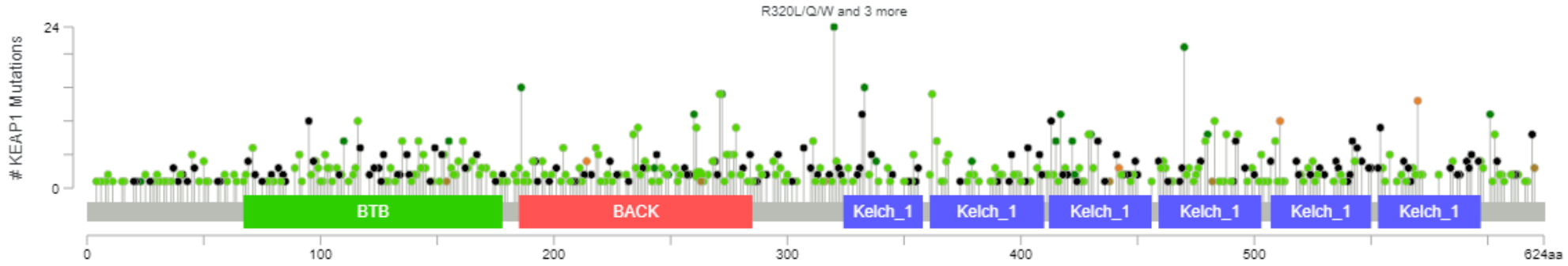
Study of the effect of DPP III overexpression on NRF2-KEAP1 signaling pathway in the cell culture

Mihaela Matovina

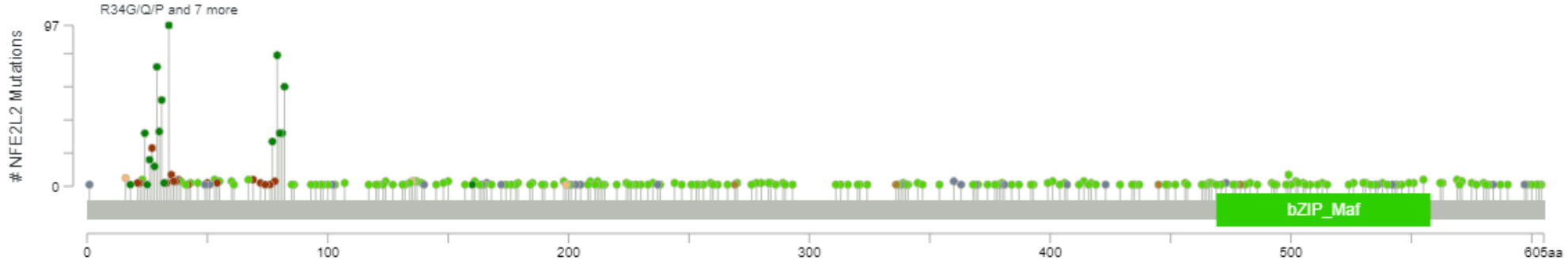
KEAP1/NRF2 mutacije u cBioPortal bazi

Pretraživanje *curated set of nonredundant studies* - 59859 pacijenata/62949 uzoraka iz 193 istraživanja

KEAP1 oko 1300 mutacija (468 *driver*)

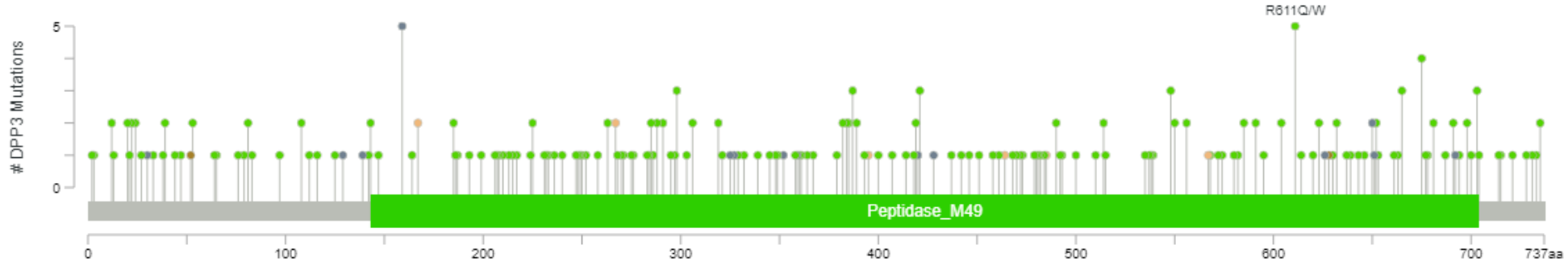


NRF2 oko 1000 mutacija (602 *driver*)



Istraživanje mutiranih varijanti proteina DPP III iz cBioPortal baze podataka

- U nekoliko različitih istraživanja pronađena povećana količina i/ili aktivnost DPP III u uzorcima zloćudnih tumora
- cBioPortal baza za genomiku raka - https://www.cbioportal.org/
- Trenutno 262 mutacija u genu DPP3
- Ispitivana enzimska aktivnost mutanata – većina ima sličnu aktivnost kao WT; nekoliko mutanata s puno manjom aktivnošću (R510W, P358L) ili inaktivnih (E451K)
- MST-om do sada ispitana Kd interakcije 15-ak DPP III mutiranih varijanti s Kelch domenom KEAP1 proteina – R623W varijanta imala daleko najveći afinitet prema Kelch domeni – 40-180X veći od WT

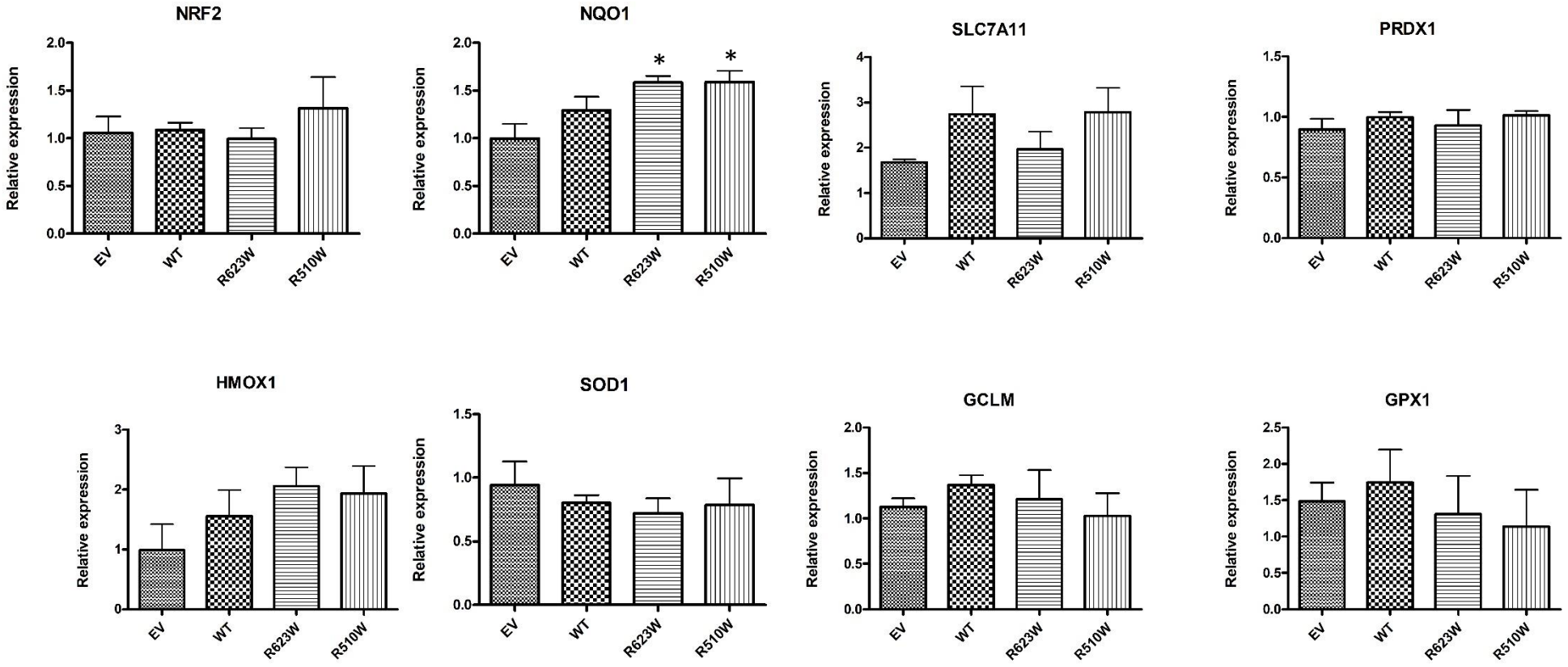


Pokusi na stanicama

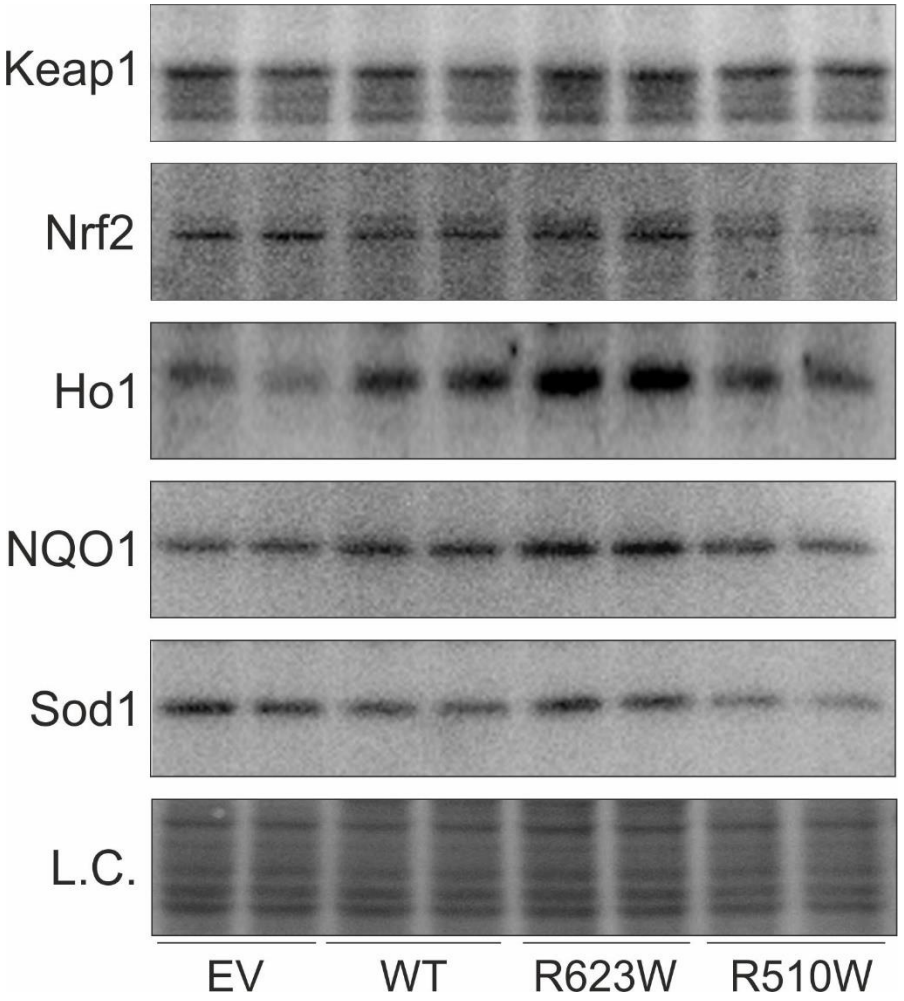
- Potvrda rezultata dobivenih na pročišćenim proteinima na stanicama
- Odabrana 2 mutanta: R623W (najveći afinitet za Kelch), R510W (nađen u uzorku sa samo 66 mutacija, rad Matovina i sur. RSC Advances 2017)
- HEK293T stanice transfecirane s:
  - Prazni vektor (EV) – pFLAG-CMV2
  - WT – ekspresija pFLAG-CMV2-DPP3
  - R623W – ekspresija pFLAG-CMV2-DPP3-R623W
  - R510W – ekspresija pFLAG-CMV2-DPP3-R510W
- Tretman stanica s 400 µM H_2O_2 24 sata
  - Kontrola: netretirane stanice transfecirane s EV
- RT-qPCR - određivanje relativne ekspresije Nrf2 i Nrf2-kontroliranih gena,
- Izolacija proteina → western blot
- Određivanje preživljenja stanica – MTT test
- Mjerenje ROS-a

Djelovanje prekomjerne ekspresije WT DPP3 i mutanata R623W i R510W na ekspresiju mRNA i nekoliko Nrf2-kontroliranih gena

**p<0.05; EV vs. R623W, R510W



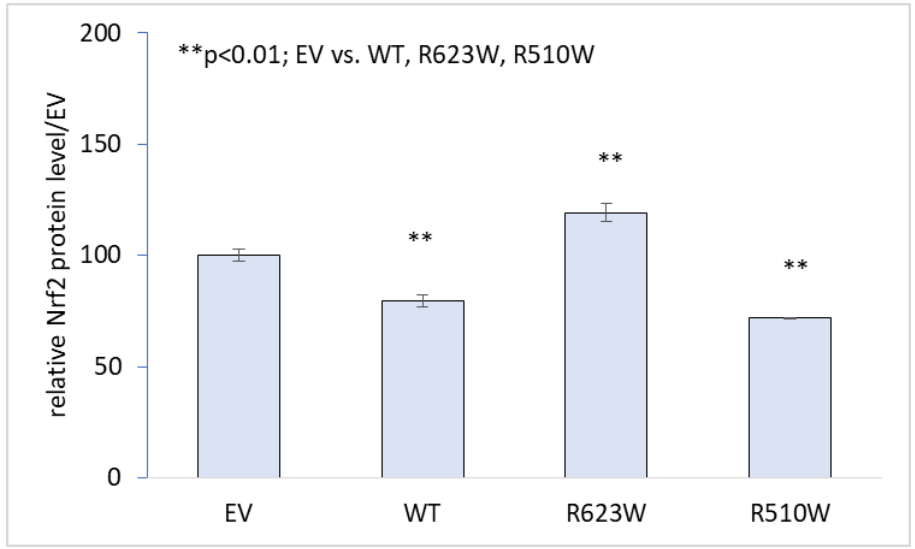
Djelovanje prekomjerne ekspresije WT DPP3 i mutanata R623W i R510W na ekspresiju proteina



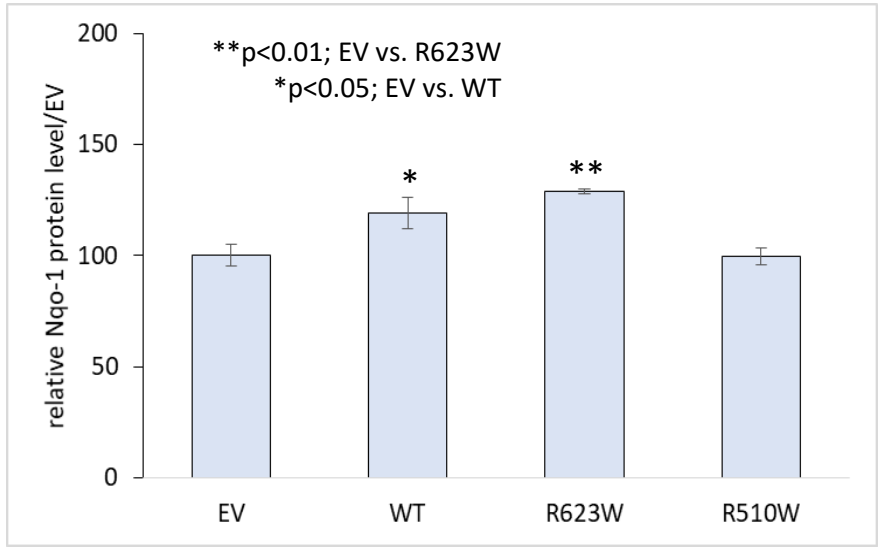
- Suradnja s Laboratorijem za metabolizam i starenje (bivši Laboratorij za mitohondrijsku bioenergetiku i dijabetes, ZMM)

1-FLAG
2-WT
3-R623W
4-R510W
5-NT/H2O2
6-NT

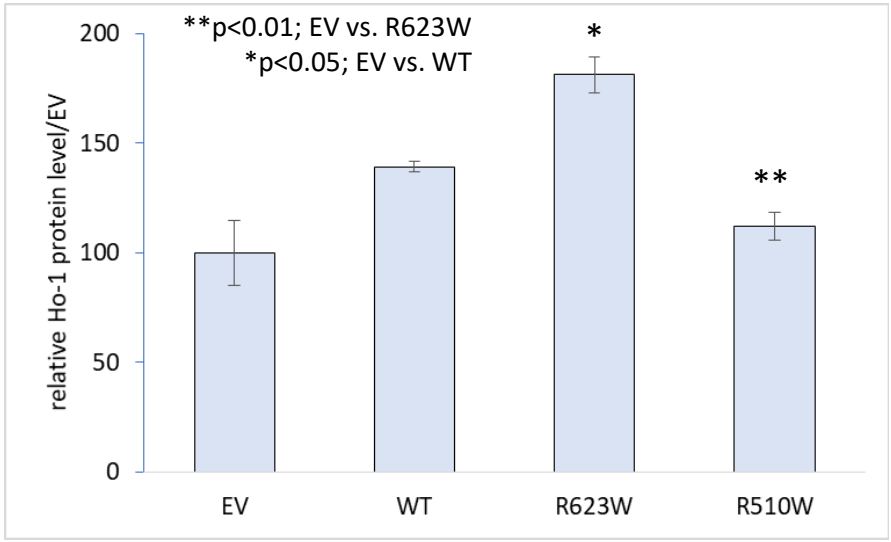
NRF2



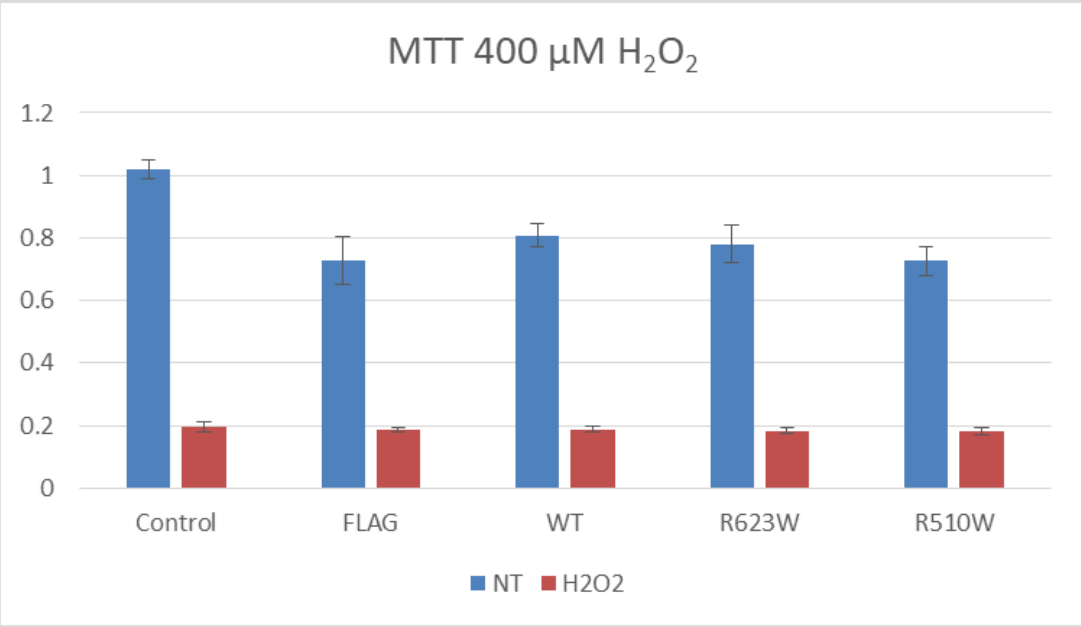
NQO1

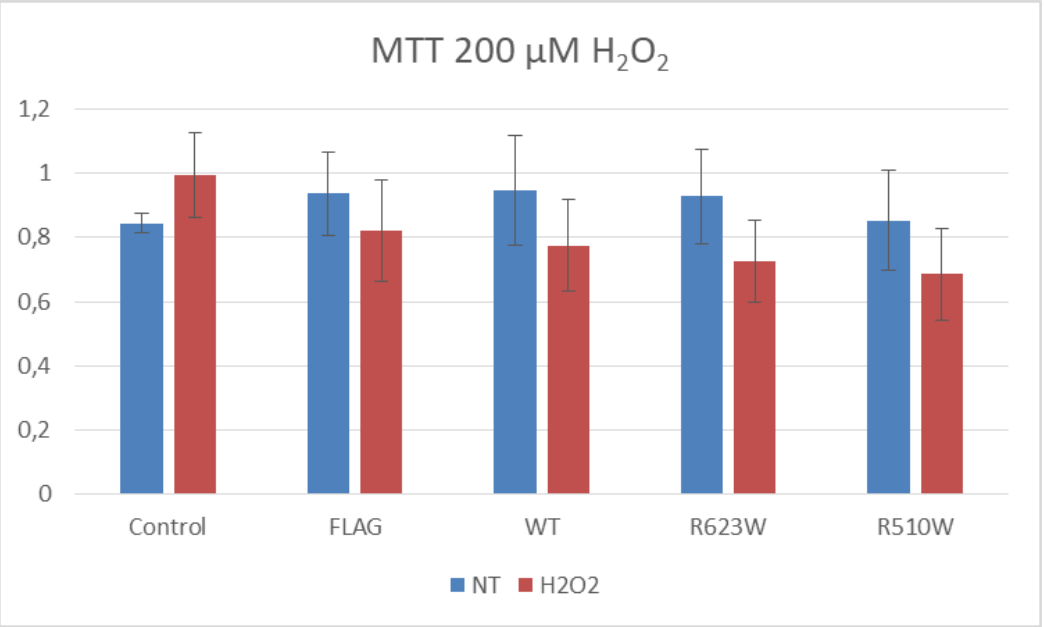


HMOX1



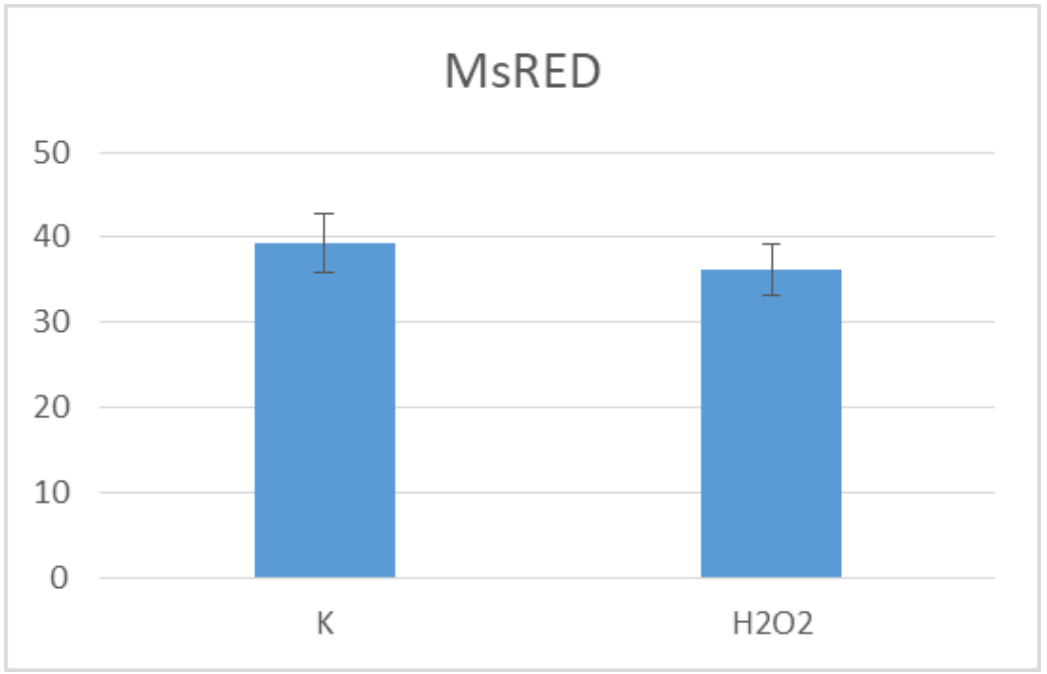
Djelovanje prekomjerne ekspresije WT DPP3 i mutanata R623W i R510W na preživljenje stanica

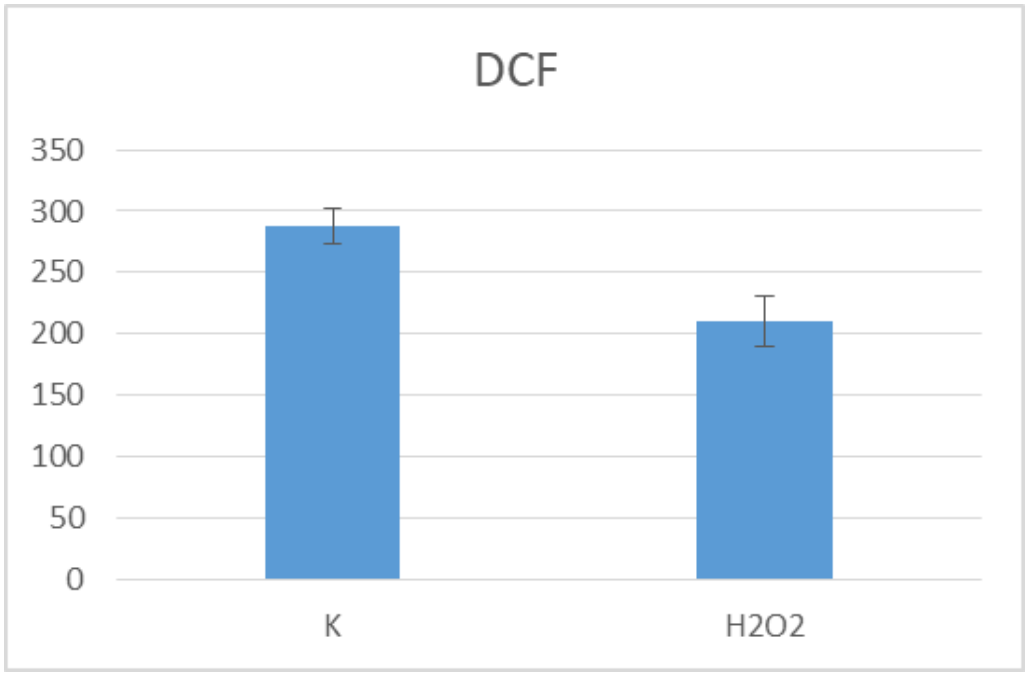




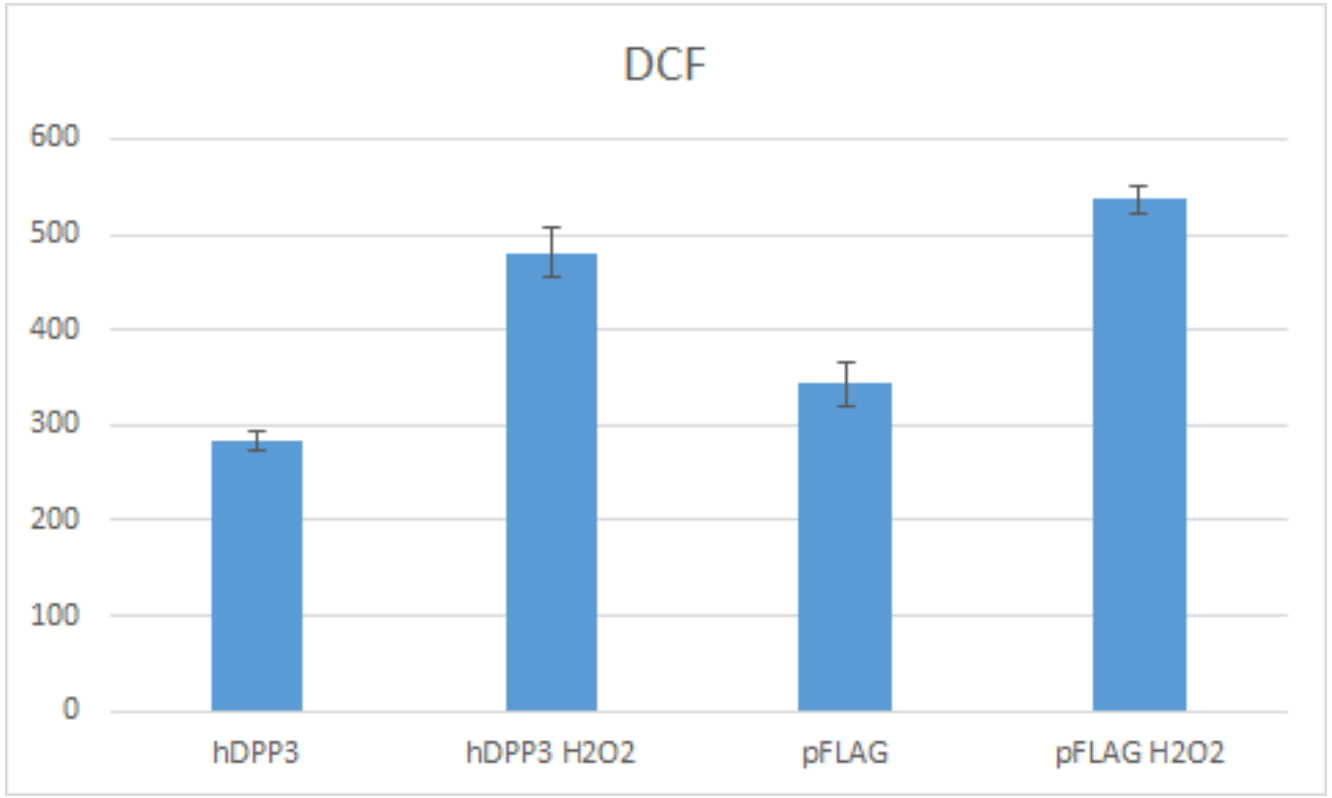
Mjerenje ROS-a

- Preliminarna mjerenja ROS-a u stanicama tretiranim s 400 µM H_2O_2 i netretiranim stanicama





Utjecaj prekomjerne ekspresije WT na ROS



Zaključci

- R623W i R510W mutanti pojačavaju ekspresiju NQO1 mRNA
- R623W pojačava ekspresiju NRF2, NQO1 i HMOX1 proteina
- WT također povećava razinu NQO1 proteina
- Buduća istraživanja:
  - Nastaviti s istraživanjem mutanata?
  - Mjeriti ROS u stanicama transfeciranim s R623W?
  - Tretman stanica u hiperbaričnoj komori?