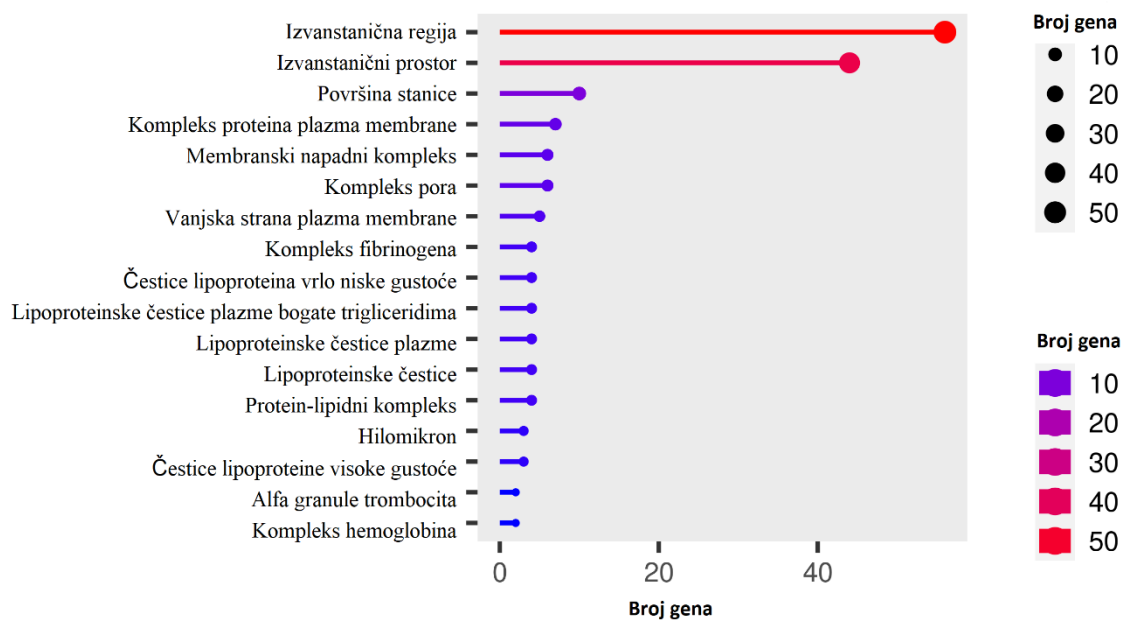
Većina bioloških procesa usko je povezana s imunim sustavom i obrambenim odgovorom organizma (obrambeni odgovor, humoralni imunski odgovor, regulacija imunskog sustava, regulacija imunskog odgovora, odgovor na vanjski biotički podražaj, biološka procesi uključeni u međuvrtnu interakciju između organizama), te metaboličkim procesima (regulacija metaboličkih procesa staničnih proteina, regulacija procesa višestaničnog organizma, regulacija aktivnosti hidrolaza i proteolize). Detaljan prikaz bioloških procesa i gena uključenih u pojedini proces nalazi se u Tablici 3.

**Tablica 3.** Analiza genske ontologije (GO) za biološke procese u serumu jelena običnog. Prikazan je naziv i oznaka procesa, broj i oznake uključenih gena. Puni nazivi gena odnosno proteina nalaze se u Tablici 2.

| GO naziv   | GO oznaka  | Broj gena | Geni  |
|--|------------|-----------|---|
| Odgovor na vanjski podražaj  | GO:0009605 | 31        | AHSG HRG PLG APOH APOA1 HPX C8A SERPINC1 KNG1 HP FGG TF APOB KLKB1 C7 PGLYRP2 C6 CFP C9 ALB C3 JCHAIN F12 APOA4 GSN SERPINF2 FGB CFB ADIPOQ |
| Imunološki odgovor   | GO:0006955 | 29        | HRG APOA1 HPX C8A C8B ECM1 C1S BoLA HP C1QA TF C1R C1QB C7 PGLYRP2 C6 CFP C9 VTN C3 JCHAIN APOA4 GSN FGB CFI CFB C8G                        |
| Proteoliza   | GO:0006508 | 29        | HRG PLG APOH ECM1 SERPINC1 C1S KNG1 HP FGG SERPINA3-8 ITIH1 FN1 C1R KLKB1 SERPINA10 SERPIND1 ITIH2 F10 C3 FETUB F12 GSN FGB CD5L CFI CFB    |
| Obrambeni odgovor  | GO:0006952 | 26        | AHSG HRG APOA1 HPX C8A ECM1 KNG1 HP TF FN1 C7 PGLYRP2 C6 CFP C9 C3 ORM1 JCHAIN F12 APOA4 GSN FGB CFB ADIPOQ                                 |
| Pozitivna regulacija odgovora na podražaj                            | GO:0048584 | 26        | HRG APOH APOA1 HPX C8A C8B C1S FGG C1QA FN1 C1R C1QB C7 C6 CFP C9 F10 C3 F12 SERPINF2 FGB CFI CFB ADIPOQ C8G                                |
| Regulacija imunološkog sustava                                       | GO:0002682 | 23        | HRG APOA1 HPX C8A C8B ECM1 C1S C1QA C1R C1QC C1QB C7 PGLYRP2 C6 CFP C9 C3 ORM1 CFI CFB ADIPOQ C8G   |
| Humoralni imunološki odgovor   | GO:0006959 | 21        | HRG HPX C8A C8B C1S C1QA TF C1R C1QB C7 C6 CFP C9 C3 JCHAIN FGB CFI CFB C8G   |
| Biološki procesi uključeni u međuvrsku interakciju između organizama | GO:0044419 | 21        | HRG HPX C8A HP TF FN1 APOB C7 PGLYRP2 C6 CFP C9 C3 JCHAIN APOA4 GSN FGB CFB ADIPOQ  |
| Regulacija višestaničnog organizma                                   | GO:0051239 | 21        | AHSG HRG PLG APOH APOA1 ECM1 SERPINC1 KNG1 FGG TF FN1 KLKB1 SERPINF1 C1QC PGLYRP2 C3 F12 APOA4 SERPINF2 FGB ADIPOQ                          |
| Odgovor na vanjski biotički podražaj                                 | GO:0043207 | 20        | HRG HPX C8A HP TF APOB C7 PGLYRP2 C6 CFP C9 C3 JCHAIN APOA4 GSN FGB CFB ADIPOQ  |
| Odgovor na drugi organizam   | GO:0051707 | 20        | HRG HPX C8A HP TF APOB C7 PGLYRP2 C6 CFP C9 C3 JCHAIN APOA4 GSN FGB CFB ADIPOQ  |
| Regulacija katalitičke aktivnosti                                    | GO:0050790 | 20        | HRG APOH APOA1 ECM1 SERPINC1 KNG1 SERPINA3-8 ITIH1 FN1 SERPINA10  |

| GO naziv   | GO oznaka  | Broj gena | Geni   |
|--|------------|-----------|--|
|  |            |           | SERPIND1 ITIH2 C3 FETUB APOA4 ADIPOQ   |
| Regulacija metaboličkih procesa staničnih proteina | GO:0032268 | 20        | HRG APOA1 HPX ECM1 SERPINC1 KNG1 SERPINA3-8 ITIH1 FN1 SERPINA10 SERPIND1 ITIH2 C3 FETUB F12 GSN ADIPOQ |
| Regulacija imunološkog odgovora                    | GO:0050776 | 19        | HRG HPX C8A C8B ECM1 C1S C1QA C1R C1QB C7 PGLYRP2 C6 CFP C9 C3 CFI CFB C8G                             |
| Procesi imunoloških učinaka                        | GO:0002252 | 18        | APOA1 HPX C8A C8B C1S C1QA C1R C1QB C7 PGLYRP2 C6 CFP C9 C3 CFI CFB C8G                                |
| Negativna regulacija višestaničnog organizma       | GO:0051241 | 18        | AHSG HRG PLG APOH APOA1 ECM1 KNG1 FGG FN1 KLKB1 SERPINF1 C1QC PGLYRP2 F12 APOA4 SERPINF2 FGB ADIPOQ    |
| Obrambeni odgovor na drugi organizam               | GO:0098542 | 18        | HRG HPX C8A HP TF C7 PGLYRP2 C6 CFP C9 C3 JCHAIN APOA4 GSN FGB CFB                                     |
| Regulacija aktivnosti hidrolaze                    | GO:0051336 | 18        | HRG APOH APOA1 ECM1 SERPINC1 KNG1 SERPINA3-8 ITIH1 FN1 SERPINA10 SERPIND1 ITIH2 C3 FETUB APOA4         |
| Pozitivna regulacija imunološkog odgovora          | GO:0050778 | 17        | HRG HPX C8A C8B C1S C1QA C1R C1QB C7 C6 CFP C9 C3 CFI CFB C8G  |
| Regulacija proteolize                              | GO:0030162 | 17        | HRG ECM1 SERPINC1 KNG1 SERPINA3-8 ITIH1 FN1 SERPINA10 SERPIND1 ITIH2 C3 FETUB F12 GSN                  |

Genska ontologija za staničnu lokalizaciju pokazala je da velika većina proteina pripada izvanstaničnoj regiji (N = 56), odnosno izvanstaničnom prostoru (N = 44) (Slika 8), što je i očekivano s obzirom da se radi o serumu. Pored toga, identificirani su i pojedini proteini vezani uz staničnu membranu, odnosno dijelovi lipoproteinskih čestica, kompleksa s fibrinogenom i hemoglobinom, te sadržaj alfa granula trombocita izlučenih u cirkulaciju.



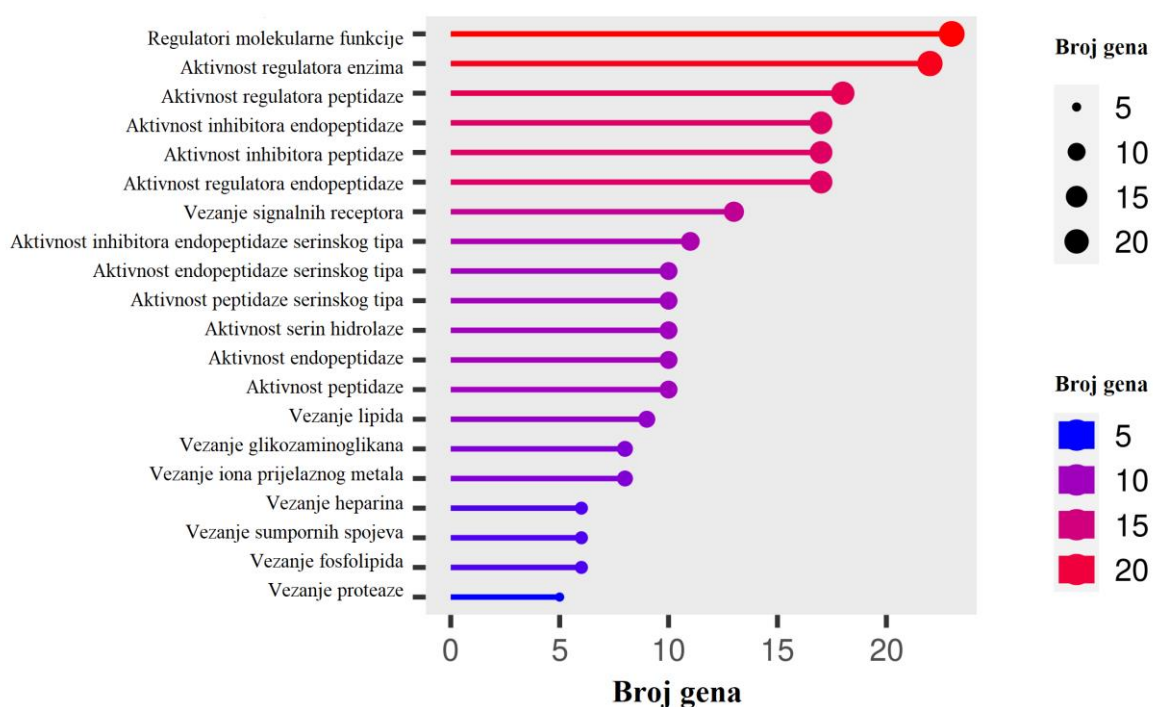
**Slika 8.** Grafički prikaz prvih 20 pojmova genske ontologije za staničnu lokalizaciju proteina seruma jelena običnog. Boja i veličina kružića odgovara broju gena uključenih u odgovarajući stanični odjeljak.

Detaljan prikaz stanične lokalizacije i gena uključenih u pojedini proces dan je u Tablici 4.

**Tablica 4.** Analiza genske ontologije (GO) za staničnu lokalizaciju proteina u serumu jelena običnog. Prikazan je naziv i oznaka GO, broj i oznake uključenih gena. Puni nazivi gena odnosno proteina nalaze se u Tablici 2.

| GO naziv  | GO oznaka  | Broj gena | Geni   |
|---|------------|-----------|--|
| Izvanstanična regija                                | GO:0005576 | 56        | RBP4 AHSG HRG PLG FGA APOH APOA1 HPX C8A ECM1 SERPINC1 KNG1 BoLA HP FGG SERPINA3-8 TF ITIH1 FN1 APOB C1R KLKB1 SERPINF1 A1BG SERPINA10 C1QC C7 CP SERPIND1 ITIH2 C6 CFP C9 VTN F10 ALB C3 ORM1 FETUB CLEC3B JCHAIN SERPINA1 F12 APOA4 SERPINF2 FGB AZGP1 IGFALS CFB AFM ADIPOQ C8G |
| Izvanstanični prostor                               | GO:0005615 | 44        | RBP4 AHSG FGA APOH APOA1 HPX ECM1 SERPINC1 KNG1 BoLA HP FGG SERPINA3-8 TF FN1 APOB C1R KLKB1 SERPINF1 SERPINA10 CP SERPIND1 CFP C9 F10 ALB C3 ORM1 FETUB CLEC3B JCHAIN SERPINA1 F12 APOA4 SERPINF2 FGB AZGP1 IGFALS AFM ADIPOQ   |
| Površina stanice                                    | GO:0009986 | 10        | HRG APOH BoLA FGG TF C3 APOA4 FGB AZGP1 ADIPOQ   |
| Kompleks proteina plazma membrane                   | GO:0098797 | 7         | C8A C8B TF C7 C6 C9 C8G  |
| Membranski napadni kompleks                         | GO:0005579 | 6         | C8A C8B C7 C6 C9 C8G   |
| Kompleks pora                                       | GO:0046930 | 6         | C8A C8B C7 C6 C9 C8G   |
| Vanjska strana plazma membrane                      | GO:0009897 | 5         | BoLA FGG TF FGB AZGP1  |
| Kompleks fibrinogena                                | GO:0005577 | 4         | FGA FGG FN1 FGB  |
| Čestice lipoproteina vrlo niske gustoće             | GO:0034361 | 4         | APOH APOA1 APOB APOA4  |
| Lipoproteinske čestice plazme bogate trigliceridima | GO:0034385 | 4         | APOH APOA1 APOB APOA4  |
| Lipoproteinske čestice plazme                       | GO:0034358 | 4         | APOH APOA1 APOB APOA4  |
| Lipoproteinske čestice                              | GO:1990777 | 4         | APOH APOA1 APOB APOA4  |
| Protein-lipidni kompleks                            | GO:0032994 | 4         | APOH APOA1 APOB APOA4  |
| Hilomikron  | GO:0042627 | 3         | APOH APOB APOA4  |
| Čestice lipoproteine visoke gustoće                 | GO:0034364 | 3         | APOH APOA1 APOA4   |
| Alfa granule trombocita                             | GO:0031091 | 2         | FGG FGB  |
| Kompleks hemoglobina                                | GO:0005833 | 2         | HBB HBA  |

Najveći broj proteina pripada regulatorima molekularnih funkcija (N = 23), odnosno zaduženi su za regulaciju enzimskih aktivnosti (N = 22), poglavito peptidaza (N = 18) i inhibitora (endo)peptidaza (N = 17) (Slika 9). Uz enzimsku regulaciju, proteini seruma sudjeluju u vezanju na signalne receptore (N = 13), lipide (N = 9), te ostale molekule (glikozaminoglikane, heparin, fosfolipide i ostalo). Detaljan prikaz molekularne funkcije i gena uključenih u pojedinu funkciju dan je u Tablici 5.



**Slika 9.** Grafički prikaz prvih 20 pojmova genske ontologije za molekularnu funkciju proteina seruma jelena običnog. Boja i veličina kružića odgovara broju gena uključenih u odgovarajuću funkciju.

**Tablica 5.** Analiza genske ontologije (GO) za molekularne funkcije proteina seruma jelena običnog. Prikazan je naziv i oznaka procesa, broj i oznake uključenih gena. Puni nazivi gena odnosno proteina nalaze se u Tablici 2.

| GO naziv  | GO oznaka  | Broj gena | Geni  |
|---|------------|-----------|---|
| Regulatori molekularne funkcije                   | GO:0098772 | 23        | AHSG HRG APOH APOA1 SERPINC1 KNG1 SERPINA3-8 ITIH1 ITIH3 FN1 SERPINA10 SERPIND1 ITIH2 C3 FETUB SERPINA1 APOA4 SERPINF2 ADIPOQ |
| Aktivnost regulatora enzima                       | GO:0030234 | 22        | AHSG HRG APOH APOA1 SERPINC1 KNG1 SERPINA3-8 ITIH1 ITIH3 FN1 SERPINA10 SERPIND1 ITIH2 C3 FETUB SERPINA1 APOA4 SERPINF2        |
| Aktivnost regulatora peptidaze                    | GO:0061134 | 18        | AHSG HRG SERPINC1 KNG1 SERPINA3-8 ITIH1 ITIH3 FN1 SERPINA10 SERPIND1 ITIH2 C3 FETUB SERPINA1 SERPINF2                         |
| Aktivnost inhibitora endopeptidaze                | GO:0004866 | 17        | AHSG HRG SERPINC1 KNG1 SERPINA3-8 ITIH1 ITIH3 SERPINA10 SERPIND1 ITIH2 C3 FETUB SERPINA1 SERPINF2                             |
| Aktivnost inhibitora peptidaze                    | GO:0030414 | 17        | AHSG HRG SERPINC1 KNG1 SERPINA3-8 ITIH1 ITIH3 SERPINA10 SERPIND1 ITIH2 C3 FETUB SERPINA1 SERPINF2                             |
| Aktivnost regulatora endopeptidaze                | GO:0061135 | 17        | AHSG HRG SERPINC1 KNG1 SERPINA3-8 ITIH1 ITIH3 SERPINA10 SERPIND1 ITIH2 C3 FETUB SERPINA1 SERPINF2                             |
| Vežanje signalnih receptora                       | GO:0005102 | 13        | HRG FGA APOA1 ECM1 KNG1 FGG TF FN1 APOB C3 JCHAIN FGB ADIPOQ  |
| Aktivnost inhibitora endopeptidaze serinskog tipa | GO:0004867 | 11        | SERPINC1 SERPINA3-8 ITIH1 ITIH3 SERPINA10 SERPIND1 ITIH2 SERPINA1 SERPINF2  |
| Aktivnost endopeptidaze serinskog tipa            | GO:0004252 | 10        | PLG C1S HP C1R KLKB1 F10 F12 CD5L CFI CFB   |
| Aktivnost peptidaze serinskog tipa                | GO:0008236 | 10        | PLG C1S HP C1R KLKB1 F10 F12 CD5L CFI CFB   |
| Aktivnost serin hidrolaze                         | GO:0017171 | 10        | PLG C1S HP C1R KLKB1 F10 F12 CD5L CFI CFB   |
| Aktivnost endopeptidaze                           | GO:0004175 | 10        | PLG C1S HP C1R KLKB1 F10 F12 CD5L CFI CFB   |
| Aktivnost peptidaze                               | GO:0008233 | 10        | PLG C1S HP C1R KLKB1 F10 F12 CD5L CFI CFB   |
| Vežanje lipida                                    | GO:0008289 | 9         | RBP4 APOH APOA1 SHBG APOB F10 ALB JCHAIN APOA4  |

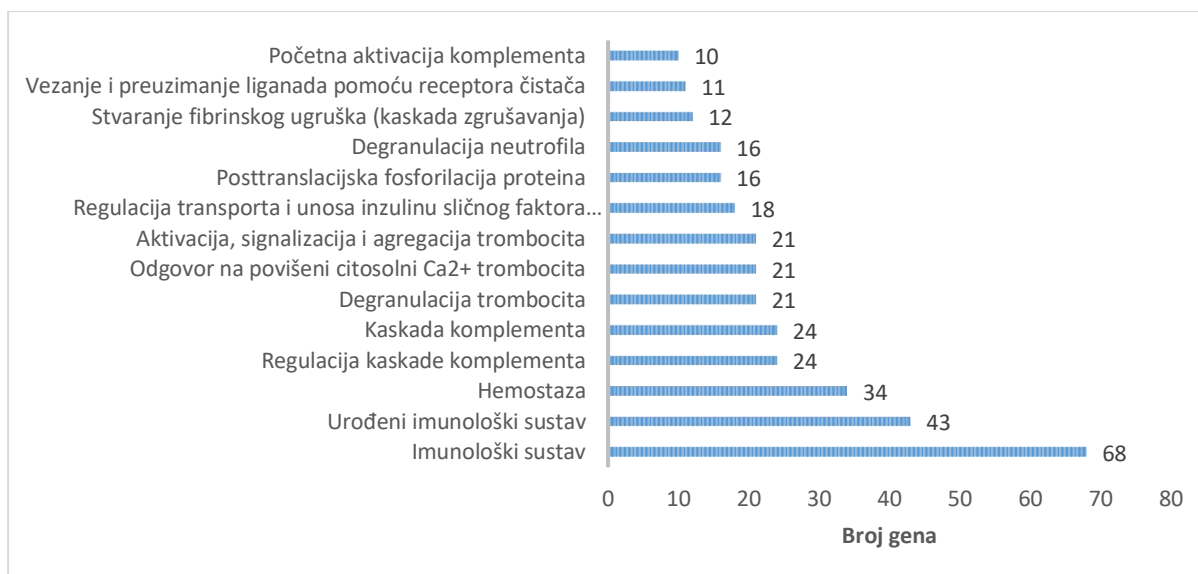
| GO naziv                        | GO oznaka  | Broj gena | Geni   |
|---------------------------------|------------|-----------|--|
| Vežanje glikozaminoglikana      | GO:0005539 | 8         | HRG APOH SERPINC1 FN1 APOB PGLYRP2 CLEC3B JCHAIN |
| Vežanje iona prijelaznog metala | GO:0046914 | 8         | HRG TF CP PGLYRP2 ALB APOA4 AOC3 HBA             |
| Vežanje heparina                | GO:0008201 | 6         | HRG APOH SERPINC1 FN1 APOB CLEC3B                |
| Vežanje sumpornih spojeva       | GO:1901681 | 6         | HRG APOH SERPINC1 FN1 APOB CLEC3B                |
| Vežanje fosfolipida             | GO:0005543 | 6         | APOH APOA1 APOB F10 JCHAIN APOA4                 |
| Vežanje proteaze                | GO:0002020 | 5         | ECM1 SERPINC1 FN1 SERPINA1                       |

### 5.1.2. ANALIZA BIOLOŠKIH PUTEVA POVEZANIH S PROTEINIMA SERUMA

Analiza bioloških puteva povezanih s proteinima seruma napravljena je pomoću bioinformatičkog alata Reactome, te su se 53 biološka puta pokazala statistički značajnima ( $FDR < 0,05$ ). Postavljen je dodatni kriterij da je u svakom biološkom putu prisutno najmanje 10 gena, te smo time reducirali broj puteva na 14 (Slika 10). Većina proteina identificiranih i kvantificiranih u proteomu seruma uključena je u imunski sustav ( $N = 68$ ), odnosno još specifičnije u urođeni imunski sustav ( $N = 43$ ). Važan dio urođenog imuniteta je sustav komplementa, te su identificirani proteini kaskade komplementa ( $N = 24$ ). Ostali zastupljeni biološki putevi vezani za imunski odgovor su degranulacija trombocita ( $N = 21$ ) i neutrofila ( $N = 16$ ), regulacija transporta i unosa inzulinu sličnog čimbenika rasta (IGF) pomoću inzulinu sličnog čimbenika rasta vezujućih proteina (IGFBP) ( $N = 18$ ), i drugi.

Velik broj proteina uključen je u biološke puteve vezane uz hemostazu ( $N = 34$ ), kao što su adhezija, aktivacija i agregacija trombocita ( $N = 21$ ) i stvaranje fibrinskog ugruška (koagulacijska kaskada) ( $N = 12$ ). Jedanaest proteina uključeno je u procese vezanja i preuzimanja liganada pomoću receptora čistača (engl. *scavenger receptors*).

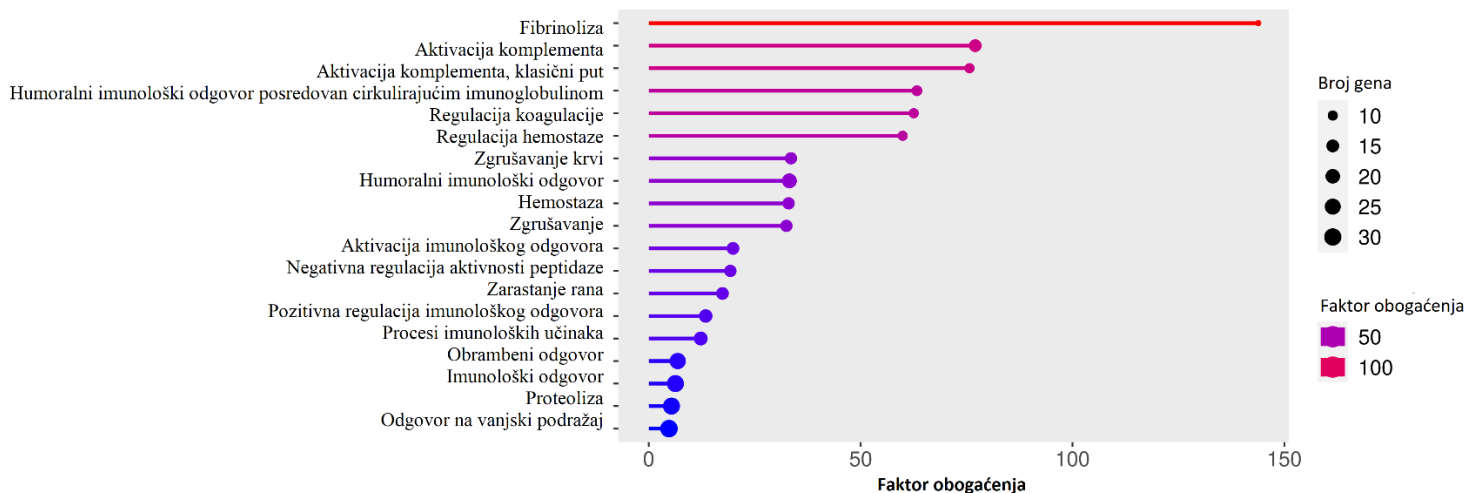




**Slika 10.** Prikaz značajnih bioloških puteva s najmanje 10 gena/putu povezanih s proteomom seruma jelena običnog, napravljen pomoću alata Reactome.

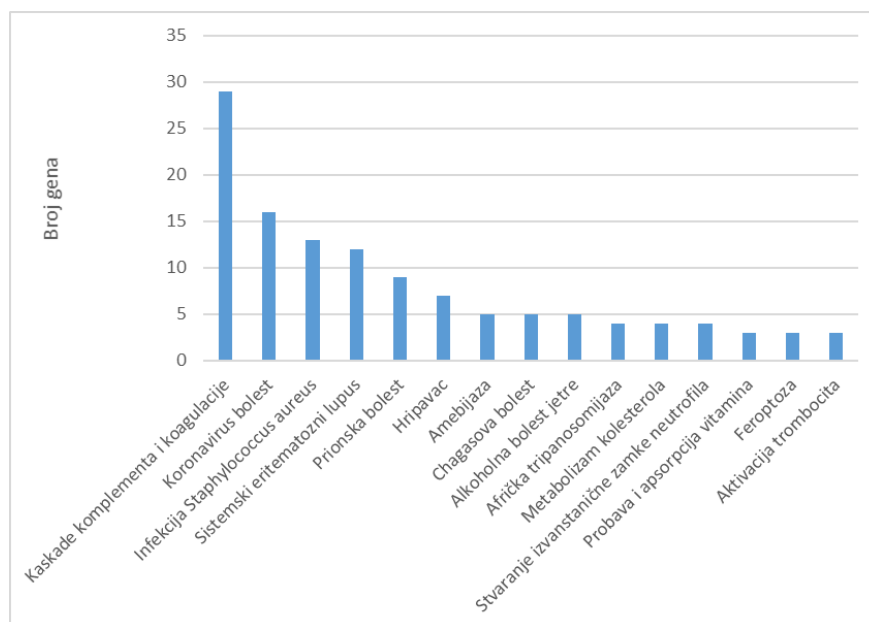
### 5.1.3. ANALIZA ZNAČAJNO OBOGAĆENIH BIOLOŠKIH PROCESA U SERUMU

Prvih 20 pojmova GO za biološke procese s najnižom vrijednošću FDR i najvećim faktorom obogaćenja (engl. *fold enrichment*) prikazano je na Slici 11. Na temelju faktora obogaćenja (postotak identificiranih gena koji pripadaju procesu podijeljen s odgovarajućim postotkom gena u pozadini (kodirajući geni za *Bos taurus*)) kao mjere veličine učinka, značajno obogaćeni biološki procesi u serumu su fibrinoliza, aktivacija komplementa, humoralni imunosni odgovor i humoralni imunosni odgovor posredovan cirkulirajućim imunoglobulinima, regulacija koagulacije i hemostaze. Većina obogaćenih bioloških procesa vezana je uz imunosni sustav i odgovor imunosnog sustava.

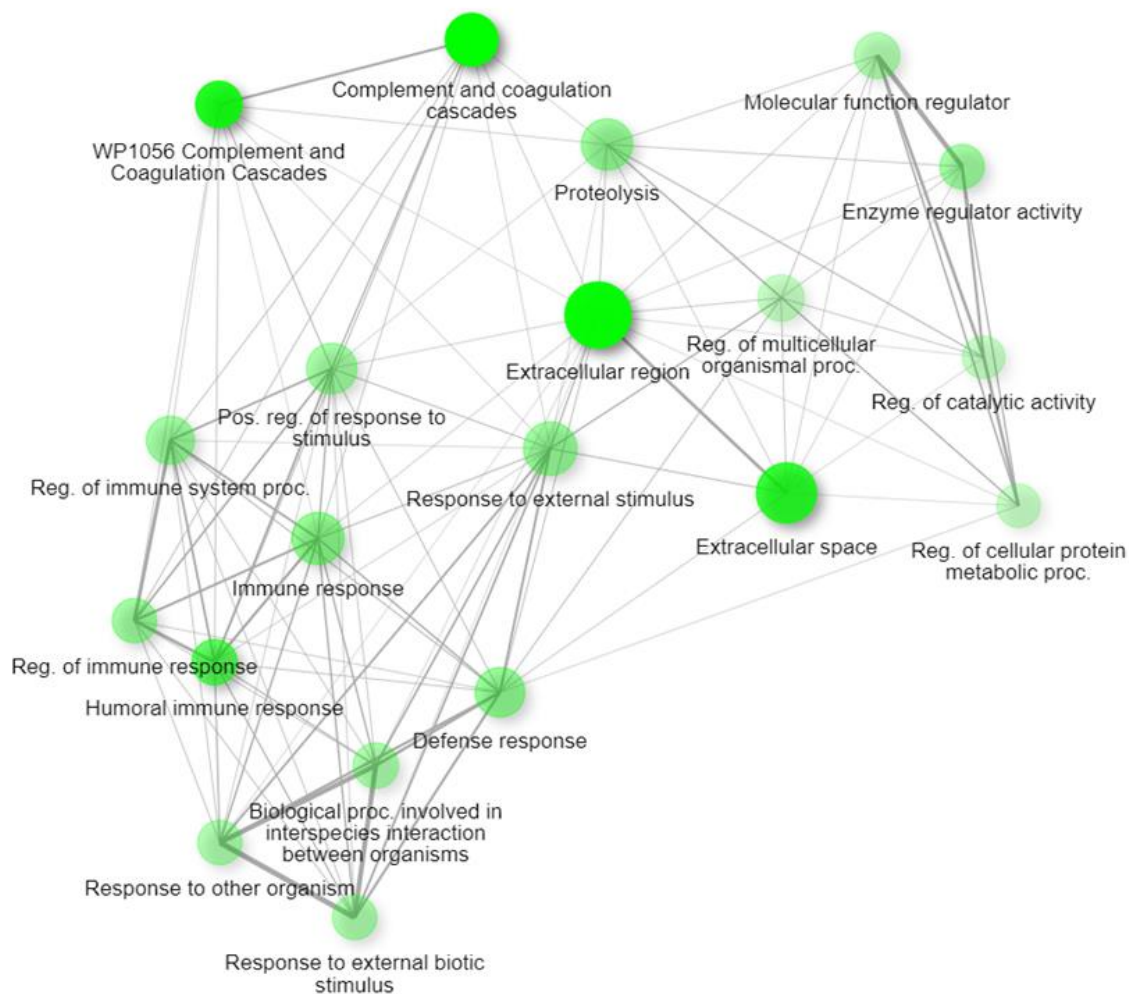


**Slika 11.** Prvih 20 pojmova genske ontologije za biološke procese u proteomu seruma s najnižom vrijednošću FDR i najvećim faktorom obogaćenja (engl. *fold enrichment*). Boja odgovara veličini faktora obogaćenja, a veličina kružića odgovara broju gena uključenih u odgovarajući proces.

Pretraživanjem Kegg baze, dobiveno je da je najviše proteina vezano uz kaskadu komplementa i koagulacije (N = 29), a zanimljiva je povezanost proteina/gena s pojedinim bolestima kao što su COVID-19 (N = 16), infekcija bakterijom *Staphylococcus aureus* (N = 13), Chagasova bolest (N = 5), amebijaza (N = 5) ili primjerice tripanosomijaza (N = 4) (Slika 12).



**Slika 12.** Prikaz najvažnijih pojmova vezanih uz proteom seruma jelena običnog dobiven pretraživanjem KEGG baze podataka.



**Slika 13.** Mrežni prikaz najznačajnijih pojmova genske ontologije u proteomu seruma jelena običnog. Dva pojma (čvora) su povezana ukoliko dijele 20% ili više gena. Tamniji čvorovi su značajnije obogaćeni skupovi gena, veći čvorovi predstavljaju veće skupove gena, a deblje linije između čvorova predstavljaju više preklapajućih gena. Slika je izrađena u programu ShinyGO.

Slika 13. prikazuje mrežu najznačajnijih pojmova genske ontologije u proteomu seruma jelena običnog, sažimajući tako sveukupnu funkcionalnu analizu proteoma seruma.

## 5.2. REZULTATI PROTEOMSKJE ANALIZE JETRE JELENA OBIČNOG PRIMJENOM TEHNIKA LC-MS/MS

Proteomskim pristupom temeljenim na obilježavanju TMT-om, analizirana su 22 uzorka jetre zdravih jelena. Analiza prikupljenih podataka u Proteome Discovereru pokazala je da je ukupno identificirano 493 proteina s pomoću najmanje dva jedinstvena peptida i uz 1% FDR. U daljnju statističku i bioinformatičku obradu uključeni su samo proteini koji su bili prisutni u najmanje 50% uzoraka. Time je ukupan broj identificiranih i kvantificiranih proteina u jetri bio 387. U Tablici 6. prikazan je identifikacijski broj proteina (engl. *accession ID*) iz baze UniProt, oznaka gena, naziv proteina, broj jedinstvenih peptida, te vrijednosti medijana, prve i treće kvartile relativne zastupljenosti za proteine jetre jelena običnog.

**Tablica 6.** Popis proteina identificiranih i kvantificiranih pomoću LC-MS/MS pristupa u jetri jelena običnog. Prikazana je jedinstvena oznaka proteina (iz baze UniProt), oznaka gena za *Cervus elaphus*, oznaka gena za *Bos taurus* (dobivena BLAST analizom), broj identificiranih jedinstvenih peptida, a zastupljenost pojedinog proteina prikazana je kao medijan i interkvartilni raspon (Q1 – Q3) u arbitrarnim (proizvoljnim) jedinicama.

| Jedinstvena oznaka proteina | Oznaka gena ( <i>Cervus elaphus</i> ) | Oznaka gena ( <i>Bos taurus</i> ) | Naziv proteina                                  | Broj jedinstvenih peptida | Medijan | Q1    | Q3    |
|-----------------------------|---------------------------------------|-----------------------------------|---|---------------------------|---------|-------|-------|
| A0A212DAL6                  | Celaphus_00001490                     | FASN                              | 3-hidroksiacil-[acil-nosač-protein] dehidrataza | 37                        | 0,656   | 0,274 | 0,726 |
| A0A212CHB6                  | Celaphus_00002806                     | COL6A3                            | Kolagen alfa-3(VI) lanac*                       | 22                        | 0,808   | 0,737 | 0,938 |
| A0A212CV89                  | Celaphus_00006518                     | PCK2                              | Fosfoenolpiruvat karboksikinaza                 | 15                        | 0,929   | 0,766 | 1,101 |
| A0A212D0T3                  | Celaphus_00003765                     | ANXA6                             | Aneksin   | 14                        | 1,054   | 0,851 | 1,170 |
| A0A212CVP2                  | Celaphus_00005371                     | HADHA                             | Enoil-CoA hidrataza                             | 13                        | 0,892   | 0,845 | 0,949 |
| A0A212CX37                  | Celaphus_00005444                     | ANXA4                             | Aneksin   | 13                        | 0,878   | 0,633 | 1,084 |
| A0A212DFN1                  | Celaphus_00011700                     | ATP5F1B                           | Podjedinica ATP sintaze beta                    | 13                        | 1,100   | 1,030 | 1,148 |
| A0A212DBU6                  | Celaphus_00004378                     | CYP2A13                           | Cytochrome P450*                                | 12                        | 1,147   | 0,890 | 1,624 |
| A0A212C8W0                  | Celaphus_00010699                     | ALDH1L1                           | Metionil-tRNA formiltransferaza                 | 11                        | 1,003   | 0,892 | 1,055 |
| A0A212DEC7                  | Celaphus_00011440                     | KRT8                              | Keratin 8                                       | 11                        | 0,868   | 0,617 | 1,068 |
| A0A212CQK2                  | Celaphus_00010855                     | EPHX1                             | Epoksid hidrolaza                               | 11                        | 1,347   | 0,939 | 1,664 |
| A0A212D9R7                  | Celaphus_00000641                     | CLTC                              | Teški lanac klatrina                            | 11                        | 0,828   | 0,761 | 0,886 |
| A0A212DH65                  | Celaphus_00013382                     | GANAB                             | Glukozidaza II, alfa podjedinica                | 11                        | 0,995   | 0,949 | 1,112 |
| A0A212C9R7                  | Celaphus_00010484                     | ACY1                              | Aminoacilaza 1                                  | 11                        | 0,923   | 0,837 | 1,015 |
| A0A212CWA2                  | Celaphus_00005177                     | SPTAN1                            | Alfa-II spektrin                                | 11                        | 0,911   | 0,802 | 1,020 |
| A0A212CNR3                  | Celaphus_00008370                     | GLUD1                             | Glutamat dehidrogenaza (NAD(P)(+))              | 10                        | 1,011   | 0,912 | 1,286 |
| A0A212D7A6                  | Celaphus_00001091                     | SHMT1                             | Serin hidroksimetiltransferaza                  | 10                        | 0,970   | 0,909 | 1,079 |
| A0A212CWL9                  | Celaphus_00005608                     | SPTBN1                            | Spektrin, beta lanac                            | 10                        | 0,879   | 0,813 | 0,940 |
| A0A212D3W3                  | Celaphus_00015077                     | FN1                               | Fibronektin                                     | 10                        | 0,971   | 0,902 | 1,086 |
| C7EDP1                      | HSPA5                                 | HSPA5                             | Protein toplinskog šoka A (HSP70), član 5       | 10                        | 0,950   | 0,879 | 1,036 |
| A0A212D9T7                  | Celaphus_00001033                     |                                   | Miozin, teški lanac 1                           | 9                         | 0,679   | 0,392 | 0,993 |
| A0A212C756                  | Celaphus_00017784                     | ACAA2                             | Acetil-CoA aciltransferaza 2                    | 9                         | 1,146   | 0,961 | 1,348 |

| Jedinstvena oznaka proteina | Oznaka gena ( <i>Cervus elaphus</i> ) | Oznaka gena ( <i>Bos taurus</i> ) | Naziv proteina                                    | Broj jedinstvenih peptida | Medijan | Q1    | Q3    |
|-----------------------------|---------------------------------------|-----------------------------------|---|---------------------------|---------|-------|-------|
| A0A212CGY9                  | Celaphus_00001909                     | LMNA                              | Prelamin-A/C                                      | 8                         | 0,982   | 0,873 | 1,067 |
| A0A212C007                  | Celaphus_00009962                     | HSD17B10                          | 17-beta-hidroksisteroid dehidrogenaza 10          | 8                         | 1,068   | 0,958 | 1,208 |
| A0A212CLS6                  | Celaphus_00018640                     | LAP3                              | Leucin aminopeptidaza 3                           | 8                         | 0,964   | 0,863 | 1,168 |
| A0A212DH83                  | Celaphus_00013162                     | CPT1A                             | Karnitin O-palmitoiltransferaza, jetrena izoforma | 8                         | 0,758   | 0,673 | 0,799 |
| A0A212CUF4                  | Celaphus_00005999                     | ALDH6A1                           | Aldehid dehidrogenaza 6, član A1                  | 8                         | 0,792   | 0,698 | 1,408 |
| A0A212CG34                  | Celaphus_00002139                     | ATP1A1                            | Natrij/kalij ATPaza, podjedinica alfa             | 8                         | 1,014   | 0,793 | 1,227 |
| A0A212DHB4                  | Celaphus_00013213                     | PC                                | Piruvat karboksilaza                              | 8                         | 0,795   | 0,696 | 0,885 |
| A0A212CBD3                  | Celaphus_00007572                     | RRBP1                             | Protein koji veže ribosome 1                      | 8                         | 1,073   | 1,019 | 1,153 |
| A0A212D5P0                  | Celaphus_00017423                     | ALB                               | Albumin   | 8                         | 1,010   | 0,734 | 1,315 |
| A0A212CAC8                  | Celaphus_00007529                     | VIM                               | Vimentin  | 8                         | 0,838   | 0,731 | 0,968 |
| A0A212CZX0                  | Celaphus_00006975                     | ACSM1                             | Acil-CoA sintetaza srednjih lanaca 1              | 8                         | 1,003   | 0,844 | 1,522 |
| A0A212CPK1                  | Celaphus_00008695                     | ACSL5                             | Acil-CoA sintetaza dugih lanaca 5                 | 7                         | 0,675   | 0,587 | 0,794 |
| A0A212C6F7                  | Celaphus_00017759                     | ATP5F1A                           | ATP sintetaza, podjedinica alfa                   | 7                         | 0,981   | 0,839 | 1,130 |
| A0A220IGB1                  | Celaphus_00009168                     | HBB                               | Hemoglobin beta lanac                             | 7                         | 1,004   | 0,884 | 1,159 |
| A0A212DEZ2                  | Celaphus_00011603                     | CCT2                              | T-kompleks protein 1, podjedinica beta            | 7                         | 1,063   | 0,899 | 1,134 |
| A0A212CYJ3                  | Celaphus_00006974                     | ACSM2A                            | Acil-CoA sintetaza srednjih lanaca 2A*            | 7                         | 0,960   | 0,815 | 1,252 |
| A0A212CV47                  | Celaphus_00006155                     | GATM                              | Glicin amidinotransferaza                         | 7                         | 0,948   | 0,818 | 1,348 |
| A0A212CGS9                  | Celaphus_00002029                     | SELENBP1                          | Protein koji veže selen 1                         | 7                         | 0,990   | 0,877 | 1,338 |
| A0A212DD04                  | Celaphus_00004945                     | A1BG                              | Afa-1-B glikoprotein                              | 7                         | 1,033   | 0,926 | 1,115 |
| A0A212CH56                  | Celaphus_00002530                     | CPT2                              | Karnitin palmitoiltransferaza 2                   | 7                         | 1,034   | 0,881 | 1,160 |
| A0A212C9S0                  | Celaphus_00010416                     | FLNB                              | Filamin B   | 7                         | 0,759   | 0,665 | 0,830 |
| A0A212CMC7                  | Celaphus_00016973                     | ALDOB                             | Fruktoza-bifosfat aldolaza                        | 7                         | 0,933   | 0,900 | 1,012 |
| A0A212CNB3                  | Celaphus_00016912                     | ALAD                              | Dehidrataza delta-aminolevulinske kiseline        | 7                         | 1,073   | 0,930 | 1,259 |
| A0A212D7H8                  | Celaphus_00000946                     | ACADVL                            | Acil-CoA dehidrogenaza dugačkih lanaca            | 7                         | 0,732   | 0,688 | 0,838 |
| A0A212C5F6                  | Celaphus_00018404                     | VCP                               | ATPaza endoplazmatskog retikuluma                 | 7                         | 1,002   | 0,768 | 1,054 |
| A0A212DBM7                  | Celaphus_00004949                     | SLC27A5                           | Acil-CoA sintetaza dugih lanaca                   | 7                         | 1,271   | 0,852 | 1,381 |
| A0A212DFN0                  | Celaphus_00011439                     | KRT18                             | Keratin 18*                                       | 7                         | 0,778   | 0,600 | 1,037 |
| A0A212D901                  | Celaphus_00000087                     | GSTT2                             | Glutation transferaza                             | 7                         | 1,048   | 0,861 | 1,339 |

| Jedinstvena oznaka proteina | Oznaka gena ( <i>Cervus elaphus</i> ) | Oznaka gena ( <i>Bos taurus</i> ) | Naziv proteina   | Broj jedinstvenih peptida | Medijan | Q1    | Q3    |
|-----------------------------|---------------------------------------|-----------------------------------|--|---------------------------|---------|-------|-------|
| A0A212C2W7                  | Celaphus_00019249                     | ACSL1                             | Acil-CoA sintetaza dugih lanaca 1  | 7                         | 0,599   | 0,541 | 0,739 |
| A0A212C8H6                  | Celaphus_00018150                     | SDHA                              | Sukcinat dehidrogenaza   | 6                         | 0,883   | 0,760 | 1,123 |
| A0A212CZ49                  | Celaphus_00007074                     | ALDOA                             | Fruktoza-bifosfat aldolaza   | 6                         | 1,043   | 0,973 | 1,146 |
| A0A212CD89                  | Celaphus_00014118                     | TST                               | Sulfurtransferaza  | 6                         | 1,146   | 0,870 | 1,561 |
| A0A212D370                  | Celaphus_00015116                     | NDUFS1                            | NADH:ubikinon oksidoreduktaza, podjedinica S1                              | 6                         | 1,049   | 0,915 | 1,153 |
| A0A212DD55                  | Celaphus_00004770                     | JOSD2                             | Protein koji sadrži domenu aspartat dehidrogenaze                          | 6                         | 0,994   | 0,909 | 1,104 |
| A0A212CHM9                  | Celaphus_00002602                     | AKR1A1                            | Alkohol dehidrogenaza [NADP(+)]  | 6                         | 0,958   | 0,852 | 1,165 |
| A0A212CXI6                  | Celaphus_00005749                     | SPR                               | Sepiapterin reduktaza  | 6                         | 1,094   | 1,008 | 1,200 |
| A0A212D2K0                  | Celaphus_00003265                     | C3                                | Komponenta komplementa C3  | 6                         | 1,026   | 0,944 | 1,109 |
| A0A212CJB7                  | Celaphus_00012834                     | FTCD                              | Formimidoiltetrahidrofolat ciklodeaminaza                                  | 6                         | 1,122   | 0,966 | 1,353 |
| A0A212D2C8                  | Celaphus_00003366                     | LMNB2                             | Lamin B2   | 6                         | 1,008   | 0,951 | 1,088 |
| A0A212DD76                  | Celaphus_00004189                     | GOT2                              | Aspartat aminotransferaza  | 6                         | 1,100   | 1,021 | 1,193 |
| A0A212D0A9                  | Celaphus_00003328                     | EEF2                              | Eukariotski elongacijski faktor 2  | 6                         | 1,017   | 0,978 | 1,065 |
| Q2Q1M6                      | ANXA2                                 | ANXA2                             | Aneksin A2   | 6                         | 0,796   | 0,673 | 0,924 |
| A0A212CIU8                  | Celaphus_00012565                     | EHHADH                            | Enoil-CoA hidrataza i 3-hidroksiacil CoA dehidrogenaza                     | 6                         | 0,996   | 0,865 | 1,138 |
| A0A212D5P4                  | Celaphus_00014534                     |                                   | Histon H3.1*   | 6                         | 0,894   | 0,418 | 1,443 |
| A0A212DID2                  | Celaphus_00009442                     | ACAD8                             | Izobutiril-CoA dehidrogenaza   | 6                         | 0,907   | 0,838 | 0,990 |
| A0A212D9D1                  | Celaphus_00001035                     | MYH3                              | Miozin 3   | 6                         | 0,650   | 0,423 | 1,068 |
| A0A212CR58                  | Celaphus_00011094                     | AGMAT                             | Agmatinaza, mitohondrijska*  | 6                         | 1,167   | 0,896 | 1,349 |
| A0A212D9W3                  | Celaphus_00001494                     | DCXR                              | Karbonil reduktaza II  | 6                         | 0,965   | 0,837 | 1,102 |
| A0A212CCR1                  | Celaphus_00013935                     | PHB2                              | Prohibitin   | 6                         | 1,017   | 0,939 | 1,106 |
| A0A212C5F0                  | Celaphus_00018327                     | AK3                               | GTP:AMP fosfotransferaza AK3   | 6                         | 1,046   | 0,896 | 1,105 |
| A0A212CD52                  | Celaphus_00014132                     | MYH9                              | Miozin, teški lanac 9*   | 6                         | 0,867   | 0,734 | 1,039 |
| A0A212CG85                  | Celaphus_00002417                     | ACADM                             | Acil-CoA dehidrogenaza srednjih lanaca                                     | 6                         | 1,119   | 0,988 | 1,364 |
| A0A212DF69                  | Celaphus_00011679                     | SHMT2                             | Serin hidroksimetiltransferaza   | 6                         | 0,901   | 0,832 | 1,057 |
| A0A212CPT1                  | Celaphus_00008801                     | CYP2E1                            | 4-nitrofenol 2-hidroksilaza  | 6                         | 1,033   | 0,878 | 1,236 |
| A0A212D452                  | Celaphus_00014726                     | DDOST                             | Dolicil-difosfooligosaharid—podjedinica protein glikoziltransferaze 48 kDa | 6                         | 0,733   | 0,551 | 0,908 |
| A0A212DDJ5                  | Celaphus_00004437                     | HNRNPL                            | Protein koji sadrži RRM domenu   | 6                         | 1,050   | 0,926 | 1,112 |

| Jedinstvena oznaka proteina | Oznaka gena ( <i>Cervus elaphus</i> ) | Oznaka gena ( <i>Bos taurus</i> ) | Naziv proteina                          | Broj jedinstvenih peptida | Medijan | Q1    | Q3    |
|-----------------------------|---------------------------------------|-----------------------------------|---|---------------------------|---------|-------|-------|
| A0A212CD23                  | Celaphus_00013755                     | ACO2                              | Akonitat hidrataza (akonitaza)          | 6                         | 1,031   | 0,846 | 1,290 |
| A0A212DAU9                  | Celaphus_00001614                     | ACOX1                             | Acil-koenzim A oksidaza                 | 6                         | 1,027   | 0,781 | 1,338 |
| A0A212CT24                  | Celaphus_00015467                     | PDIA3                             | Protein disulfid-izomeraza              | 6                         | 0,984   | 0,776 | 1,248 |
| A0A212C8N2                  | Celaphus_00018055                     | NADK2                             | NAD kinaza 2, mitohondrijska            | 6                         | 1,069   | 1,022 | 1,138 |
| A0A212D426                  | Celaphus_00015012                     | DES                               | Dezmin                                  | 6                         | 0,869   | 0,832 | 1,007 |
| A0A212C139                  | Celaphus_00009467                     | PGRMC1                            | Membranski receptor progesterona 1      | 6                         | 1,017   | 0,874 | 1,290 |
| A0A212C3W8                  | Celaphus_00016807                     | PCCA                              | Propionil-CoA karboksilaza alfa         | 6                         | 1,093   | 0,767 | 1,212 |
| A0A212D312                  | Celaphus_00014696                     | ALDH4A1                           | Aldehid dehidrogenaza 4, član A1        | 6                         | 1,020   | 0,952 | 1,172 |
| A0A212CS13                  | Celaphus_00015270                     | FAH                               | Fumarilacetoacetaza                     | 6                         | 0,990   | 0,922 | 1,153 |
| A0A212DEJ9                  | Celaphus_00011695                     | HSD17B6                           | Hidroksisteroid 17-beta dehidrogenaza 6 | 5                         | 0,830   | 0,649 | 1,372 |
| A0A212CZB2                  | Celaphus_00007064                     | SULT1A1                           | Sulfotransferaza                        | 5                         | 1,022   | 0,682 | 1,185 |
| A0A212CIP7                  | Celaphus_00012875                     | CBS                               | Cistationin beta-sintaza                | 5                         | 0,910   | 0,723 | 1,039 |
| A0A212DC06                  | Celaphus_00004760                     | MYH14                             | Miozin, teški lanac 14*                 | 5                         | 0,920   | 0,794 | 1,006 |
| A0A212CU82                  | Celaphus_00006530                     | GMPR2                             | GMP reduktaza                           | 5                         | 1,135   | 1,020 | 1,249 |
| A0A212CZT8                  | Celaphus_00006800                     | ECI1                              | Enoil-CoA delta izomeraza 1             | 5                         | 1,051   | 0,921 | 1,171 |
| A0A212CIN4                  | Celaphus_00012836                     | COL6A2                            | Kolagen, alfa-2(VI) lanac               | 5                         | 0,873   | 0,766 | 0,941 |
| A0A212CRY4                  | Celaphus_00015215                     | IDH2                              | Izocitrat dehidrogenaza                 | 5                         | 1,086   | 0,933 | 1,227 |
| A0A212DH88                  | Celaphus_00013184                     | GSTP1                             | Glutation S-transferaza P               | 5                         | 0,400   | 0,327 | 0,634 |
| A0A212D657                  | Celaphus_00017341                     | SEC31A                            | Transportni protein Sec31A              | 5                         | 0,831   | 0,683 | 1,051 |
| O46412                      | SOD1                                  | SOD1                              | Superoksid dismutaza [Cu-Zn]            | 5                         | 1,371   | 0,837 | 1,601 |
| A0A212CNE1                  | Celaphus_00017042                     | FBP1                              | Fruktota-bifosfataza                    | 5                         | 1,071   | 0,963 | 1,255 |
| A0A212D931                  | Celaphus_00000755                     | VTN                               | Vitronektin                             | 5                         | 1,145   | 1,023 | 1,202 |
| A0A212CY21                  | Celaphus_00005296                     | PDIA6                             | Protein disulfid-izomeraza A6           | 5                         | 0,903   | 0,816 | 1,058 |
| A0A212CX59                  | Celaphus_00005373                     | HADHB                             | Acetil-CoA aciltransferaza              | 5                         | 0,924   | 0,860 | 1,047 |
| A0A212CHB7                  | Celaphus_00002483                     | LOC521656                         | Citokrom P450 2J2*                      | 5                         | 1,099   | 0,882 | 1,336 |
| A0A212CLS2                  | Celaphus_00018596                     |                                   | Alkohol dehidrogenaza 1C*               | 5                         | 1,060   | 0,925 | 1,212 |
| A0A212CAT7                  | Celaphus_00007907                     | AHCY                              | Adenozilhomocisteinaza                  | 5                         | 0,801   | 0,642 | 0,896 |
| A0A212DAA2                  | Celaphus_00000577                     | FGA                               | Fibrinogen alfa lanac                   | 5                         | 0,858   | 0,725 | 1,078 |



| Jedinstvena oznaka proteina | Oznaka gena ( <i>Cervus elaphus</i> ) | Oznaka gena ( <i>Bos taurus</i> ) | Naziv proteina  | Broj jedinstvenih peptida | Medijan | Q1    | Q3    |
|-----------------------------|---------------------------------------|-----------------------------------|---|---------------------------|---------|-------|-------|
| A0A212DFY4                  | Celaphus_00011758                     | AMDHD1                            | Protein koji sadrži domenu amidohidrolaze 1                           | 5                         | 1,054   | 0,873 | 1,191 |
| A0A212C0D2                  | Celaphus_00009848                     | RPS4                              | Ribosomalni protein S4  | 5                         | 0,878   | 0,793 | 1,185 |
| A0A212D4C1                  | Celaphus_00014355                     | HSP90AB1                          | Protein toplinskog šoka HSP 90-beta*                                  | 5                         | 1,029   | 0,934 | 1,168 |
| A0A212CID9                  | Celaphus_00012812                     | CBR1                              | Karbonil reductaza (NADPH)  | 5                         | 1,055   | 0,839 | 1,355 |
| A0A212CBC5                  | Celaphus_00007962                     | RPN2                              | Dolicil-difosfooligosaharid—podjedinica protein glikoziltransferaze 2 | 5                         | 0,934   | 0,717 | 1,091 |
| A0A212D6R3                  | Celaphus_00001296                     | KRT10                             | Keratin 10  | 5                         | 1,003   | 0,909 | 1,144 |
| A0A212DAU4                  | Celaphus_00001161                     | PHB1                              | Prohibitin  | 5                         | 1,092   | 0,817 | 1,214 |
| A0A212CUS9                  | Celaphus_00005986                     | DLST                              | Dihidrolipoamide S-sukciniltransferaza                                | 5                         | 1,058   | 0,893 | 1,479 |
| A0A212DHP9                  | Celaphus_00008946                     | APOA1                             | Apolipoprotein A1   | 5                         | 1,019   | 0,959 | 1,199 |
| A0A212CZB9                  | Celaphus_00007154                     | ASL                               | Argininosukcinat liaza  | 5                         | 0,998   | 0,933 | 1,072 |
| A0A212D7J2                  | Celaphus_00000576                     | FGB                               | Fibrinogen beta lanac   | 5                         | 0,950   | 0,762 | 1,191 |
| A0A212DGA4                  | Celaphus_00013415                     | TKFC                              | ATP-ovisna dihidroksiaceton kinaza                                    | 5                         | 1,214   | 1,092 | 1,306 |
| A0A212D8I8                  | Celaphus_00000315                     | ACAD10                            | Acil-CoA dehidrogenaza 10   | 5                         | 1,136   | 0,824 | 1,311 |
| A0A212CDX8                  | Celaphus_00016074                     | RPL8                              | 60S ribosomalni protein L8  | 5                         | 1,119   | 0,527 | 1,439 |
| A0A212DDZ9                  | Celaphus_00004894                     | RPS9                              | 40S ribosomalni protein S9  | 5                         | 0,964   | 0,677 | 1,225 |
| A0A212D9F8                  | Celaphus_00000079                     | UPB1                              | Beta-ureidopropionaza 1   | 5                         | 0,970   | 0,835 | 1,163 |
| A0A212CMB3                  | Celaphus_00017128                     |                                   | Nekarakterizirani protein   | 5                         | 0,850   | 0,727 | 0,911 |
| A0A212CGK0                  | Celaphus_00002224                     | GSTM4                             | Glutation transferaza   | 5                         | 1,332   | 1,049 | 1,632 |
| A0A212C1P4                  | Celaphus_00016005                     | HSPD1                             | 60 kDa šaperonin  | 5                         | 1,184   | 0,852 | 1,446 |
| A0A212CPY2                  | Celaphus_00008254                     | PCBD1                             | 4a-hidroksitetrahydrobiopterin dehidrataza                            | 5                         | 0,974   | 0,723 | 1,318 |
| A0A212CKY6                  | Celaphus_00012437                     | PDIA4                             | Protein disulfid-izomeraza A4   | 5                         | 1,145   | 0,899 | 1,398 |
| A0A212CEU8                  | Celaphus_00002116                     | HMGCS2                            | 3-hidroksi-3-metilglutaril coenzim A sintaza                          | 5                         | 0,833   | 0,767 | 0,999 |
| A0A212DGZ1                  | Celaphus_00013211                     | PC                                | Piruvat karbiksilaza, mitohondrijska                                  | 5                         | 0,871   | 0,786 | 0,977 |
| A0A212CM12                  | Celaphus_00018531                     | RPS18                             | 40S ribosomalni protein S18   | 5                         | 0,965   | 0,649 | 1,384 |
| A0A212CU54                  | Celaphus_00006250                     | TPM1                              | Tropomiozin alfa-1 lanac  | 4                         | 0,922   | 0,725 | 0,989 |
| A0A212DEJ4                  | Celaphus_00011722                     | MYL6                              | Miozin, laki lanac 6*   | 4                         | 1,021   | 0,870 | 1,395 |
| A0A212CPD0                  | Celaphus_00008513                     | CYP2C90                           | Citokrom P450, 2C18*  | 4                         | 0,833   | 0,651 | 1,322 |
| A0A212CXN8                  | Celaphus_00005476                     | MDH1                              | Malat dehidrogenaza   | 4                         | 0,975   | 0,831 | 1,031 |

| <b>Jedinstvena oznaka proteina</b> | <b>Oznaka gena (<i>Cervus elaphus</i>)</b> | <b>Oznaka gena (<i>Bos taurus</i>)</b> | <b>Naziv proteina</b>                                      | <b>Broj jedinstvenih peptida</b> | <b>Medijan</b> | <b>Q1</b> | <b>Q3</b> |
|------------------------------------|--|--|--|----------------------------------|----------------|-----------|-----------|
| A0A212C7N0                         | Celaphus_00019197                          | PSMB1                                  | Proteasom, podjedinica beta                                | 4                                | 0,828          | 0,675     | 0,925     |
| A0A212DA65                         | Celaphus_00000250                          | ALDH2                                  | Aldehyde dehidrogenaza 2                                   | 4                                | 1,119          | 0,926     | 1,296     |
| A0A212D3R2                         | Celaphus_00014703                          | AKR7A2                                 | Aldo-keto reduktaza 7, A2*                                 | 4                                | 1,293          | 1,110     | 1,448     |
| A0A212D615                         | Celaphus_00017436                          | LOC781988                              | UDP-glukuronoziltransferaza                                | 4                                | 1,428          | 1,335     | 1,494     |
| A0A212CHT9                         | Celaphus_00002221                          | GSTM3                                  | Glutation-S-transferaza                                    | 4                                | 1,715          | 1,147     | 2,414     |
| A0A212C958                         | Celaphus_00010496                          | SLC25A20                               | Karnitin/acilkarnitin translokaza                          | 4                                | 1,116          | 0,835     | 1,312     |
| A0A212DFY8                         | Celaphus_00013388                          | EEF1G                                  | Elongacijski faktor 1 gama                                 | 4                                | 1,041          | 0,886     | 1,356     |
| A0A212C8H8                         | Celaphus_00018077                          | TARS1                                  | Treonil-tRNA sintetaza                                     | 4                                | 1,100          | 0,965     | 1,213     |
| A0A212CT91                         | Celaphus_00006651                          | IQGAP2                                 | Ras GTPase-activating-like protein IQGAP2                  | 4                                | 0,891          | 0,802     | 0,981     |
| A0A212C160                         | Celaphus_00009982                          | MSN                                    | Moezin   | 4                                | 0,951          | 0,818     | 1,051     |
| A0A212DD57                         | Celaphus_00004593                          | APOE                                   | Apolipoprotein E   | 4                                | 1,035          | 0,813     | 1,221     |
| A0A212CIW6                         | Celaphus_00012985                          | RBP1                                   | Retinol-vezujući protein 1                                 | 4                                | 0,986          | 0,869     | 1,161     |
| A0A212CTX7                         | Celaphus_00005891                          | CALM1                                  | Kalmodulin 1*  | 4                                | 1,437          | 0,714     | 1,536     |
| A0A212DAX8                         | Celaphus_00001623                          | GALK1                                  | Galaktokinaza 1  | 4                                | 0,982          | 0,877     | 1,066     |
| A0A212CP55                         | Celaphus_00008217                          | PBLD                                   | Protein koji sadrži domenu sličnu biosintezi fenazina      | 4                                | 0,998          | 0,889     | 1,178     |
| A0A212BZM5                         | Celaphus_00009520                          | AIFM1                                  | Čimbenik koji inducira apoptozu povezan s mitohondrijima 1 | 4                                | 0,840          | 0,729     | 1,075     |
| A0A212DIE8                         | Celaphus_00009241                          | RPS3                                   | 40S ribosomalni protein S3                                 | 4                                | 0,958          | 0,849     | 1,041     |
| A0A212D354                         | Celaphus_00014681                          | SDHB                                   | Sukcinat dehidrogenaza                                     | 4                                | 1,013          | 0,964     | 1,225     |
| A0A212CJF3                         | Celaphus_00012722                          | HGD                                    | Homogentizat 1,2-dioksigenaza                              | 4                                | 1,208          | 0,962     | 1,285     |
| A0A212CI00                         | Celaphus_00002465                          | PGM1                                   | Fosfoglukomutaza-1   | 4                                | 1,056          | 0,958     | 1,149     |
| A0A212CAE9                         | Celaphus_00007807                          | PCK1                                   | Fosfoenolpiruvat karboksikinaza                            | 4                                | 1,212          | 1,120     | 1,362     |
| A0A212CV25                         | Celaphus_00006051                          | ACTN1                                  | Aktinin alfa 1   | 4                                | 0,970          | 0,859     | 1,062     |
| B6D985                             | HP   | HP                                     | Haptoglobin  | 4                                | 0,760          | 0,615     | 1,009     |
| A0A212CX07                         | Celaphus_00005474                          | UGP2                                   | UTP-glukoza-1-fosfat uridililtransferaza                   | 4                                | 0,812          | 0,723     | 0,946     |
| A0A212CVD0                         | Celaphus_00006105                          | DHRS7                                  | Dehidrogenaza/reduktaza SDR 7                              | 4                                | 0,986          | 0,681     | 1,726     |
| A0A212DCN7                         | Celaphus_00004237                          | RPL4                                   | 60S ribosomalni protein L4                                 | 4                                | 0,969          | 0,611     | 1,353     |
| A0A212C5A0                         | Celaphus_00018372                          | ALDH1A1                                | Aldehid dehidrogenaza 1, A1                                | 4                                | 1,003          | 0,870     | 1,322     |
| A0A212DE67                         | Celaphus_00004060                          | RPL13                                  | 60S ribosomalni protein L13                                | 4                                | 0,891          | 0,724     | 1,107     |

| <b>Jedinstvena oznaka proteina</b> | <b>Oznaka gena (<i>Cervus elaphus</i>)</b> | <b>Oznaka gena (<i>Bos taurus</i>)</b> | <b>Naziv proteina</b>                                | <b>Broj jedinstvenih peptida</b> | <b>Medijan</b> | <b>Q1</b> | <b>Q3</b> |
|------------------------------------|--|--|--|----------------------------------|----------------|-----------|-----------|
| A0A212DB37                         | Celaphus_00001510                          | P4HB                                   | Protein disulfid-izomeraza                           | 4                                | 1,007          | 0,767     | 1,205     |
| A0A212CAD5                         | Celaphus_00007608                          | APMAP                                  | Protein povezan s plazmatskom membranom adipocita    | 4                                | 1,004          | 0,923     | 1,082     |
| A0A212CDR6                         | Celaphus_00016310                          | RPL7                                   | 60S ribosomalni protein L7                           | 4                                | 0,931          | 0,659     | 1,218     |
| A0A212C9Z3                         | Celaphus_00010485                          | ABHD14B                                | Protein koji sadrži domenu abhidrolaze 14B           | 4                                | 0,967          | 0,871     | 1,102     |
| A0A212CJH4                         | Celaphus_00012835                          | COL6A2                                 | Kolagen VI, alfa 2 lanac                             | 4                                | 0,910          | 0,812     | 1,198     |
| A0A212C5Z2                         | Celaphus_00018842                          | MTHFD1                                 | C-1-tetrahidrofolat sintaza                          | 4                                | 1,121          | 0,819     | 1,247     |
| A0A212C811                         | Celaphus_00019160                          | ACAT2                                  | Acetil-CoA aciltransferaza 2                         | 4                                | 1,075          | 0,951     | 1,224     |
| A0A212CZ51                         | Celaphus_00007285                          | CYP3A4                                 | Citokrom P450 3A4*                                   | 4                                | 0,805          | 0,743     | 0,978     |
| A0A212CMV8                         | Celaphus_00016977                          | LOC530653                              | Žučna kiselina-CoA: aminokiselina N-aciltransferaza* | 4                                | 1,153          | 0,846     | 1,413     |
| A0A212DCB6                         | Celaphus_00004706                          | NUCB1                                  | Nukleobindin 1                                       | 3                                | 0,960          | 0,903     | 1,110     |
| A0A212DHC5                         | Celaphus_00013224                          | CCS                                    | Superoksid dismutaza bakar šaperon                   | 3                                | 0,927          | 0,875     | 1,074     |
| A0A212DD65                         | Celaphus_00004732                          | ALDH16A1                               | Aldehid dehidrogenaza 16, A1                         | 3                                | 1,126          | 0,954     | 1,251     |
| A0A212D859                         | Celaphus_00000259                          | RPL6                                   | 60S ribosomalni protein L6                           | 3                                | 0,967          | 0,843     | 1,091     |
| A0A212CNC7                         | Celaphus_00008582                          | LOC511498                              | Citokrom P450 2C19*                                  | 3                                | 0,779          | 0,646     | 0,881     |
| A0A212CV36                         | Celaphus_00006439                          | IVD                                    | Butiril-CoA dehidrogenaza                            | 3                                | 1,198          | 0,864     | 1,390     |
| A0A212D2B0                         | Celaphus_00003250                          | RAB11A                                 | Ras-srodan protein Rab-11A*                          | 3                                | 0,853          | 0,796     | 0,972     |
| A0A212DGZ8                         | Celaphus_00013113                          | CTSD                                   | Katepsin D   | 3                                | 1,218          | 1,030     | 1,329     |
| A0A212CP99                         | Celaphus_00008304                          | VCL                                    | Metavinculin   | 3                                | 0,857          | 0,786     | 1,020     |
| A0A212D3A3                         | Celaphus_00015018                          | TUBA4A                                 | Tubulin alfa lanac                                   | 3                                | 0,961          | 0,650     | 1,328     |
| A0A212CUV5                         | Celaphus_00006638                          | BHMT                                   | Betain-homocistein S-metiltransferaza 1              | 3                                | 0,951          | 0,807     | 1,097     |
| A0A212D857                         | Celaphus_00000915                          | SLC25A11                               | Nosač 2-oksoglutarata/malata                         | 3                                | 0,978          | 0,798     | 1,184     |
| A0A212D132                         | Celaphus_00003269                          | TUBB4A                                 | Tubulin beta lanac                                   | 3                                | 0,961          | 0,849     | 1,089     |
| A0A212DDG9                         | Celaphus_00004440                          | ACTN4                                  | Alfa-aktinin 4                                       | 3                                | 0,889          | 0,778     | 1,003     |
| A0A212CWU8                         | Celaphus_00005811                          | RPL31                                  | 60S ribosomalni protein L31                          | 3                                | 0,669          | 0,360     | 1,193     |
| A0A212D364                         | Celaphus_00014744                          | HSPG2                                  | Heparan sulfat proteoglikan 2*                       | 3                                | 0,847          | 0,818     | 0,934     |
| A0A212DCT4                         | Celaphus_00004797                          | VSIG10L                                | Protein koji sadrži domenu imunoglobulina*           | 3                                | 1,054          | 0,875     | 1,096     |
| A0A212D1B1                         | Celaphus_00003121                          | PRDX2                                  | Peroksiredoksin 2                                    | 3                                | 0,780          | 0,596     | 0,857     |
| A0A212CAB6                         | Celaphus_00010248                          | ACAA1                                  | Acetil-CoA aciltransferaza 1                         | 3                                | 1,154          | 1,062     | 1,278     |

| <b>Jedinstvena oznaka proteina</b> | <b>Oznaka gena (<i>Cervus elaphus</i>)</b> | <b>Oznaka gena (<i>Bos taurus</i>)</b> | <b>Naziv proteina</b>                                      | <b>Broj jedinstvenih peptida</b> | <b>Medijan</b> | <b>Q1</b> | <b>Q3</b> |
|------------------------------------|--|--|--|----------------------------------|----------------|-----------|-----------|
| A0A212CR39                         | Celaphus_00011126                          | PRDX6                                  | Peroksiredoksin 6  | 3                                | 1,092          | 1,024     | 1,147     |
| A0A212CE91                         | Celaphus_00016458                          | CA3                                    | Karboanhidraza   | 3                                | 1,188          | 1,024     | 1,700     |
| A0A212CKA1                         | Celaphus_00012146                          | PPIA                                   | Peptidil-prolil cis-trans isomeraza                        | 3                                | 1,127          | 0,935     | 1,280     |
| A0A212CD71                         | Celaphus_00013928                          | TPI1                                   | Triozafosfat izomeraza                                     | 3                                | 0,929          | 0,784     | 1,129     |
| A0A212D8T8                         | Celaphus_00000031                          | SLC25A1                                | Trikarboksilatni transportni protein                       | 3                                | 0,944          | 0,923     | 1,025     |
| A0A212CKH7                         | Celaphus_00012094                          | HIBADH                                 | 3-hidroksiizobutirat dehidrogenaza                         | 3                                | 1,151          | 0,975     | 1,386     |
| A0A212CX79                         | Celaphus_00005779                          | MOGS                                   | Manozil-oligosaharid glukozidaza*                          | 3                                | 1,028          | 0,825     | 1,172     |
| A0A212C6B8                         | Celaphus_00017828                          | LMAN1                                  | Lektin koji veže manozu 1                                  | 3                                | 0,853          | 0,756     | 0,979     |
| A0A212CI06                         | Celaphus_00002620                          | RPS8                                   | 40S ribosomalni protein S8                                 | 3                                | 0,879          | 0,623     | 1,219     |
| A0A212D8L8                         | Celaphus_00000128                          | SEC14L2                                | SEC14-like protein 2                                       | 3                                | 1,021          | 0,949     | 1,376     |
| A0A212CD44                         | Celaphus_00013784                          | RPL3                                   | 60S ribosomalni protein L3                                 | 3                                | 1,083          | 0,997     | 1,272     |
| A0A212C941                         | Celaphus_00010271                          | RPSA                                   | Ribosomalni protein SA                                     | 3                                | 1,020          | 0,836     | 1,174     |
| A0A212C8Z8                         | Celaphus_00010683                          |  | Ras-srodan protein rab-7a                                  | 3                                | 0,943          | 0,872     | 1,046     |
| A0A212C5J9                         | Celaphus_00018433                          | CLTA                                   | Klatrin, laki lanac  | 3                                | 0,991          | 0,917     | 1,079     |
| A0A212CUK9                         |  | ACTC1                                  | Aktin 1*   | 3                                | 0,985          | 0,880     | 1,062     |
| A0A212CZ96                         | Celaphus_00006696                          | HBA                                    | Hemoglobin alfa lanac                                      | 3                                | 1,096          | 0,800     | 1,672     |
| A0A212CYP4                         | Celaphus_00007152                          | GUSB                                   | Beta-glukuronidaza   | 3                                | 1,039          | 0,811     | 1,120     |
| A0A212CEZ4                         | Celaphus_00001925                          | PKLR                                   | Piruvat kinaza   | 3                                | 0,977          | 0,891     | 1,065     |
| A0A212CNQ0                         | Celaphus_00008734                          | PRDX3                                  | Peroksiredoksin 3  | 3                                | 0,960          | 0,855     | 1,209     |
| A0A212D5P1                         | Celaphus_00017440                          | LOC530553                              | UDP-glukuronoziltransferaza*                               | 3                                | 1,028          | 0,832     | 1,319     |
| A0A212C8I9                         | Celaphus_00018114                          | CMBL                                   | Homolog karboksimetilenbutenolidaze                        | 3                                | 1,018          | 0,888     | 1,074     |
| A0A212D3B1                         | Celaphus_00015013                          | DNPEP                                  | Aspartil aminopeptidaza                                    | 3                                | 0,885          | 0,856     | 0,927     |
| A0A212D5S9                         | Celaphus_00017260                          | QDPR                                   | Dihidropteridin reduktaza                                  | 3                                | 0,898          | 0,866     | 0,998     |
| A0A212CY37                         | Celaphus_00006874                          | NMRAL1                                 | Protein koji sadrži NmrA-like domenu 1                     | 3                                | 1,123          | 0,969     | 1,232     |
| A0A212CNR5                         | Celaphus_00008506                          | CYP2C87                                | Citokrom P450 2C18*  | 3                                | 0,750          | 0,672     | 0,847     |
| A0A212CVP8                         | Celaphus_00005485                          | CCT4                                   | T-kompleks protein 1 podjedinica delta                     | 3                                | 1,027          | 0,634     | 1,128     |
| A0A212CEC2                         | SNRPD1                                     | SNRPD1                                 | Mali nuklearni ribonukleoprotein Sm D1                     | 3                                | 0,911          | 0,750     | 1,272     |
| A0A212CT25                         |  | SEC11A                                 | Katalitička podjedinica kompleksa signalne peptidaze SEC11 | 3                                | 0,962          | 0,822     | 1,030     |

| <b>Jedinstvena oznaka proteina</b> | <b>Oznaka gena (<i>Cervus elaphus</i>)</b> | <b>Oznaka gena (<i>Bos taurus</i>)</b> | <b>Naziv proteina</b>  | <b>Broj jedinstvenih peptida</b> | <b>Medijan</b> | <b>Q1</b> | <b>Q3</b> |
|------------------------------------|--|--|--|----------------------------------|----------------|-----------|-----------|
| A0A212DI17                         | Celaphus_00009386                          | NDUFS3                                 | Kompleks I-30kD  | 3                                | 1,051          | 0,880     | 1,175     |
| A0A212DAA6                         | Celaphus_00000146                          | NIPSNAP1                               | Protein koji sadrži NIPSNAP domenu                                 | 3                                | 1,295          | 0,905     | 1,563     |
| A0A212CAX0                         | Celaphus_00007763                          | RPS21                                  | 40S ribosomalni protein S21  | 3                                | 1,127          | 0,942     | 1,180     |
| A0A212DEV2                         | Celaphus_00011809                          | HSP90B1                                | Endoplasmin  | 3                                | 1,207          | 0,981     | 1,271     |
| A0A212CSB5                         | Celaphus_00015433                          | SEC23A                                 | Transportni protein SEC23  | 3                                | 1,125          | 0,925     | 1,183     |
| A0A212CEU6                         | Celaphus_00016416                          | RPL30                                  | 60S ribosomal protein L30  | 3                                | 0,970          | 0,861     | 1,082     |
| A0A212D9E9                         | Celaphus_00000616                          | SRSF1                                  | Serinom/argininom bogati faktor spajanja 1                         | 3                                | 0,964          | 0,912     | 1,053     |
| A0A212CZ50                         | Celaphus_00006958                          | RPS15A                                 | 40S ribosomalni protein S15a                                       | 3                                | 0,957          | 0,829     | 1,319     |
| A0A212D1I1                         | Celaphus_00002878                          | CANX                                   | Kalneksin  | 3                                | 0,974          | 0,770     | 1,280     |
| A0A212CTV3                         | Celaphus_00006521                          | PSME1                                  | Aktivator proteasoma, podjedinica 1                                | 3                                | 1,145          | 1,095     | 1,159     |
| A0A212CK87                         | Celaphus_00011876                          | PON3                                   | Paraoksonaza   | 3                                | 1,274          | 1,034     | 1,508     |
| A0A212D0Y2                         | Celaphus_00003207                          | PRKCSH                                 | Glukozidaza 2 beta   | 3                                | 1,051          | 0,895     | 1,221     |
| A0A212BZH7                         | Celaphus_00009899                          | UBA1                                   | Enzim aktivator ubikvitina E1                                      | 3                                | 0,969          | 0,911     | 0,996     |
| A0A212D0J6                         | Celaphus_00002882                          | HNRNPH1                                | Nuklearni ribonukleoprotein H1                                     | 3                                | 1,096          | 0,922     | 1,176     |
| A0A212CIB6                         | Celaphus_00002288                          | AGL                                    | Enzim koji razgranava glikogen                                     | 3                                | 1,061          | 0,988     | 1,193     |
| A0A212D0W4                         | Celaphus_00002892                          | H2BC26                                 | Histon H2B   | 3                                | 1,090          | 0,335     | 1,794     |
| A0A212D4M8                         | Celaphus_00014441                          | VAR51                                  | Valil-tRNA sintetaza   | 3                                | 0,795          | 0,712     | 0,896     |
| A0A212D4G8                         | Celaphus_00014402                          | GSTA1                                  | Glutation S-transferaza A1   | 3                                | 0,964          | 0,831     | 1,092     |
| A0A212CHJ3                         | Celaphus_00002466                          | PGM1                                   | Fosfoglukomutaza-1   | 3                                | 1,020          | 0,935     | 1,175     |
| A0A212D8E0                         | Celaphus_00001379                          | RPL27                                  | 60S ribosomalni protein L27  | 3                                | 0,807          | 0,612     | 1,146     |
| A0A212CLT2                         | Celaphus_00018592                          | MTTP                                   | Velika podjedinica mikrosomalnog prijenosnog proteina triglicerida | 3                                | 1,083          | 0,902     | 1,225     |
| A0A212CFB1                         | Celaphus_00002851                          | HDLBP                                  | Protein koji veže lipoproteine visoke gustoće                      | 3                                | 1,012          | 0,941     | 1,050     |
| A0A212D262                         | Celaphus_00003638                          | HSPA9                                  | Protein toplinskog šoka 70 kda                                     | 3                                | 0,972          | 0,837     | 1,275     |
| A0A212CQF6                         | Celaphus_00010984                          | ENO1                                   | 2-fosfo-D-glicerat hidroliza                                       | 3                                | 0,932          | 0,852     | 1,163     |
| A0A212DHQ7                         | Celaphus_00009421                          | LOC104974345                           | Protein sličan glicin N-aciltransferazi                            | 3                                | 1,224          | 0,935     | 1,521     |
| A0A212CZF2                         | Celaphus_00007198                          |  | Citokrom P450 reduktaza  | 3                                | 0,985          | 0,832     | 1,277     |
| A0A212DH75                         | Celaphus_00013098                          | TALDO1                                 | Transaldolaza  | 3                                | 1,009          | 0,915     | 1,182     |
| A0A212DF00                         | Celaphus_00011494                          | METTL7A                                | Metiltransferazi sličan protein 7A                                 | 3                                | 1,189          | 0,728     | 1,382     |

| Jedinstvena oznaka proteina | Oznaka gena ( <i>Cervus elaphus</i> ) | Oznaka gena ( <i>Bos taurus</i> ) | Naziv proteina  | Broj jedinstvenih peptida | Medijan | Q1    | Q3    |
|-----------------------------|---------------------------------------|-----------------------------------|---|---------------------------|---------|-------|-------|
| A0A212C9M8                  | Celaphus_00010324                     | ARPC4                             | Aktinu-srodan protein 2/3 kompleks podjedinica 4*                     | 3                         | 1,121   | 0,903 | 1,220 |
| A0A212D692                  | Celaphus_00017453                     | LOC100138004                      | UDP-glukuronoziltransferaza*  | 3                         | 1,081   | 0,751 | 1,308 |
| A0A212CPS8                  | Celaphus_00008502                     | CYP2C281                          | Citokrom P450 2C81*   | 3                         | 0,967   | 0,727 | 1,265 |
| A0A212D8N6                  | Celaphus_00000944                     | ASGR1                             | Asialoglikoprotein receptor 1   | 3                         | 1,060   | 0,764 | 1,217 |
| A0A212DDZ1                  | Celaphus_00004606                     | LOC508455                         | Estradiol 17-beta-dehidrogenaza 12*                                   | 3                         | 1,012   | 0,873 | 2,181 |
| A0A212BZP0                  | Celaphus_00009647                     | BGN                               | Biglikan  | 3                         | 0,870   | 0,735 | 0,966 |
| A0A212CDV9                  | Celaphus_00016402                     | PABPC1                            | Poliadenilat-vezajući protein   | 3                         | 1,017   | 0,947 | 1,124 |
| A0A212C9G3                  | Celaphus_00010446                     | TKT                               | Transketolaza   | 3                         | 0,890   | 0,831 | 0,988 |
| A0A212CUW8                  | Celaphus_00006289                     | PYGL                              | Alfa-1,4 glikan fosforilaza   | 3                         | 1,002   | 0,789 | 1,107 |
| A0A212CVC6                  | Celaphus_00006662                     | SFXN1                             | Siderofleksin-1   | 3                         | 1,027   | 0,841 | 1,208 |
| A0A212C9D9                  | Celaphus_00010684                     | RPN1                              | Dolicil-difosfooligosaharid-protein glikoziltransferaza podjedinica 1 | 3                         | 1,131   | 0,870 | 1,424 |
| A0A212CPU1                  | Celaphus_00008344                     | MAT1A                             | S-adenozilmetionin sintaza  | 3                         | 0,920   | 0,819 | 1,235 |
| A0A212CP93                  | Celaphus_00008664                     | ECHS1                             | Enoil-CoA hidrataza, mitohondrijska                                   | 3                         | 1,250   | 1,027 | 1,764 |
| A0A212CRB3                  | Celaphus_00010878                     | HNRNPU                            | Heterogeni nuklearni ribonukleoprotein U                              | 3                         | 0,704   | 0,590 | 0,761 |
| A0A212CNC6                  | Celaphus_00016902                     | ORM1                              | Alfa-1-kiseli glikoprotein  | 3                         | 1,470   | 0,828 | 1,553 |
| A0A212CXT4                  | Celaphus_00005686                     | GALM                              | Galaktoza mutarotaza  | 3                         | 1,167   | 1,029 | 1,259 |
| A0A212C2R1                  | Celaphus_00019253                     | SLC25A4                           | ADP/ATP translokaza   | 3                         | 0,919   | 0,693 | 1,077 |
| A0A212DAD9                  | Celaphus_00000921                     | PSMB6                             | Proteasomska podjedinica beta   | 3                         | 0,943   | 0,750 | 1,276 |
| A0A212CDG3                  | Celaphus_00013723                     | CYB5R3                            | NADH-citokrom b5 reduktaza  | 3                         | 0,821   | 0,749 | 0,878 |
| A0A212CNM9                  | Celaphus_00008347                     | PRXL2A                            | Peroksiredoksinu sličan protein 2A                                    | 2                         | 1,036   | 0,977 | 1,198 |
| A0A212BZP9                  | Celaphus_00009657                     | SSR4                              | Receptor signalne sekvence, podjedinica delta                         | 2                         | 0,569   | 0,416 | 0,644 |
| A0A212CBU4                  | Celaphus_00007629                     | AKR1C3                            | Protein koji sadrži aldo_ket_red domenu                               | 2                         | 1,084   | 1,011 | 1,131 |
| A0A212CMG6                  | Celaphus_00017104                     | GULO                              | L-gulono-gama-lakton oksidaza   | 2                         | 0,954   | 0,940 | 1,002 |
| A0A212CK59                  | Celaphus_00011836                     | DDC                               | Dopa dekarboksilaza   | 2                         | 0,798   | 0,686 | 1,070 |
| A0A212D6M5                  | Celaphus_00001079                     | ALDH3A2                           | Aldehid dekarboksilaza  | 2                         | 1,018   | 0,877 | 1,194 |
| A0A212CLY1                  | Celaphus_00018684                     |                                   | ATP sintaza podjedinica d   | 2                         | 0,885   | 0,836 | 1,133 |
| A0A212DIA5                  | Celaphus_00008990                     | SLC37A4                           | Topljivi nosač 37, član 4   | 2                         | 1,178   | 0,871 | 1,383 |
| A0A212DEZ7                  | Celaphus_00011438                     | KRT18                             | Keratin 18  | 2                         | 0,756   | 0,654 | 1,197 |

| <b>Jedinstvena oznaka proteina</b> | <b>Oznaka gena (<i>Cervus elaphus</i>)</b> | <b>Oznaka gena (<i>Bos taurus</i>)</b> | <b>Naziv proteina</b>                               | <b>Broj jedinstvenih peptida</b> | <b>Medijan</b> | <b>Q1</b> | <b>Q3</b> |
|------------------------------------|--|--|---|----------------------------------|----------------|-----------|-----------|
| A0A212D7Q6                         | Celaphus_00000913                          | PFN1                                   | Profilin  | 2                                | 0,988          | 0,758     | 1,081     |
| A0A212CKH3                         | Celaphus_00012361                          | GSTK1                                  | Glutation S-transferaza kappa                       | 2                                | 1,344          | 1,025     | 1,500     |
| A0A212C541                         | Celaphus_00018420                          | TPM2                                   | Tropomiozin beta lanac*                             | 2                                | 0,831          | 0,774     | 1,035     |
| A0A212C2D7                         | Celaphus_00015701                          | HNRNPA3                                | Heterogeni nuklearni ribonukleoprotein A3           | 2                                | 0,890          | 0,795     | 1,075     |
| A0A212D400                         | Celaphus_00015103                          | IDH1                                   | Izocitrat dehidrogenaza [NADP]                      | 2                                | 0,980          | 0,849     | 1,304     |
| A0A212CVS3                         | Celaphus_00005440                          | PCBP2                                  | Poly(rC)-vezajući protein 2                         | 2                                | 0,886          | 0,820     | 0,972     |
| A0A212D6Z1                         | Celaphus_00001124                          | NME1-1                                 | Nukleozid difosfat kinaza                           | 2                                | 1,041          | 0,949     | 1,126     |
| A0A212DEB7                         | Celaphus_00011771                          | SLC25A3                                | Nosač fosfata, mitohondrijski                       | 2                                | 0,934          | 0,748     | 1,299     |
| A0A212CJ19                         | Celaphus_00013026                          | CP                                     | Ceruloplazmin                                       | 2                                | 0,735          | 0,568     | 0,869     |
| A0A212CJ78                         | Celaphus_00012495                          | SLC2A2                                 | Transporter glukoze tip 2, jetreni                  | 2                                | 0,866          | 0,756     | 1,038     |
| A0A212DBQ3                         | Celaphus_00004552                          | RPS19                                  | 40S ribosomal protein S19                           | 2                                | 0,986          | 0,450     | 1,388     |
| A0A212CK37                         | Celaphus_00012269                          |  | Kaldesmon 1   | 2                                | 1,202          | 1,072     | 1,334     |
| A0A212CFT3                         | Celaphus_00002108                          |  | Homolog B proteina koji prenosi vezikule SEC22      | 2                                | 0,959          | 0,783     | 1,044     |
| A0A212CPD6                         | Celaphus_00008296                          | SEC24C                                 | SEC24 homolog C, komponenta kompleksa omotača COPII | 2                                | 0,949          | 0,841     | 1,172     |
| A0A212D000                         | Celaphus_00003504                          | RACK1                                  | Receptor aktivirane protein C kinaze 1*             | 2                                | 0,958          | 0,881     | 1,102     |
| A0A212D4U0                         | Celaphus_00014274                          | GLO1                                   | Glioksalaza I                                       | 2                                | 0,875          | 0,723     | 1,043     |
| A0A212D3D4                         | Celaphus_00014930                          | AK2                                    | Adenilat kinaza 2, mitohondrijska                   | 2                                | 0,934          | 0,854     | 1,032     |
| A0A212DB85                         | Celaphus_00001509                          | ARHGDI A                               | Inhibitor Rho GDP-disocijacije 1                    | 2                                | 1,068          | 0,914     | 1,269     |
| A0A212DDG4                         | Celaphus_00004290                          | CYB5B                                  | Citokrom b5 tip B                                   | 2                                | 1,026          | 0,947     | 1,507     |
| A0A212DC26                         | Celaphus_00004144                          | BREH1                                  | Hidrolaza karboksilnog estera                       | 2                                | 0,752          | 0,608     | 0,909     |
| A0A212CGC1                         | Celaphus_00002481                          | LOC521656                              | Citokrom P450 2J2*                                  | 2                                | 1,108          | 0,886     | 1,348     |
| A0A212CDI0                         | Celaphus_00013927                          | USP5                                   | Ubikvitin karboksil-terminalna hidrolaza            | 2                                | 0,919          | 0,820     | 1,007     |
| A0A212CS11                         | Celaphus_00015353                          | COX5A                                  | Citokrom c oksidaza polipeptid Va                   | 2                                | 0,857          | 0,802     | 0,934     |
| A0A212CIV5                         | Celaphus_00012723                          | NDUFB4                                 | Kompleks I-B15                                      | 2                                | 1,008          | 0,963     | 1,154     |
| A0A212DGN4                         | Celaphus_00013212                          | PC                                     | Piruvat karboksilaza                                | 2                                | 0,693          | 0,638     | 0,909     |
| A0A212CBQ8                         | Celaphus_00007968                          | TGM2                                   | Protein-glutamin gama-glutamiltransferaza 2         | 2                                | 1,444          | 1,061     | 1,727     |
| A0A212DDR2                         | Celaphus_00004702                          | HSD17B14                               | 17-beta-hidroksisteroid dehidrogenaza 14            | 2                                | 0,749          | 0,595     | 1,492     |
| A0A212D1P4                         | Celaphus_00003458                          | CLTB                                   | Klatrin, laki lanac                                 | 2                                | 1,026          | 0,969     | 1,136     |

| <b>Jedinstvena oznaka proteina</b> | <b>Oznaka gena (<i>Cervus elaphus</i>)</b> | <b>Oznaka gena (<i>Bos taurus</i>)</b> | <b>Naziv proteina</b>                    | <b>Broj jedinstvenih peptida</b> | <b>Medijan</b> | <b>Q1</b> | <b>Q3</b> |
|------------------------------------|--|--|--|----------------------------------|----------------|-----------|-----------|
| A0A212CXC3                         | Celaphus_00005661                          | HAAO                                   | 3-hidroksiantranilat 3,4-dioksigenaza    | 2                                | 0,977          | 0,864     | 1,086     |
| A0A212C8F9                         | Celaphus_00018012                          | NNT                                    | NAD(P) transhidrogenaza, mitohondrijska  | 2                                | 1,028          | 0,848     | 1,343     |
| A0A212DC96                         | Celaphus_00004667                          | SULT2A1                                | Sulfotransferaza                         | 2                                | 0,566          | 0,439     | 0,732     |
| A0A212D765                         | Celaphus_00001014                          | MYH10                                  | Protein koji sadrži miozin motor domenu  | 2                                | 1,012          | 0,838     | 1,079     |
| A0A212CUX4                         | Celaphus_00006267                          | PPIB                                   | Peptidil-proлил cis-trans izomeraza      | 2                                | 0,877          | 0,806     | 1,151     |
| A0A212CTJ3                         | Celaphus_00006011                          | ACOT2                                  | Acil-koenzim A tioesteraza 2             | 2                                | 0,552          | 0,452     | 0,719     |
| A0A212D1Q1                         | Celaphus_00003477                          | LMAN2                                  | Lektin koji veže manozu 2                | 2                                | 1,105          | 0,971     | 1,200     |
| A0A212CE83                         | Celaphus_00016135                          | NAPRT                                  | Nikotinat fosforiboziltransferaza        | 2                                | 1,007          | 0,960     | 1,100     |
| A0A212CX23                         | Celaphus_00005504                          | RETSAT                                 | Retinol saturaza                         | 2                                | 1,020          | 0,908     | 1,159     |
| A0A212D040                         |  |  | 40S ribosomalni protein S14*             | 2                                | 1,044          | 0,541     | 1,388     |
| A0A212CN58                         | Celaphus_00016877                          | STOM                                   | Protein koji sadrži PHB domenu           | 2                                | 0,648          | 0,548     | 0,874     |
| A0A212CYL4                         | Celaphus_00007284                          | CYP3A76                                | Citokrom P450 3A*                        | 2                                | 0,893          | 0,727     | 1,048     |
| A0A212D7B8                         | Celaphus_00001373                          | AOC3                                   | Amin oksidaza                            | 2                                | 0,888          | 0,819     | 1,040     |
| A0A212D310                         | Celaphus_00015017                          |  | Tubulin alfa lanac                       | 2                                | 0,934          | 0,772     | 1,291     |
| A0A212D2W9                         | Celaphus_00003293                          | RPL36                                  | 60S ribosomalni protein L36              | 2                                | 1,017          | 0,874     | 1,219     |
| A0A212CNV8                         | Celaphus_00008161                          | ACTN2                                  | Alfa-aktinin-2                           | 2                                | 0,981          | 0,873     | 1,207     |
| A0A212CV77                         | Celaphus_00006637                          | BHMT                                   | Betaine-homocistein S-metiltransferaza 1 | 2                                | 0,981          | 0,858     | 1,121     |
| A0A212C6Z7                         | Celaphus_00017747                          | EEF1A1                                 | Elongacijski faktor 1 alfa 1*            | 2                                | 1,051          | 0,758     | 1,194     |
| A0A212CBP9                         | Celaphus_00007632                          | AKR1C4                                 | Protein koji sadrži aldo_ket_red domenu  | 2                                | 1,002          | 0,902     | 1,106     |
| A0A212CPK9                         | Celaphus_00008550                          | PGAM1                                  | Fosfoglicerat mutaza                     | 2                                | 0,768          | 0,522     | 1,136     |
| A0A212DFV1                         | Celaphus_00013242                          | RAB1B                                  | Ras-srodni protein Rab-1B                | 2                                | 0,978          | 0,907     | 1,088     |
| A0A212D8V1                         | Celaphus_00000231                          | MLEC                                   | Malektin                                 | 2                                | 1,003          | 0,956     | 1,071     |
| A0A212CH34                         | Celaphus_00002320                          | RPL5                                   | 60S ribosomalni protein L5               | 2                                | 1,253          | 1,103     | 1,460     |
| A0A212CWP5                         | Celaphus_00005755                          | CCT7                                   | T-kompleks protein 1 podjedinica eta     | 2                                | 1,004          | 0,894     | 1,160     |
| A0A212CLV1                         | Celaphus_00018552                          | HADH                                   | Hidroksiacil-CoA dehidrogenaza           | 2                                | 1,064          | 0,974     | 1,385     |
| A0A212BZD0                         | Celaphus_00009806                          | PLS3                                   | Plastin 3                                | 2                                | 1,088          | 0,954     | 1,410     |
| A0A212CYR7                         | Celaphus_00006979                          | ACSM3                                  | Acil-CoA sintetaza srednjih lanaca 3     | 2                                | 0,807          | 0,639     | 0,967     |
| A0A212C0F3                         | Celaphus_00009540                          | HPRT1                                  | Hipoksantin fosforiboziltransferaza      | 2                                | 1,187          | 1,016     | 1,504     |



| Jedinstvena oznaka proteina | Oznaka gena ( <i>Cervus elaphus</i> ) | Oznaka gena ( <i>Bos taurus</i> ) | Naziv proteina                                | Broj jedinstvenih peptida | Medijan | Q1    | Q3    |
|-----------------------------|---------------------------------------|-----------------------------------|---|---------------------------|---------|-------|-------|
| A0A212CAD2                  | Celaphus_00007638                     | LOC782884                         | Protein koji sadrži aldo_ket_red domenu       | 2                         | 1,189   | 1,125 | 1,398 |
| A0A212CDF2                  | Celaphus_00014131                     |                                   | Miozin-9                                      | 2                         | 0,884   | 0,797 | 0,952 |
| A0A212BZG4                  | Celaphus_00010170                     |                                   | Ribosomalni protein L15                       | 2                         | 0,862   | 0,743 | 1,256 |
| A0A212CX28                  | Celaphus_00005433                     | EHD3                              | Protein koji sadrži EH domenu 3               | 2                         | 0,957   | 0,891 | 1,004 |
| A0A212C1V5                  | Celaphus_00015734                     | FMO3                              | Flavin monooksigenaza                         | 2                         | 0,901   | 0,794 | 1,126 |
| A0A212CYS5                  | Celaphus_00007293                     | ATP5MF                            | ATP sintaza membranska podjedinica f          | 2                         | 1,083   | 1,020 | 1,195 |
| A0A212CE01                  | CYP7B1                                | CYP7B1                            | Citokrom P450 7B1*                            | 2                         | 0,922   | 0,838 | 1,037 |
| A0A212DJ88                  | Celaphus_00009236                     | SPCS2                             | Mikrosomalna signalna peptidaza, 25 kDa       | 2                         | 1,222   | 1,132 | 1,316 |
| A0A212CB40                  | Celaphus_00007506                     | PHYH                              | Fitanoil-CoA dioksidgenaza, peroksisomalna    | 2                         | 1,077   | 0,813 | 1,231 |
| A0A212C5H4                  | Celaphus_00018263                     |                                   | 40S ribosomalni protein S6                    | 2                         | 0,895   | 0,779 | 1,006 |
| A0A212DHN1                  | Celaphus_00009124                     | TPP1                              | Tripeptidil aminopeptidaza                    | 2                         | 0,986   | 0,798 | 1,114 |
| A0A212CNF3                  | Celaphus_00008767                     | ACADSB                            | Acil-CoA dehidrogenaza kratkih lanaca         | 2                         | 0,881   | 0,739 | 0,915 |
| A0A212C8W4                  | Celaphus_00010247                     | ACAA1                             | Acetil-CoA aciltransferaza 1                  | 2                         | 1,096   | 0,900 | 1,339 |
| A0A212DA88                  | Celaphus_00000127                     | SEC14L3                           | SEC14-like protein 3*                         | 2                         | 1,112   | 0,901 | 1,253 |
| A0A212CKS4                  | Celaphus_00012107                     | HNRNPA2B1                         | Heterogeni nuklearni ribonukleoproteini A2/B1 | 2                         | 0,870   | 0,724 | 0,949 |
| A0A212CQ58                  | Celaphus_00008289                     | ANXA7                             | Aneksin                                       | 2                         | 0,973   | 0,812 | 1,047 |
| A0A212CIZ9                  | Celaphus_00012837                     | COL6A1                            | Kolagen 6 alfa 1 lanac                        | 2                         | 0,905   | 0,836 | 0,955 |
| A0A212C359                  | Celaphus_00019509                     | CPOX                              | Koproporfirinogen oksidaza                    | 2                         | 1,222   | 0,805 | 1,385 |
| A0A212D793                  | Celaphus_00001320                     | KRT13                             | Keratin tip 13                                | 2                         | 1,089   | 0,932 | 1,259 |
| A0A212CP48                  | Celaphus_00008571                     | GOT1                              | Aspartat transaminaza                         | 2                         | 1,111   | 0,934 | 1,292 |
| A0A212CLK7                  | Celaphus_00011897                     | NDUFA4                            | Komponenta citokrom c oksidaze                | 2                         | 1,073   | 0,787 | 1,248 |
| A0A212CPE8                  | Celaphus_00008657                     | LOC785216                         | Glutation-ovisna dehidroaskorbat reduktaza    | 2                         | 0,883   | 0,817 | 1,025 |
| A0A212C6J5                  | Celaphus_00017573                     | CYB5A                             | Citokrom b5                                   | 2                         | 0,965   | 0,855 | 1,185 |
| A0A212CMR4                  | Celaphus_00016880                     |                                   | RAB14 GTPaza                                  | 2                         | 0,785   | 0,759 | 0,865 |
| A0A212CRL1                  | Celaphus_00011257                     | HSD11B1                           | Hidroksisteroid 11-beta dehidrogenaza 1       | 2                         | 1,045   | 0,958 | 1,123 |
| A0A212D6C8                  | Celaphus_00017451                     | LOC615303                         | UDP-glukuronoziltransferaza*                  | 2                         | 0,685   | 0,549 | 0,876 |
| A0A212CVB9                  | Celaphus_00006481                     | RAB2B                             | Ras-srodni protein Rab-2B                     | 2                         | 1,013   | 0,928 | 1,104 |
| A0A212DBU2                  | Celaphus_00004564                     | ETHE1                             | Persulfid dioksidgenaza                       | 2                         | 1,072   | 0,984 | 1,234 |

| <b>Jedinstvena oznaka proteina</b> | <b>Oznaka gena (<i>Cervus elaphus</i>)</b> | <b>Oznaka gena (<i>Bos taurus</i>)</b> | <b>Naziv proteina</b>  | <b>Broj jedinstvenih peptida</b> | <b>Medijan</b> | <b>Q1</b> | <b>Q3</b> |
|------------------------------------|--|--|--|----------------------------------|----------------|-----------|-----------|
| A0A212DCJ8                         | Celaphus_00004397                          | BLVRB                                  | Flavin reduktaza (NADPH)   | 2                                | 1,009          | 0,942     | 1,151     |
| A0A212C3H8                         | Celaphus_00019518                          | NIT2                                   | Omega-amidaza  | 2                                | 1,001          | 0,894     | 1,161     |
| A0A212DEC6                         | Celaphus_00011636                          | GNS                                    | N-acetilglukozamin-6-sulfataza   | 2                                | 1,109          | 0,974     | 1,238     |
| A0A212D225                         | Celaphus_00003489                          | TMED9                                  | Transmembranski protein koji sadrži emp24 domenu 9                       | 2                                | 0,983          | 0,892     | 1,220     |
| A0A212D7Z4                         | Celaphus_00000305                          | PEBP1                                  | Fosfatidiletanolamin-vezajući protein 1                                  | 2                                | 1,085          | 0,985     | 1,362     |
| A0A212D6K0                         | Celaphus_00017441                          | LOC53055                               | UDP-glukuronoziltransferaza 2B15*  | 2                                | 0,965          | 0,758     | 1,271     |
| A0A212C3I7                         | Celaphus_00019408                          | ATP5PO                                 | ATP sintaza periferna stabljična podjedinica OSCP                        | 2                                | 0,889          | 0,846     | 0,988     |
| A0A212D672                         | Celaphus_00017446                          | LOC540544                              | UDP-glukuronoziltransferaza 2B4*   | 2                                | 1,015          | 0,785     | 1,173     |
| A0A212CG33                         | Celaphus_00002226                          | GSTM4                                  | Glutation transferaza  | 2                                | 0,937          | 0,709     | 1,327     |
| A0A212DF17                         | Celaphus_00011688                          | RDH16                                  | Retinol dehidrogenaza 16   | 2                                | 0,783          | 0,674     | 0,962     |
| A0A212CIP3                         | Celaphus_00012935                          | TF                                     | Serotransferin   | 2                                | 0,883          | 0,812     | 0,928     |
| A0A212D0J8                         | Celaphus_00003599                          | SAR1B                                  | GTP-vezajući protein SAR1b   | 2                                | 0,938          | 0,900     | 1,223     |
| A0A212DA16                         | Celaphus_00001650                          | ATP5PD                                 | ATP sintaza podjedinica d  | 2                                | 1,207          | 1,169     | 1,461     |
| A0A212CEW6                         | Celaphus_00002028                          | PSMB4                                  | Proteasomska podjedinica beta  | 2                                | 1,128          | 0,895     | 1,326     |
| A0A212DFB7                         | Celaphus_00011454                          | KRT6A                                  | Keratin tip 6A   | 2                                | 0,751          | 0,689     | 1,029     |
| A0A212D1A9                         | Celaphus_00003081                          | DDX39A                                 | RNA helikaza   | 2                                | 0,967          | 0,850     | 1,055     |
| A0A212CV82                         | Celaphus_00006465                          | DAD1                                   | Dolicil-difosfooligosaharid-podjedinica protein glikoziltransferaze DAD1 | 2                                | 1,021          | 0,852     | 1,083     |
| A0A212DHB2                         | Celaphus_00013101                          | SLC25A22                               | Mitohondrijski nosač glutamata 1   | 2                                | 1,266          | 0,879     | 1,348     |
| A0A212DB08                         | Celaphus_00001212                          | RPL23                                  | 60S ribosomal protein L23  | 2                                | 0,898          | 0,771     | 1,189     |
| A0A212CYM9                         | Celaphus_00006903                          | ABAT                                   | 4-aminobutirat aminotransferaza  | 2                                | 1,075          | 0,895     | 1,321     |
| A0A212D157                         | Celaphus_00003367                          | TIMM13                                 | Translokaza mitohondrijske unutarnje membrane                            | 2                                | 1,070          | 0,830     | 1,137     |
| A0A212C784                         | Celaphus_00017689                          | MYL9                                   | Miozin regulatorni laki polipeptid 9                                     | 2                                | 0,974          | 0,871     | 1,028     |
| A0A212CVQ3                         | Celaphus_00005860                          | FAHD2                                  | Protein koji sadrži FAA domenu 2A  | 2                                | 0,971          | 0,950     | 1,154     |
| A0A212DIQ1                         | Celaphus_00008991                          | HYOU1                                  | Hipoksija up-regulated protein 1   | 2                                | 0,976          | 0,939     | 1,061     |
| A0A212D5M3                         | Celaphus_00017452                          | LOC615303                              | UDP-glukuronoziltransferaza*   | 2                                | 0,902          | 0,756     | 1,074     |
| A0A212C911                         | Celaphus_00010378                          | SUCLG2                                 | Sukcinat-CoA ligaza, podjedinica beta                                    | 2                                | 1,143          | 0,853     | 1,228     |
| A0A212CAH5                         | Celaphus_00007620                          | GDI2                                   | Inhibitor Rab GDP disocijacije   | 2                                | 0,945          | 0,866     | 0,999     |
| A0A212DFC4                         | Celaphus_00011617                          | RAP1B                                  | Ras-srodan protein Rap-1b  | 2                                | 1,178          | 1,069     | 1,394     |

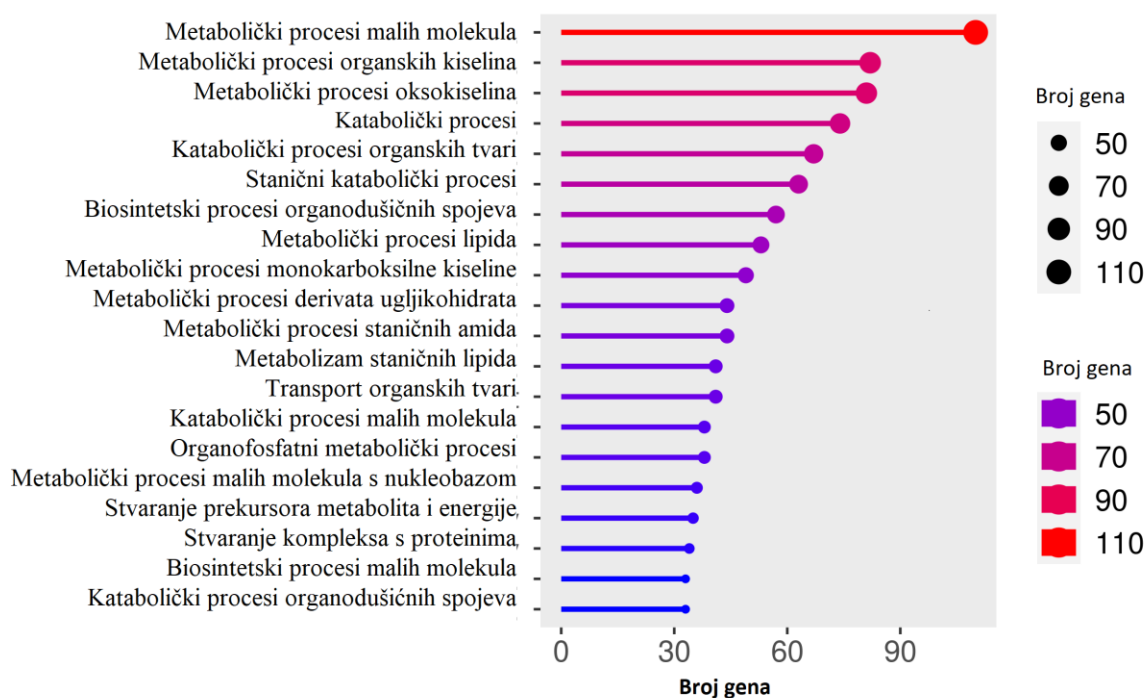
| <b>Jedinstvena oznaka proteina</b> | <b>Oznaka gena (<i>Cervus elaphus</i>)</b> | <b>Oznaka gena (<i>Bos taurus</i>)</b> | <b>Naziv proteina</b>          | <b>Broj jedinstvenih peptida</b> | <b>Medijan</b> | <b>Q1</b> | <b>Q3</b> |
|------------------------------------|--|--|--------------------------------|----------------------------------|----------------|-----------|-----------|
| A0A212DD89                         | Celaphus_00004048                          | APRT                                   | Adenin fosforiboziltransferaza | 2                                | 0,903          | 0,829     | 0,949     |

\*nakon BLAST analize

### 5.2.1. FUNKCIONALNA ANALIZA PROTEINA JETRE JELENA OBIČNOG

Identifikacijski brojevi proteina jetre upareni su s 365 jedinstvena gena. Analiza genske ontologije napravljena je s pomoću bioinformatičkog alata ShinyGO 0.76.3. Za svaku ontologiju prikazano je prvih 20 pojmova koji su uključivali najveći broj gena.

Genska ontologija za biološki proces pokazala je da je najveći broj gena uključen u različite metaboličke procese, kao što su metabolizam malih molekula (N = 110), metabolizam organskih kiselina (N = 82), katabolički procesi (N = 74), metabolizam lipida (N = 53) i ostali (Slika 14). Značajno je spomenuti i procese transporta organskih tvari (N = 41), te stvaranja prekursora metabolita i energije (N = 35). Detaljan prikaz bioloških procesa i gena uključenih u pojedini proces dan je u Tablici 7.



**Slika 14.** Grafički prikaz prvih 20 pojmova genske ontologije za biološke procese u koje su uključeni proteini jetre jelena običnog. Boja i veličina kružića odgovara broju gena uključenih u odgovarajući proces.

**Tablica 7.** Analiza genske ontologije (GO) za biološke procese u jetri jelena običnog. Prikazan je naziv i oznaka procesa, broj i oznake uključenih gena. Puni nazivi gena odnosno proteina nalaze se u Tablici 6.

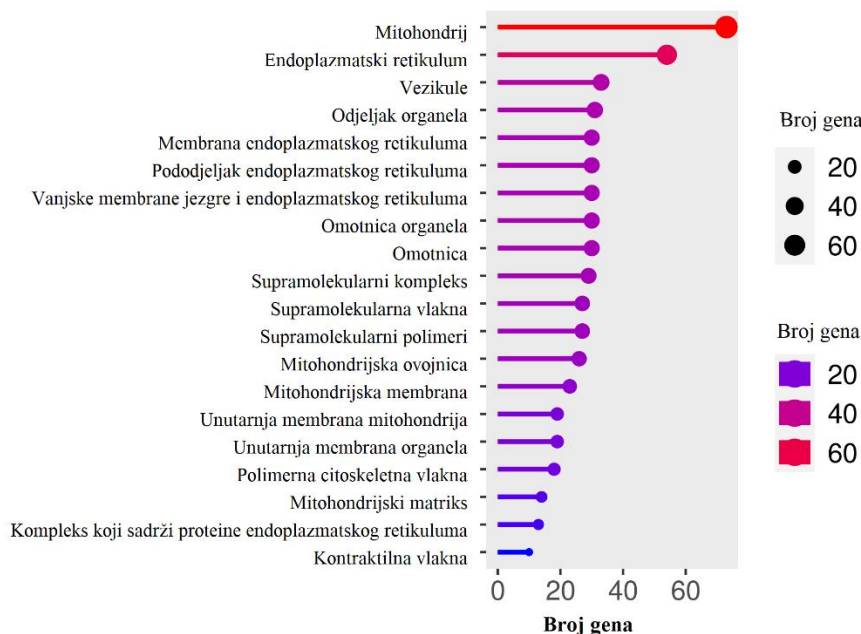
| GO naziv                               | GO oznaka  | Broj gena | Geni   |
|--|------------|-----------|--|
| Metabolički procesi malih molekula     | GO:0044281 | 110       | UGP2 EPHX1 CBS AKR1A1 APRT HIBADH CYP7B1 UPB1 ACSM1 PCK1 HADH ATP5MF BHMT APOA1 AGMAT ATP5F1A GMPR2 ACAT2 ACADVL HMGCS2 ABAT ACSL1 IVD HAAO NIT2 GATM VARS1 MAT1A ACO2 ACSM3 DLST ACSL5 JOSD2 GOT2 GLUD1 SLC37A4 SUCLG2 MTHFD1 FBP1 ECI1 APOE NADK2 HSD17B6 PCBD1 PCK2 GOT1 FAH PGAM1 ALDOA ATP5F1B ENO1 IDH2 TARS1 ALDH1L1 SFXN1 NAPRT CPT2 HPRT1 GALK1 VCP HADHA SLC27A5 ASL ALDOB HGD FASN AMDHD1 PKLR SHMT1 ECHS1 HSD17B10 ACADSB AHCY TKFC ATP5PO ACAA1 CYP2E1 ALDH6A1 PGM1 MDH1 ACSM2B EHHADH PC TPI1 FTCD IDH1 DDC GALM ATP5PD RETSAT SPR CPT1A ACADM GULO ACOX1 ALDH4A1 TST SHMT2 ACY1 PON3 CYP2C87 ALDH3A2 ACOT2 DCXR |
| Metabolički procesi organskih kiselina | GO:0006082 | 82        | EPHX1 CBS AKR1A1 HIBADH CYP7B1 UPB1 ACSM1 PCK1 HADH BHMT AGMAT ACAT2 ACADVL ABAT ACSL1 IVD HAAO NIT2 GATM VARS1 MAT1A ACO2 ACSM3 DLST ACSL5 GOT2 GLUD1 SLC37A4 MTHFD1 FBP1 ECI1 PCK2 GOT1 FAH PGAM1 ALDOA ENO1 IDH2 TARS1 ALDH1L1 CPT2 GALK1 HADHA SLC27A5 ASL ALDOB HGD FASN AMDHD1 PKLR SHMT1 ECHS1 HSD17B10 ACADSB ACAA1 CYP2E1 ALDH6A1 MDH1 ACSM2B EHHADH PC TPI1 FTCD IDH1 DDC CPT1A ACADM GULO ACOX1 ALDH4A1 TST SHMT2 ACY1 PON3 CYP2C87 ACOT2   |
| Metabolički procesi oksokiselina       | GO:0043436 | 81        | EPHX1 CBS AKR1A1 HIBADH CYP7B1 UPB1 ACSM1 PCK1 HADH BHMT AGMAT ACAT2 ACADVL ABAT ACSL1 IVD HAAO NIT2 GATM VARS1 MAT1A ACO2 ACSM3 DLST ACSL5 GOT2 GLUD1 SLC37A4 MTHFD1 FBP1 ECI1 PCK2 GOT1 FAH PGAM1 ALDOA ENO1 IDH2 TARS1 ALDH1L1 CPT2 GALK1 HADHA SLC27A5 ASL ALDOB HGD FASN AMDHD1 PKLR SHMT1 ECHS1 HSD17B10 ACADSB ACAA1 CYP2E1 ALDH6A1 MDH1 ACSM2B EHHADH PC TPI1 FTCD IDH1 DDC CPT1A ACADM GULO ACOX1 ALDH4A1 TST SHMT2 ACY1 PON3 CYP2C87 ACOT2   |
| Katabolički procesi                    | GO:0009056 | 74        | EPHX1 ALAD AKR1A1 GUSB HIBADH UPB1 GSTM3 BREH1 ACAT2 ACADVL HSP90B1 MSN ABAT IVD HAAO MAT1A DLST AGL AIFM1 GOT2 HNRNPU HSPA5 PSMB1 PRDX3 HSD17B14 FBP1 ECI1 APOE BLVRB PCCA HSD17B6 PCK2 GOT1 PRDX2 FAH PGAM1 ALDOA PHB2 PSMB6 ENO1 ALDH1L1 CPT2 GALK1 VCP HADHA   |

| GO naziv                                     | GO oznaka  | Broj gena | Geni   |
|--|------------|-----------|--|
|  |            |           | HSD11B1 ALDOB TPP1 HGD AMDHD1 PKLR SHMT1 ECHS1 HSD17B10 ACADSB TKFC ACAA1 VIM ALDH6A1 EHHADH USP5 TPI1 ANXA7 FTCD IDH1 PSMB4 PSME1 CPT1A ACADM ACOX1 ALDH4A1 PON3 PABPC1 RAB1B   |
| Katabolički procesi organskih tvari          | GO:1901575 | 67        | ALAD AKR1A1 GUSB HIBADH UPB1 BREH1 ACAT2 ACADVL HSP90B1 MSN ABAT IVD HAAO MAT1A DLST AGL AIFM1 GOT2 HNRNPU HSPA5 PSMB1 HSD17B14 FBP1 ECI1 APOE BLVRB PCCA HSD17B6 PCK2 GOT1 FAH PGAM1 ALDOA PSMB6 ENO1 ALDH1L1 CPT2 GALK1 VCP HADHA HSD11B1 ALDOB TPP1 HGD AMDHD1 PKLR SHMT1 ECHS1 HSD17B10 ACADSB TKFC ACAA1 VIM ALDH6A1 EHHADH USP5 TPI1 FTCD IDH1 PSMB4 PSME1 CPT1A ACADM ACOX1 ALDH4A1 PON3 PABPC1 |
| Stanični katabolički procesi                 | GO:0044248 | 63        | EPHX1 ALAD AKR1A1 GUSB HIBADH UPB1 GSTM3 ACAT2 ACADVL HSP90B1 MSN ABAT IVD HAAO MAT1A DLST AGL AIFM1 GOT2 HNRNPU HSPA5 PSMB1 PRDX3 ECI1 APOE BLVRB HSD17B6 PCK2 GOT1 PRDX2 FAH PGAM1 PHB2 PSMB6 ALDH1L1 CPT2 VCP HADHA TPP1 HGD AMDHD1 SHMT1 ECHS1 HSD17B10 ACADSB TKFC ACAA1 VIM ALDH6A1 EHHADH USP5 ANXA7 FTCD IDH1 PSMB4 PSME1 CPT1A ACADM ACOX1 ALDH4A1 PON3 PABPC1 RAB1B                          |
| Biosintetski procesi organodušičnih spojeva  | GO:1901566 | 57        | CBS ALAD APRT UPB1 RPL5 ATP5MF BHMT APOA1 AGMAT ATP5F1A RPS18 RPL3 CPOX ACSL1 HAAO RPN1 RPL4 GATM VARS1 DDOST RPS9 ACSL5 JOSD2 GOT2 MTHFD1 RPSA APOE NADK2 EEF1G PCBD1 MTTP GOT1 RPS19 RPL13 ALDOA ATP5F1B ENO1 TARS1 EEF1A1 NAPRT RPN2 HPRT1 VCP RPS8 ASL CLTC SHMT1 ATP5PO VIM RPS4X DAD1 PGRMC1 DDC ATP5PD SPR ACADM SHMT2  |
| Metabolički procesi lipida                   | GO:0006629 | 53        | EPHX1 ATP1A1 CYP7B1 ACSM1 BREH1 PCK1 HADH APOA1 ATP5F1A ACAT2 ACADVL HMGCS2 ACSL1 ACSM3 ACSL5 SLC37A4 HSD17B14 ECI1 APOE PCCA HSD17B6 PCK2 MTTP ACAD8 PHB2 ATP5F1B CPT2 HADHA HSD11B1 SLC27A5 FASN C3 ECHS1 HSD17B10 ACADSB ACAA1 CYP2E1 ACSM2B EHHADH IDH1 RETSAT CPT1A AKRIC3 ACADM ACOX1 CYP2C87 ALDH3A2 ACOT2 CYP3A5   |
| Metabolički procesi monokarboksilne kiseline | GO:0032787 | 49        | EPHX1 AKR1A1 CYP7B1 ACSM1 PCK1 HADH ACAT2 ACADVL ABAT ACSL1 HAAO GATM ACSM3 ACSL5 SLC37A4 FBP1 ECI1 PCK2 FAH PGAM1 ALDOA ENO1 CPT2 GALK1 HADHA SLC27A5 ALDOB FASN PKLR ECHS1 HSD17B10 ACADSB ACAA1 CYP2E1 ACSM2B EHHADH PC TPI1 FTCD IDH1 CPT1A ACADM ACOX1 CYP2C87 ACOT2  |

| GO naziv   | GO oznaka  | Broj gena | Geni  |
|--|------------|-----------|---|
| Metabolički procesi derivata ugljikohidrata      | GO:1901135 | 44        | UGP2 AKR1A1 APRT GUSB UPB1 ACSM1 ATP5MF ATP5F1A GMPR2 TKT HMGCS2 ACSL1 RPN1 BGN DDOST ACSM3 DLST ACSL5 SUCLG2 FBP1 TALDO1 PGAM1 ALDOA ATP5F1B ENO1 RPN2 HPRT1 GALK1 VCP ALDOB CLTC GANAB PKLR GNS ATP5PO DAD1 ACSM2B TPI1 ATP5PD RAB1B ACOT2                |
| Metabolički procesi staničnih amida              | GO:0043603 | 44        | ACSM1 GSTM3 RPL5 RPS18 RPL3 GSTP1 HMGCS2 ACSL1 ETHE1 RPL4 VARS1 ACSM3 DLST RPS9 SPCS2 ACSL5 GSTT2 SUCLG2 RPSA GSTK1 APOE SEC11A EEF1G RPS19 RPL13 PGAM1 TARS1 EEF1A1 RPS8 ASL TPP1 AMDHD1 SHMT1 VIM RPS4X ACSM2B FTCD IDH1 GSTA1 SHMT2 GSTM1 ACOT2          |
| Metabolizam staničnih lipida                     | GO:0044255 | 41        | EPHX1 ACSM1 PCK1 HADH APOA1 ACAT2 ACADVL HMGCS2 ACSL1 ACSM3 ACSL5 SLC37A4 ECI1 APOE PCK2 MTTP PHB2 CPT2 HADHA SLC27A5 FASN C3 ECHS1 HSD17B10 ACADSB ACAA1 CYP2E1 ACSM2B EHHADH IDH1 RETSAT CPT1A ACADM ACOX1 CYP2C87 ALDH3A2 ACOT2                          |
| Transport organskih tvari                        | GO:0071702 | 41        | CLTA SLC25A22 KRT18 EHD3 APOA1 SEC24C HSP90B1 SEC23A ACSL1 GDI2 SLC2A2 HNRNPA2B1 SPCS2 ACSL5 AIFM1 SPTBN1 GOT2 HSPA5 SLC37A4 SLC25A1 APOE MYH9 CLTB HSPA9 MTTP PHB2 SLC25A4 TIMM13 SFXN1 VCP SLC27A5 RRBP1 CLTC C3 LMNA SEC31A MYH10 SAR1B DDX39A FGB RAB1B |
| Katabolički procesi malih molekula               | GO:0044282 | 38        | AKR1A1 HIBADH UPB1 ACAT2 ACADVL ABAT IVD HAAO MAT1A DLST GOT2 ECI1 APOE HSD17B6 PCK2 GOT1 FAH ENO1 ALDH1L1 CPT2 GALK1 HADHA HGD AMDHD1 SHMT1 ECHS1 HSD17B10 ACADSB TKFC ACAA1 ALDH6A1 EHHADH FTCD CPT1A ACADM ACOX1 ALDH4A1 PON3                            |
| Organofosfatni metabolički procesi               | GO:0019637 | 38        | UPB1 ACSM1 ATP5MF APOA1 ATP5F1A GMPR2 TKT HMGCS2 ACSL1 HAAO ACSM3 DLST ACSL5 JOSD2 SUCLG2 MTHFD1 FBP1 TALDO1 NADK2 PGAM1 ALDOA PHB2 ATP5F1B ENO1 NAPRT HPRT1 GALK1 VCP HADHA ALDOB PKLR ATP5PO ACSM2B TPI1 IDH1 ATP5PD ACOT2                                |
| Metabolički procesi malih molekula s nukleobazom | GO:0055086 | 36        | UGP2 APRT UPB1 ACSM1 ATP5MF ATP5F1A GMPR2 HMGCS2 ACSL1 HAAO ACSM3 DLST ACSL5 JOSD2 SUCLG2 MTHFD1 FBP1 NADK2 PGAM1 ALDOA ATP5F1B ENO1 NAPRT HPRT1 GALK1 VCP ALDOB PKLR SHMT1 ATP5PO ALDH6A1 ACSM2B TPI1 ATP5PD ACOT2   |
| Stvaranje prekursora metabolita i energije       | GO:0006091 | 35        | UGP2 CYB5B ATP5F1A TKT HMGCS2 ACO2 DLST AGL SLC37A4 SDHB SUCLG2 FBP1 TALDO1 PYGL PGAM1 ALDOA PHB2 ATP5F1B ENO1 GALK1 VCP SLC27A5 ALDOB PKLR   |

| GO naziv                                   | GO oznaka  | Broj gena | Geni   |
|--|------------|-----------|--|
|  |            |           | NDUFS3 MDH1 TPI1 VSIG10L IDH1 ATP5PD<br>NDUFS1 ACADM ACOX1 SHMT2 SDHA  |
| Stvaranje kompleksa proteinima             | GO:0065003 | 34        | ALAD IQGAP2 CLTA UPB1 FGA EHD3 RPL5<br>APOA1 RPL3 MSN MAT1A AIFM1 SPTBN1<br>ARPC4 FN1 RPSA APOE MTTP RPS19 SRSF1 VCP<br>SPTAN1 ALDOB CLTC SHMT1 HSD17B10<br>NDUFS3 CCT2 KRT10 TUBB4A NDUFS1 FGB<br>SHMT2     |
| Biosintetski procesi malih molekula        | GO:0044283 | 33        | CBS AKR1A1 APRT CYP7B1 UPB1 ACSM1 PCK1<br>BHMT APOA1 ACADVL HMGCS2 HAAO GATM<br>ACSM3 GOT2 MTHFD1 FBP1 APOE PCBD1 PCK2<br>GOT1 HPRT1 SLC27A5 ASL FASN SHMT1<br>HSD17B10 ACSM2B PC SPR ACADM GULO<br>SHMT2    |
| Katabolički procesi organodušičnih spojeva | GO:1901565 | 33        | ALAD GUSB HIBADH UPB1 HSP90B1 MSN<br>ABAT IVD HAAO MAT1A DLST GOT2 HSPA5<br>PSMB1 APOE BLVRB GOT1 FAH PSMB6<br>ALDH1L1 VCP TPP1 HGD AMDHD1 SHMT1<br>HSD17B10 ACADSB ALDH6A1 USP5 FTCD<br>PSMB4 PSME1 ALDH4A1 |

Rezultati analize genske ontologije za staničnu lokalizaciju pokazali su da najviše proteina ima porijeklo iz mitohondrija (N = 73) i endoplazmatskog retikuluma (N = 54) (Slika 15). Detaljan prikaz stanične lokalizacije i gena uključenih u pojedini stanični odjeljak dan je u Tablici 8.



**Slika 15.** Grafički prikaz prvih 20 pojmova genske ontologije za staničnu lokalizaciju proteina jetre jelena običnog. Boja i veličina kružića odgovara broju gena uključenih u odgovarajući stanični odjeljak.



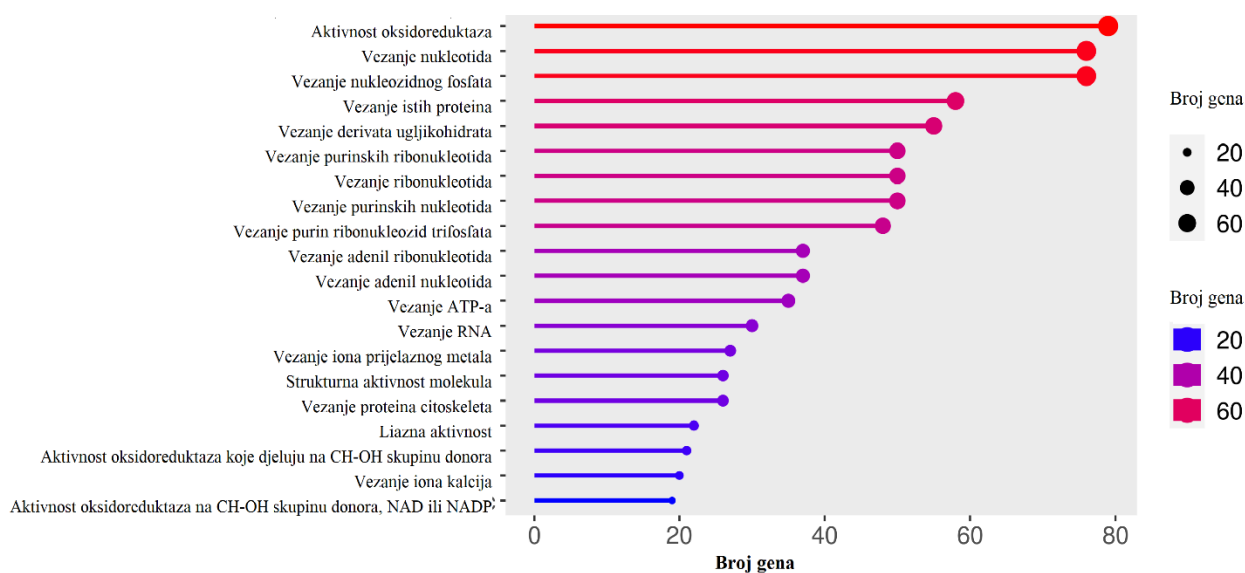
**Tablica 8.** Analiza genske ontologije (GO) za staničnu lokalizaciju proteina jetre jelena običnog. Prikazan je naziv i oznaka GO, broj i oznake uključenih gena. Puni nazivi gena odnosno proteina nalaze se u Tablici 6.

| GO naziv   | GO oznaka  | Broj gena | Geni   |
|--|------------|-----------|--|
| Mitohondrij  | GO:0005739 | 73        | SLC25A20 ACAD10 SLC25A22 ACSM1 ATP5MF CYB5B ATP5F1A ACAT2 ACADVL HMGCS2 ABAT CPOX ACSL1 ETHE1 IVD GATM ACO2 ACSM3 DLST ACSL5 AIFM1 GOT2 HSPA5 SDHB PRDX3 SUCLG2 GSTK1 ECI1 HADHB PCCA NADK2 HSPA9 NNT PCK2 SLC25A3 PHB2 NIPSNAP1 SLC25A4 ATP5F1B TIMM13 IDH2 SFXN1 CPT2 ANXA6 HADHA NDUFB4 TGM2 UBA1 AK3 COX5A ECHS1 HSD17B10 ACADSB ATP5PO ALDH6A1 NDUFS3 ACSM2B PGRMC1 PC VSIG10L IDH1 ATP5PD PSMB4 NDUFS1 CPT1A ACADM ALDH4A1 TST SHMT2 CYP2C87 STOM SDHA |
| Endoplazmatski retikulum                             | GO:0005783 | 54        | EPHX1 CYP7B1 TMED9 MOGS PDIA6 PCK1 CYB5B SEC24C HSP90B1 SEC23A TKT ACSL1 RPN1 P4HB DDOST SPCS2 ACSL5 LMAN1 HSPA5 LMAN2 PRKCSH HADHB APOE HYOU1 SEC11A EEF1G MTTP CYB5A RPN2 VCP HSD11B1 SLC27A5 RRBP1 TGM2 CYB5R3 UBA1 PPIB GANAB ALB PDIA4 PDIA3 DAD1 PGRMC1 MLEC ANXA7 FTCD SEC31A FMO3 SSR4 RETSAT FGB CYP2C87 STOM CANX  |
| Vezikule   | GO:0031982 | 33        | HSP90AB1 ANXA4 CLTA TMED9 EHD3 PDIA6 BHMT APOA1 SEC24C SEC23A BGN HNRNPA2B1 P4HB LMAN1 TF LMAN2 FN1 PRDX3 MYH9 CLTB ALDOA ANXA6 TPP1 CLTC UBA1 ALB PDIA4 PDIA3 VIM PGRMC1 ANXA7 SEC31A FGB   |
| Odjeljak organela                                    | GO:0031984 | 31        | EPHX1 CYP7B1 SEC24C HSP90B1 SEC23A TKT RPN1 DDOST SPCS2 LMAN1 HSPA5 LMAN2 CLTB SEC11A RPN2 VCP HSD11B1 SLC27A5 RRBP1 UBA1 PDIA3 DAD1 MLEC ANXA7 FTCD SEC31A FMO3 SSR4 RETSAT CYP2C87 CANX  |
| Membrana endoplazmatskog retikuluma                  | GO:0005789 | 30        | EPHX1 CYP7B1 SEC24C HSP90B1 SEC23A TKT RPN1 DDOST SPCS2 LMAN1 HSPA5 LMAN2 SEC11A RPN2 VCP HSD11B1 SLC27A5 RRBP1 UBA1 PDIA3 DAD1 MLEC ANXA7 FTCD SEC31A FMO3 SSR4 RETSAT CYP2C87 CANX   |
| Pododjeljak endoplazmatskog retikuluma               | GO:0098827 | 30        | EPHX1 CYP7B1 SEC24C HSP90B1 SEC23A TKT RPN1 DDOST SPCS2 LMAN1 HSPA5 LMAN2 SEC11A RPN2 VCP HSD11B1 SLC27A5 RRBP1 UBA1 PDIA3 DAD1 MLEC ANXA7 FTCD SEC31A FMO3 SSR4 RETSAT CYP2C87 CANX   |
| Vanjske membrane jezgre i endoplazmatskog retikuluma | GO:0042175 | 30        | EPHX1 CYP7B1 SEC24C HSP90B1 SEC23A TKT RPN1 DDOST SPCS2 LMAN1 HSPA5 LMAN2 SEC11A RPN2 VCP HSD11B1 SLC27A5 RRBP1 UBA1 PDIA3 DAD1 MLEC ANXA7 FTCD SEC31A FMO3 SSR4 RETSAT CYP2C87 CANX   |

| GO naziv                        | GO oznaka  | Broj gena | Geni  |
|---------------------------------|------------|-----------|---|
| Omotnica organela               | GO:0031967 | 30        | ANXA4 SLC25A22 ATP5MF CYB5B ATP5F1A ACADVL CPOX GATM AIFM1 SDHB HADHB PHB2 SLC25A4 ATP5F1B TIMM13 LMNB2 SFXN1 COX5A LMNA ATP5PO NDUFS3 PGRMC1 ATP5PD RETSAT NDUFS1 CPT1A ACADM SHMT2 CYP2C87 SDHA |
| Omotnica                        | GO:0031975 | 30        | ANXA4 SLC25A22 ATP5MF CYB5B ATP5F1A ACADVL CPOX GATM AIFM1 SDHB HADHB PHB2 SLC25A4 ATP5F1B TIMM13 LMNB2 SFXN1 COX5A LMNA ATP5PO NDUFS3 PGRMC1 ATP5PD RETSAT NDUFS1 CPT1A ACADM SHMT2 CYP2C87 SDHA |
| Supramolekularni kompleks       | GO:0099080 | 29        | KRT8 KRT18 MYH14 CCT4 DES ACTC1 LMAN1 SPTBN1 HNRNPU ACTN2 MYH9 MYL9 MYH3 CCT7 LMNB2 VCP CLTC LMNA ACTN1 VIM CCT2 KRT10 TUBB4A MYH10 VCL TUBA4A KRT6A PABPC1                                       |
| Supramolekularna vlakna         | GO:0099512 | 27        | KRT8 KRT18 MYH14 CCT4 DES ACTC1 LMAN1 SPTBN1 HNRNPU ACTN2 MYH9 MYL9 MYH3 CCT7 LMNB2 CLTC LMNA ACTN1 VIM CCT2 KRT10 TUBB4A MYH10 VCL TUBA4A KRT6A  |
| Supramolekularni polimeri       | GO:0099081 | 27        | KRT8 KRT18 MYH14 CCT4 DES ACTC1 LMAN1 SPTBN1 HNRNPU ACTN2 MYH9 MYL9 MYH3 CCT7 LMNB2 CLTC LMNA ACTN1 VIM CCT2 KRT10 TUBB4A MYH10 VCL TUBA4A KRT6A  |
| Mitohondrijska ovojnica         | GO:0005740 | 26        | SLC25A22 ATP5MF CYB5B ATP5F1A ACADVL CPOX GATM AIFM1 SDHB HADHB PHB2 SLC25A4 ATP5F1B TIMM13 SFXN1 COX5A ATP5PO NDUFS3 PGRMC1 ATP5PD NDUFS1 CPT1A ACADM SHMT2 CYP2C87 SDHA                         |
| Mitohondrijska membrana         | GO:0031966 | 23        | SLC25A22 ATP5MF CYB5B ATP5F1A ACADVL SDHB HADHB PHB2 SLC25A4 ATP5F1B TIMM13 SFXN1 COX5A ATP5PO NDUFS3 PGRMC1 ATP5PD NDUFS1 CPT1A ACADM SHMT2 CYP2C87 SDHA   |
| Unutarnja membrana mitohondrija | GO:0005743 | 19        | SLC25A22 ATP5MF ATP5F1A ACADVL SDHB HADHB PHB2 SLC25A4 ATP5F1B TIMM13 SFXN1 COX5A ATP5PO NDUFS3 ATP5PD NDUFS1 SHMT2 CYP2C87 SDHA  |
| Unutarnja membrana organela     | GO:0019866 | 19        | SLC25A22 ATP5MF ATP5F1A ACADVL SDHB HADHB PHB2 SLC25A4 ATP5F1B TIMM13 SFXN1 COX5A ATP5PO NDUFS3 ATP5PD NDUFS1 SHMT2 CYP2C87 SDHA  |
| Polimerna citoskeletna vlakna   | GO:0099513 | 18        | KRT8 KRT18 CCT4 DES ACTC1 HNRNPU CCT7 LMNB2 CLTC LMNA ACTN1 VIM CCT2 KRT10 TUBB4A TUBA4A KRT6A  |
| Mitohondrijski matriks          | GO:0005759 | 14        | ACSM1 ACADVL ACSM3 DLST HADHB PCCA HSPA9 ATP5F1B HADHA HSD17B10 ACSM2B VSIG10L ACADM SHMT2  |
| Kompleks koji sadrži proteine   | GO:0140534 | 13        | RPN1 P4HB SPCS2 HSPA5 PRKCSH HYOU1 SEC11A RPN2 VCP PPIB GANAB PDIA3 DAD1  |

| GO naziv                                       | GO oznaka  | Broj gena | Geni  |
|--|------------|-----------|---|
| endoplazmatskog retikuluma Kontraktilna vlakna | GO:0043292 | 10        | KRT8 DES ACTC1 LMAN1 SPTBN1 ACTN2 MYL9 MYH3 ACTN1 VCL |

Analiza genske ontologije za molekularnu funkciju pokazala je da su najzastupljenije oksidoreduktaze (N = 79), zatim proteini koji vežu nukleotide, odnosno nukleozidne fosfate (N = 76) (Slika 16). Detaljan prikaz molekularnih funkcija i gena uključenih u pojedinu funkciju dan je u Tablici 9.



**Slika 16.** Grafički prikaz prvih 20 pojmova genske ontologije za molekularnu funkciju proteina jetre jelena običnog. Boja i veličina kružića odgovara broju gena uključenih u odgovarajuću funkciju.

**Tablica 9.** Analiza genske ontologije (GO) za molekularne funkcije u jetri jelena običnog. Prikazan je naziv i oznaka procesa, broj i oznake uključenih gena. Puni nazivi gena odnosno proteina nalaze se u Tablici 6.

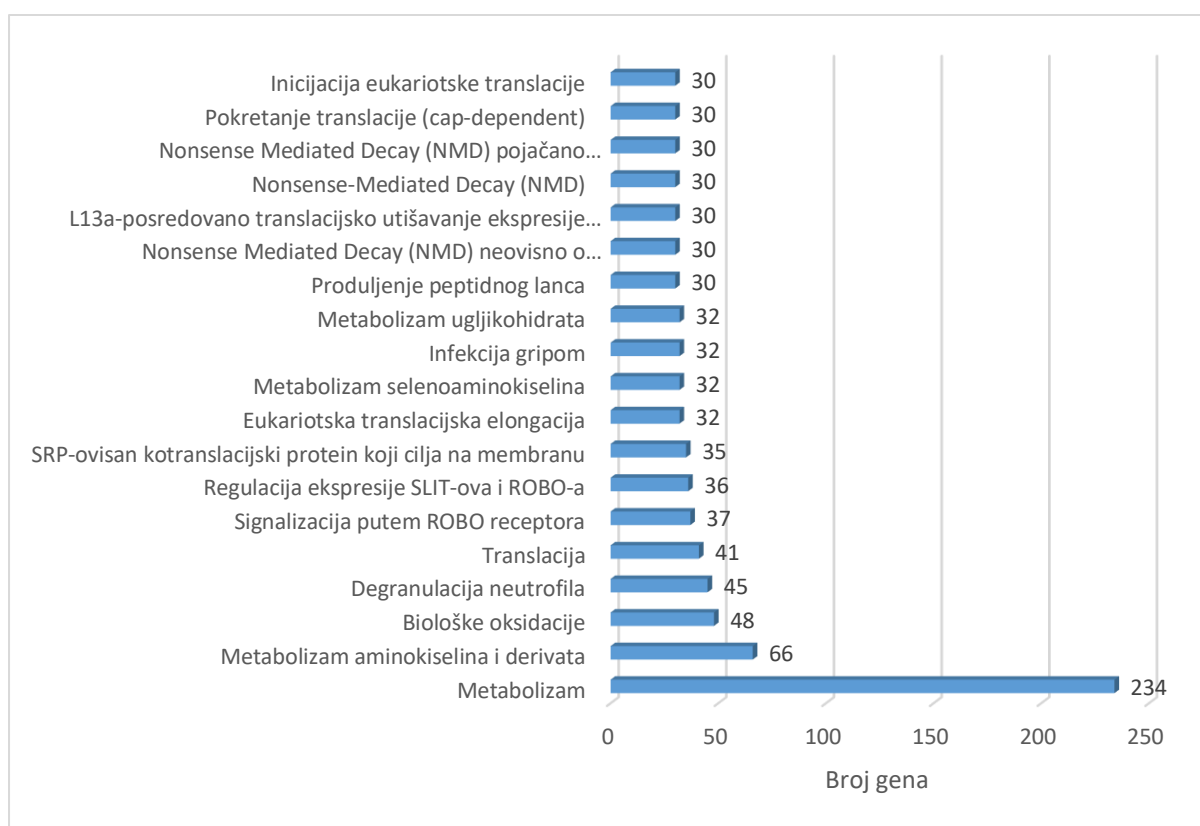
| GO naziv                        | GO oznaka  | Broj gena | Geni  |
|---------------------------------|------------|-----------|---|
| Aktivnost oksidoreduktaza       | GO:0016491 | 79        | ALDH16A1 AKR1A1 HIBADH ACAD10 CYP7B1 RDH16 HADH CYB5B GMPR2 ACADVL CPOX CCS ETHE1 IVD HAAO PRDX6 P4HB AIFM1 JOSD2 GLUD1 ALDH1A1 SDHB PRDX3 ALDH2 HSD17B14 MTHFD1 GSTK1 BLVRB HSD17B6 PCBD1 NNT PRDX2 CP AKR7A2 ACAD8 IDH2 ALDH1L1 HADHA HSD11B1 NDUFB4 HGD FASN CYB5R3 COX5A HSD17B10 ACADSB ACAA1 CYP2E1 ALDH6A1 NDUFS3 SOD1 MDH1 EHHADH VSIG10L IDH1 FMO3 DHRS7 RETSAT SPR NDUFS1 AKR1C3 CBR1 ACADM GULO ACOX1 AOC3 ALDH4A1 CYP2C87 ALDH3A2 QDPR SDHA DCXR CYP3A5 |
| Vežanje nukleotida              | GO:0000166 | 76        | APRT HSP90AB1 HIBADH ACAD10 ATP1A1 ACSM1 EHD3 PCK1 HADH ATP5F1A MYH14 ACADVL HSP90B1 EEF2 ACSL1 IVD CCT4 VARS1 ACTC1 MAT1A ACSM3 ACSL5 AIFM1 HNRNPU HSPA5 RAP1B SUCLG2 MTHFD1 FBP1 HYOU1 MYH9 PCCA NADK2 HSPA9 PYGL MYH3 NNT PCK2 CCT7 ACAD8 ATP5F1B IDH2 TARS1 EEF1A1 HPRT1 ANXA6 GALK1 VCP HADHA HSD11B1 SLC27A5 TGM2 UBA1 PKLR AK3 ACADSB TKFC RAB11A CCT2 ACSM2B EHHADH PC IDH1 FMO3 TUBB4A MYH10 SAR1B DDX39A ACADM GULO ACOX1 TUBA4A RAB2B SDHA RAB1B         |
| Vežanje nukleozidnog fosfata    | GO:1901265 | 76        | APRT HSP90AB1 HIBADH ACAD10 ATP1A1 ACSM1 EHD3 PCK1 HADH ATP5F1A MYH14 ACADVL HSP90B1 EEF2 ACSL1 IVD CCT4 VARS1 ACTC1 MAT1A ACSM3 ACSL5 AIFM1 HNRNPU HSPA5 RAP1B SUCLG2 MTHFD1 FBP1 HYOU1 MYH9 PCCA NADK2 HSPA9 PYGL MYH3 NNT PCK2 CCT7 ACAD8 ATP5F1B IDH2 TARS1 EEF1A1 HPRT1 ANXA6 GALK1 VCP HADHA HSD11B1 SLC27A5 TGM2 UBA1 PKLR AK3 ACADSB TKFC RAB11A CCT2 ACSM2B EHHADH PC IDH1 FMO3 TUBB4A MYH10 SAR1B DDX39A ACADM GULO ACOX1 TUBA4A RAB2B SDHA RAB1B         |
| Vežanje istih proteina          | GO:0042802 | 58        | UGP2 ALAD ANXA4 UPB1 GSTM3 APOA1 ACADVL TKT HMGCS2 ABAT ETHE1 DES MAT1A HNRNPU FN1 PRDX3 HSD17B14 HNRNPH1 ACTN2 FBP1 NMRAL1 APOE MYH9 NADK2 PYGL PCBD1 CCT7 PHB2 ENO1 LMNB2 TARS1 PBLD ANXA6 VCP HSD11B1 ALDOB HGD SHMT1 ALB PDIA3 ACADSB ACTN1 VIM PGRMC1 PC TPI1 IDH1 DNPEP DDX39A FLNB ACADM ACOX1 ALDH4A1 PON3 GSTM1 STOM ALDH3A2 DCXR  |
| Vežanje derivata ugljikohidrata | GO:0097367 | 55        | APRT HSP90AB1 ATP1A1 EHD3 PCK1 ATP5F1A MYH14 HSP90B1 EEF2 CCT4 BGN VARS1 ACTC1 MAT1A HNRNPU HSPA5 FN1 RAP1B SUCLG2 MTHFD1 FBP1 APOE HYOU1 MYH9 PCCA NADK2 HSPA9 PYGL MYH3 PCK2 CCT7 ATP5F1B TARS1 EEF1A1 ANXA6  |

| GO naziv                               | GO oznaka  | Broj gena | Geni  |
|--|------------|-----------|---|
|  |            |           | GALK1 VCP TPP1 TGM2 UBA1 PKLR AK3 GNS TKFC RAB11A CCT2 PC TUBB4A MYH10 SAR1B DDX39A TUBA4A RAB2B RAB1B  |
| Vežanje purinskih ribonukleotida       | GO:0032555 | 50        | APRT HSP90AB1 ATP1A1 EHD3 PCK1 ATP5F1A MYH14 HSP90B1 EEF2 CCT4 VARS1 ACTC1 MAT1A HNRNPU HSPA5 RAP1B SUCLG2 MTHFD1 FBP1 HYOU1 MYH9 PCCA NADK2 HSPA9 PYGL MYH3 PCK2 CCT7 ATP5F1B TARS1 EEF1A1 ANXA6 GALK1 VCP TGM2 UBA1 PKLR AK3 TKFC RAB11A CCT2 PC TUBB4A MYH10 SAR1B DDX39A TUBA4A RAB2B RAB1B |
| Vežanje ribonukleotida                 | GO:0032553 | 50        | APRT HSP90AB1 ATP1A1 EHD3 PCK1 ATP5F1A MYH14 HSP90B1 EEF2 CCT4 VARS1 ACTC1 MAT1A HNRNPU HSPA5 RAP1B SUCLG2 MTHFD1 FBP1 HYOU1 MYH9 PCCA NADK2 HSPA9 PYGL MYH3 PCK2 CCT7 ATP5F1B TARS1 EEF1A1 ANXA6 GALK1 VCP TGM2 UBA1 PKLR AK3 TKFC RAB11A CCT2 PC TUBB4A MYH10 SAR1B DDX39A TUBA4A RAB2B RAB1B |
| Vežanje purinskih nukleotida           | GO:0017076 | 50        | APRT HSP90AB1 ATP1A1 EHD3 PCK1 ATP5F1A MYH14 HSP90B1 EEF2 CCT4 VARS1 ACTC1 MAT1A HNRNPU HSPA5 RAP1B SUCLG2 MTHFD1 FBP1 HYOU1 MYH9 PCCA NADK2 HSPA9 PYGL MYH3 PCK2 CCT7 ATP5F1B TARS1 EEF1A1 ANXA6 GALK1 VCP TGM2 UBA1 PKLR AK3 TKFC RAB11A CCT2 PC TUBB4A MYH10 SAR1B DDX39A TUBA4A RAB2B RAB1B |
| Vežanje purin ribonukleozid trifosfata | GO:0035639 | 48        | HSP90AB1 ATP1A1 EHD3 PCK1 ATP5F1A MYH14 HSP90B1 EEF2 CCT4 VARS1 ACTC1 MAT1A HNRNPU HSPA5 RAP1B SUCLG2 MTHFD1 HYOU1 MYH9 PCCA NADK2 HSPA9 PYGL MYH3 PCK2 CCT7 ATP5F1B TARS1 EEF1A1 ANXA6 GALK1 VCP TGM2 UBA1 PKLR AK3 TKFC RAB11A CCT2 PC TUBB4A MYH10 SAR1B DDX39A TUBA4A RAB2B RAB1B           |
| Vežanje adenil ribonukleotida          | GO:0032559 | 37        | APRT HSP90AB1 ATP1A1 EHD3 ATP5F1A MYH14 HSP90B1 CCT4 VARS1 ACTC1 MAT1A HNRNPU HSPA5 SUCLG2 MTHFD1 FBP1 HYOU1 MYH9 PCCA NADK2 HSPA9 PYGL MYH3 CCT7 ATP5F1B TARS1 GALK1 VCP UBA1 PKLR AK3 TKFC CCT2 PC MYH10 DDX39A   |
| Vežanje adenil nukleotida              | GO:0030554 | 37        | APRT HSP90AB1 ATP1A1 EHD3 ATP5F1A MYH14 HSP90B1 CCT4 VARS1 ACTC1 MAT1A HNRNPU HSPA5 SUCLG2 MTHFD1 FBP1 HYOU1 MYH9 PCCA NADK2 HSPA9 PYGL MYH3 CCT7 ATP5F1B TARS1 GALK1 VCP UBA1 PKLR AK3 TKFC CCT2 PC MYH10 DDX39A   |
| Vežanje ATP-a                          | GO:0005524 | 35        | HSP90AB1 ATP1A1 EHD3 ATP5F1A MYH14 HSP90B1 CCT4 VARS1 ACTC1 MAT1A HNRNPU HSPA5 SUCLG2 MTHFD1 HYOU1 MYH9 PCCA NADK2 HSPA9 PYGL MYH3 CCT7 ATP5F1B TARS1 GALK1 VCP UBA1 PKLR AK3 TKFC CCT2 PC MYH10 DDX39A   |

| GO naziv  | GO oznaka  | Broj gena | Geni  |
|---|------------|-----------|---|
| Vežanje RNA   | GO:0003723 | 30        | HNRNPL RPL5 RPS18 RPL3 HSP90B1 MSN HDLBP RPL4 HNRNPA2B1 RPS9 HNRNPU PRKCSH HNRNPH1 EEF1G RPS19 EEF1A1 SRSF1 RPL30 CLTC SHMT1 HSD17B10 ACTN1 VIM RPS4X PCBP2 MYH10 HNRNPA3 DDX39A PABPC1 |
| Vežanje iona prijelaznog metala                                 | GO:0046914 | 27        | ALAD CYP7B1 PCK1 BHMT SEC24C SEC23A CCS ETHE1 HAAO LAP3 ACO2 TF PCK2 CP TARS1 CA3 SHMT1 ALB CYP2E1 USP5 DNPEP AOC3 CYP2C87 CYP3A5 HBA   |
| Strukturna aktivnost molekula                                   | GO:0005198 | 26        | CLTA KRT18 RPL5 RPS18 RPL3 CPOX RPL4 RPS9 SPTBN1 RPSA CLTB RPS19 RPL13 RPS8 RPL30 CLTC ACTN1 VIM RPS4X SEC31A KRT10 TUBB4A VCL FGB TUBA4A   |
| Vežanje proteina citoskeleta                                    | GO:0008092 | 26        | IQGAP2 MYH14 MSN PFN1 DES TPM1 ACTC1 P4HB SPTBN1 HNRNPU ANXA2 ACTN2 APOE MYH9 ACTN4 MYL9 PLS3 MYH3 ALDOA SPTAN1 ALDOB ACTN1 FTCD MYH10 VCL FLNB   |
| Liazna aktivnost  | GO:0016829 | 22        | CBS ALAD PCK1 APMAP ACO2 ECI1 PCBD1 PCK2 GOT1 GLO1 ALDOA ENO1 HADHA CA3 ASL ALDOB FASN ECHS1 TKFC EHHADH FTCD DDC   |
| Aktivnost oksidoreduktaza koje djeluju na CH-OH skupinu donora  | GO:0016614 | 21        | AKR1A1 HIBADH HADH HSD17B14 HSD17B6 AKR7A2 IDH2 HADHA HSD11B1 FASN HSD17B10 MDH1 EHHADH IDH1 SPR AKR1C3 GULO ALDH3A2 DCXR   |
| Vežanje iona kalcija  | GO:0005509 | 20        | ANXA4 EHD3 NUCB1 TKT PRKCSH ANXA2 ACTN2 MYL6 ACTN4 MYL9 PLS3 ANXA6 SPTAN1 TGM2 HSPG2 ACTN1 ANXA7 TUBB4A CALM1 CANX  |
| Aktivnost oksidoreduktaza na CH-OH skupinu donora, NAD ili NADP | GO:0016616 | 19        | AKR1A1 HIBADH HADH HSD17B14 HSD17B6 AKR7A2 IDH2 HADHA HSD11B1 FASN HSD17B10 MDH1 EHHADH IDH1 SPR AKR1C3 DCXR  |

## 5.2.2. ANALIZA BIOLOŠKIH PUTEVA POVEZANIH S PROTEINIMA JETRE

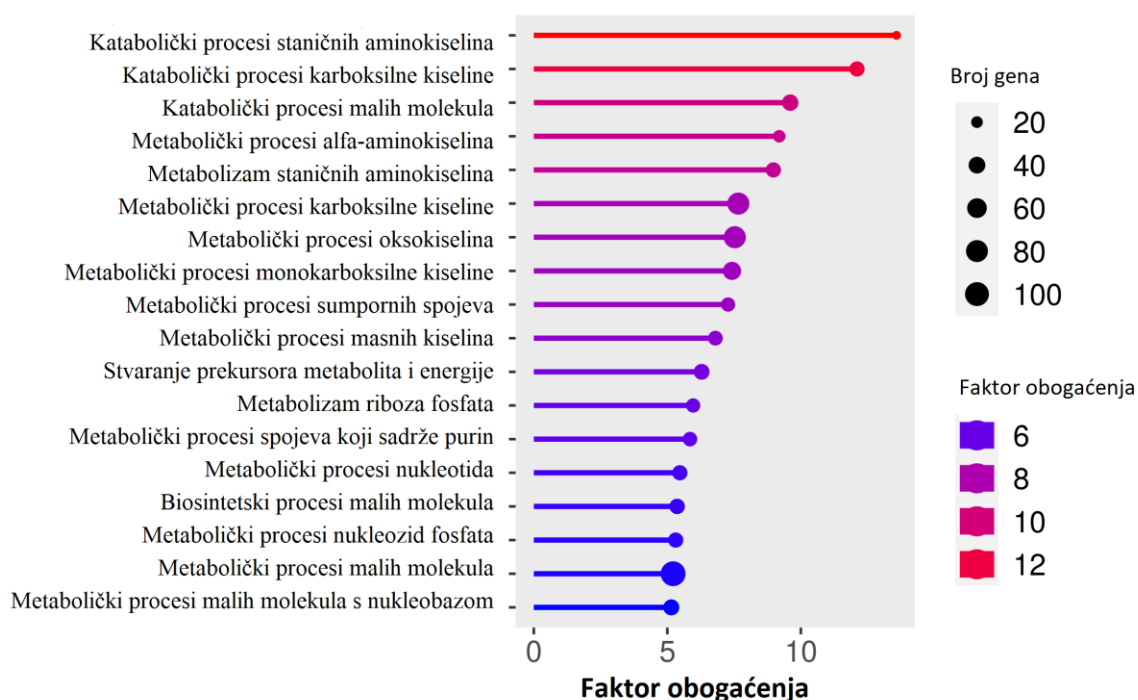
Analiza bioloških puteva povezanih s proteinima jetre napravljena je uz pomoć bioinformatičkog alata Reactome, te su se 66 biološka puta pokazala statistički znakovitima (FDR < 0,05). Nakon uvođenja dodatnog kriterija da je u svakom biološkom putu prisutno najmanje 30 gena, reducirali smo broj značajnih bioloških puteva na 19 (Slika 17). Najveći broj proteina jetre uključen je u metaboličke procese (N = 234), metabolizam aminokiselina i derivata (N = 66), biološke oksidacije (N = 48), degranulaciju neutrofila (N = 45) i translaciju (N = 41).



**Slika 17.** Prikaz značajnih bioloških puteva s najmanje 30 gena/putu povezanih s proteomom jetre jelena običnog, napravljen pomoću alata Reactome.

### 5.2.3. ANALIZA ZNAČAJNO OBOGAĆENIH BIOLOŠKIH PROCESA U JETRI

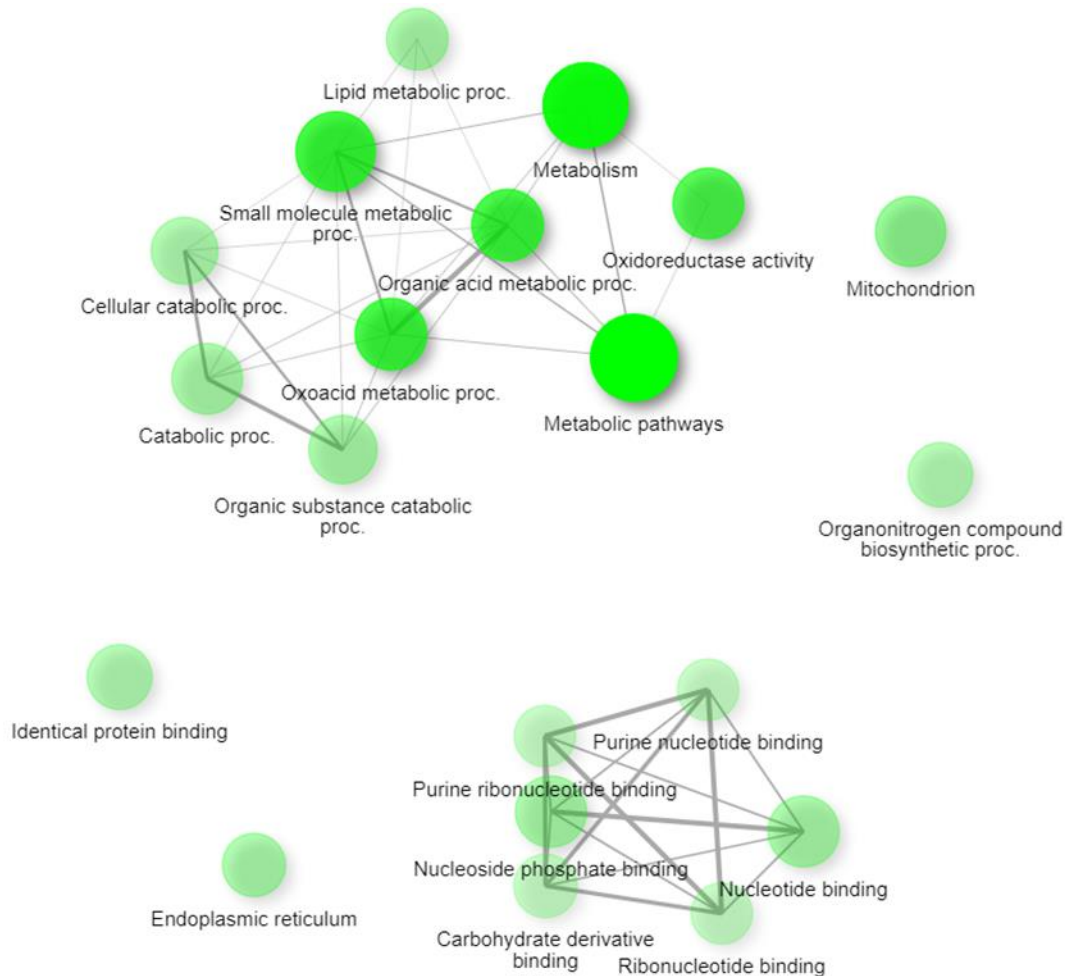
Prvih 20 pojmova GO za biološke procese s najnižom vrijednošću FDR i najvećim faktorom obogaćenja (engl. *fold enrichment*) prikazano je na Slici 18. Na temelju faktora obogaćenja kao mjere veličine učinka, značajno obogaćeni biološki procesi u jetri su metabolički/katabolički procesi aminokiselina, malih molekula, masnih kiselina, kao i nukleotida, te spojeva s nukleobazama.



**Slika 18.** Prvih 20 pojmova genske ontologije za biološke procese u proteomu jetre s najnižom vrijednošću FDR i najvećim faktorom obogaćenja (engl. *fold enrichment*). Boja odgovara veličini faktora obogaćenja, a veličina kružića odgovara broju gena uključenih u odgovarajući proces.



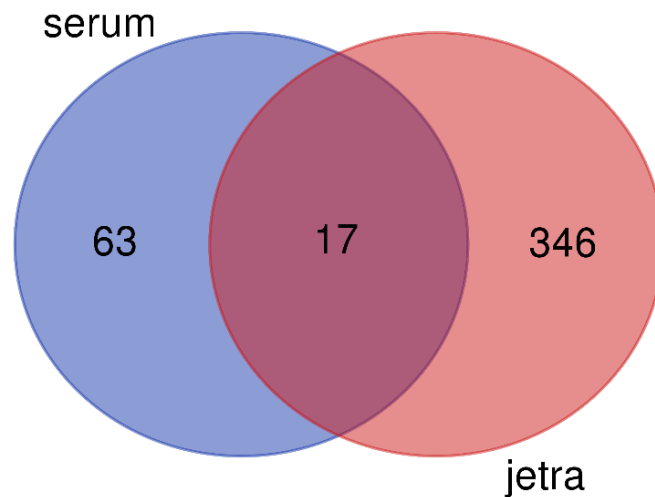
Skupni prikaz svih pojmova genske ontologije u obliku mreže jasno izdvaja dva glavna grozda, veći grozd povezan sa metaboličkim procesima u jetri te drugi povezan sa translacijskim procesima (Slika 19). Također uočavamo mitohondrij i endoplazmatski retikulum kao glavno izvorište proteina jetre.



**Slika 19.** Mrežni prikaz najznačajnijih pojmova genske ontologije u proteomu jetre jelena običnog. Dva pojma (čvora) su povezana ako dijele 20% ili više gena, tamniji čvorovi predstavljaju značajnije obogaćene skupove gena, veći čvorovi predstavljaju veće skupove gena, a deblje linije predstavljaju više preklapajućih gena. Slika je izrađena u programu ShinyGO.

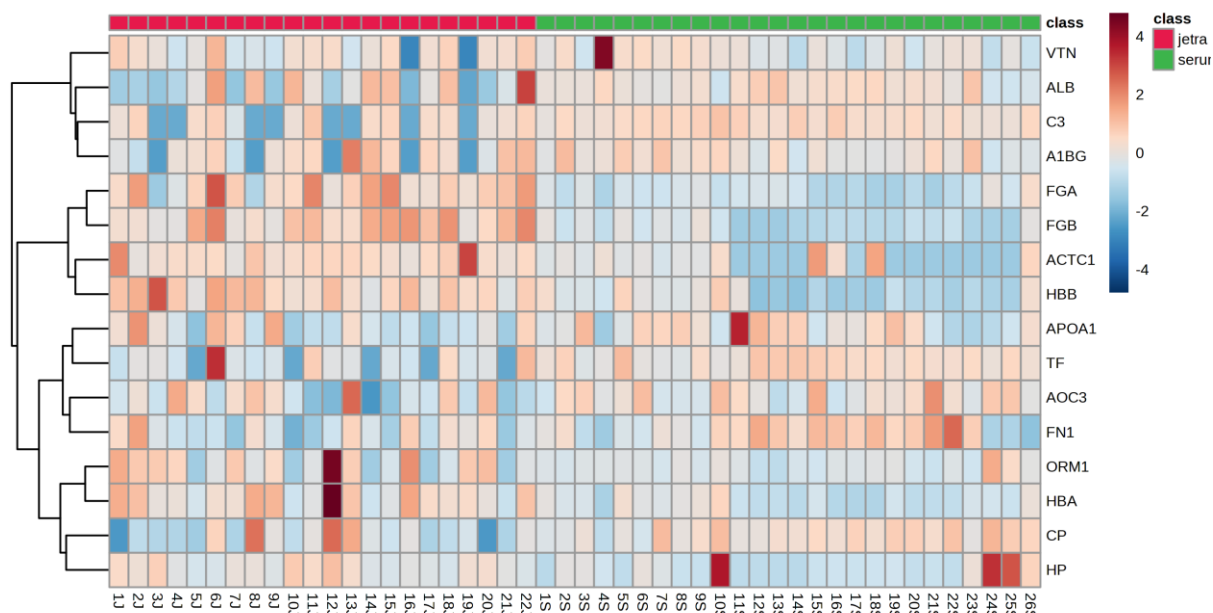
### 5.3. USPOREDBA PROTEOMA SERUMA I JETRE

Raspodjela proteina između jetre i seruma jelena običnog prikazana je Vennovim dijagramom (Slika 20). U serumu su identificirana 63 jedinstvena proteina, dok je u jetri njih 346. Sedamnaest proteina pokazalo se zajedničkim serumu i jetri, i to: amino oksidaza (AOC3), keratin 10 (KRT10), vitronektin (VTN), komponenta komplementa C3, fibrinogen alfa lanac (FGA), alfa-1-kiseli glikoprotein (ORM1), albumin (ALB), hemoglobin alfa lanac (HBA), apolipoprotein A1 (APOA1), transferin (TF), alfa-1-B glikoprotein (A1BG), alfa aktin (ACTC1), fibrinogen beta lanac (FGB), ceruloplazmin (CP), hemoglobin beta lanac (HBB), fibronektin (FN1) i haptoglobin (HP). Keratin tip 10 izuzet je iz daljnje analize, jer se pripisuje onečišćenju uzorka nastalom prilikom uzorkovanja.



**Slika 20.** Raspodjela proteina identificiranih LC-MS/MS pristupom u serumu i jetri jelena običnog prikazana Vennovim dijagramom.

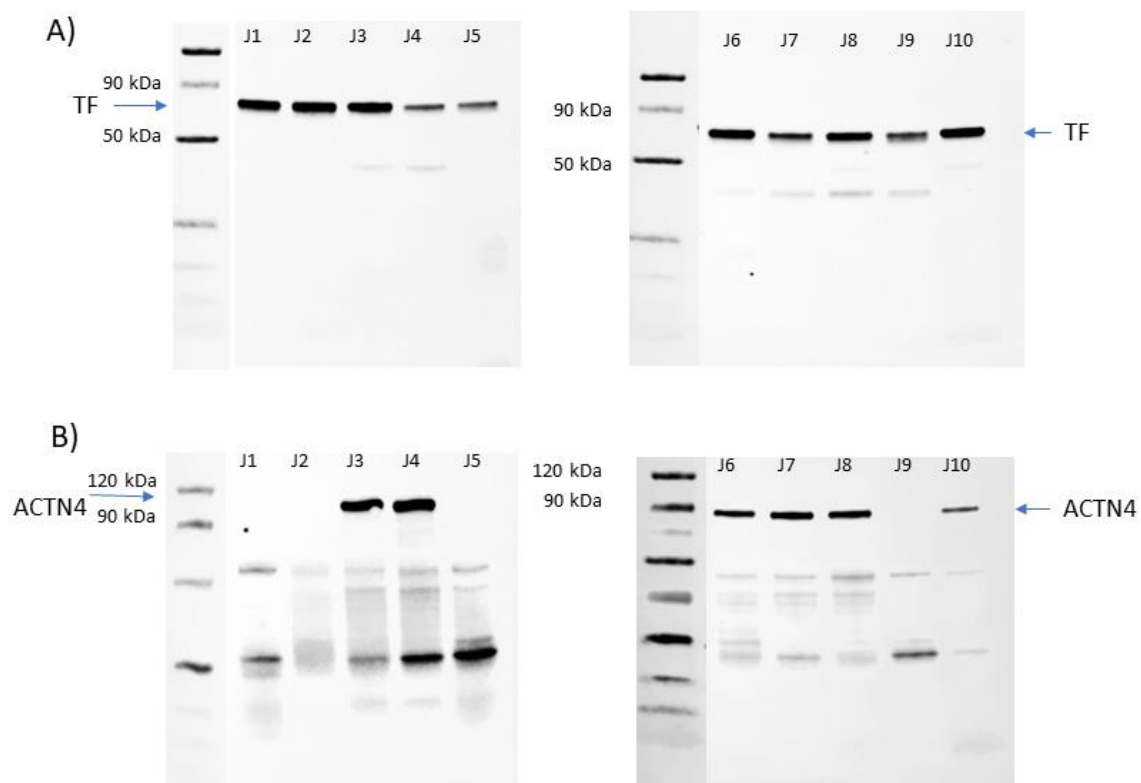
Usporedba relativne zastupljenosti istih proteina u serumu i jetri prikazana je u obliku toplinske mape (Slika 21).



**Slika 21.** Toplinska mapa relativne zastupljenosti proteina seruma (zeleni panel gore) i jetre (crveni panel gore). Uzorci i proteini rangirani su prema relativnoj zastupljenosti s euklidskom mjerom udaljenosti i Wardovim algoritmom za grupiranje; crvena boja označava veću zastupljenost pojedinog proteina, dok plava boja označava manju zastupljenost. Puni nazivi gena odnosno proteina nalaze se u Tablicama 2 i 6.

## 5.4. VALIDACIJA POMOĆU WESTERN BLOTA

Dva odabrana proteina, transferin i alfa-aktinin 4, validirani su Western blot metodom. Zastupljenost proteina od interesa normalizirana je na ukupnu količinu proteina nakon bojanja s Ponceau S i kvantificirana pomoću ImageJ softvera (Slika 22).



**Slika 22.** Validacija proteomskih rezultata Western blotom. Prikaz membrane i relativna zastupljenost A) transferina (TF) i B) alfa-4 aktinina (ACTN4) u uzorcima jetre jelena običnog. U prvu jažicu na gelu nanesen je molekularni marker, a u ostale ekstrakti proteina jetre jelena običnog (J1-J10). Proteini na membrani inkubirani su s odgovarajućim protutijelima te su detektirani kemiluminiscentno.

## 6. RASPRAVA

Proteomika temeljena na spektrometriji masa pruža izrazito snažan pristup globalnom istraživanju biološke funkcije pojedinih tipova stanica i tkiva životinja. Glavnina opsežnih proteomskih istraživanja provedena je kod ljudi, miševa i štakora, a u novije vrijeme i domaćih životinja, što omogućuje provedbu komparativnih analiza. Konačno, proteomski opis svih vrsta stanica, tkiva i tjelesnih tekućina neophodan je za opisivanje brojnih funkcionalnih svojstava stanica različitih životinjskih vrsta. Iz tog razloga, ovo istraživanje se usredotočilo na proteomsku karakterizaciju seruma i jetre jelena običnog.

Serum je jedan od najvrijednijih bioloških uzoraka jer se lako uzorkuje i sadrži stotine proteina, uključujući i one izlučene u krv normalnim staničnim i tkivnim procesima ili pak s druge strane, oštećenjem stanica. Stoga, prisutnost ili promjena u izražajnosti proteina potencijalno može ukazivati na početak i napredovanje većine bolesnih stanja, što serum čini odličnim potencijalnim izvorom biomarkera bolesti. Međutim, sustavna analiza proteoma seruma iznimno je izazovna prvenstveno zbog svoje složenosti, ali i zbog prilično širokoga dinamičkog raspona koncentracija proteina koji obuhvaća više od deset redova veličina, te velike fiziološke varijacije među uzorcima. Proteomom seruma također dominira mali broj proteina visoke zastupljenosti, kao što su albumin i imunoglobulini, koji zajedno čine više od 80% ukupnih proteina seruma.

U ovom istraživanju u serumu su ukupno identificirana 234 proteina s pomoću najmanje dva jedinstvena peptida i uz 1% FDR, te je u daljnju statističku i bioinformatičku obradu uključeno 87 proteina koji su bili utvrđeni u najmanje 50% uzoraka. S obzirom da nema dostupnih proteomskih istraživanja seruma na jelenima, broj identificiranih proteina uspoređen je sa sličnim studijama na govedima, kao najrodnijoj vrsti preživača za koju su dostupni proteomski podaci. Tako je u nedavnoj studiji na kravama s zaostajanjem posteljice, a u kojoj je primijenjen isti proteomski pristup kao i u ovome istraživanju kroz obilježavanje peptida seruma s TMT-om te analizom LC-MS/MS pristupom, identificirano 114 proteina (BELETIĆ i sur., 2023.). U drugoj studiji istim analitičkom pristupom analizirani su uzorci seruma i mlijeka krava sa subkliničkim i kliničkim mastitisom, te je identificiran 181 protein u serumu prema istim kriterijima (TURK i sur., 2021.). U još jednoj studiji istim analitičkom pristupom praćena je dinamika proteomskih promjena u serumu krava bez i s dodatkom zeolita u prehrani, te je identificiran 141 protein (MAITY i sur., 2021.). Nešto manji broj identificiranih proteina u predmetnom istraživanju očekivan je s obzirom na dostupnost i pokrivenost pretraživanih

baza. Drugim riječima, za jelena običnog (*Cervus elaphus*) postoji 19 262 unosa, dok je primjerice za govedo (*Bos taurus*), ovisno o pretraživanoj bazi, dostupno od 69 663 (NCBI) do čak 120 378 unosa (UniProt).

Većina identificiranih i kvantificiranih proteina u proteomu seruma uključena je u imunosni odgovor, odnosno povezana je na određeni način s imunosnim sustavom. Posebno je pri tome istaknuta uloga nespecifične (urođene) imunosti, koja je prva i glavna linija obrane od bakterija, gljivica, virusa, parazita i drugih štetnih ili nepoželjnih vrsta.

Kaskada komplementa, skupa proteina koji određenim slijedom aktiviraju jedan drugoga proteolitičkom razgradnjom, aktivira se klasičnim, lektinskim ili alternativnim putem (RICKLIN i sur., 2010.). Kaskada komplementa stvara enzimski aktivne molekule (kao što su C3/C5 konvertaze) i biološke efektore: opsonine (C3b, C3d i C4b) i anafilatoksine (C3a i C5a) i C5b, koji iniciraju sastavljanje kompleksa litičkog napada na membranu (MAC, engl. *lytic membrane attack complex*). U ovom istraživanju, zabilježene su različite komponente kaskade komplementa i njezini regulatori (C1QB, C1QA, CFH, C1S, C1R, CFI, IGKV1D-39, C4BPA, CFP, C8B, C8A, C3, VTN, IGHG1, C8G, C6, CFHR2, C7, C9, CFB, C1QC). Aktivacija sustava komplementa dovodi do nekoliko važnih ishoda: lize stanica, bakterija i virusa, opsonizacije mikroorganizama i pospješivanje fagocitoze, povećanje kapilarne propusnosti za različite sastojke plazme, oslobađanje topivih posrednika upale, kemotaksije i sl. Ishodi aktivacije usklađeni su s nekoliko regulatornih mehanizama (npr. pomoću topivih regulatora C4BP, CFI i CFH) te koordinirani putem receptora komplementa (kao što je C1R).

Komponente komplementa međusobno djeluju s drugim biološkim sustavima. Nakon infekcije komplement djeluje u suradnji s Toll-like receptorima (TLR) kako bi pojačao urođenu obranu domaćina. Komplement može aktivirati trombocite ili doprinijeti biokemijskim i morfološkim promjenama endotela pojačavajući koagulaciju i pridonoseći homeostazi kao odgovoru na ozljedu (OIKONOMOPOULOU i sur., 2012.). Međudjelovanje komplementa i koagulacije također uključuje cijepanje C3 i C5 konvertaza pomoću koagulacijskih proteaza, stvarajući biološki aktivne anafilatoksine (AMARA i sur., 2010.).

Iz svega navedenog slijedi da komplement povezuje urođeni imunosni odgovor s humoralnim i stanično posredovanim imunitetom (TOAPANTA i ROSS, 2006.; MERLE, 2015.). Drugim riječima, sustav komplementa orkestrira obranu domaćina prepoznavajući signal opasnosti i pretvarajući ga u specifične stanične odgovore dok opsežno komunicira s povezanim biološkim putovima u rasponu od imuniteta i upale pa do homeostaze i razvoja.

Među proteinima seruma nađeni su i proteini akutne faze (APP, engl. *acute phase proteins*), kao što su haptoglobin, fibrinogen, ceruloplazmin, albumin, alfa-2 makroglobulin, alfa-1-kiseli glikoprotein, transferin, histidinom bogat glikoprotein i drugi. Odgovor akutne faze je nespecifična i složena reakcija organizma koja se javlja ubrzo nakon infekcije, ozljede, upalnih ili nekih malignih procesa, a APP su proteini krvi koje prvenstveno sintetiziraju jetrene stanice kao dio odgovora akutne faze (CRAY i sur., 2009.; CECILIANI i sur., 2012.). Unatoč ujednačenoj prirodi odgovora akutne faze, ipak postoje brojne razlike u njenim značajkama između različitih životinjskih vrsta (ECKERSALL i BELL, 2010.). Dijagnostički najvažniji proteini akutne faze u preživača su haptoglobin (Hp) i serumski amiloid A, a značajni su još i fibrinogen, ceruloplazmin, alfa-1-kiseli glikoprotein, alfa-1 antitripsin, laktoferin, te kao negativni proteini akutne faze albumin, transferin i transtiretin (ECKERSALL i BELL, 2010.; TOTHOVA i sur., 2014.).

Istraživanja o akutno-faznom odgovoru kod punorožaca su relativno rijetka. Objavljena su istraživanja o metodama za određivanje koncentracija fibrinogena u sobova, te su kod bolesnih sobova zabilježene njegove povišene koncentracije (HALIKAS i BOWERS, 1972.; CATLEY i sur., 1990.). Kod drugih vrsta punorožaca, kao što je jelen, također je primijećeno da fibrinogen ima ulogu i kao reaktant akutne faze (SUTHERLAND i sur., 1987.; CROSS i sur., 1994.). Kod jelena običnog je serumski Hp pokazao visoku prediktivnu vrijednost u identificiranju životinja s proliferativnom tuberkulozom (GRIFFIN i sur., 1992.), a nedavno istraživanje pokazalo je povezanost cirkulirajućeg serumskog Hp i infekcije mikobakterijama (VICENTE i sur., 2019.). U drugih vrsta jelena dostupna su povremena istraživanja o fibrinogenu ili Hp, a zabilježene su fiziološke vrijednosti za Hp kod srne obične (HARTWIG i sur., 1983.) te za fibrinogen u jelena lopatara (SUTHERLAND i sur., 1985.).

Neki od identificiranih proteina akutne faze u proteomu seruma imaju anti-proteazno djelovanje: inhibiraju proteaze koje otpuštaju fagociti ili uzročnici bolesti, kako bi se smanjilo oštećenje zdravog tkiva ( $\alpha$ 1-anti-tripsin,  $\alpha$ 2-makroglobulin). Drugi APP-i, poput haptoglobina, imaju sposobnost čišćenja i vežu metabolite koji se oslobađaju staničnom razgradnjom (WAGENER i sur., 2002.), dok APP-i poput alfa-1-kiselog glikoproteina imaju antibakterijsko djelovanje te utječu na tijek imunskog odgovora (FOURNIER i sur., 2000.).

Drugi najzastupljeniji sustav proteina prisutnih u serumu jelena odnosi se na hemostazu. Imunosni sustav i hemostaza su dva glavna obrambena i usko povezana (pato)fiziološka sustava domaćina odgovorna za prepoznavanje i borbu protiv uzročnika bolesti (MARGETIĆ, 2012.). Tako su u proteomu seruma prisutne različite komponente hemostatskog sustava, kao što su

koagulacijski čimbenici, antikoagulansi, komponente fibrinolitičkog sustava i vaskularnog endotela.

Kao značajno obogaćeni biološki procesi u serumu jelena običnog pokazali su se procesi vezani uz imunostni sustav i odgovor imunostnog sustava, kao što su fibrinoliza, aktivacija komplementa, humoralni imunostni odgovor i humoralni imunostni odgovor posredovan cirkulirajućim imunoglobulinima, regulacija koagulacije i hemostaze.

U slučaju divljih životinja, brze promjene sastava krvi mogu biti povezane i s onečišćenjem staništa. Biokemijska analiza seruma srne obične tako je pokazala izloženost pesticidima i umjetnim gnojivima koji se primjenjuju u poljoprivredi (CYGAN-SZCZEGIELNIAK i sur., 2015.). Divlje životinje također su suočene i s drugim puno većim izazovima u odnosu na domaće, farmske životinje, uključujući tako i izloženost različitim uzročnicima bolesti. Tome u prilog govore i rezultati KEGG analize, koji ukazuju na povezanost proteoma seruma jelena običnog s različitim bolestima uzrokovanim virusima, bakterijama i parazitima. Prema tome, životni uvjeti i stanište jelena običnog uvjetuju dominaciju proteina povezanih s imunostnim sustavom u proteomu seruma.

Jetra predstavlja najveću žlijezdu u organizmu i odgovorna je za proizvodnju većine proteina seruma uključujući hormone, proteine nosače, apolipoproteine, kao i čimbenike potrebne za zgrušavanje krvi i fibrinolizu. Jetrene stanice proizvode oko 10 do 20 g proteina seruma dnevno kao rezultat složene regulacije koja omogućuje prilagodbu čitavog spektra sintetiziranih proteina potrebama organizma. U isto vrijeme, izrazita metabolička aktivnost jetrenih stanica zahtijeva i učinkovito procesiranje sintetiziranih polipeptida i brzo uklanjanje oštećenih vrsta. Kao metaboličko središte organizma sisavaca, jetra obavlja širok raspon bioloških funkcija poput metabolizma aminokiselina, masnih kiselina i ugljikohidrata; sinteze žučnih kiselina i hormona; biogeneze lipoproteina; i detoksikacije ksenobiotika (HE, 2005.). Budući da je jetra tako složen biološki sustav, potrebna je globalna analiza na razini "omike" kako bi se u potpunosti razjasnile njezine funkcije.

U jetri jelena običnog identificirano je 493 proteina s pomoću najmanje dva jedinstvena peptida i uz 1% FDR, te je u daljnju obradu uključeno 387 proteina koji su utvrđeni u najmanje 50% uzoraka. Primjenom istog analitičkog pristupa, ŠIMONJI i sur. (2022.) analizirali su promjene u proteomu jetara jelena običnoga nakon invazije velikim američkim metiljem *F. magna* na uzorku od 25 jetara, i identificirali 550 proteina. U navedenoj studiji, pretraživana je



baza jelena (*Cervidae*) koja sadrži 105 671 unos, što je rezultiralo nešto većim brojem identificiranih proteina.

Rezultati analize genske ontologije za proteine jetre pokazali su da najviše proteina ima podrijetlo iz mitohondrija i endoplazmatskog retikuluma. Vezano uz funkciju proteina, najzastupljenije su oksidoreduktaze, a najveći broj proteina uključen je u metaboličke procese, translaciju i elongaciju, te biološke oksidacije.

Među pojmovima genske ontologije i kao rezultat analize bioloških puteva, u ovom istraživanju opetovano se ponavljaju metabolički procesi, katabolički i anabolički, te metabolizam kao najdominantnija kategorija prisutna u proteomu jetre jelena običnog. Tako su identificirani proteini koji sudjeluju u metabolizmu ugljikohidrata, aminokiselina i masnih kiselina, enzimi ciklusa limunske kiseline, oksidativne fosforilacije i beta oksidacije.

Nedavna opsežna i sveobuhvatna proteomska studija pokazala je usporedni prikaz funkcionalne organizacije organizama u cijelom evolucijskom rasponu, obuhvaćajući 100 taksonomski različitih vrsta, uključujući 19 arheja, 49 bakterija i 32 eukariota (MÜLLER i sur., 2020.). Najdominantniji proteini dobiveni analizom obogaćivanja bili su proteini povezani s oksidacijskim i redukcijским procesima, koji služe kao temelj za biokemijske reakcije poput metabolizma ugljikohidrata. To je potvrđeno i ovim istraživanjem gdje su oksido-redukcijски procesi bili najzastupljeniji pojam genske ontologije za molekularnu funkciju. Nadalje, funkcije povezane s životnim ciklusom proteoma (translacija, elongacija, proteoliza) činile su čak 10% mase proteoma u živim organizmima (MÜLLER i sur., 2020.). To je u skladu s rezultatima ovoga istraživanja, gdje su biološki putevi vezani uz translaciju i elongaciju polipeptidnog lanca najdominantniji nakon puteva vezanih uz metabolizam. U istom radu, autori su označili proteine koji doprinose 90% proteinske mase unutar svih 100 proučavanih organizama prema njihovim funkcionalnim proteinskim domenama, i tu je vidljivo poklapanje s rezultatima ovoga istraživanja, i to za proteine koje sadrže domene elongacijskog čimbenika, RRM domene, HSP70, ATP sintaze i histona H2B i H3.

Velik dio proteoma jetre jelena običnog čine ribosomalni proteini (10 proteina male 40S ribosomalne podjedinice i 11 proteina velike 60S ribosomalne podjedinice), komponente nukleosoma (histoni H2B i H3), ribonukleoproteini (HNRNPA3, HNRNPL, HNRNPH1), proteasomske podjedinice (PSMB4, PSMB6), elongacijski čimbenici i proteini povezani s ubikvitinacijom (USP5, UBA1). Biosinteza ribosoma, organela koji prevode glasničku RNA (mRNA) u proteine, temeljni je biološki proces koji je usko povezan s rastom i proliferacijom

stanica i smatra se jednim od procesa koji troše najviše energije u proliferirajućim stanicama sisavaca (MOSS, 2004.; THOMPSON i sur., 2013.; KANG i sur., 2021.). Pored sinteze proteina, mnogi ribosomalni proteini reguliraju apoptozu i stanični ciklus (BHAVSAR i sur., 2010.). Selektivna razgradnja proteina, koja se odvija kroz ubikvitin-proteasomski sustav (UPS), kritična je za većinu staničnih procesa, kao što su stanični ciklus, stanični odgovor na stres i izvanstanične efektore, modulaciju receptora stanične površine, ionskih kanala, i popravak DNA (SCHWARTZ i CIECHANOVER, 1999.; YEN i sur., 2008.). UPS također ima ključnu ulogu u povezivanju staničnog ciklusa s metaboličkim aktivnostima kroz kontrolu izmjene proteina (BENANTI i sur., 2012.).

Proteini toplinskog šoka (engl. *heat-shock proteins*, HSPs) ili proteini stresa, velika su obitelj evolucijski visoko očuvanih i imunogenih proteina s ključnim ulogama u preživljavanju i razvoju stanica, a prisutni su u svim organizmima i svim stanicama organizama (LIZ i sur., 2001.; ABAZA, 2014.). Djeluju kao molekularni šaperoni i imaju ključnu ulogu u staničnom održavanju strukture proteina. Kontroliraju pravilno smatanje proteina, održavanje njihove trodimenzionalne konformacije, sastavljanje multiproteinskih kompleksa, transport proteina u ispravne subcelularne odjeljke pa sve do razgradnje nepravilno smotanih proteina koji mogu biti štetni za stanicu. U proteomu jetre jelena običnog identificirano je nekoliko članova ove obitelji koji se razvrstavaju na temelju njihove molekularne mase (HSP90AB1, HSPD1, HSP90B1, HSPA9, HSPA5). Također, imaju ulogu u pojačavanju imunskog odgovora domaćina, što se pokazalo i u odgovoru na invaziju jelena običnoga velikim američkim metiljem (ŠIMONJI i sur., 2022.). Proteini HSP70 i HSP90 posreduju između urođenih i adaptivnih imunskih odgovora putem aktivacije limfocita i stanica koje predstavljaju antigen kao što su dendritične stanice, omogućujući proizvodnju proupalnih citokina, te aktivaciju i izlučivanje interferona  $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ).

Među proteinima značajno zastupljenima u proteomu jetre ističu se članovi sustava citokroma P450 (članovi porodica CYP2, 3 i 7), zajedno s drugim proteinima odgovornima za detoksikaciju ksenobiotika (citokrom P450 reduktaza, flavin monooksigenaza, flavin reduktaza, S-adenozilmetionin sintaza, monoamino oksidaza i UDP-glukuronoziltransferaze). To su proteini koji sudjeluju u metabolizmu ksenobiotika djelujući kao oksido-reduktaze.

Sustav citokroma P450 sačinjava superobitelj enzima prisutna u gotovo svim carstvima od bakterija do jednostaničnih eukariota, biljaka, gljiva i životinja (WERCK-REICHHART i FEYEREISEN, 2000.). Osnovna uloga enzima citokroma P450 je metabolizam lijekova i ksenobiotika kojim se strani spojevi degradiraju ili izlučuju iz organizma, te biosinteza

signalnih molekula poput steroidnih hormona i vitamina topivih u mastima koji sudjeluju u kontroli razvoja i održavanju homeostaze organizama. Eukariotski enzimi citokroma P450 membranski su proteini smješteni u unutrašnjoj membrani mitohondrija ili vezani na endoplazmatski retikulum u citoplazmi stanice (WILLIAMS i sur., 2000.). Ove monooksigenaze metaboliziraju široki raspon spojeva, od endogenih lipida do ksenobiotika.

Flavin monooksigenaze (FMO) su, uz sustav citokroma P450, drugi važni mikrosomalni enzimi uključeni u proces metabolizma ne-nutritivnih stranih spojeva odnosno ksenobiotika (ESWARAMOORTHY i sur., 2006.). FMO oksigeniraju nukleofilne O, N, S i Se atome širokog raspona supstrata, kao što su amini, amidi, tioli i sulfidi, čineći ih topivim kako bi se osiguralo brzo izlučivanje (DIXIT i ROCHE, 1984.).

Enzimi koji sudjeluju u metabolizmu ksenobiotika pokazali su se značajno promijenjenima kod jelena invadiranih velikim američkim metiljem (ŠIMONJI i sur., 2022.). U sklopu programa suzbijanja bolesti životinjama su bili dostupni ljekoviti mamci s triklabendazolom, antiparazitskim lijekom. Uporaba triklabendazola u endemskim područjima fascioloidoze rezultirala je razvojem jetrenih metilja otpornih na ovaj spoj. Brojni *in vitro* i *in vivo* pokusi istaknuli su ulogu sustava CYP450 u razvijanju rezistencije na antiparazitske lijekove (DEVINE i sur., 2010., 2011., 2012.). Enzimski sustav flavin-monooksigenaze (FMO) pokazao se kao glavni metabolički put uključen u nastanak rezistencije na triklabendazol (ALVAREZ i sur., 2005.).

Pored toga što je jetra ključna za proizvodnju proteina, za metabolizam različitih tvari i za detoksikaciju, ona je također ključni imunosni organ (KUBES i JENNE, 2018.). Arhitektura i anatomska organizacija jetre omogućava maksimalnu interakciju imunosnih stanica s uzročnicima bolesti koji dolaze krvotokom. Jetru krvlju opskrbljuju i jetrena arterija i portna vena, koje mogu nositi potencijalne uzročnike bolesti, molekule porijeklom od njih ili stare, oksidirane i oštećene molekule. Kako krv ulazi u jetru tako prolazi kroz sinusoide, gdje brzina protoka i tlak krvi padaju, što dovodi do povećane izloženosti krvi Kupfferovim stanicama i jetrenim sinusoidnim endotelnim stanicama. Te stanice filtriraju krv, uklanjajući uzročnike bolesti i određene molekule. Pod odgovarajućim uvjetima, te stanice mogu aktivirati i pokrenuti imunosni odgovor kroz proizvodnju citokina i regrutiranje dodatnih imunosnih stanica. Između sinusoida jetre nalaze se stupci jetrenih stanica, glavne vrste stanica odgovornih za proizvodnju čimbenika zgrušavanja krvi, proteina komplementa i proteina akutne faze. Nakon filtriranja, krv izlazi iz jetre kroz jetrenu venu.

Imunosni odgovor u jetri tipično je imuno-tolerantan ili hipoimun. U slučajevima u kojima uzročnik bolesti uđe u jetru, dolazi do brzog i akutnog imunskog odgovora, što dovodi do samoograničavajuće upale, uklanjanja uzročnika i konačnog popravka/vraćanja tkiva na funkcionalnu razinu. U slučajevima u kojima upala nije ograničavajuća, već je kronična, može doći do značajnog regrutiranja neutrofila i monocita iz krvotoka. Regrutiranje neutrofila u upaljena tkiva posredovano je interakcijama receptor-ligand na leukocitima i endotelu krvnih žila (PETRI i sur., 2008.). Neuspjeh u pokretanju odgovarajućeg imunskog odgovora može rezultirati razvojem kronične bolesti, disfunkcijom tkiva, fibrozom i otkazivanjem organa. Stoga je ravnoteža između imunotolerancije i učinkovitih imunskih odgovora ključna za normalno funkcioniranje i homeostazu ovog tkiva (KUBES i JENNE, 2018.).

Shodno tome, u proteomu jetre jelena običnog identificirano je mnoštvo proteina povezanih s imunskim odgovorom, a u istaknutom biološkom putu „degranulacija neutrofila“ uključeno je njih 45. Među njima nalazimo proteine akutne faze (haptoglobin, alfa-1-kiseli glikoprotein, A1BG, transferin, ceruloplazmin), komponente antioksidativnog sustava (peroksiredoksini, glutathion-S-transferaza, glutathion reduktaza, superoksid dismutaza, citokrom P450, paraoksonaza), te ostale proteine koji djeluju na modulaciju imunskog odgovora (aneksini, alfa-aktinin, kalmodulin, katepsin, HSP-i i ostali).

Oksidativni stres nastaje kada se poremeti ravnoteža oksidacijsko-redukcijskih procesa uslijed prekomjernog stvaranjem slobodnih reaktivnih radikala kisika (ROS), smanjenja antoksidativne zaštite i/ili nemogućnosti popravka oksidativnog oštećenja (KELLY i sur., 1998.). Tako su kod jelena s fascioloidozom utvrđene promjene antioksidativnih enzima u jetri kao posljedica invazije (ŠIMONJI i sur., 2022.). U tom istraživanju također su dokazane promijenjene razine i drugih proteina jetre koji sudjeluju u interakciji nositelj-parazit poput aneksina, alfa-aktinina, kalmodulina, katepsina i ostalih.

Alfa aktinini (ACTN), koji pripadaju obitelji citoskeletnih proteina, poznati su po svojoj sposobnosti modulacije citoskeletne organizacije i stanične pokretljivosti umrežavanjem aktinskih filamenata (HONDA, 2015.). U ovom istraživanju, alfa aktinin 4 (ACTN4) dokazan je u ekstraktu jetre jelena običnog i primjenom Western blot metode. Ova nemišićna izoforma povezana je sa staničnom adhezijom i migracijom stanica. Pokazalo se da je ekspresija ACTN4 bitna za transkripcijsku aktivnost nuklearnog faktora kapa B (NF- $\kappa$ B) u prisutnosti čimbenika nekroze tumora alfa (TNF- $\alpha$ ) (ZHAO i sur., 2015.).

Razine proteina proizvedenih u jetrenim stanicama mogu se pratiti u serumu i čine temelj višestrukih klinički korisnih biomarkera. Tako je u serumu i jetri jelena običnog identificirano 16 proteina koji se pojavljuju i u serumu i u jetri. Većinu čine proteini akutne faze (ORM1, A1BG, CP, HP, TF, ALB, FGA, FGB), zatim proteini ekstracelularnog matriksa (VTN, FN1, ACTC1) i apolipoproteini (APOA1).

Jedan od proteina identificiranih proteomskim pristupom i u jetri i u serumu, kao i korištenjem Western blot metode, jest transferin (TF). Koncentracije transferina određivane su u goveda u različitim fiziološkim stanjima, u energetske deficitarnih (ketotičnih) krava, u situacijama nekoliko akutnih i kroničnih infekcija, te nakon primjene endotoksina (MOSER i sur., 1994). Koncentracija TF u odraslih životinja bila je niža nego u mladim životinja, kronične zarazne bolesti bile su karakterizirane s relativno niskim razinama TF, dok se tijekom akutnih infekcija, nakon primjene endotoksina i tijekom ketoze koncentracije TF-a nisu mijenjale.

Homeostaza željeza neophodna je za održavanje funkcije mnogih tkiva, posebice jetre, koja između ostaloga služi i kao glavni organ za metabolizam željeza. Transferin, protein koji veže feri željezo ( $\text{Fe}^{3+}$ ) u topivom, netoksičnom obliku kako bi dostavio željezo u koštano srž i druga tkiva, prvenstveno se sintetizira u jetri (HUGGENVIK i sur., 1989.). Upravo transferin u jetri ima ključnu ulogu u regulaciji sustavnog metabolizma željeza i funkcije jetre (YU i sur., 2020.). Nadalje, transferin, kao negativni APP uz albumin, ima smanjene koncentracije tijekom upale, disfunkcije jetre ili sepse. GULDIKEN i sur. (2021.) pokazali su da razine transferina u serumu koreliraju s proizvodnjom transferina u jetri i da njegova sinteza u jetri nije samo izravno regulirana, već također odražava aktivnost signalizacije hepatocitnog nuklearnog čimbenika 4 alfa ( $\text{HNF4}\alpha$ ).

Iz svega navedenog slijedi da proteomska analiza jetre i seruma može doprinijeti boljoj karakterizaciji proteoma divljači, identifikaciji biomarkera i molekularnom opisu specijalizacije organa. Proteom seruma je s medicinskog stajališta najinformativniji, jer gotovo sve stanice izravno ili neizravno komuniciraju s krvlju, a mnoge nakon oštećenja ili smrti i otpuštaju svoj sadržaj u krvotok; dok proteom jetre, kao glavne "tvornice" u organizmu, pruža važne informacije o metaboličkim promjenama kod životinja.

## 7. ZAKLJUČCI

Analiziranjem rezultata dobivenih u ovom istraživanju te njihovom usporedbom s drugim istraživanjima moguće je iznijeti sljedeće zaključke:

- Proteomskim pristupom temeljenim na obilježavanju TMT-om, te LC-MS/MS analizom identificirano je 234 proteina s pomoću najmanje dva jedinstvena peptida i uz 1% FDR u serumu jelena običnog, dok je 87 proteina (prisutnih u najmanje 50% uzoraka) uključeno u bioinformatičku obradu
- Većina proteina u serumu usko je povezana s imunskim sustavom. Najveći broj proteina seruma pripada regulatorima molekularnih funkcija, odnosno zaduženi su za regulaciju enzimskih aktivnosti, te sudjeluju u vezanju na signalne receptore, lipide i ostale molekule
- U jetri jelena običnog identificirano je 493 proteina, a 387 proteina je uključeno u bioinformatičku obradu
- Rezultati analize genske ontologije za proteine jetre pokazali su da najviše proteina ima porijeklo iz mitohondrija i endoplazmatskog retikuluma. Vezano uz funkciju proteina, najzastupljenije su oksidoreduktaze, a najveći broj proteina uključen je u metaboličke procese, translaciju i elongaciju, te biološke oksidacije
- Sedamnaest proteina pokazalo se zajedničkim serumu i jetri

Iz svega navedenog proizlazi da je istraživanje potvrdilo početne pretpostavke: u serumu jelena običnog prevladavaju proteini koji sudjeluju u imunskom odgovoru zbog specifičnosti vrste i životnih uvjeta; dok u jetri prevladavaju proteini s metaboličkom ulogom. Analiza proteoma otkriva mnoge važne funkcije organizma, stoga će daljnje istraživanje proteoma divljih životinja biti primarno težište postgenomske ere.

## 8. LITERATURA

- ABAZA, S. (2014): Heat shock proteins and parasitic diseases: part 1: Helminths. *Parasitolog. United J.* 7, 93–103.
- AEBERSOLD, R., M. MANN (2003): Mass spectrometry-based proteomics. *Nature* 422, 198–207.
- ALONSO-FAUSTE, I., M. ANDRÉS, M. ITURRALDE, F. LAMPREAVE, J. GALLART, M. A. ALAVA (2012): Proteomic characterization by 2-DE in bovine serum and whey from healthy and mastitis affected farm animals. *J. Proteomics* 75, 3015-3030.
- ALVAREZ, L.I., H. D. SOLANA, M. L. MOTTIER, G. L. VIRKEL, I. FAIRWEATHER, C. E. LANUSSE (2005): Altered drug influx/efflux and enhanced metabolic activity in triclabendazole-resistant liver flukes. *Parasitology* 131, 501–510.
- AMARA, U., M. A. FLIERL, D. RITTIRSCH, A. KLOS, H. CHEN, B. ACKER, U. B. BRÜCKNER, B. NILSSON, F. GEBHARD, J. D. LAMBRIS, M. HUBER-LANG (2010): Molecular intercommunication between the complement and coagulation systems. *J. Immunol.* 185, 5628-5636.
- APWEILER, R., A. BAIROCH, C. H. WU (2004): Protein sequence databases. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 8, 76–80.
- BANWELL, B. D. (1997): The Pannonians – *Cervus elaphus pannoniensis* – a race apart. *Deer* 10, 275-277.
- BATRA, J., J. F. HULTQUIST, D. LIU, O. SHTANKO, J. VON DOLLEN, L. SATKAMP, G. M. JANG, P. LUTHRA, T. M. SCHWARZ, G. I. SMALL, E. ARNETT, M. ANANTPADMA, A. REYES, D. W. LEUNG, R. KAAKE, P. HAAS, C. B. SCHMIDT, L. S. SCHLESINGER, D. J. LACOUNT, R. DAVEY, G. K. AMARASINGHE, C. F. BASLER, N. J. KROGAN (2018): Protein Interaction Mapping Identifies RBBP6 as a Negative Regulator of Ebola Virus Replication. *Cell* 175, 1917–1930.
- BECKER, D. J., G. F. ALBERY, A. R. SJODIN, T. POISOT, L. M. BERGNER, B. CHENG, L. E. COHEN, T. A. DALLAS, E. A. ESKEW, A. C. FAGRE, M. J. FARRELL, S. GUTH, B. A. HAN, N. B. SIMMONS, M. STOCK, E. C. TEELING, C. J. CARLSON (2022): Optimising predictive models to prioritise viral discovery in zoonotic reservoirs. *Lancet. Microbe.* e625-e637.

BELETIĆ, A, J. KULEŠ, D. REŠETAR MASLOV, V. FARKAŠ, I. RUBIĆ, B. BEER LJUBIĆ, D. ĐURIČIĆ, D. ŽUBČIĆ, M. SAMARDŽIJA, V. MRLJAK (2023): Profiling the alterations of serum proteome in dairy cows with retained placenta using high-throughput tandem mass tags quantitative approach. *Vet Q.* 43, 1-13.

BENANTI, J. A. (2012): Coordination of cell growth and division by the ubiquitin-proteasome system. *Semin. Cell Dev. Biol.* 23, 492–498.

BERGER, A., K.-M. SCHEIBE, A. BRELURUT, F. SCHOBBER, W. J. STREICH (2002): Seasonal Variation of Diurnal and Ultradian Rhythms in Red Deer. *Biol. Rhythm Res.* 33, 237-253.

BHAVSAR, R. B., L. N. MAKLEY, P. A. TSONIS (2010): The other lives of ribosomal proteins. *Hum. Genom.* 4: 327.

BILIĆ, P., J. KULEŠ, A. GALAN, L. GOMES DE PONTES, N. GUILLEMIN, A. HORVATIĆ, A. FESTA SABES, V. MRLJAK, P. D. ECKERSALL (2018): Proteomics in Veterinary Medicine and Animal Science: Neglected Scientific Opportunities with Immediate Impact. *Proteomics* 18: 1800047.

BINNS, D., E. DIMMER, R. HUNTLEY, D. BARRELL, C. O'DONOVAN, R. APWEILER (2009): QuickGO: a web-based tool for Gene Ontology searching. *Bioinformatics* 25, 3045-3046.

BISLEV, S. L., E. W. DEUTSCH, Z. SUN, T. FARRAH, R. AEBERSOLD, R. L. MORITZ, E. BENDIXEN, M. C. CODREA (2012): A Bovine PeptideAtlas of milk and mammary gland proteomes. *Proteomics* 12, 2895-2899.

BODZON-KULAKOWSKA A., A. BIERCZYNSKA-KRZYSIK, T. DYLAG, A. DRABIK, P. SUDER, M. NOGA, J. JARZEBINSKA, R. CROITOR (2018): Plio-Pleistocene Deer of Western Palearctic: Taxonomy, Systematics, Phylogeny, 1<sup>st</sup> ed., Institute of Zoology of the Academy of Sciences of Moldova, Kişinjev, Moldavia.

BOSCHIERO, C., X. DAI, P. K. LUNDQUIST, S. ROY, T. CHRISTIAN DE BANG, S. ZHANG, Z. ZHUANG, I. TORRES-JEREZ, M. K. UDVARDI, W.-R. SCHEIBLE, P. X. ZHAO (2020): MtSSPdb: the *Medicago truncatula* Small Secreted Peptide Database. *Plant Physiol.* 183, 399–413.



- CATLEY, A., R. A. KOCK, M. G. HART, C. M. HAWKEY (1990): Haematology of clinically normal and sick captive reindeer (*Rangifer tarandus*). *Vet. Rec.* 126, 239-241.
- CECILIANI, F., J. J. CERON, P. D. ECKERSALL, H. SAUERWEIN (2012): Acute phase proteins in ruminants. *J. Proteomics* 75, 4207–4231.
- CECILIANI, F., D. ECKERSALL, R. BURCHMORE, C. LECCHI (2014): Proteomics in veterinary medicine: applications and trends in disease pathogenesis and diagnostics. *Vet. Pathol.* 51, 351-362.
- CHEN, Y., Z. ZHANG, W. JIN, Z. LI, C. BAO, C. HE, Y. GUO, C. LI (2022): Integrative Analyses of Antler Cartilage Transcriptome and Proteome of Gansu Red Deer (*Cervus elaphus kansuensis*) at Different Growth Stages. *Animals* 12: 934.
- CRAY, C., J. ZAIAS, N. H. ALTMAN (2009): Acute phase response in animals: a review. *Comp. Med.* 59, 517–526.
- CROSS, J. P., C. G. MACKINTOSH, J. F. T. GRIFFIN (1994): The haematology of acute bacterial infection in farmed red deer *Cervus elaphus: Yersinia pseudotuberculosis*. *Comp. Hematol. Int.* 4, 86-95.
- CYGAN-SZCZEGIELNIAK, D., K. STASIAK, B. JANICKI, A. ROŚLEWSKA, Magdalena STANEK (2015): Blood plasma proteins and protein fractions in roe deer *Capreolus capreolus* L. *JCEA* 16, 289-298.
- DEVINE, C., G. P. BRENNAN, C. E. LANUSSE, L. I. ALVAREZ, A. TRUDGETT, E. HOEY, I. FAIRWEATHER (2010): Inhibition of cytochrome P450-mediated metabolism enhances ex vivo susceptibility of *Fasciola hepatica* to triclabendazole. *Parasitology* 137, 871–880.
- DEVINE, C., G. P. BRENNAN, C. E. LANUSSE, L. I. ALVAREZ, A. TRUDGETT, E. HOEY, I. FAIRWEATHER (2011): Inhibition of triclabendazole metabolism in vitro by ketoconazole increases disruption to the tegument of a triclabendazole-resistant isolate of *Fasciola hepatica*. *Parasitol. Res.* 109, 981–995.
- DEVINE, C., G. P. BRENNAN, C. E. LANUSSE, L. I. ALVAREZ, A. TRUDGETT, E. HOEY, I. FAIRWEATHER (2012): Potentiation of triclabendazole action in vivo against a triclabendazole-resistant isolate of *Fasciola hepatica* following its co-administration with the metabolic inhibitor, ketoconazole. *Vet. Parasitol.* 184, 37–47.

- ECKERSALL, P. D., R. BELL (2010): Acute phase proteins: Bio-markers of infection and inflammation in veterinary medicine. *Vet. J.* 185, 23–27.
- GRIFFIN, J. F. T., J. P. CROSS, G. S. BUCHAN (1992): Laboratory assays for the diagnosis of tuberculosis in farmed red deer (*Cervus elaphus*). *The biology of deer. Proceedings of the International Symposium on the Biology of Deer*, 28. May - 1. June 1990, Mississippi State University, USA, p. 130-135.
- HALIKAS, G. C., K. BOWERS (1972): Fibrinogen concentration in reindeer blood. *Comp. Biochem. Physiol. Part A: Physiol.* 41, 437-438.
- HARTWIG, H., L. ROKA, D. BARTH (1983): Serum proteins of roe deer. Comparison of paper and immuno-electrophoresis for single and long-term observations. *Zentralbl. Veterinarmed. B* 30, 61-78.
- DARABUŠ, S., I.-Z. JAKELIĆ (2002): *Osnove lovstva*. Hrvatski lovački savez, Zagreb.
- DI GIROLAMO, F., A. D'AMATO, I. LANTE, F. SIGNORE, M. MURACA, L. PUTIGNANI (2014): Farm animal serum proteomics and impact on human health. *Int. J. Mol. Sci.* 15, 15396-15411.
- DIXIT, A., T. E. ROCHE (2012): Spectrophotometric assay of the flavin-containing monooxygenase and changes in its activity in female mouse liver with nutritional and diurnal conditions. *Arch. Biochem. Biophys.* 233, 50-63.
- DOHERTY, M. K., R. J. BEYNON, P. D. WHITFIELD (2008): Proteomics and naturally occurring animal diseases: Opportunities for animal and human medicine. *Proteomics Clin. Appl.* 2, 135-141.
- DONG, Z., S. HAINES, D. COATES (2020): Proteomic profiling of stem cell tissues during regeneration of deer antler - a model of mammalian organ regeneration. *J. Proteome Res.* 19, 1760-1775.
- ESWARAMOORTHY, S., J. B. BONANNO, S. K. BURLEY, S. SWAMINATHAN (2006): Mechanism of action of a flavin-containing monooxygenase. *PNAS* 103, 9832-9837.
- FIGGINS, G., P. HOLLAND (2012): Red deer in New Zealand: Game animal, economic resource or environmental pest?. *NZ Geogr.* 68, 36-48.

FLUECK, W. T. (2010): Exotic deer in southern Latin America: what do we know about impacts on native deer and on ecosystems? *Biol. Invasions* 12, 1909–1922.

FOSS, E. J., D. RADULOVIC, S. A. SHAFFER, D. M. RUDERFER, A. BEDALOV, D. R. GOODLETT, L. KRUGLYAK (2007): Genetic basis of proteome variation in yeast. *Nat. Genet.* 39, 1369–1375.

FOURNIER, T., N. MEDJOUBI, D. PORQUET (2000): Alpha-1-acid glycoprotein. *Biochim. Biophys. Acta* 1482, 306–311.

FRANCO, C., R. SOARES, E. PIRES, K. KOCI, A. M. ALMEIDA, R. SANTOS, A. VARELA COELHO (2013): Understanding regeneration through proteomics. *Proteomics* 13, 686–709.

GARCÍA-LUNAR, P., J. REGIDOR-CERRILLO, D. GUTIÉRREZ-EXPÓSITO, L. ORTEGA-MORA, G. ALVAREZ-GARCÍA (2013): First 2-DE approach towards characterising the proteome and immunome of *Besnoitia besnoiti* in the tachyzoite stage. *Vet. Parasitol.* 195, 24-34.

GAO, L., D. TAO, Y. SHAN, Z. LIANG, L. ZHANG, Y. HUO, Y. ZHANG (2010): HPLCMS/MS shotgun proteomic research of deer antlers with multiparallel protein extraction methods. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 878, 3370–3374.

GE, S. X., D. JUNG, R. YAO (2019): ShinyGO: a graphical gene-set enrichment tool for animals and plants. *Bioinformatics* 36, 2628-2629.

GEIST, V. (1998): *Deer of the World: Their Evolution, Behavior, and Ecology*. Stackpole Books, Mechanicsburg, Pennsylvania, USA.

GILLESPIE, M., B. JASSAL, R. STEPHAN, M. MILACIC, K. ROTHFELS, A. SENFF-RIBEIRO, J. GRISS, C. SEVILLA, L. MATTHEWS, C. GONG, C. DENG, T. VARUSAI, E. RAGUENEAU, Y. HAIDER, B. MAY, V. SHAMOVSKY, J. WEISER, T. BRUNSON, N. SANATI, L. BECKMAN, X. SHAO, A. FABREGAT, K. SIDIROPOULOS, J. MURILLO, G. VITERI, J. COOK, S. SHORSER, G. BADER, E. DEMIR, C. SANDER, R. HAW, G. WU, L. STEIN, H. HERMIAKOB, P. D'EUSTACHIO (2021): The reactome pathway knowledgebase 2022. *Nucl. Acids Res.* 50 (D1), D687-D692.

GOLDSTEIN, B., N. KING (2016): The Future of Cell Biology: Emerging Model Organisms. *Trends Cell Biol.* 26, 818–824.

GRAVES P. R., T. A. HAYSTEAD (2002): Molecular biologist's guide to proteomics. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 66, 39-63.

GULDIKEN, N., J. ARGEMI, B.GURBUZ, i sur. (2021):. Serum transferrin as a biomarker of hepatocyte nuclear factor 4 alpha activity and hepatocyte function in liver diseases. *BMC Med* 19, 39.

GYLLENSTEN, U., N. RVMAN, C. REUTERWALL, P. DRATCH (1983): Genetic differentiation in four European subspecies of red deer (*Cervus elaphus* L). *Heredity* 51, 561—580.

HARTL, G. B., F. ZACHOS, K. NADLINGER (2003): Genetic diversity in European red deer (*Cervus elaphus* L): anthropogenic influences on natural populations. *C. R. Biol.* 326, 37–42.

HE, F. (2005): "Human liver proteome project." *Mol. Cell. Proteomics* 4, 1841-1848.

HECK, M., B. A. NEELY (2020): Proteomics in Non-model Organisms: A New Analytical Frontier. *J. Proteome Res.* 19, 3595–3606.

HILLSON, S. (2005): *Teeth*, 2<sup>nd</sup> edn. Cambridge University Press, Cambridge, UK.

HONDA, K. (2015): The biological role of actinin-4 (ACTN4) in malignant phenotypes of cancer. *Cell Biosci.* 5 (1) 41.

HORVATIĆ, A., N. GUILLEMIN, H. KAABB, D. MCKEEGAN, E. O'REILLY, M. BAIN, J. KULEŠ, D. P. ECKERSALL (2019): Quantitative proteomics using tandem mass tags in relation to the acute phase protein response in chicken challenged with *Escherichia coli* lipopolysaccharide endotoxin. *J. Proteomics.* 192, 64-77.

HU, J.-Y., Y.-P. ZHANG, L. YU (2012): Summary of Laurasiatheria (Mammalia) Phylogeny. *Zool. Res.* 33(E5-6), E65-E74.

HUGGENVIK, J.I., C.M. CRAVEN, R.L. IDZERDA, S. BERNSTEIN, J. KAPLAN, G.S. MCKNIGHT (1989): A splicing defect in the mouse transferrin gene leads to congenital atransferrinemia. *Blood.* 74(1):482-486.

KANG, J., N. BRAJANOVSKI, K. T. CHAN, J. XUAN, R. B. PEARSON, E. SANIJ (2021): Ribosomal proteins and human diseases: molecular mechanisms and targeted therapy. *Sig. Transduct. Target. Ther.* 6: 323.

KAY, R. N. B., M. L. RYDER (1978): Coat growth in Red deer (*Cervus elaphus*) exposed to a day-length cycle of six months duration. *J. Zool.* 185, 505-510.

KELLY, S. A., C. M. HAVRILLA, T. C. BRADY, K. H. ABRAMO, E. D. LEVIN (1998): Oxidative stress in toxicology: established mammalian and emerging piscine model systems. *Envir. Health Persp.* 106, 375-384.

KELMER SACRAMENTO, E., J. M. KIRKPATRICK, M. MAZZETTO, M. BAUMGART, A. BARTOLOME, S. DI SANZO, C. CATERINO, M. SANGUANINI, N. PAPADEVGENIOU, M. LEFAKI, D. CHILDS, S. BAGNOLI, E. TERZIBASI TOZZINI, D. DI FRAIA, N. ROMANOV, P. H. SUDMANT, W. HUBER, N. CHONDROGIANNI, M. VENDRUSCOLO, A. CELLERINO, A. ORI (2020): Reduced proteasome activity in the aging brain results in ribosome stoichiometry loss and aggregation. *Mol. Syst. Biol.* 16: e9596.

KIERDORF, U., H. KIERDORF, T. SZUWART (2007): Deer Antler Regeneration: Cells, Concepts, and Controversies. *J. Morphol.* 268, 726–738.

KOLLARS, P. G., M. L. BECK, S. G. MECH, P. K. KENNEDY, M. L. KENNEDY (2004): Temporal and spatial genetic variability in white tailed deer (*Odocoileus virginianus*). *Genetica* 121, 269–276.

KRASNY, L., P. H. HUANG (2021): Data-independent acquisition mass spectrometry (DIA-MS) for proteomic applications in oncology. *Mol. Omics*, 17, 29-42.

KUBES, P., C. JENNE (2018): Immune Responses in the Liver. *Ann. Rev. Immunol.* 36, 247-277.

KULEŠ, J., L. LOVRIĆ, A. GELEMANOVIĆ, B. BEER LJUBIĆ, I. RUBIĆ, M. BUJANIĆ, D. KONJEVIĆ (2021): Complementary liver and serum protein profile in wild boars infected by the giant liver fluke *Fascioloides magna* using tandem mass tags quantitative approach. *J. Proteomics* 247: 104332.

LAPORTA, J., G. J. ROSA, H. NAYA, M. CARRIQUIRY (2014): Liver functional genomics in beef cows on grazing systems: novel genes and pathways revealed. *Physiol. Genomics* 46, 138-147.

LEE, J. E., J. Y. LEE, H. R. KIM, H. Y. SHIN, T. LIN, D. I. JIN (2015): Proteomic Analysis of Bovine Pregnancy-specific Serum Proteins by 2D Fluorescence Difference Gel Electrophoresis. *Asian-Australas. J. Anim. Sci.* 28, 788-95.

LI, F. (2013): Receptor recognition and cross-species infections of SARS coronavirus. *Antiviral Res.* 100, 246–54.

LI, C., H. ZHAO, Z. LIU, C. MCMAHON (2014): Deer antler—a novel model for studying organ regeneration in mammals. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 56, 111–22.

LIU, Y., A. BEYER, R. AEBERSOLD (2016): On the Dependency of Cellular Protein Levels on mRNA Abundance. *Cell* 165, 535–550.

LOPES, M. M., T. R. BRITO, J. F. LAGE, T. C. COSTA, M. M. D. S. FONTES, N. V. L. SERÃO, T. A. O. MENDES, R. A. REIS, R. VERONEZE, F. F. SILVA, M. S. DUARTE (2021): Proteomic Analysis of Liver from Finishing Beef Cattle Supplemented with a Rumen-Protected B-Vitamin Blend and Hydroxy Trace Minerals. *Animals* 11: 1934.

LÓPEZ-PEDROUSO, M., F. DANIEL, M. P. SERRANO, A. MAGGIOLINO, T. LANDETE-ASTILLEJOS, P. DE PALO, J. M. LORENZO (2019): A proteomic-based approach for the search of biomarkers in Iberian wild deer (*Cervus elaphus*) as indicators of meat quality. *J. Proteomics* 205, 103422.

LÓPEZ-PEDROUSO, M., J. M. LORENZO, T. LANDETE-CASTILLEJOS, L. CHONCO, F. JAVIER PÉREZ-BARBERÍA, A. GARCÍA, M.-P. LÓPEZ-GARRIDO, D. FRANCO (2021): SWATH-MS Quantitative Proteomic Analysis of Deer Antler from Two Regenerating and Mineralizing Sections. *Biol.* 10: 679.

MACKIEWICZ, P., M. MATOSIUK, M. ŚWISŁOCKA, F. E. ZACHOS, G. M. HAJJI, A. P. SAVELJEV, I. V. SERYODKIN, T. FARAHVASH, H. REZA REZAEI, R. VAEZ TORSHIZI, S. MATTIOLI, M. RATKIEWICZ (2022): Phylogeny and evolution of the genus *Cervus* (Cervidae, Mammalia) as revealed by complete mitochondrial genomes. *Sci. Rep.* 12: 16381.

MAITY, S., I. RUBIĆ, J. KULEŠ, A. HORVATIĆ, D. ĐURIČIĆ, M. SAMARDŽIJA, B. BEER LJUBIĆ, R. TURK, D. GRAČNER, N. MAČEŠIĆ, H. VALPOTIĆ, V. MRLJAK (2021): Integrated Metabolomics and Proteomics Dynamics of Serum Samples Reveals Dietary Zeolite Clinoptilolite Supplementation Restores Energy Balance in High Yielding Dairy Cows. *Metabolites* 11: 842.

MANOJLOVIĆ, L., K. KRAPINEC, M. BUJANIĆ, D. KONJEVIĆ (2022): Pannonian red deer (*Cervus elaphus pannoniensis*) in Croatia – review and facts. *Zbornik sažetaka* 10th

International Deer Biology Congress (Konjević, D., M. Bujanić, N. Škvorc, ur.). Osijek, 4. – 9. 9. 2022. Sveučilište u Zagrebu Veterinarski fakultet, Zagreb, Hrvatska, str. 136-137.

MARGETIĆ, S. (2012): Inflammation and haemostasis. *Biochem. Med. (Zagreb)* 22, 49–62.

MARMAN, M. (2021): Usporedba trofejnih parametara rogovlja jelena običnog (*Cervus elaphus* L.) iz Hrvatske i nekih zemalja središnje i istočne Europe. Diplomski rad. Sveučilište u Zagrebu, Fakultet šumarstva i drvne tehnologije, Zagreb.

MERLE, N. S., R. NOE, L. HALBWACHS-MECARELLI, V. FREMEAUX-BACCHI, L. T. ROUMENINA (2015): Complement System Part II: Role in Immunity. *Front. Immunol.* 6: 257.

MOSER, M., H. PFISTER, R. M. BRUCKMAIER, J. REHAGE, J.W. BLUM (1994). Blood serum transferrin concentration in cattle in various physiological states, in veal calves fed different amounts of iron, and in cattle affected by infectious and non-infectious diseases. *Zentralbl Veterinarmed A.* 41(6):413-20.

MOSS, T. (2004): At the crossroads of growth control: making ribosomal RNA. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 14, 210–217.

OIKONOMOPOULOU, K., D. RICKLIN, P. A. WARD, J. D. LAMBRIS (2012): Interactions between coagulation and complement--their role in inflammation. *Semin Immunopathol.* 34, 151-165.

PARK, H. J., L. DO HEE, S. G. PARK, S. C. LEE, S. CHO, H. K. KIM, J. J. KIM, H. BAE, B. C. PARK (2004): Proteome analysis of red deer antlers. *Proteomics* 4, 3642–3653.

PETRI, B., M. PHILLIPSON, P. KUBES (2008): The physiology of leukocyte recruitment: an in vivo perspective. *J. Immunol.* 180, 6439–6446.

POKORNY, B., K. FLAJŠMAN, L. CENTORE, F. S. KROPE, N. ŠPREM (2017): Border fence: a new ecological obstacle for wildlife in Southeast Europe. *Eur. J. Wildl. Res.* 63: 1.

RADKO, A., D. ZALEWSKI, D. RUBIŚ, A. SZUMIEC (2014): Genetic differentiation among populations of red deer (*Cervus elaphus* L.) in Poland based on microsatellite DNA polymorphism. *Acta. Biol. Hung.* 65, 414–427.

RIBEIRO, D. M., A. A. K. SALAMA, A. C. M. VITOR, A. ARGÜELLO, C. T. MONCAU, E. M. SANTOS, G. CAJAB JULIAN, S. DE OLIVEIRA. J. C. C. BALIEIRO, L. E. HERNÁNDEZ-CASTELLANO, M. ZACHUT, M. D. POLETI, N. CASTRO, S. P. ALVES,

A. M. ALMEIDA (2020): The application of omics in ruminant production: a review in the tropical and subtropical animal production context. *J. Proteomics* 227: 103905.

RICKLIN, D., G. HAJISHENGALLIS, K. YANG, J. D. LAMBRIS (2010): Complement: a key system for immune surveillance and homeostasis. *Nat. Immunol.* 11, 785-97.

ROY, J. H. B. (1990): *The Calf. Management of Health.* Blackwell Science, Oxford, UK.

RUSSELL, J. J., J. A. THERIOT, P. SOOD, W. F. MARSHALL, L. F. LANDWEBER, L. FRITZ-LAYLIN, J. K. POLKA, S. OLIFERENKO, T. GERBICH, A. GLADFELTER, J. UMEN, M. BEZANILLA, M. A. LANCASTER, S. HE, M. C. GIBSON, B. GOLDSTEIN, E. M. TANAKA, C. K. HU, A. BRUNET (2017): Non-model model organisms. *BMC Biol.* 15, 55.

RUXTON, G. D., N. COLEGRAVE (2016): Dizajniranje istraživanja u biomedicinskim znanostima. 1. hrvatsko izdanje (Jovanov Milošević, N. ur. hrvatskog izdanja). Medicinska naklada, Zagreb, 60-73.

RYDER, M. L., R. N. B. KAY (1973): Structure of and seasonal change in the coat of Red deer (*Cervus elaphus*). *J. Zool.* 170, 69-77.

SALOVSKA, B., H. ZHU, T. GANDHI, M. FRANK, W. LI, G. ROSENBERGER, C. WU, P. L. GERMAIN, H. ZHOU, Z. HODNY, L. REITER, Y. LIU (2020): Isoform-resolved correlation analysis between mRNA abundance regulation and protein level degradation. *Mol. Syst. Biol.* 16: e9170.

SCHOCH C. L., S. CIUFO, M. DOMRACHEV, C. L. HOTTON, S. KANNAN, R. KHOVANSKAYA, D. LEIPE, R. MCVEIGH, K. O'NEILL, B. ROBERTSE, S. SHARMA, V. SOUSSOV, J. P. SULLIVAN, L. SUN, S. TURNER, I. KARSCH-MIZRACHI (2020): NCBI Taxonomy: a comprehensive update on curation, resources and tools. *Database (Oxford)* 1: 2020:baaa062.

SCHWARTZ, A. L., A. CIECHANOVER (1999): The ubiquitin-proteasome pathway and pathogenesis of human diseases. *Annu. Rev. Med.* 50, 57-74.

SETH, M., E. A. LAMONT, H. K. JANAGAMA, A. WIDDEL, L. VULCHANOVA, J. R. STABEL, W. R. WATERS, M. V. PALMER, S. SREEVATSAN (2009): Biomarker discovery in subclinical mycobacterial infections of cattle. *PLoS One* 4: e5478.



SIBBALD, A. M. (1994): Effect of changing daylength on the diurnal pattern of intake and feeding behaviour in penned red deer (*Cervus elaphus*). *Appetite* 22, 197-203.

SILBERRING (2007): Methods for samples preparation in proteomic research. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 849, 1-31.

SHAH, P. S., N. LINK, G. M. JANG, P. P. SHARP, T. ZHU, D. L. SWANEY, J. R. JOHNSON, J. VON DOLLEN, H. R. RAMAGE, L. SATKAMP, B. NEWTON, R. HÜTTENHAIN, M. J. PETIT, T. BAUM, A. EVERITT, O. LAUFMAN, M. TASSETTO, M. SHALES, E. STEVENSON, G. N. IGLESIAS, L. SHOKAT, S. TRIPATHI, V. BALASUBRAMANIAM, L. G. WEBB, S. AGUIRRE, A. J. WILLSEY, A. GARCIA-SASTRE, K. S. POLLARD, S. CHERRY, A. V. GAMARNIK, I. MARAZZI, J. TAUNTON, A. FERNANDEZ-SESMA, H. J. BELLEN, R. ANDINO, N. J. KROGAN (2018): Comparative Flavivirus-Host Protein Interaction Mapping Reveals Mechanisms of Dengue and Zika Virus Pathogenesis. *Cell* 175, 1931–1945.

SOUZA, T. T. S., M. F. VAN TILBURG, M. J. B. BEZERRA, L. D. ROLA, L. M. C. PEREIRA, J. M. B. DUARTE, M. S. CHAVES, L. M. MELO, A. A. A. N. MOURA, V. J. F. FREITAS (2022): Global proteomic analysis of the follicular fluid from brown brocket deer (*Mazama gouazoubira*; Fisher, 1814). *Eur. J. Wildl. Res.* 68: 13.

SUTHERLAND, R. J., B. W. SAUNDERS, L. A. GUY (1985): Blood coagulation parameters in clinically normal intensively farmed red deer (*Cervus elaphus*) and fallow deer (*Dama dama*). *N. Z. Vet. J.* 33, 14-16.

SUTHERLAND, R. J., R. E. OLIVER, B. W. SAUNDERS, W. S. POOLE (1987): Changes in blood coagulation parameters of red deer (*Cervus elaphus*) experimentally infected with malignant catarrhal fever. *N. Z. Vet. J.* 35, 150-154.

STENVINKEL, P., J. PAINER, M. KURO-O, M. LANASPA, W. ARNOLD, T. RUF, P. G. SHIELS, R. J. JOHNSON (2018): Novel treatment strategies for chronic kidney disease: insights from the animal kingdom. *Nat. Rev. Nephrol.* 14, 265–284.

STENVINKEL, P., J. PAINER, R. J. JOHNSON, B. NATTERSON-HOROWITZ (2020): Biomimetics - Nature's roadmap to insights and solutions for burden of lifestyle diseases. *J. Intern. Med.* 287, 238–251.

SU, H., X. TANG, X. ZHANG, L. LIU, L. JING, D. PAN, W. SUN, H. HE, C. YANG, D. ZHAO, H. ZHANG, B. QI (2019): Comparative proteomics analysis reveals the difference during antler regeneration stage between red deer and sika deer. *PeerJ* 7: e7299.

SUI, Z., L. ZHANG, Y. HUO, Y. ZHANG (2014): Bioactive components of velvet antlers and their pharmacological properties. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 87, 229–240.

SUI, Z., H. SUN, Y. WENG, X. ZHANG, M. SUN, R. SUN, B. ZHAO, Z. LIANG, Y. ZHANG, C. LI, L. ZHANG (2020): Quantitative proteomics analysis of deer antlerogenic periosteal cells reveals potential bioactive factors in velvet antlers. *J. Chromatogr. A.* 1609, 460496.

SWARTZ, T. H., U. MOALLEM, H. KAMER, G. KRA, Y. LEVIN, L. K. MAMEDOVA, B. J. BRADFORD, M. ZACHUT (2021): Proteome dataset of liver from dairy cows experiencing negative or positive energy balance at early lactation. *Data Brief.* 39: 107517.

ŠIMONJI, K., D. KONJEVIĆ, M. BUJANIĆ, I. RUBIĆ, V. FARKAŠ, A. BELETIĆ, L. GRBAVAC, J. KULEŠ (2022): Liver Proteome Alterations in Red Deer (*Cervus elaphus*) Infected by the Giant Liver Fluke *Fascioloides magna*. *Pathogens* 11 (12): 1503.

TALAMO, F., C. D'AMBROSIO, S. ARENA, P. DEL VECCHIO, L. LEDDA, G. ZEHENDER, L. FERRARA, A. SCALONI (2003): Proteins from bovine tissues and biological fluids: Defining a reference electrophoresis map for liver, kidney, muscle, plasma and red blood cells. *Proteomics* 3, 440-460.

TANG, H. Y., L. A. BEER, D. W. SPEICHER (2011): In-Depth Analysis of a Plasma or Serum Proteome Using a 4D Protein Profiling Method. *Methods Mol. Biol.* 728, 47–67.

TANG, X.-M., J.-L. GUO, L. CHEN, P. CHI-LUI HO (2020): Application for proteomics analysis technology in studying animal-derived traditional Chinese medicine: A review. *J. Pharm. Biomed. Analysis* 191: 113609.

THE UNIPROT CONSORTIUM (2020): UniProt: the universal protein knowledgebase in 2021. *Nucl. Acids Res.* 49 (D1), D480-D489.

THOMSON, E., S. FERREIRA-CERCA, E. HURT (2013): Eukaryotic ribosome biogenesis at a glance. *J. Cell Sci.* 126, 4815–4821.

TOAPANTA, F. R., T. M. ROSS (2006): Complement-mediated activation of the adaptive immune responses. *Immunol. Res.* 36, 197–210.

- TOTHOVA, C., O. NAGY, G. KOVAC (2014): Acute phase proteins and their use in the diagnosis of diseases in ruminants: a review. *Vet. Med-Czech.* 59, 163-180.
- TROUWBORST, A., F. FLEURKE, J. DUBRULLE (2016): Border Fences and their Impacts on Large Carnivores, Large Herbivores and Biodiversity: An International Wildlife Law Perspective. *RECIEL* 25, 291-306.
- TURK, R., C. PIRAS, M. KOVAČIĆ, M. SAMARDŽIJA, H. AHMED, M. DE CANIO, A. URBANI, Z. F. MEŠTRIĆ, A. SOGGIU, L. BONIZZU, P. RONCADA (2012): Proteomics of inflammatory and oxidative stress response in cows with subclinical and clinical mastitis. *J. Proteomics* 75, 4412-4428.
- VICENTE, J., J. MARTINEZ-GUIJOSA, A. TVARIJONAVICIUTE, I.G. FERNANDEZ-DE MERA, C. GORTAZAR, J.J. CERON, S. MARTINEZ-SUBIELA (2019): Serum haptoglobin response in red deer naturally infected with tuberculosis. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 64, 25-30.
- VALLADAS, H., I. CLOTTE, J. M. GENESTE, M. A. GARCIA, M. ARNOLD, H. CACHIER, N. TISNÉRAT-LABORDE (2001): Evolution of prehistoric cave art. *Nature* 413: 479.
- WAGENER, F. A., A. EGGERT, O. C. BOERMAN, W. J. OYEN, A. VERHOFSTAD, N. G. ABRAHAM, G. ADEMA, Y. VAN KOOYK, T. DE WITTE, C. G. FIGDOR (2002): Heme is a potent inducer of inflammation in mice and is counteracted by heme oxygenase. *Blood* 98, 1802–1811
- WAIT, R., I. MILLER, I. EBERINI, F. CAIROLI, C. VERONESI, M. BATTOCCHIO, M. GEMEINER, E. GIANAZZA (2002): Strategies for proteomics with incompletely characterized genomes: the proteome of *Bos taurus* serum. *Electrophoresis* 23, 3418-3427.
- WANG, L., Z. RANRAN, L. HUAMIAO, L. HUITAO, Z. YONGNA, D. SHIWU, X. XIUMEI (2017): Comparative proteomics analysis on different parts of *Cervus elaphus songaricus* velvet antler. *Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica* 48, 1401-1415.
- WARD, T. J., D. E. TOWELL (1982): *Elk of North America, Ecology and Management*. Stackpole, New York, USA.
- WASINGER, V. C., S. J. CORDWELL, A. CERPA-POLJAK, J. X. YAN, A. A. GOOLEY, M. R. WILKINS, M. W. DUNCAN, R. HARRIS, K. L. WILLIAMS, I. HUMPHERY-SMITH

(1995): Progress with gene-product mapping of the Mollicutes: *Mycoplasma genitalium*. Electrophoresis 16, 1090-1094.

WAGENKNECHT, E. (1984): Altersbestimmung des erlegten Wildes. Neumann-Neudamm, Melsungen, Germany.

WEI, Y., K. YI, C. SHEN, X. CHEN, T. IQBAL, M. CAO, T. CHEN, Y. LUO, J. LI, X. ZHOU, C. LI, L. CHEN (2022): Whole Transcriptome Profiling of the Effects of Cadmium on the Liver of the Xiangxi Yellow Heifer. Front. Vet. Sci. 9: 846662.

WERCK-REICHHART, D., R. FEYEREISEN (2000): Cytochromes P450: a success story. Genome Biol. 1, 1-9.

WILLIAMS, P. A., J. COSME, V. SRIDHAR, E. F. JOHNSON, D. E. MCREE (2000): Mammalian microsomal cytochrome P450 monooxygenase: structural adaptations for membrane binding and functional diversity. Mol. Cell. 5, 121-131.

WILSON, D. E., D. M. REEDER (2005): Mammal Species of the World, 3rd edn. The Johns Hopkins University Press, Baltimore, USA.

WISNIEWSKI J. R., A. ZOUGMAN, N. NAGARAJ, M. MANN (2009): Universal sample preparation method for proteome analysis. Nat. Methods 6, 359.

XUE, F., B. WANG, D.-X. GUO, Y. JIAO, X. YIN, W.-L. CUI, Q.-Q. ZHOU, F.-R. YU, Y.-Q. LIN (2022): Peptide Biomarkers Discovery for Seven Species of Deer Antler Using LC-MS/MS and Label-Free Approach. Molecules 27: 4756.

YATES J. R., C. I. RUSE, A. NAKORCHEVSKY (2009): Proteomics by mass spectrometry: approaches, advances, and applications. Annu. Rev. Biomed. Engl. 11, 49-79.

YEN, H.C., Q. XU, D. M. CHOU, Z. ZHAO, S. J. ELLEDGE (2008): Global protein stability profiling in mammalian cells. Science 322, 918–923.

YOU, Q., C. P. VERSCHOOR, S. D. PANT, J. MACRI, G. M. KIRBY, N. A. KARROW (2012): Proteomic analysis of plasma from Holstein cows testing positive for *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP). Vet. Immunol. Immunopathol. 148, 243-51.

YU, Y., L. JIANG, H. WANG, Z. SHEN, Q. CHENG, P. ZHANG, J. WANG, Q. WU, X. FANG, L. DUAN, S. WANG, K. WANG, P. AN, T. SHAO, R. T. CHUNG, S. ZHENG, J.

MIN, F. WANG (2020): Hepatic transferrin plays a role in systemic iron homeostasis and liver ferroptosis. *Blood*. 136 (6): 726–739.

ZACHOS, F., G. B. HARTL (2011): Phylogeography, population genetics and conservation of the European red deer *Cervus elaphus*. *Mammal. Rev.* 41, 138-150.

ZHANG, R., Y. LI, X. XING (2021): Comparative antler proteome of sika deer from different developmental stages. *Sci. Rep.* 11: 10484.

ZHAO, X., K.S. HSU, J.H. LIM, L.A. BRUGGEMAN, H.Y. KAO (2015):  $\alpha$ -Actinin 4 potentiates nuclear factor  $\kappa$ -light-chain-enhancer of activated B-cell (NF- $\kappa$ B) activity in podocytes independent of its cytoplasmic actin binding function, *J. Biol. Chem.* 290 (1) 338–349.

ZHENG, Y., S. M. SWEET, R. POPOVIC, E. MARTINEZ-GARCIA, J. D. TIPTON, P. M. THOMAS, J. D. LICHT, N. L. KELLEHER (2012): Total kinetic analysis reveals how combinatorial methylation patterns are established on lysines 27 and 36 of histone H3. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 109, 13549–13554.

## 9. ŽIVOTOPIS

Karol Šimonji rođen je 10. lipnja 1966. godine u Osijeku. Osnovnu školu pohađao je u Osijeku, Zagrebu i Kloštar Ivaniću, a srednju u Ivanić Gradu i Zagrebu. Studij veterinarske medicine na Veterinarskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu upisuje 1985. godine, a diplomira 2002. godine. Od 1993. godine je zaposlenik Klinike za unutarnje bolesti Veterinarskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu kao tehnički suradnik do 1997. godine, kao viši laborant do 2011. godine, stručni suradnik do 2020. godine, a kao viši stručni suradnik do danas. Završava stručni poslijediplomski studij iz „Uzgoja i patologije domaćih mesoždera“ na Veterinarskom fakultetu 2013./2014. godine te iste godine upisuje poslijediplomski doktorski studij Veterinarske znanosti. Bio je sudionik na više nacionalnih i međunarodnih znanstvenih i stručnih skupova te radionica. Sudjeluje u izvođenju dodiplomske nastave (priprema predavanja i suradnja na vježbama) iz Kliničke propedeutike, Unutarnjih bolesti, Hitne i intenzivne veterinarske medicine. Karol Šimonji također aktivno sudjeluje u svakodnevnom radu ambulante Klinike za unutarnje bolesti te u poslijepodnevnom, noćnim i vikend dežurstvima. Područje posebnog interesa su mu unutarnje bolesti malih životinja te endokrinologija. Član je Hrvatske veterinarske komore. Kao autor ili koautor objavio je 30-ak znanstvenih i stručnih radova.

U nastavku slijede sudjelovanja na nedavnim skupovima te popis novijih radova.

### **Sudjelovanje na kongresima i stručnim skupovima:**

10th International Deer Biology Congress, Osijek, 5. rujna-9. rujna 2022.

9<sup>th</sup> INTERNATIONAL CONGRESS VETERINARY SCIENCE AND PROFESSION,  
Zagreb, 9. listopada 2021.

„Citology in veterinary medicine (Body cavity effusions)“, Zagreb 4. listopada 2013.

### **Popis novijih radova:**

GRDEN, D., J. GOTIĆ, I. ŠMIT, M. CRNOGAJ, N. BRKLJAČA BOTTEGARO, **K. ŠIMONJI**, D. IVŠIĆ ŠKODA, B. BEER LJUBIĆ, N. KUČER (2020): EKG u hrvatskog Posavca i lipicanca - frekvencija i ritam. Vet. stanica, 51, 33-45.

GRDEN, D., J. GOTIĆ, **K. ŠIMONJI**, N. KUČER, V. MRLJAK, I. ŠMIT, M. CRNOGAJ, V. MATIJATKO (2019): Hematological and biochemical reference intervals for adult Croatian Posavac horse. *Vet. arhiv* 89, 771-783.

**ŠIMONJI, K.**, D. KONJEVIĆ, M. BUJANIĆ, I. RUBIĆ, V. FARKAŠ, A. BELETIĆ, L. GRBAVAC, J. KULEŠ (2022): Liver proteome profile in red deer (*Cervus elaphus*) infected by the liver fluke *Fascioloides magna*. Book of Abstracts, 10th International Deer Biology Congress, 4.-9. September, Osijek, Croatia, pp. 142-143.

BRKLJAČIĆ, M., N. KUČER, I. KIŠ, M. TORTI, G. JURKIĆ, **K. ŠIMONJI**, T. DODIG, N. SUBAŠIĆ, M. EFENDIĆ, E. MADUNA, I. FILIPČIĆ, V. MATIJATKO (2021): Lockdown clear-out?-Incidence of euthanasia at clinic for internal medicine at Faculty of Veterinary medicine, University of Zagreb, Croatia during the lockdown in 2020. Book of Abstracts, 9 th International Congress Veterinary Science and Profession, 9. October, Zagreb, Croatia, p. 92.

EĆIMOVIĆ, L., I. ŠMIT, V. ĐURIĆ, J. GOTIĆ, D. IVŠIĆ ŠKODA, I. FILIPČIĆ, **K. ŠIMONJI**, B. BEER LJUBIĆ (2021): Does storage of blood in EDTA tube affect hematologic parameters or not?. Book of Abstracts, 9 th International Congress Veterinary Science and Profession, 9. October, Zagreb, Croatia, p. 85.

GOJKOVIC, S., I. KREZIC, H. VRANES, H. ZIZEK, D. DRMIC, L. BATELJA VULETIC, M. MILAVIC, S. SIKIRIC, I. STILINOVIC, P. SIMEON, M. KNEZEVIC, T. KOLAK, M. TEPES, **K. SIMONJI**, S. STRBE, N. NIKOLAC GABAJ, I. BARISIC, E. G. ORESKOVIC, E. LOVRIC, A. KOKOT, A. SKRTIC, A. BOBAN BLAGAIC, S. SEIWERTH, P. SIKIRIC (2021): Robert's Intragastric Alcohol-Induced Gastric Lesion Model as an Escalated General Peripheral and Central Syndrome, Counteracted by the Stable Gastric Pentadecapeptide BPC 157. *Biomedicines* 9, 1-31.

**ŠIMONJI, K.**, D. KONJEVIĆ, M. BUJANIĆ, I. RUBIĆ, V. FARKAŠ, A. BELETIĆ, L. GRBAVAC, J. KULEŠ (2022): Liver Proteome Alterations in Red Deer (*Cervus elaphus*) Infected by the Giant Liver Fluke *Fascioloides magna*. *Pathogens* 11: 1503.

TEPES, M., S. GOJKOVIC, I. KREZIC, H. ZIZEK, H. VRANES, Z. MADZAR, G. SANTAK, L. BATELJA, M. MILAVIC, S. SIKIRIC, I. KOCCMAN, **K. SIMONJI**, M. SAMARA, M. KNEZEVIC, I. BARISIC, E. LOVRIC, S. STRBE, A. KOKOT, I. SJEKAVICA, T. KOLAK, A. SKRTIC, S. SEIWERTH, A. B. BLAGAIC, P. SIKIRIC (2021): Stable Gastric Pentadecapeptide BPC 157 Therapy for Primary Abdominal Compartment Syndrome in Rats. *Front. Pharmacol.* 12: 718147.

Poveznica za radove:

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/?term=karol+simonji>

[https://scholar.google.com/scholar?q=%22karol+%C5%A0imonji%22&hl=hr&as\\_sdt=0,5](https://scholar.google.com/scholar?q=%22karol+%C5%A0imonji%22&hl=hr&as_sdt=0,5)