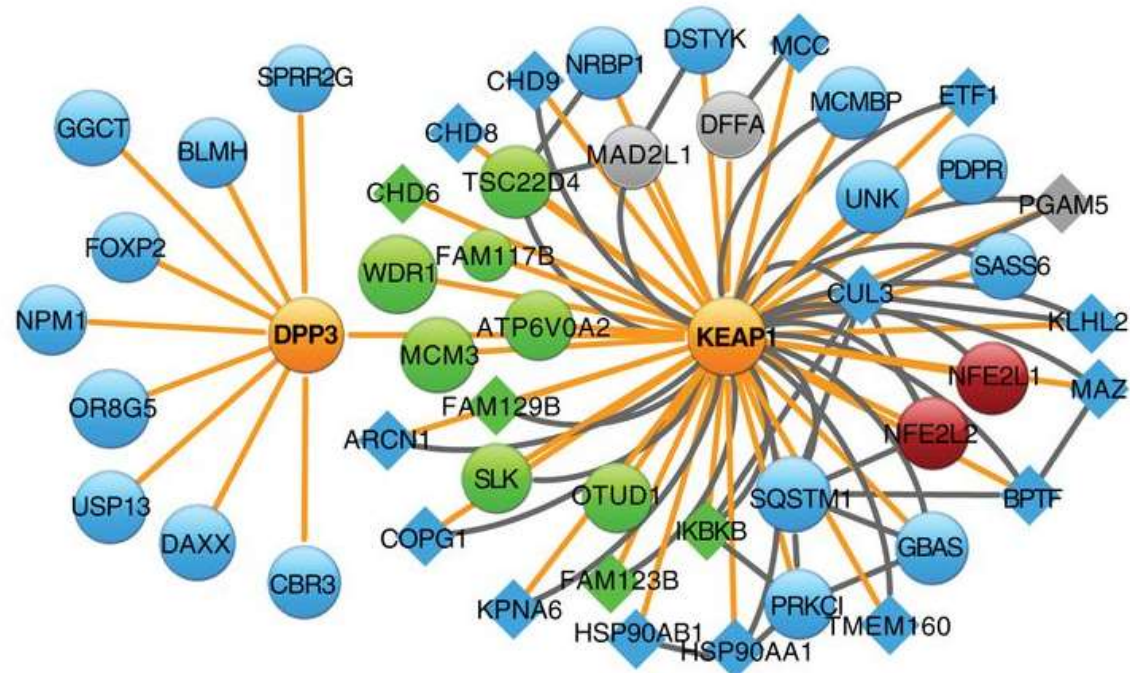


Istraživanje proteinskih interaktora dipeptidil peptidaze 3

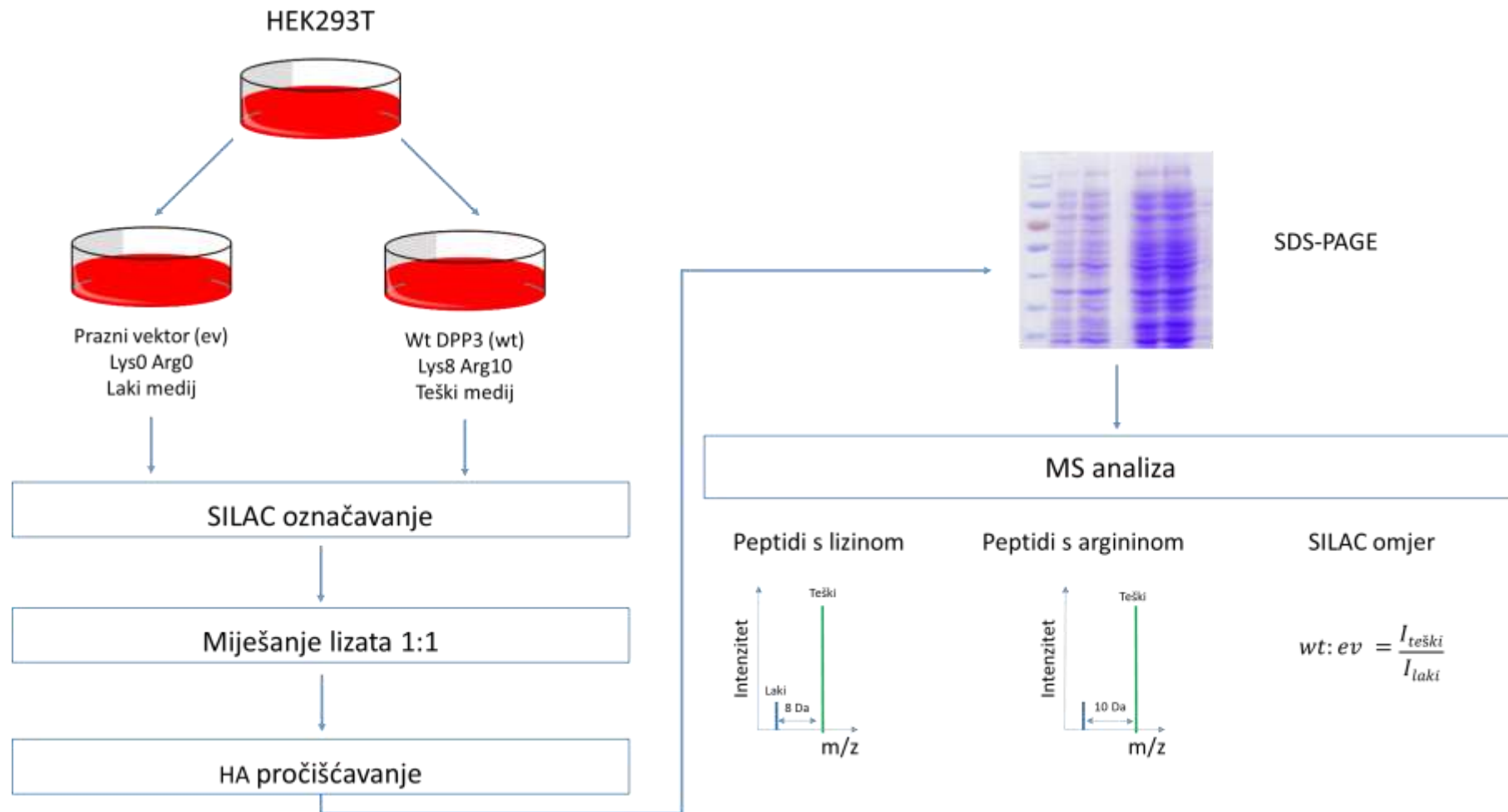
Uloga hDPP3 u Nrf2/Keap1 signalnom putu

Hast et al., Cancer Res 2013

- DPP3 se veže na Keap1 → otpuštanje Nrf2 – aktivacija gena uključenih u odgovor na oksidacijski stres



Identifikacija potencijalnih interaktora metodom SILAC-MS



Rezultati SILAC-MS – proteini nađeni u bar 2 biološka replikata

EV vs WT				
replica 1		replica 2	replica 3	replica 4
Gene names	Ratio WT/EV	Ratio WT/EV	Ratio WT/EV	Ratio WT/EV
KEAP1			7,470491558	
HNRNPC;HNRNPCL4;HNRNP	2,6839	1,629619973		
HNRNPA3	2,0008	2,421190257		
PPIA	1,8843		4,980079681	
HNRNPDL	1,8701		1,505661286	
RPS27A;UBB;UBC;UBA5	1,7502	5,241914347	3,402170585	4,745859238
VCP	1,5596		5,709065997	4,029171199
EEF1A1P5;EEF1A1		3,258284188	5,829204314	6,248828345
CCT4		3,060162801	2,578316359	2,293841037
PCBD1		2,331056668		3,226118657
DNAJC10		1,549738869		1,633239694
HSP90B1			7,169486665	9,193711501
CAND1			4,923198109	3,035361967
TMEM33			4,429090265	1,931956492
KATNAL2			3,213057867	4,829751268
PRDX4			2,759838825	8,776549061
SEC24C			2,60599901	1,811791137
NUDT21			2,412196063	2,004690977
SUB1			2,249364555	1,578930748
CCT2			2,160013824	1,745231156
PFN1			2,156334232	1,512538948
CCT7			2,074086365	2,363786786
UBE2M			2,065816927	1,626809826
CCT5			1,95549298	1,986176214
MTHFD1			1,897605222	1,518533704
EIF4A1			1,881679964	1,603103609
CCT8			1,875152356	1,844371899
CLTC			1,874554793	1,643979746
PHGDH			1,629327902	2,16755175
EEF1G			1,601383595	1,601383595
PCBP1			1,597418572	1,678246568
HIST1H4A			1,578307738	5,008263635

Metode za potvrdu interakcije

Y2H – 1 na 1

- Pozitivna kontrole:
 - KEAP1/hDPP3
 - Kelch/hDPP3
- Negativna kontrole:
 - KEAP1/hDPP3 Δ ETGE
 - Kelch/hDPP3 Δ ETGE
- Analizirani proteini: VCP, EEF1A1, CCT4, HSP90B1, PPIA, PRDX4, TMEM33, RPS27A, UBA52 – svi negativni

GST-pulldown

- Pozitivna kontrola GST-Kelch
- Negativna kontrola: GST
- Analizirani proteini: VCP, EEF1A1, CCT4, HSP90B1, RPS27A, UBA52 – svi negativni

Ko-imunoprecipitacija

- Pozitivna kontrola: KEAP1/WT hDPP3 HEK293T
- Negativna kontrola: TO HEK293T
- Analizirani proteini: VCP, EEF1A1, CCT4, HSP90B1, CAND1, KATNAL, PPIA, PRDX4, TMEM33, SEC24C, CFL1, NUDT21 – nije potvrđena nijedna interakcija

Rezultati SILAC-MS – proteini s najvećim omjerom WT/EV

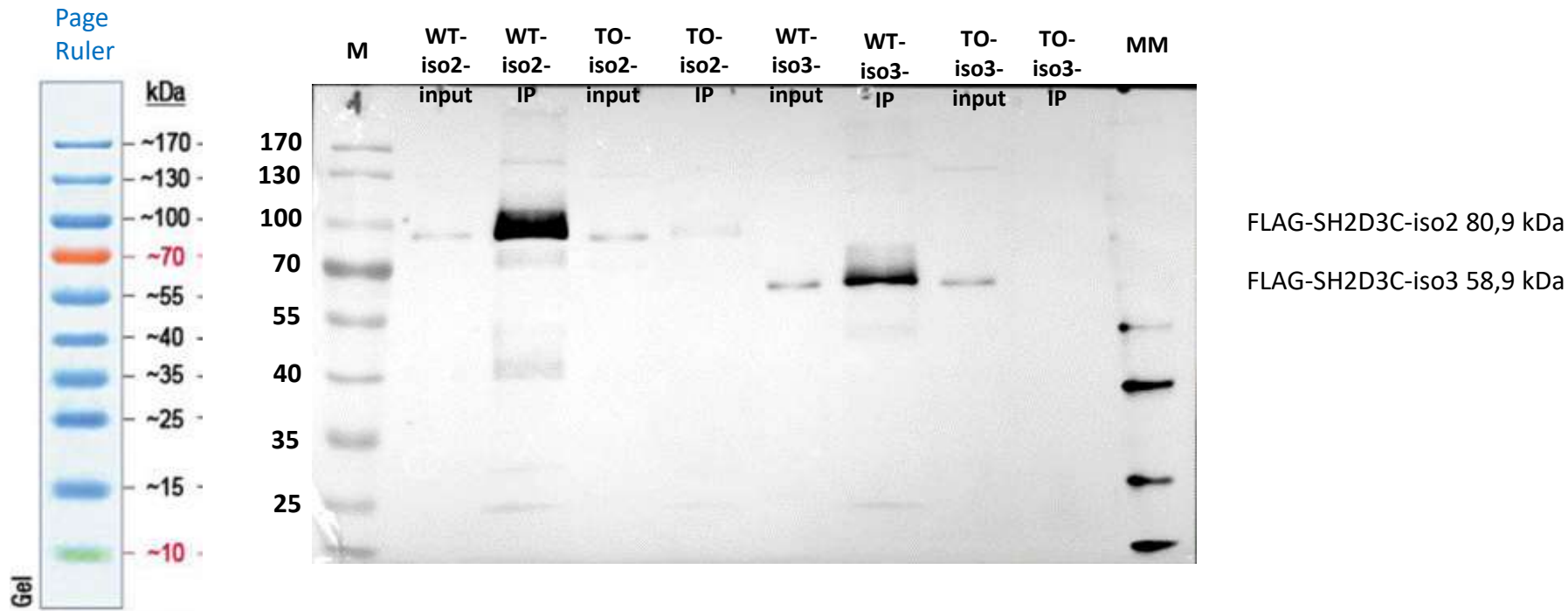
EV vs WT							
replica 1		replica 2		replica 3		replica 4	
Gene names	Ratio WT/EV	Gene names	Ratio WT/EV	Gene names	Ratio WT/EV	Gene names	Ratio WT/EV
DPP3	6,2345	SH2D3C	8,54920065	KEAP1	7,470491558	HSP90B1	9,193711501
MRPL21	3,8068	UBB;RPS27A;UBC;UBA5	5,241914347	HSP90B1	7,169486665	PRDX4	8,776549061
MRPL43	3,4851	DPP3	3,989308653	EEF1A1P5;EEF1A1;EEF1A1	5,829204314	HIST2H3A;H3F	7,089181908
SNRPD3	2,961	EEF1A1P5;EEF1A1	3,258284188	VCP	5,709065997	EEF1A1P5;EEF1A1	6,248828345
SNRPN;SNRPB	2,956	CCT4	3,060162801	PPIA	4,980079681	CFL1;CFL2	5,642385601
SNRPD2	2,8626	HNRNPA3	2,421190257	CAND1	4,923198109	GAPDH	5,437146585
SNRPF	2,7434	PCBD1	2,331056668	TMEM33	4,429090265	HIST1H4A	5,008263635
MRPS7	2,7185	RPS15	2,296685882	HSP90AB1	3,445187074	KATNAL2	4,829751268
RAB7A	2,7097	HSP90AB1;HSP90AA1	2,278734846	UBB;RPS27A;UBC;UBA5	3,402170585	RPS27A;UBB;UBA5	4,745859238
HNRNPC;HNRN	2,6839	ILF3	2,190004818	KATNAL2	3,213057867	GSTP1	4,501462975
MRPL48	2,6442	COPA	2,063216968	PRDX4	2,759838825	HSP90AA1	4,444246922
SNRPC	2,5435	SNRNP70	2,008032129	SEC24C	2,60599901	VCP	4,029171199
TIA1	2,5074	RPL18	1,992865541	CCT4	2,578316359	ACTC1;ACTG2;	3,400204012

Protein SH2D3C

- UniProtKB - Q8N5H7 (SH2D3_HUMAN)
- Alternativna imena:
 - NSP3 - Novel SH2-containing protein 3
 - SHEP1 - SH2 domain-containing Eph receptor-binding protein 1
 - CHAT - Cas/HEF1-associated signal transducer (mišji protein)
 - Adaptorski protein uključen u regulaciju stanične migracije
- Spada u porodicu proteina koji sadrže SH2 i RasGEF-like domenu – još samo 2 proteina u porodici – SH2D3A (NSP1), BCAR3 (SH2D3B, NSP2)
- N-terminalna SH2 domena (220-319 ak.), središnja prolin-serin bogata domena, C-terminalne RasGEF-like domene (586-854 ak.)
- 6 izoformi koje su eksprimirane i 2 pretpostavljene (Uniprot):
 - Izoforma 1 – 860 ak. (94,4 kDa), kanonička izoforma
 - Izoforma 2 – 703 ak. (77,1 kDa)
 - 1-172: MTEGTTKTSK...RPPRDVHSER → MTAVGRRCPALGSRG
 - Izoforma 3 – 506 ak. (55,2 kDa)
 - 1-354: fali (nema SH2 domenu)
- Protein atlas – na razini RNA eksprimiran u svim tkivima, na razini proteina najjača ekspresija u limfoidnim tkivima
 - jako niska ekspresija mRNA u HEK293T stanicama; značajna ekspresija u stanicama limfoidnih, mijeloidnih i endotelnih st. linija
- <https://www.proteinatlas.org/ENSG00000095370-SH2D3C/cell>

Ko-imunoprecipitacija DPP III i izoformi 2 i 3 proteina SH2D3C

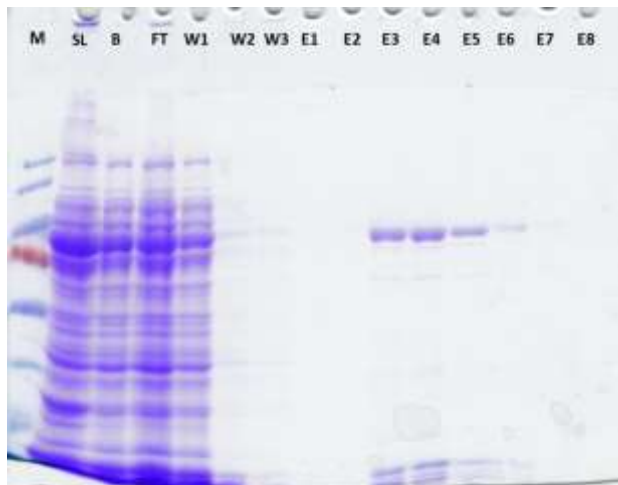
- IP HA-DPP3 s anti-HA agaroznim kuglicama u staničnom lizatu iz HEK293T stanica koje prekomjerno ekspimiraju FLAG-SH2D3C izoforme 2 i 3
 - Neg. kontrola HEK293T TO stanice (ne ekspimiraju HA-DPP3)
- WB anti-FLAG
- Input: stanični lizat iz HEK293T WT ili TO stanica koje ekspimiraju izoformu 2 ili 3 SH2D3C
- SH2D3C izoforme 2 i 3 se vežu na hDPP3



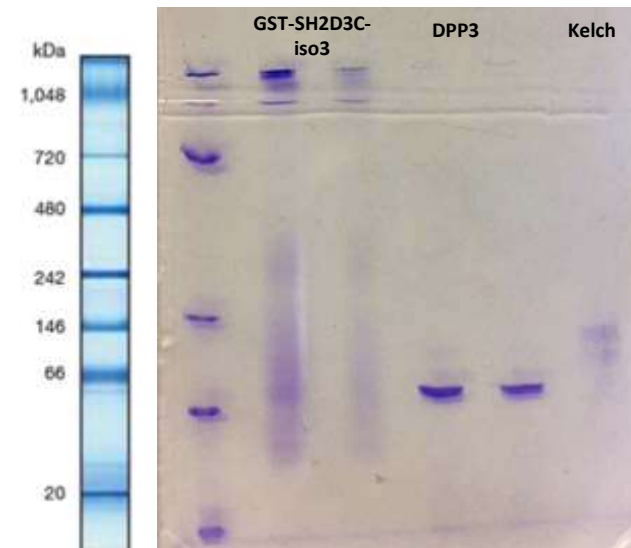
Y2H, ekspresija u *E. coli* i pročišćavanje proteina

- Isoforme 2 i 3 proteina SH2D3C uklonirane u pGADT7 vektor za testiranje interakcije u stanicama kvasca *S. cerevisiae* (kotransformacija s pGBKT7 vektorom s ukloniranim DPP3)
 - Nismo uspjeli dokazati interakciju, ali također nismo ni detektirali ekspresiju izoformi proteina SH2D3C → proteini se iz nekog razlika ne eksprimiraju u kvascu ili ne ulaze u jezgru
- Isoforme 2 i 3 uklonirane u pET15b (N-terminalni HIS-tag) vektor za ekspresiju u *E. coli* – djeluje kao da ima jako slabe indukcije, ali nismo uspjeli pročistiti protein
- Izoforme 2, 3 i fragment SH2D3C_539-860 (Ras-GEF like domena) uklonirane u pLATE_31 (C-terminalni HIS-tag) vektor za ekspresiju u *E. coli*
- Nismo uspjeli dobiti niti indukciju iso2 i fragmenta 539-860, a slaba ekspresija iso3
- Dobivena ekspresija GST-SH2D3C-iso3 (82 kDa) – jako mali prinos (oko 200 ng iz 0,5 L kulture)

GST-SH2D3C – SDS-PAGE



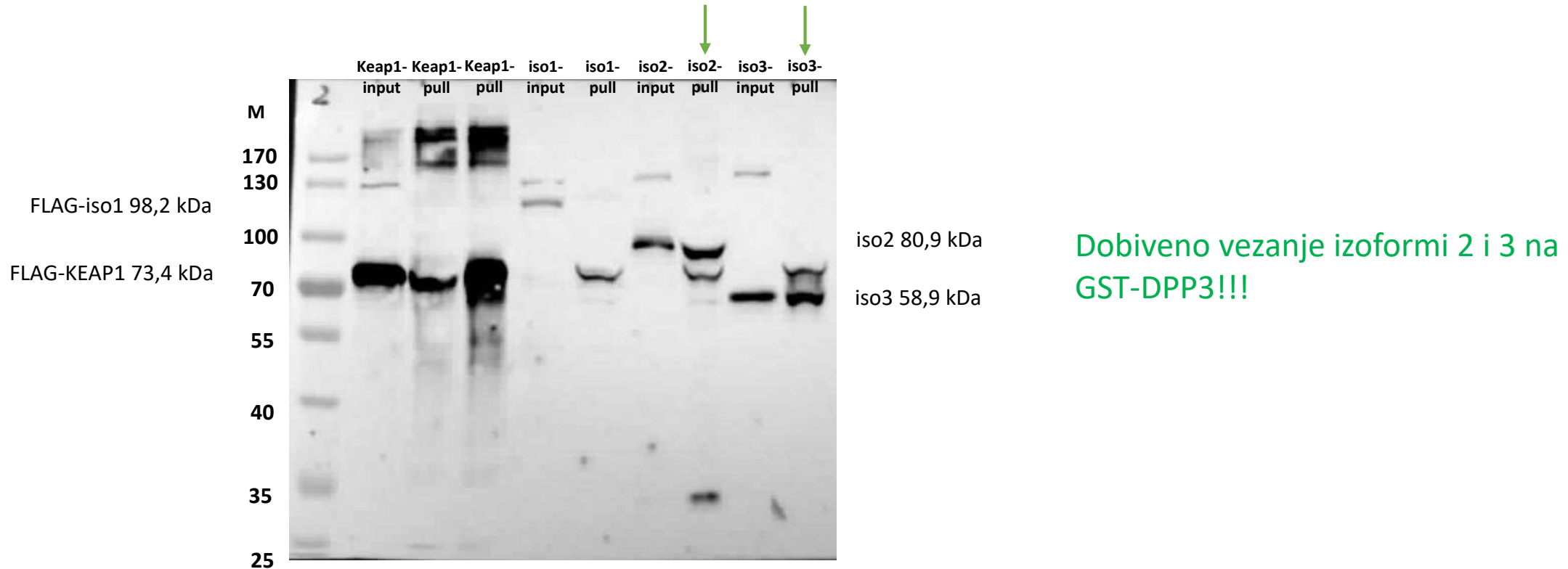
GST-SH2D3C – nativni gel



GST-SH2D3C-iso3
agregira!!!

GST-pulldown s GST-DPP3 proteinom

- GST-DPP3 vezan na glutation agarozne kuglice inkubiran sa staničnim lizatima iz HEK293T WT stanica koje prekomjerno eksprimiraju FLAG-Keap1 i FLAG-SH2D3C-izoforme 1, 2 ili 3
- Input: stanični lizat iz HEK293T WT stanica koje eksprimiraju FLAG-obilježene SH2D3C izoforme 1, 2 ili 3





- GST-pulldown s inaktivnim oblikom DPP3-E451A
- Kolokalizacija DPP3-EGFP i SH2D3C-mCherry na konfokalnom mikroskopu u NIH3T3 stanicama (mišji fibroblasti)
- BiFC DPP3/SH2D3C u NIH3T3 stanicama
- Modeliranje kompleksa DPP3/SH2D3C (kristalna struktura GEFras-like domene – ak. 539-860)