

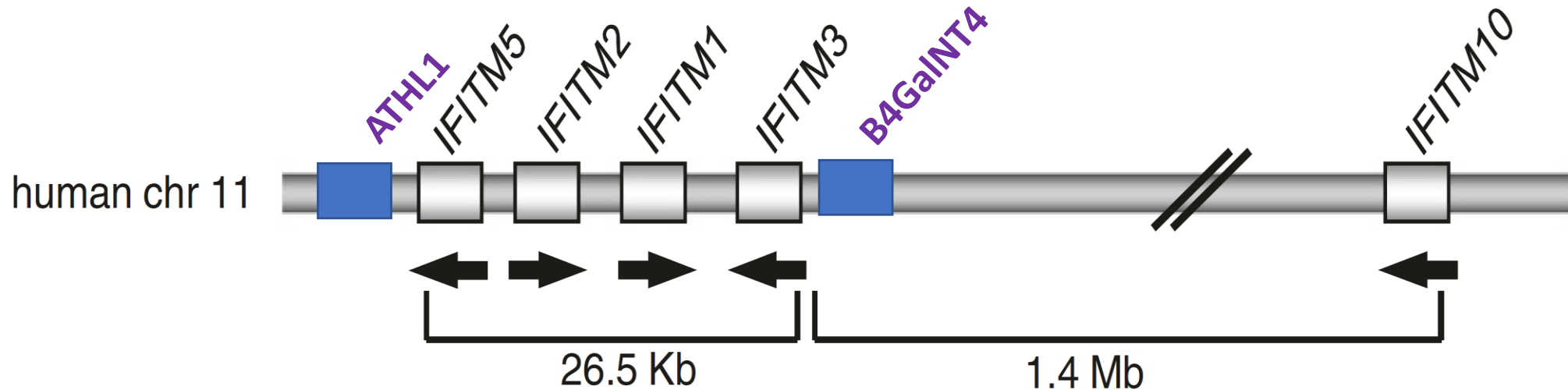
IFITM3 Retrogenes with Intact ORF: Are They Functional?

Kazi Rahman

03/02/2018

IFITMs : Genomic and Syntenic Context

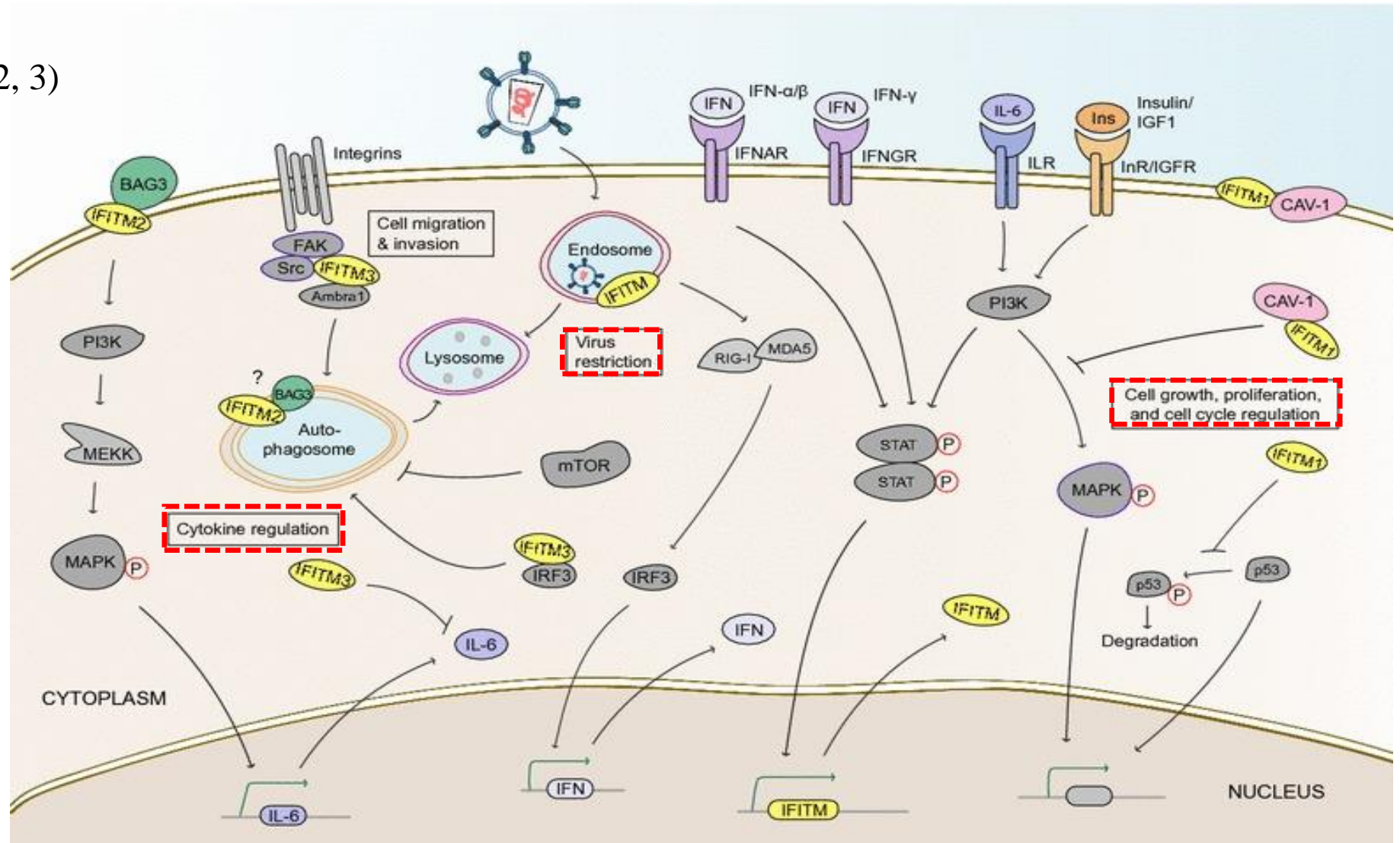
- Five different types: IFITM1, 2, 3, 5 and 10
- All are in Chromosome 11
- IFITM1, 2, and 3 are interferon-inducible and flanked by ATHL1 and B4GalNT4 genes



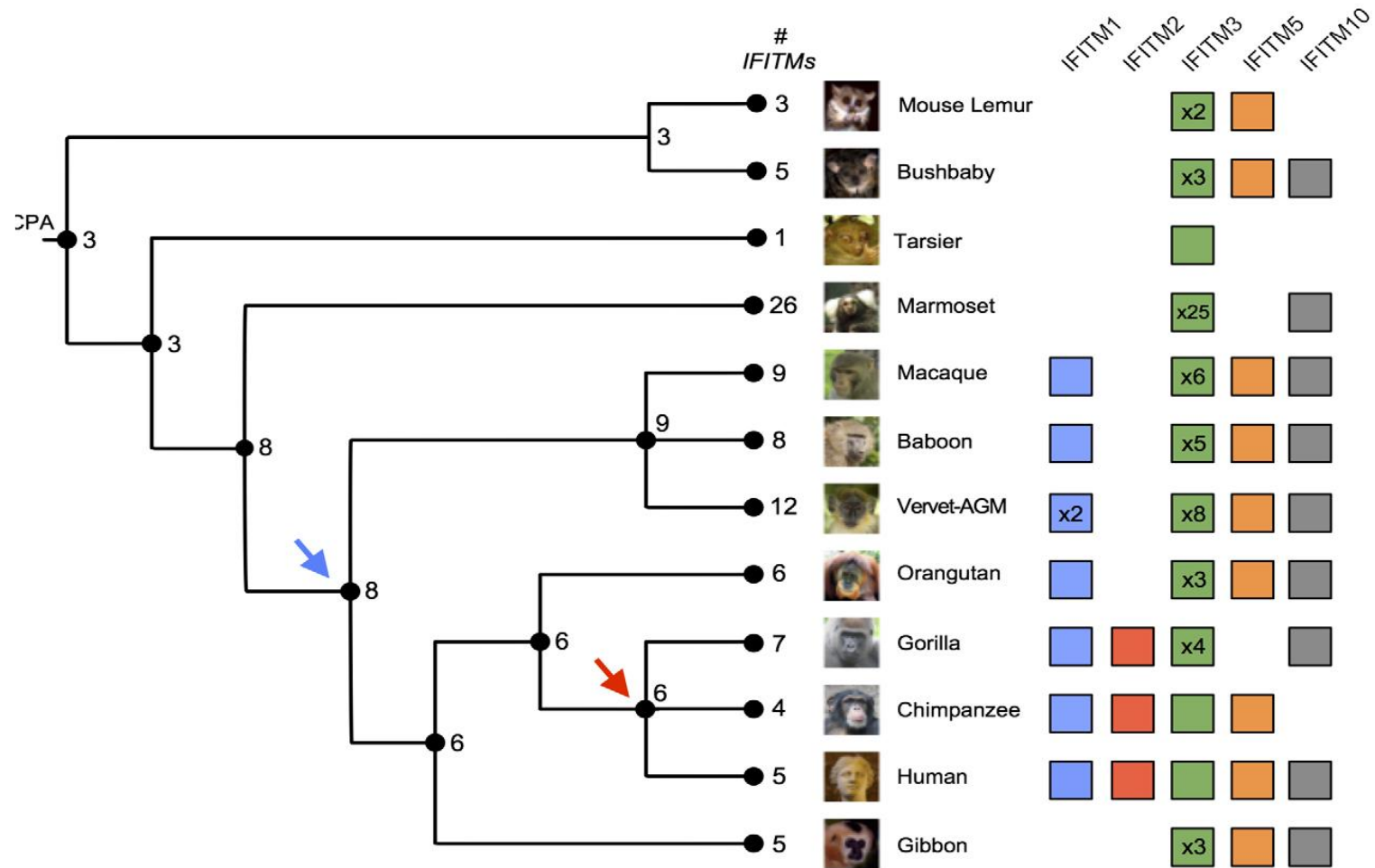
Role of IFITMs in Various Cellular Processes

Involved in

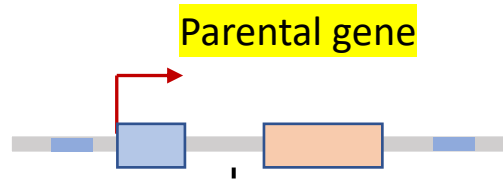
- A. Virus Restriction (IFITM1, 2, 3)
- B. Cell Adhesion
- C. Anti-Proliferation
- D. Tumor Suppression
- E. Germ cell and embryo development

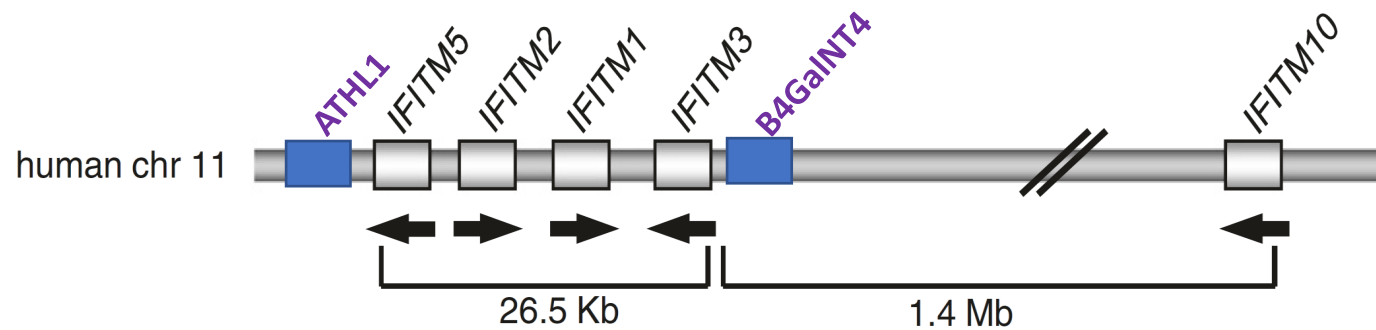
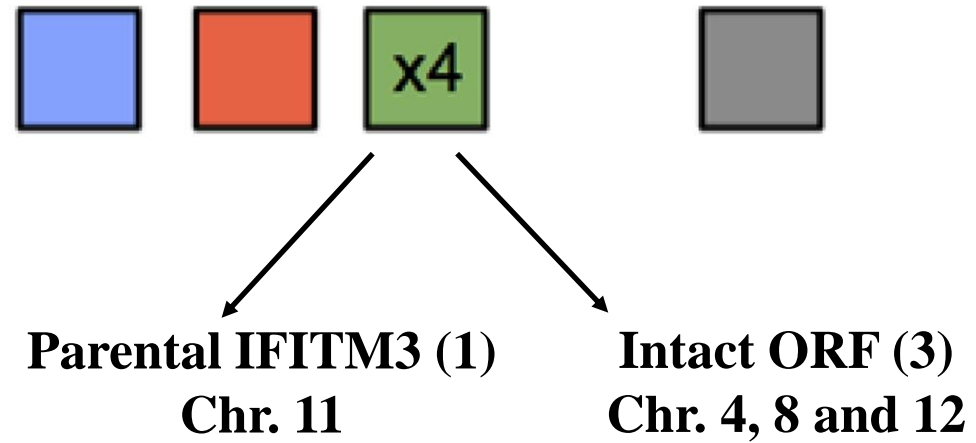


Recurrent Duplication of IFITM3 in Primates



Origin of New Gene Copies through Gene Duplication





Questions

Are those IFITM3 retrogenes with intact ORF functional?

- A. Do they undergo transcription and translation?
- B. What is their spatio-temporal expression pattern (i.e. specific cells/tissues and timing of expression)?
- C. Do they play redundant Roles of IFITM3 or gained neofunctionalism?

Investigating the function of human IFITM3 retrogenes.

IFITM Duplicants in Human

- Total 15 IFITM duplicants in Human
- All are retrogenes –intronless/ PolyA-tailed

	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100
IFITM2									
IFITM3									
IFITM2	MNHIVQT-FSPVNSGQPPNYEMLKEEQEVAMLGVPHPNPAPPMSTVIHIRSETSVDPHVVWSLFNTLFMNTCCCLGFIAFAYSVKSRDRKMVGDTVGAQAYA									
IFITM3	MNHIVQTFSPVNSGQPPNYEMLKEEHEVAVLGAPHPNPAPPTSTVIHIRSETSVDPHVVWSLFNTLFMNPCCCLGFIAFAYSVKSRDRKMVGDTVGAQAYA									

Intact ORF (2)

IFITM8P2	MNHITFQTFFTPANSCHPBNYEMLKEEHKVAVVGAPQNPAPPMSTMIHFHSETSMPPDHVVWSLFNTLFMNSGCLCFTAFVYSMKSRERKKVGDLTGAQAYT
IFITM12P1	MNHITVQTFSPVNSGQPPNYEMLKEEHKVAVLGVPHPNPAPPTSTVIHIRSKTSVPHHVWSLFNTLFMNPCCCLGFIAFAYSVKSRDRKMVGNTVGAQAYA

Deleterious Mutations (13)

IFITM1P1	KNHTSKSLFTHANTGLPTIEMFKEKHEVAMLGAPHSSAPLMSSVIHICSETSMPPDHVVWSLFNTLFMNSGCLCFTAFVYSMKSRERKKVGDLTGAQAYT
IFITM1P2	MNHITVQTFFTPANTGCPDLYQMLIHEVAVLGAPHPNSAPPRSTVIHIRSETSVDPHVVWSLFNTLFMNSGCLCFTAFVYSMKSRDRKMVGDLTGGAQACA
IFITM2P	MNHAVQTVFTPANTSHPLNYEMLKEEHEVAVLRVPHNPVPTSTVIHIRSETTVPSHVVWSLFNTLFMNSGCLCFTAFVYSMKSRDRKMVGDLTGGAQAYA
IFITM3P	SNFRFIFSIFTVSN-LKLKLTGKENVALLRVPHSS-PPHPISTTTVIPPCLTLLSGPCLMCCLSFIALAYSVKSRDRKMVGDLTGGAQAYA
IFITM4P	MNHITVQPSL-LSTAASPTMRCRRSMRWLCGWPTTLLPRRPSTSATRPCCP-TMLSGPCSTLSSPPAAWASISLTPSLLATLAPRPM
IFITM6P1	MNHITVQTFFTPANSCHPBNYEMLKEEHEVAVLGAPHPNPAPPMSTMIHFHSETSVSDYVVWSLSNLFMNPCHCLCFTAFVYSMKSRDRKMVGDLTGGAQAYA
IFITM6P2	MNHITVQTFSPVNSGHPPIAQGGARGGCAEGTPQPCSTPTSTMIHRSSETSVDPDRVSLFNTLFVNPCCCLGFIAFAYSVKSRDRKMVGDLTGGAQAYA
IFITM7P	MNHITVQTFSPVNSGQPLNYEMLKEEHEVAVVGVPHPNPAPP--TSTSAARPPCCP-TMLSGPCSTPSSPPAAWASRSPTPSLLATPGPRPMP
IFITM8P1	MNHMVQTFFTPANTGHPATMRCGRSKRWLCGCPPTLLPQRPSTSAARPLCP-TMSSGPRLTASPPAAWASISPIPSLLVTAGPRPMP
IFITM11P	MNHITVQTFSPVNSGQPPQIAQGGTRRGACAGAPHNPAPPTSTVIHIRSETSVDPHVVWSLFNTLFMNPCHCLCFTAFVYSMKSRDRKMVGDLTGGAQAYA
IFITM12P2	MNHITVQTLFTPANTGRSTNHEMLKEKHEVAVLGAPHPNPVPPAFTMIHICSETSVDPHVVWSLFNTLFKNSCCPDFAFIYYSVKSRGSLLVTLGPRPVS
IFITM12P3	MNHNVQTSSLLPTSAIPLTMRCRRRSKRWLCGHPPTLLPQCPISTARTPCP-TMSSGPCSTPSSPPAAWASHWPTPSLLATSGPRPMP
IFITM16P	MNYTVQTFFTPANSRSPNYKMLKEEQEVAVLGAPHPNPAPLTSTSTSTARPISTSTARPISTSTARPISTSTARPISTSTARPISTSTARPISTSTARPI

	110	120	130
IFITM2		
IFITM3		
IFITM2	STAKCLNIWALILGIFMTILLIIPVLVVAQQR*		
IFITM3	STAKCLNIWALILGILMTILLIIPVLVLIQAYG*		

IFITM8P2	STAKCLNIWALIVDIVMTILLIIPVLVLIQVY**
IFITM12P1	STTKCLNIWALILGILMTILLIIPVLVLIQAH*

IFITM1P1	PPPSISSTSLWSLHSSCFSPACSSSKQFL-
IFITM1P2	STAKCLNVWALVLGILMSILLIFIPVLVLIQVYQ*
IFITM2P	STAKCLNVCTILGIRVTTTLLIILSMIIFQAIQ*
IFITM3P	HCKVPHLCPLDRHPCSHCTHDFHTRDNLPSN
IFITM4P	PPPSIFWASSFCSSS---SQCS*SSKPIN-
IFITM6P1	STAKYLNIALIVCIIMTILLIILVLIQVCR*
IFITM6P2	STAKCLNIALIVDILMTILLIIRVLIFQAYR*
IFITM7P	PPPSITLWASSFCSSS---SQCS*SSKPID-
IFITM8P1	PLPSITFCTSI*FCCLSS---SQCS*SSKSID-
IFITM11P	STAKCLNIWALILGILMTILLIIPVLVLIQAH*
IFITM12P2	PLPSITLWASSFCSSS---SQCS*SSKSLD-
IFITM12P3	LPPSITLCAIRPFCSAS---SQCS*SEKSID-
IFITM16P	PPPSITLWASSFCSSS---SRC*PSKSID-

Evolutionary Conservation of IFITM8P2/12P1

IFITM8P2
(Chr. 8)

		10	20	30	40	50	60	70	80	90																																																																															
																																																																																								
IFITMP8P2	Human	MN	HT	FQ	TFF	T	P	A	N	S	G	H	P	R	N	Y	E	M	L	K	E	E	H	K	V	A	V	V	G	A	P	Q	N	P	A	P	P	M	S	T	M	I	H	F	H	S	E	T	S	M	P	D	H	V	V	W	S	L	F	N	T	L	F	M	N	S	G	C	L	C	F	T	A	F	V	Y	S	M	K	S	R	E	R	K	K	V			
IFITMP8P2	Bonobo	MN	HT	FQ	TFF	T	P	A	N	S	G	H	P	R	N	Y	E	M	L	K	E	E	H	E	V	A	V	V	G	A	P	Q	N	P	A	L	P	M	S	T	M	I	H	F	H	S	E	T	S	M	P	D	H	V	V	W	S	L	F	N	T	L	F	M	N	S	G	C	L	G	F	I	A	F	A	Y	S	L	K	S	R	E	R	K	K	V			
IFITMP8P2	Chimpanzee	MN	HT	FQ	TFF	T	P	A	N	S	G	H	P	R	N	Y	E	M	L	K	E	E	H	E	V	A	V	V	G	A	P	Q	N	P	A	L	P	M	S	T	M	I	H	F	H	S	E	T	S	M	P	D	H	V	V	W	S	L	F	N	T	L	F	M	N	S	G	C	L	G	F	I	A	F	A	Y	S	L	K	S	R	E	R	K	K	V			
IFITMP8P2	Gorilla	MN	HT	FQ	TFF	T	P	A	N	S	G	H	P	R	N	Y	E	M	L	K	E	E	H	E	V	A	V	V	G	V	P	Q	N	P	A	P	P	M	S	T	M	I	H	F	H	S	E	T	S	M	P	D	H	V	V	W	S	L	F	N	T	L	F	M	N	S	G	C	L	G	F	I	A	F	V	Y	S	M	K	S	R	E	R	K	K	V			
IFITMP8P2	Orangutan	MN	H	I	F	Q	T	F	F	T	P	A	N	S	G	H	P	R	N	Y	E	M	L	K	E	E	H	E	V	A	V	V	G	A	P	Q	N	P	A	L	P	M	S	T	M	I	H	F	H	S	E	T	S	M	P	D	H	V	D	S	L	F	N	T	L	F	M	N	S	G	C	L	G	F	I	E	F	A	Y	S	K	K	S	R	G	R	K	M	V
IFITMP8P2	Green Monkey	MN	HT	FQ	TFF	T	P	A	N	S	S	R	S	R	N	Y	E	M	L	K	E	E	H	E	V	A	V	L	G	A	P	H	N	S	A	P	P	M	S	T	M	I	H	F	S	S	E	T	S	V	P	D	H	V	V	W	S	L	F	N	T	L	F	M	N	S	S	C	L	G	F	I	A	F	A	Y	S	M	T	S	R	D	R	K	I	V			
IFITMP8P2	Gibbon	MN	HT	FQ	TFF	T	P	A	N	S	G	H	P	C	N	Y	E	M	L	K	E	E	H	E	V	A	V	V	G	A	R	P	T	T	L	P	D	V	H	D	P	L	P	Q	R	D	L	M	P	D	H	V	I	W	S	L	F	D	A	L	F	M	N	S	G	C	L	G	F	I	A	F	A	Y	S	M	K	C	W	T	G	R	C	E					
IFITMP8P2	Crab-eating Macaque	MN	HT	FQ	TFF	T	P	A	N	S	S	R	P	P	Q	L	*	D	A	Q	G	G	A	*	G	G	C	G	D	T	P	Q	L	Y	A	S	N	V	H	H	D	P	L	Q	*	D	L	C	A	R	P	C	C	L	V	A	V	Q	H	H	F	H	E	L	Q	L	P	G	L	H	S	I	C	L	L	H	D	V	*	G	O	E	D	G					
IFITMP8P2	Rhesus Macaque	MN	HT	FQ	TFF	T	P	A	N	S	S	R	P	P	Q	L	*	D	A	Q	G	G	A	*	G	G	C	G	D	T	P	Q	L	Y	A	S	N	V	H	H	D	P	L	Q	*	D	L	C	A	R	P	C	C	L	V	A	V	Q	H	H	F	H	E	L	Q	L	P	G	L	H	S	I	C	L	L	H	D	V	*	G	O	E	D	G					
IFITMP8P2	Olive baboon	MN	HT	FQ	TFF	T	P	A	N	S	R	R	P	P	Q	L	*	D	A	Q	G	G	A	*	G	G	C	G	D	T	P	Q	L	Y	S	S	N	V	H	H	D	P	L	Q	*	D	L	C	A	R	P	C	C	L	V	A	V	Q	H	P	F	H	E	L	Q	L	P	G	L	H	S	I	C	L	L	H	D	V	*	G	O	E	D	G					

IFITMP12P1
(Chr. 12)

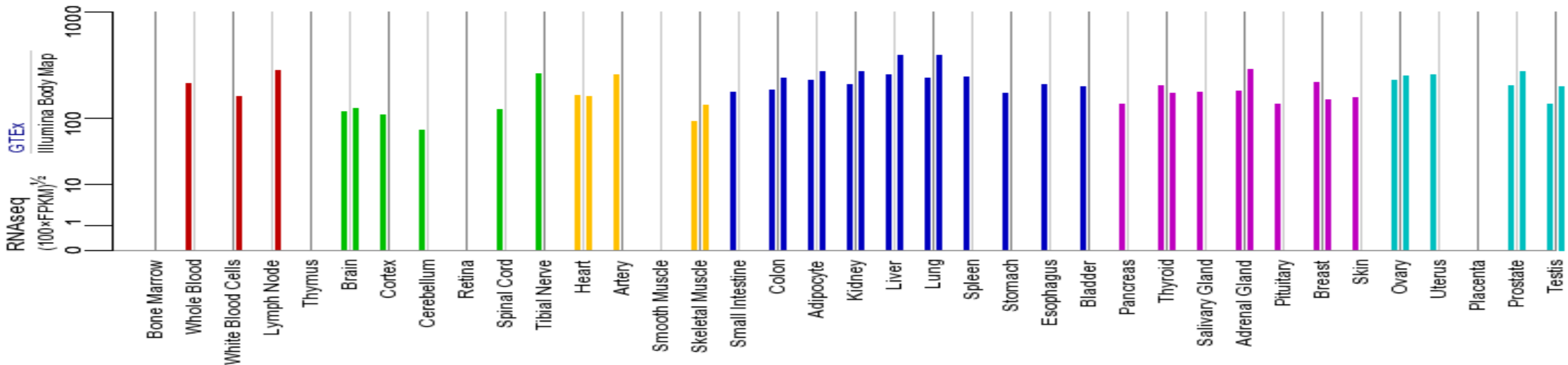
IFITMP12P1	Human	MNHTVQ	TFFSPVNSGQPPNYEMLKEEHKVAVLGVP	HNPA	PPTSTVI	HIRSKT	SVPHHVVWSLFNTLFMNP	CCLGFI	AFAYSVKSRDRKMV		
IFITMP12P1	Bonobo	MNHTVQ	TFFSPVNSGQPPNYEMLKEEHKVAVLGVP	HNPA	PPTSTVI	HIHSKT	SVPHCVVWSLFNTLFMNP	CCLGFI	AFAYSVKSRDRKMV		
IFITMP12P1	Chimpanzee	MNHTVQ	TFFSPVNSGQPPNYEMLKEEHKVAVLGVP	HNPA	PPTSTVI	HIHSKT	SVPHCVVWSLFNTLFMNP	CCLGFI	AFAYSVKSRDRKMV		
IFITMP12P1	Gorilla	MNHTVQT	-FSPVNSGQPPNYEMLKEEHKVAVLGVP	HNPA	PPTSTVI	HIRSKT	SVPHHVVWSLFNTLFMNS	CCLGFI	AFAYSVKSRDRKMV		
IFITMP12P1	Orangutan	MNHTVQ	TFFSPVNSGQH	PQ---	(*)	TQ	GGAQGGCAEGT	PQ	PCSPDVH-RSETSVPHHVVWSLFNTLFRNP	CCLGFI	AFAYSVKSRDRKMV

		100	110	120	130
				
IFITMP8P2	Human	GDLTRAQAYTSTAKCLNIWALIVDIVMTILLIIIPVLIFQVY**			
IFITMP8P2	Bonobo	GDLTRAQAYTSTAKCLNIWALIVDIVMTILLIIIPVLIFQVY**			
IFITMP8P2	Chimpanzee	GDLTRAQAYTSTAKCLNIWALIVDIVMTILLIIIPVLIFQVY**			
IFITMP8P2	Gorilla	GDLTRAQAYASTAKCLNIWALIVDIVMTILLSIIPVLIFQVY**			
IFITMP8P2	Orangutan	GDLTRAQAYASTAKCLNIWALIVDIVMTILLIIIPVLIFQVY**			
IFITMP8P2	Green Monkey	GDLTRAQAYASTAKCLNIWALIVGIVMTVLLIIIPVLIFQVY**			
IFITMP8P2	Gibbon	PTCPPLKAISP*T*DRYTG*YSIPS*KFE*HNMC*SSESID--			
IFITMP8P2	Crab-eating Macaque	W*PDQGPGLCLHHQVPEHLGPDGCHCHDRSAHHHPGVDLPSLLI			
IFITMP8P2	Rhesus Macaque	W*PDQGPGLCLHHQVPEHLGPDGCHCHDRSAHHHPGVDLPSLLI			
IFITMP8P2	Olive baboon	W*PDQAPMPPPPSA*TSGP*LINALS*PFCSSSSRC*SSKSID			

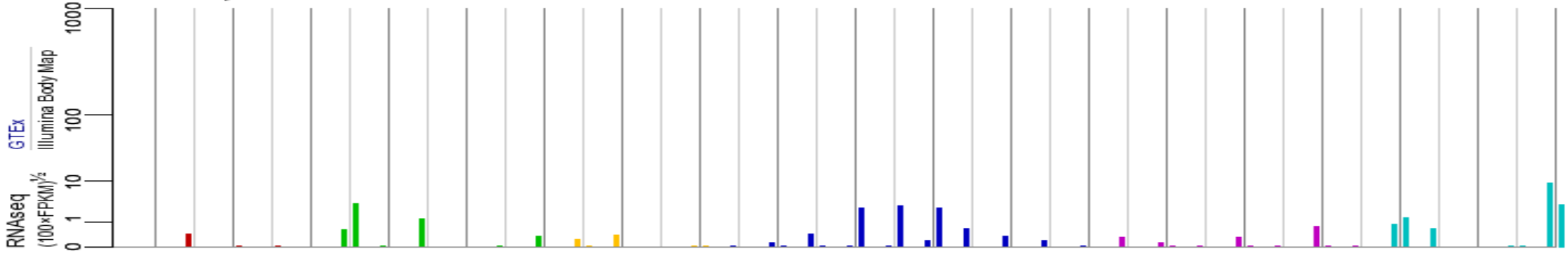
IFITMP12P1	Human	GNVTGAQAYASTTKCLNIWALILGILMTILLIIIPVLIFQ ^{AHR} *
IFITMP12P1	Bonobo	GNVTGAQAYASTTKCLNIWALILGILMTILLIIIPVLIFQ ^{AHR} *
IFITMP12P1	Chimpanzee	GNVTGAQAYASTAKCLNIWALILGILMTILLIIIPVLIFQ ^{AHR} *
IFITMP12P1	Gorilla	GNVTGAQAYSSTAKCLNIWALILGILMTILLIVIPVLIFQ ^{AHR} *
IFITMP12P1	Orangutan	GDLTGAQAYASTAKCLNIWALILGILMTILLIVIPILIFQ ^{AHR} *

mRNA Expression In Normal Human Tissues From Genotype-Tissue Expression (GTEx) Consortium

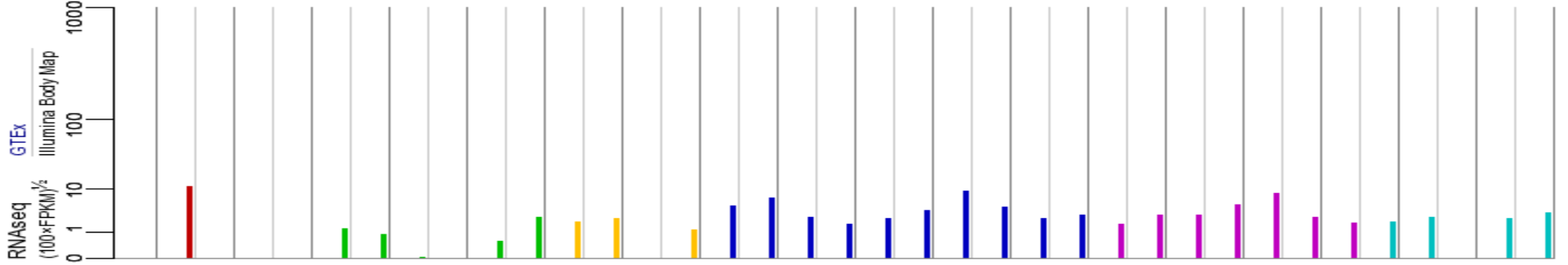
IFITM3



IFITM8P2



IFITMP12P1



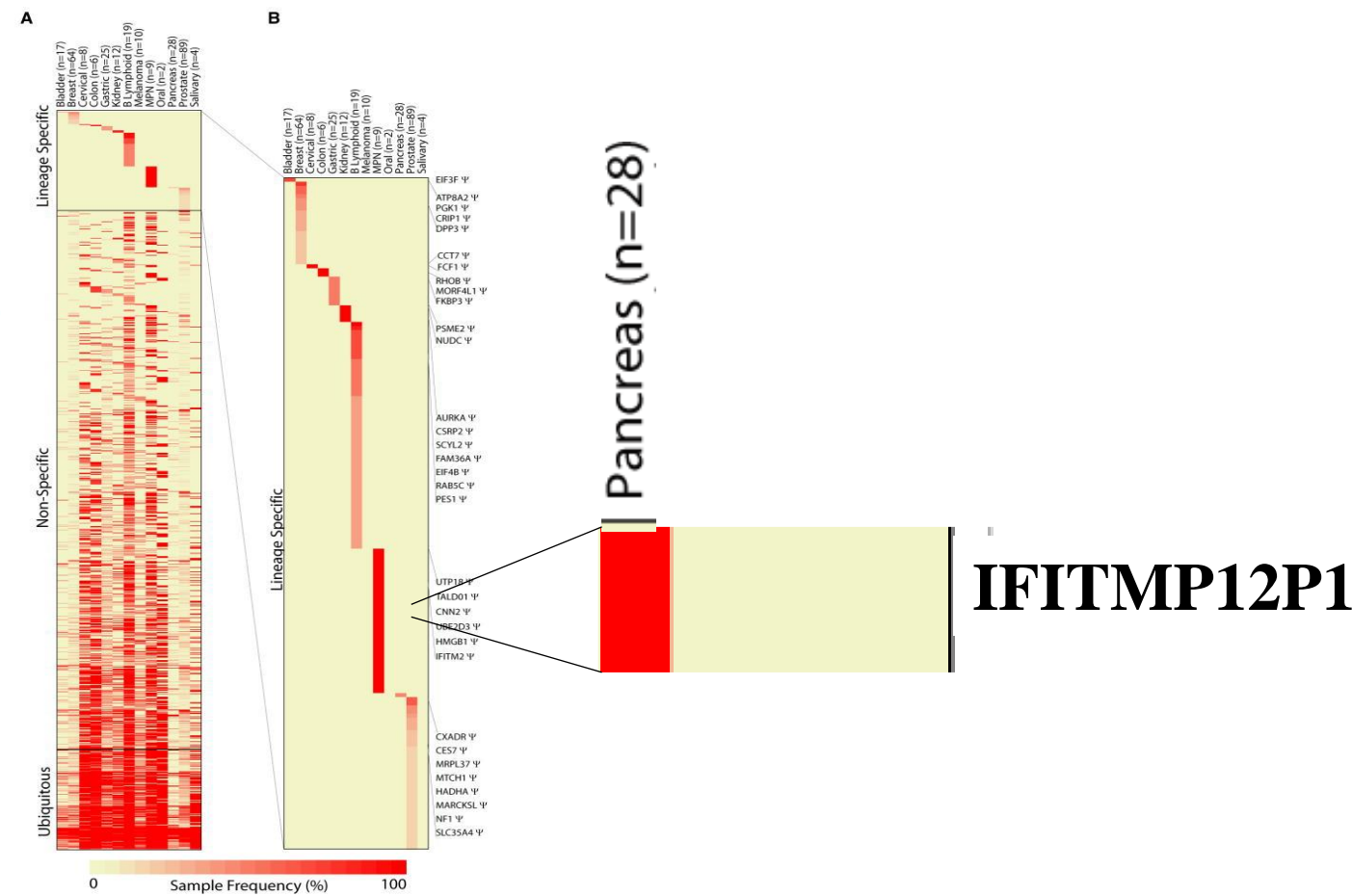
Transcriptomic Evidence of IFITM12P1 Expression

Tissue/Lineage-Specific Pseudogene Expression Profiles



Expressed Pseudogenes in the Transcriptional Landscape of Human Cancers

Cell. 2012 Jun 22; 149(7): 1622–1634.



Proteomics Evidence of IFITM12P1 Expression

IFITM3	1	MNHTVQTFSPVNSGQPPNYEMLKEEHEVAVLGAP	PHNPAPPTSTVIHIRSE	TSVPD	HVV
IFITM12P1	1	MNHTVQTFSPVNSGQPPNYEMLKEEH	KVAVLG	VPHNPAPPTSTVIHIRS	KTSVPHHV
<hr/>					
IFITM3	60	WSLFNTLFMNPCCLGFI	AFAYSVKSRDRKMVG	DVTGAQAYASTAKCLNIWALILGILMTI	
IFITM12P2	60	WSLFNTLFMNPCCLGFI	AFAYSVKSRDRKMVG	NVTGAQAYAST	TKCLNIWALILGILMTI
<hr/>					
Unique peptide					
IFITM3	120	LLIVIPVLIFQAYG			
IFITM12P3	120	LLI	IIPVLIFQA	HR	

J. Proteomic Research: 2016 Mar 4;15(3):945-55: Myoblastic cell lines

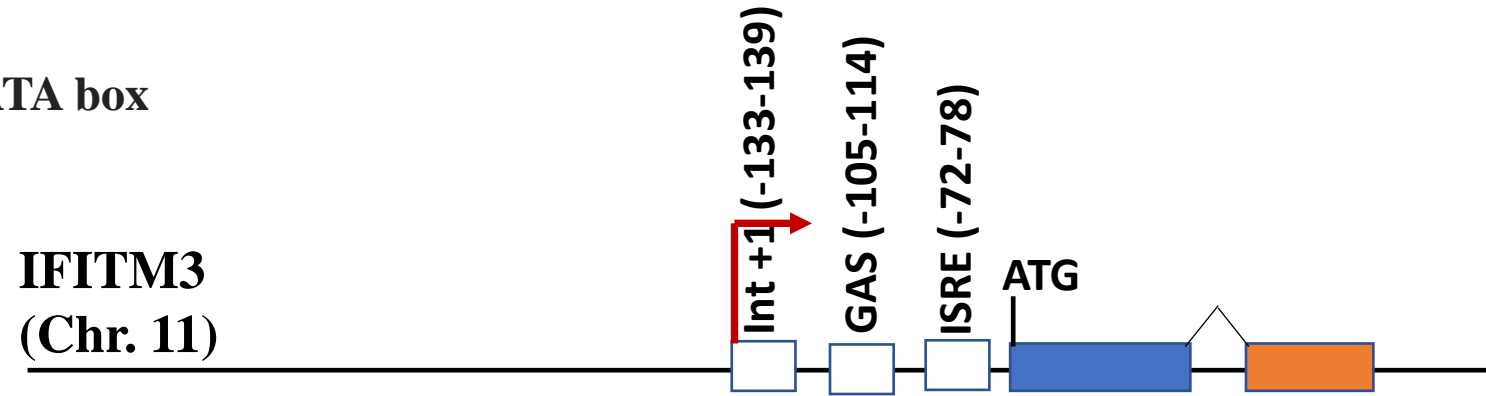
Mol. Cell Proteomics: 2016 Mar;15(3):1072-82: Pancreatic carcinoma

Scientific Data volume2: Article number: 150022 : Colon cancer

Mol. Cell Proteomics: 2012 Mar;11(3) :deep proteomics –in Jurkat cells

Potential Adoption of Regulatory Sequences in IFITM12P1

➤ IFITM3: NO TATA box



ISRE: Interferon-stimulated response element (for IFN-alfa/beta)

GAS: Interferon-Gamma Activated Sequence

Int+1 : Transcription Start Site (TSS)

Aim-1: Is endogenous IFITM12P1 undergoes transcription and if these exapted regulatory sequences are active?

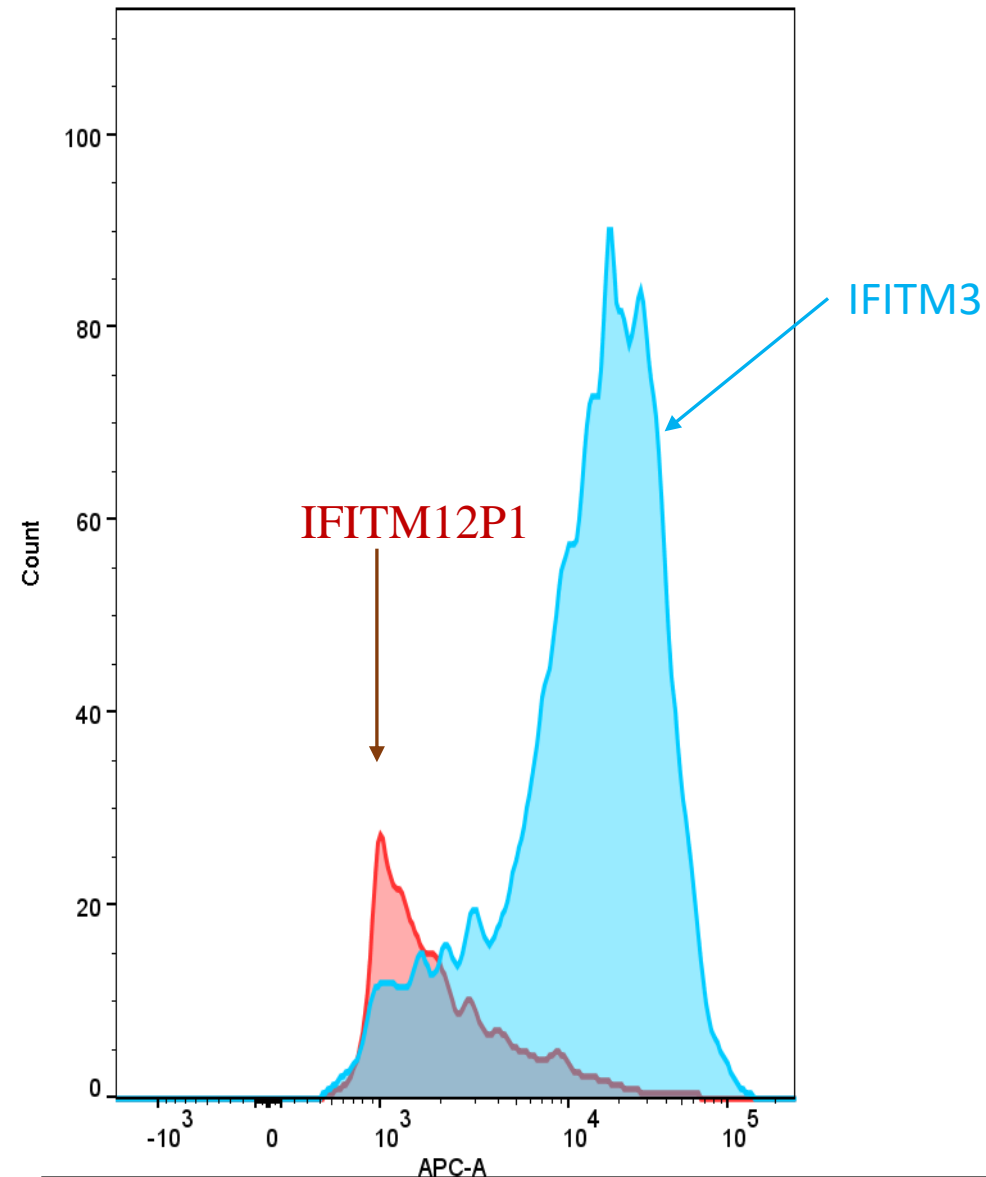
Experiments:

- A.** Determine the level of IFITM12P1 RNA expression in different cells/tissues by RT-PCR
- B.** Endogenous Tagging of IFITM12P1 by CRISPR/Cas9
- C. 5'-RACE** (Rapid amplification of cDNA ends) analysis to check the TSS.

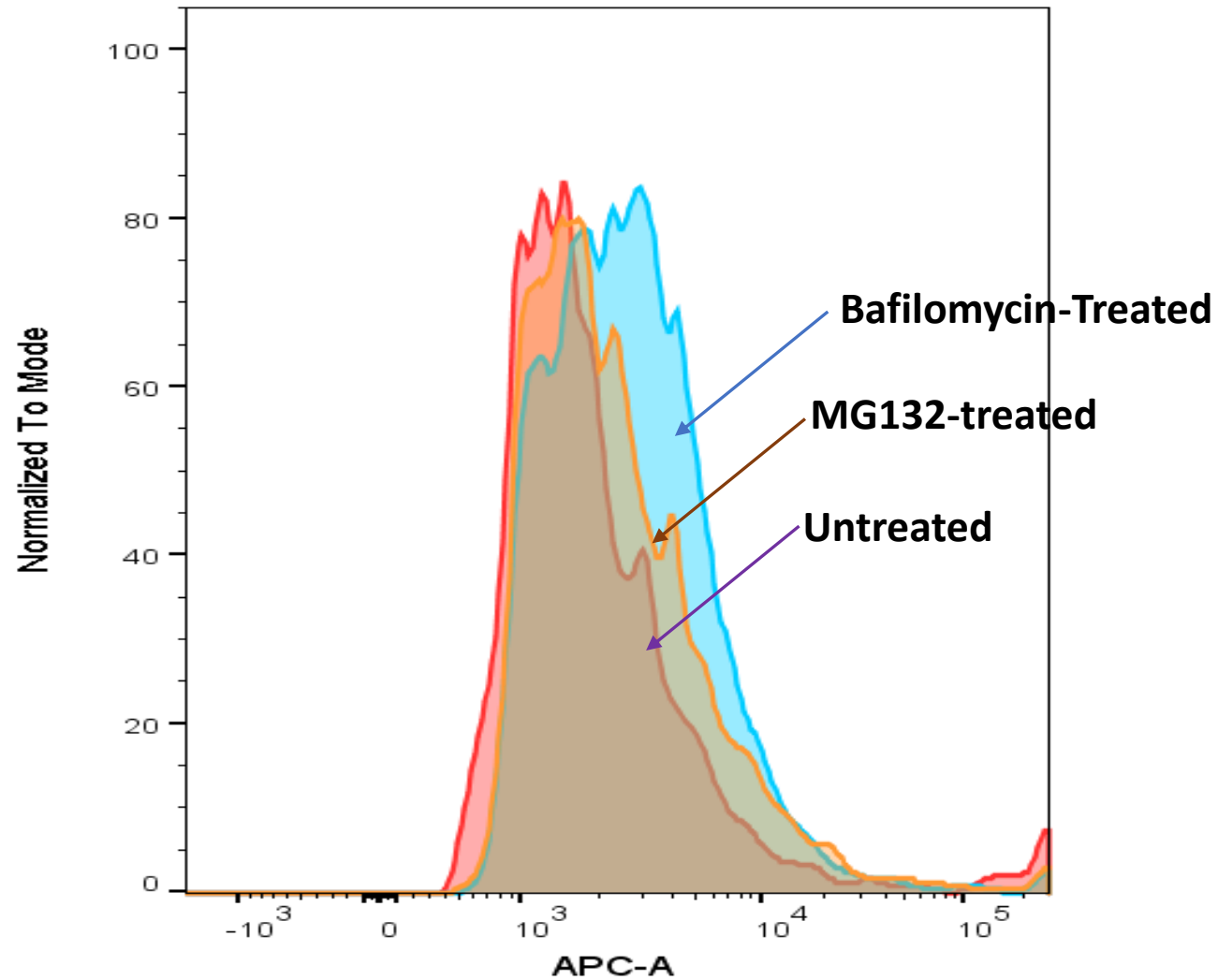
Aim-2: Investigating the role of IFITM12P1

Ectopically Expressed IFITM12P1 Shows Instability

**Stable 293-T cells expressing
FLAG-IFITM12P1/IFITM3**



IFITM12P1 Might Degrade by Lysosome



Why IFIM12P1 shows Instability in comparison to IFITM3?

Sequence Variations among IFITM12P1 and IFITM2/IFITM3

--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--

E27K

E50K

D54H

IFITM2	60	LFNTL	FMN	T	CCLGFIAFAYSVKSRDRKMVG	D	VTGA	QAY	ASTAKCLNIWALILGI	F	MTILL
IFITM3	61	LFNTL	FMN	P	CCLGFIAFAYSVKSRDRKMVG	D	VTGA	QAY	ASTAKCLNIWALILGI	L	MTILL
Human- IFITM12P1	61	LFNTL	FMN	P	CCLGFIAFAYSVKSRDRKMVG	N	VTGA	QAY	AST	T	KCLNIWALILGILMTILL
Gorilla- IFITM12P1	60	LFNTL	FMN	S	CCLGFIAFAYSVKSRDRKMVG	N	VTGA	QAY	S	S	TAKCLNIWALILGILMTILL
Chimpange- IFITM12P1	61	LFNTL	FMN	P	CCLGFIAFAYSVKSRDRKMVG	N	VTGA	QAY	ASTAKCLNIWALILGI	L	MTILL

D91N

IFITM2	120	IIIPVL	V	V	QAQR
IFITM3	121	IVIPVL	L	I	FQAYG
Human- IFITM12P1	121	IIIPVL	L	I	FQAHR
Gorilla- IFITM12P1	120	IVIPVL	L	I	FQAHR
Chimpange- IFITM12P1	121	IIIPVL	L	I	FQAHR

Which amino acids are responsible for IFITM12P1 instability?

Aim-2a: Which amino acid(s) render IFITM12P1 unstable?

Experiments:

- A.** SDM of each modified a.a. and testing their impact on expression pattern.
- B.** Determine if that specific mutation is a characteristic pattern of other retrogenes to find for a universal code of retrogene instability

Aim-2b: What is the endogenous role of IFITM12P1 in cellular immunity against virus and/or in other cellular processes?

Experiments:

A. Redundant function of IFITMs?

Knocking out the IFITM12P1 by CRISPR/Cas9 in different cell types and test for mutants against virus challenge.

B. Inhibiting the expression of IFITMs by anti-sense RNA?

Co-expression of IFITM3 and IFITM12P1 and check the impact on IFITM3 expression

C. Enhancing the expression of IFITMs by binding with the IFIMT3 miRNAs?

Expression of IFITM12P1 3'-UTR in Hela cells and explore the expression level of IFITM3

Knocking-out of IFITMP121 by CRISPR attempt

Experimental progress:

-Made stable 293T cells and Hela cells expressing Cas9 protein.



Thanks