



**Ministério da Saúde
Instituto Nacional de Câncer José Alencar
Gomes da Silva
Coordenação de Pós-graduação *Stricto sensu***

PRISCILA RAFAELA RIBEIRO

***Screening* de proteínas que potencialmente interagem com o
receptor inibitório *Lymphocyte-Activation Gene 3 (LAG-3)***

**Orientadores: Dr. Martin Bonamino
Dr. Leonardo Chicaybam**

Orientador(a) do período sanduíche: Dra. Angela Bachi

**RIO DE JANEIRO
2020**



**Ministério da Saúde
Instituto Nacional de Câncer José Alencar
Gomes da Silva
Coordenação de Pós-graduação *Stricto sensu***

**INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER
Pós-Graduação em Oncologia**

PRISCILA RAFAELA RIBEIRO

***Screening de proteínas com potenciais interações com o receptor
inibitório Lymphocyte-Activation Gene 3 (LAG-3)***

Tese apresentada ao Instituto Nacional de Câncer como
parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em
Oncologia

**Orientadoras: Dr. Martin Bonamino
Dr. Leonardo Chicaybam**

Orientador (a) do período sanduíche: Dra. Angela Bachi

**RIO DE JANEIRO
2020**





**Ministério da Saúde
Instituto Nacional de Câncer José Alencar
Gomes da Silva
Coordenação de Pós-graduação *Stricto sensu*
INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER
Pós-Graduação em Oncologia**

PRISCILA RAFAELA RIBEIRO

***Screening de proteínas com potenciais interações com o receptor
inibitório Lymphocyte-Activation Gene 3 (LAG-3)***

Orientadoras: Dr. Martin Bonamino

Dr. Leonardo Chicaybam

Orientador do período sanduíche: Dra. Angela Bachi

Aprovada em ____/____/_____

EXAMINADORES:

Prof. Dr. Emiliano Horacio Medei (Titular externo)

Prof. Dr. Francisco Bastos (Suplente externo)

Prof(a). Dra. Mariana Emerenciano (Titular interno)

Prof. Dr. Miguel Angelo Martins Moreira (Titular interno)

Prof(a). Dr(a). Sheila Coelho(Suplente interno)

Prof. Dr. Zilton Vasconcelos (Titular externo)

RIO DE JANEIRO

2020

EPÍGRAFE

“...o sucesso demora, dói e dá trabalho. Por outro lado, dói menos e demora menos do que não ter sucesso, do que desistir, do que não ter planos ou sonhos. Por isso, só vence quem não esmorece, quem persevera e não desiste. Quando o caminho é difícil, a perseverança vale mais que a inteligência”

(As 25 leis bíblicas do sucesso)

“...somente a sabedoria confere excelência ao detentor do conhecimento”

(Eclesiastes 7:12)

AGRADECIMENTOS

Difícil resumir 7 anos (AP, mestrado e doutorado) em 1 folha, mas vou tentar.

Sem dúvida, agradeço primeiro a Deus, pois mesmo sem saber como provar, se é que preciso disso, sinto que está por perto e me ajudou não só nesta etapa, mas em toda minha vida.

Ao meu orientador e co-orientador pela oportunidade de conhecer este projeto do qual tanto gosto e que me trouxe experiências pessoais e profissionais valiosas. Agradeço também a minha orientadora do exterior, por ter me recebido tão bem e por tudo que pude aprender com o grupo durante o período do doutorado sanduíche.

Aos colegas do laboratório do INCA, por toda a convivência durante este tempo, em especial Priscila, Luiza, Mari e Giovana.

A todos do 6o andar, por todos os momentos e em especial, pelos cafés ☺

Aos meus pais Eva e Ilário, por toda a simplicidade, riso fácil, amor e ao mesmo tempo, por serem fortes e terem me dado irmãos tão especiais com estas mesmas características, que também me inspiram e me fazem sentir orgulho de fazer parte da nossa família.

Aos meus tios, especial Carlinhos e Leninha, por toda a parceria de sempre, por serem também irmãos e amigos ao mesmo tempo. Muito obrigada!

Aos meus amigos...e que sorte a minha de poder citar aqui tantos nomes! Aos de infância que são da infância para a vida, em especial Juninho e Dani; aos que fiz no Rio de Janeiro e foram responsáveis por tantos momentos incríveis, em especial Ana Laura, Adriana, Fabi, Gabi, Amanda e Dora.

Às meninas com quem dividi quartos nos alojamentos, e que sorte tive durante todos esses anos: em especial Neze, Lauana, Mari, Thaissa, Taisnara e Amanda. Muito obrigada por tudo e principalmente pelas risadas!

Ao Neimar por ter estado comigo em praticamente todos os momentos durante esse 7 anos, e ter sido um super parceiro. Muito obrigada por tudo!

A todos os que zelam por nós no alojamento, como os porteiros, aos que lutam por manter essa idéia, uma vez que sem ela, no meu caso, seria impossível concluir minha formação nesta instituição.

Aos que conheci durante o doutorado sanduíche, que fizeram desta experiência muito melhor do que eu poderia imaginar: Zica, Chaitra, Tami, Regis, Rafa, Andrea, Francesco, Ilaria, Sara, Marina e, em especial, Anjali e Gian, por todo carinho e por terem me feito sentir em casa. Vou traduzir esta frase e mostrar a eles, haha. Thanks a lot guys!

Em especial, a Aline Costa Matos da Hora e Wesley Lima, ambos acometidos pelo câncer e que após lutarem contra esta doença, descansaram. Aline foi o motivo pelo qual comecei na pesquisa sobre câncer, e Wesley foi mais um que fortaleceu minhas razões para continuar. Que a jornada de vocês nos permita lembrar sempre o principal motivo pelo qual estamos aqui.

A todos que de alguma forma torceram e torcem por mim e talvez eu nem saiba, obrigada...

“O bem que você pratica em algum lugar é teu advogado em toda parte”.



**Ministério da Saúde
Instituto Nacional de Câncer José Alencar
Gomes da Silva
Coordenação de Pós-graduação *Stricto sensu***

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER

***Screening de proteínas com potenciais interações com o receptor
inibitório Lymphocyte-Activation Gene 3 (LAG-3)***

RESUMO

Priscila Rafaela Ribeiro

Introdução: Receptores inibitórios como PD-1, LAG-3, TIM-3 e CTLA-4 ganharam atenção especial como potenciais alvos para imunoterapia, uma vez que a manipulação de sinais negativos mediados por esses receptores pode fornecer novos alvos terapêuticos para várias doenças, inclusive câncer. Mais recentemente, Lymphocyte activation gene-3 (LAG-3) foi descrito como uma molécula de superfície celular que interage com moléculas de MHC de classe II e a identificação de como as proteínas transduzem o sinal desses receptores tem sido um desafio. Técnicas como Imunoprecipitação e a mais recentemente descrita, denominada BioID, são técnicas que podem auxiliar significativamente na identificação das interações proteína-proteína e, desta forma, na descoberta de proteínas essenciais para a ativação de determinada via de sinalização. **Objetivo:** Realizar um screening de proteínas que interagem com LAG-3 através das técnicas de Imunoprecipitação e BioID. **Metodologia:** os receptores de antígenos quiméricos (CARs) foram construídos com o scFv anti-CD20 fundido com os domínios intracelulares consistindo de: Lag-3 WT, Lag-3KMUT (K => mutação A no domínio KIEELE), Lag3 EPdel (domínio EP deletado), todos fusionados ao domínio BirA, com posterior indução da expressão destes CARs nas linhagens celulares HEK293T e MOLT4 (linfócitos T CD4+). Análise por citometria de fluxo, imunofluorescência e western blot foram feitos para avaliar a expressão e presença dos CARs. Após a imunoprecipitação das proteínas em beads conjugadas a streptavidina (BioID) e beads revestidas por proteína G (IP), as proteínas foram eluídas e submetidas a análise por espectrometria de massas. Posteriormente, análises *in silico* de possíveis vias de sinalização envolvidas downstream a LAG-3 foram realizadas com base nas proteínas marcadas identificadas no espectrometro de massas. **Resultados:** Receptores baseados em CAR foram sintetizados e clonados no vetor pcDNA3.1 MCS-BirA (R118G)-HA, em sequência com o domínio BirA. O CAR anti-CD20 / Lag3Wild foi eletroporado na linhagem celular MOLT4 e transfectado na linhagem HEK293T; nesta última, as demais construções também foram transfectadas, e a expressão e presença dos CARs foi verificada por citometria de fluxo, imunofluorescência e Western blot. Para a técnica de BioID em MOLT4, a análise do padrão de biotilação para o CAR anti-CD20 / Lag3Wild revelou o padrão de biotilação esperado. Contudo, foi verificada necessidade de otimização tanto da técnica BioID quanto IP em células T. Já a realização da IP em células HEK293T revelou que as proteínas EEF1G, DYNC1H1, PTBP1, FASN e DERL1 estavam presentes exclusivamente na condição LAG-3WT, quando esta foi comparada com as condições EPDEL e KMUT. Além disso, o ensaio mostrou que as proteínas PDIA4, SDF4 e HEL-S-269 estavam presentes exclusivamente na lista da condição LAG3WT, quando esta foi comparada com as condições KMUT e DMUT. A análise das vias de sinalização enriquecidas com base nas proteínas exclusivamente encontradas em cada condição, entre a condição CAR LAG3WT versus controle, mostrou que as vias de processamento de proteínas no retículo endoplasmático, de biossíntese de N-glicanos e exporte de proteínas foram encontradas como enriquecidas. Quando todas as condições foram consideradas para esta mesma análise simultaneamente- considerando- se somente as proteínas únicas presentes em cada condição-, foi observado que a via de processamento de proteínas no retículo endoplasmático esteve presente como enriquecida em quase todas as condições, assim como vias de processamento de N-glicanos e exporte de proteínas. Na condição KMUT, a via da interleucina 17 (IL-17) também foi enriquecida. Ainda, a via de exporte de proteínas também esteve presente para a condição KMUT e também na DMUT, sendo que nesta última, a de síntese de N-glicanos também foi observada, novamente nos levando a inferir uma possível correlação entre a necessidade de glicosilação de LAG-3 para sua função inibitória. **Conclusão:** Em relação a técnica de BioID, é possível também observar pela técnica de western blot o padrão de biotilação esperado entre amostra e controles. A análise das amostras seguindo os protocolos de IP e BioID por espectrometria de massas nos revelou algumas proteínas que provavelmente estão diretamente envolvidas com a função de LAG-3. **Perspectivas:** realizar a edição através da técnica de CRISPR/Cas9 das possíveis proteínas essenciais a LAG-3 encontradas após análise das amostras por espectrometria de massas. Uma vez realizados tais ensaios funcionais, pretende-se realizar os mesmos novamente, mas usando modelos *in vivo*. **PALAVRAS-CHAVES:** LAG-3, checkpoint imunológico, imunoprecipitação, BioID, receptores quiméricos de antígenos.



Ministério da Saúde
Instituto Nacional de Câncer José Alencar
Gomes da Silva
Coordenação de Pós-graduação *Stricto sensu*

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER

Screening of proteins with potential interactions with the inhibitory receptor
Lymphocyte-Activation Gene 3 (LAG-3)

ABSTRACT

Priscila Rafaela Ribeiro

Introduction: Inhibitory receptors such as PD-1, LAG-3, TIM-3, and CTLA-4 gained special attention as targets for immunotherapy since manipulation of signals mediated by these receptors can cause new therapeutic targets for some diseases, including cancer. More recently, the lymphocyte activation gene 3 (LAG-3) has been described as a cell surface molecule that interacts with MHC class II molecules and to identify how proteins transduce or signal these receptors proved challenging. Techniques such as Immunoprecipitation and more recent ones, called BioID, can help in the identification of interactions of proteins and, likewise, in the discovery of essential chemical substances for the activation of a specific signaling pathway. **Objective:** to perform a protein screening that interacts with LAG-3 using immunoprecipitation and BioID techniques. **Methodology:** chemical antigen receptors (CARs) were constructed with anti-CD20 scFv and intracellular domains composed of Lag-3 WT, Lag-3KMUT (K => mutation in the KIEELE domain), Lag3 EPdel (deleted EP domain), all fused in the BirA domain, with subsequent induction of the expression of these CARs in the HEK293T and MOLT4 cell lines (CD4 + T lymphocytes). Flow cytometry, immunofluorescence and western blot analyzes were performed to assess the expression and presence of CARs. After the immunoprecipitation of proteins in beads conjugated to streptavidin (BioID) and beads coated with protein G (IP), proteins were eluted and subjected to mass spectrometry analysis. Subsequently, in silico analysis of possible signaling pathways involved downstream of LAG-3 were performed based on the labeled proteins identified by mass spectrometry. **Results:** CAR-based receptors were synthesized and cloned into the pcDNA3.1 MCS-BirA (R118G) -HA vector, in sequence with the BirA domain. The anti-CD20 / Lag3Wild CAR was electroporated in the MOLT4 cell line and transfected in the HEK293T line; in the latter, the other constructions were also transfected, and the expression and presence of the CARs were verified by flow cytometry, immunofluorescence and Western blot. As for the BioID technique in MOLT4, the analysis of the biotinylation pattern for the anti-CD20 / Lag3Wild CAR revealed the expected biotinylation pattern. However, there was a need to optimize both the BioID and IP techniques in T cells. The IP in HEK293T cells revealed that the EEF1G, DYNC1H1, PTBP1, FASN, and DERL1 proteins were present exclusively in the LAG-3WT condition when it was compared to EPDEL and KMUT conditions. In addition, the test showed that the proteins PDIA4, SDF4, and HEL-S-269 were present exclusively in the list of the conditions LAG3WT, when this was compared with the conditions KMUT and DMUT. Analysis of the enriched signaling pathways based on the proteins found exclusively in each condition, between the CAR LAG3WT versus control condition, showed that the protein processing pathways in the endoplasmic reticulum, N-glycans biosynthesis, and protein export were found as enriched. When all conditions were considered for this same analysis simultaneously - considering only the unique proteins present in each condition-, it was observed that the protein processing pathway in the endoplasmic reticulum was present as enriched in almost all conditions, as well as pathways processing of N-glycans and export of proteins. In the KMUT condition, the interleukin 17 (IL-17) pathway was also enriched. In addition, the protein export route was also present for the KMUT condition and also in DMUT, and in the latter, the synthesis of N-glycans was observed as well, again leading us to infer a possible correlation between the need for glycosylation of LAG-3 to exert its inhibitory function. **Conclusion:** Regarding the BioID technique, it is also possible to observe the expected biotinylation pattern between samples and controls by western blot technique. Samples following the protocols of IP and BioID by mass spectrometry revealed to us some proteins that are probably directly involved with the function of LAG-3. **Perspectives:** carry out the editing using the CRISPR / Cas9 technique of candidate proteins essential to LAG-3 highlighted by mass spectrometry analysis of the samples. Once these functional tests will be performed, we will move towards their application to in vivo models **KEYWORDS:** LAG-3, immunological checkpoint, immunoprecipitation, BioID, chimeric antigen receptor

ÍNDICE

| | |
|--------------------------------------------------------------|-------------|
| RESUMO | vii |
| ABSTRACT | viii |
| LISTA DE QUADROS | xii |
| LISTA DE FIGURAS | xiii |
| LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS | xv |
| 1. INTRODUÇÃO | 16 |
| 1.1. Epidemiologia | 16 |
| 1.2. Hematopoese e Linfócitos T | 16 |
| 1.3. Ativação de células T | 20 |
| 1.4. Sistema Imune e Câncer | 21 |
| 1.4.1 Anticorpos monoclonais..... | 23 |
| 1.4.2 Transferência de linfócitos modificados..... | 25 |
| 1.4.3 CARs..... | 25 |
| 1.5. Checkpoints imunológicos | 28 |
| 1.5.1 PD-1..... | 28 |
| 1.5.2 CTLA-4..... | 29 |
| 1.6. LAG-3 | 31 |
| 1.6.1 Estrutura..... | 31 |
| 1.6.2 Sinalização e expressão..... | 33 |
| 1.6.3 LAG-3 e imunoterapia..... | 36 |
| 1.7. Biold | 38 |
| 1.8. Imunoprecipitação | 41 |
| 2. OBJETIVOS | 44 |
| 2.1. Objetivo primário | 44 |
| 2.2. Objetivos secundários | 44 |
| 3. METODOLOGIA | 45 |
| 3.1. Plasmídeos | 45 |
| 3.2. Multiplicação do DNA plasmidial | 45 |
| 3.3. Linhagens celulares | 46 |
| 3.4. Eletroporação e Transfecção dos plasmídeos | 46 |
| 3.4.1. Eletroporação com Nucleofactor II..... | 46 |
| 3.4.2. Eletroporação com NEPA21..... | 47 |
| 3.4.3. Transfecção com Fosfato de Cálcio..... | 47 |
| 3.5. Biold | 48 |
| 3.6 Imunoprecipitação | 49 |

| | |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 3.7. Detecção da expressão dos CARs | 49 |
| 3.7.1. Detecção por citometria de fluxo..... | 50 |
| 3.7.2. Detecção por imunofluorescência..... | 51 |
| 3.8. Western blot..... | 52 |
| 3.9. Preparação de amostras para análise por espectrometria de massas. | 52 |
| 3.9.1. Redução | 53 |
| 3.9.2. Alquilação..... | 53 |
| 3.9.3. Digestão e injeção da amostra | 54 |
| 3.9.4. Eluição..... | 54 |
| 3.10. Análise dos dados provenientes do espectrômetro de massas | 55 |
| 3.10.1. Processamento dos dados brutos | 55 |
| 3.10.2. Análises estatísticas..... | 55 |
| 4. RESULTADOS..... | 56 |
| 4.1. BioID em MOLT4 | 56 |
| 4.1.2. Análise da expressão dos plasmídeos por citometria de fluxo | 60 |
| 4.1.1. Análise da presença do CAR LAG3-WT por Western blot | 62 |
| 4.1.2. Análise do padrão de biotilação por Western Blot | 63 |
| 4.1.3. Diagrama de Venn- BioID em MOLT 4 | 64 |
| 4.2. Imunoprecipitação em MOLT4 | 65 |
| 4.2.1. Análise da expressão do CARLAG3-WT por citometria de fluxo..... | 65 |
| 4.2.2. Análise da presença do CAR LAG3-WT por Western blot | 67 |
| 4.2.3. Diagrama de Venn pós Imunoprecipitação em MOLT 4 | 68 |
| 4.3. Imunoprecipitação em HEK 293T | 70 |
| 4.3.1. Análise da presença do CAR LAG3 WT por imunofluorescência..... | 70 |
| 4.3.2. Análise da presença do CAR LAG3 WT e do teste de imunoprecipitação por Western blot..... | 71 |
| 4.3.3. Análise da presença dos CARs com construções mutantes (EPDEL, KMUT e DMUT) por imunofluorescência | 73 |
| 4.3.4. Análise da expressão dos CARs EPDEL, KMUT e DMUT e da presença das bandas correspondentes às construções de CARs após imunoprecipitação por SDS PAGE | 75 |
| 4.4. Análises estatísticas | 76 |
| 4.4.1. Análises diferenciais dos dados de interação das construções contendo domínios intracitoplasmáticos de LAG3..... | 76 |
| 4.4.2. Análise de componentes principais (PCA) | 78 |
| 4.5. Diagramas de Venn e localização da proteínas | 79 |
| 4.6. Vias de enriquecimento | 82 |
| 5. DISCUSSÃO | 86 |
| 5.1. BioID em MOLT4 | 86 |
| 5.1. Imunoprecipitação em MOLT4 | 86 |
| 5.2. Imunoprecipitação em HEK 293T | 88 |
| 6. CONCLUSÕES..... | 93 |

| | |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| 7. PERSPECTIVAS..... | 95 |
| REFERÊNCIAS..... | 95 |
| 8. APÊNDICES..... | 102 |
| 8.1. Apêndice 1: Quadro de proteínas encontradas no ensaio de Biold em células MOLT4..... | 102 |
| 8.2. Apêndice 2: Quadro de proteínas encontradas na condição LAG3WT através do ensaio de imunoprecipitação..... | 107 |
| 8.3. Apêndice 3: Quadro de proteínas encontradas na condição EPDEL através do ensaio de imunoprecipitação..... | 110 |
| 8.4. Apêndice 4: Quadro de proteínas encontradas na condição KMUT através do ensaio de imunoprecipitação..... | 116 |
| 8.5. Apêndice 5: Quadro de proteínas encontradas na condição DMUT através do ensaio de imunoprecipitação..... | 122 |
| 8.6. Apêndice 6: Quadro de proteínas encontradas exclusivamente em CARLAG3WT,EPDEL,KMUT e DMUT,quando comparadas simultaneamente,através do ensaio de imunoprecipitação | 128 |
| 9. ANEXOS..... | 130 |
| 9.1. Anexo A..... | 130 |
| 9.2. Anexo B..... | 131 |

LISTA DE QUADROS

| | |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| QUADRO 1: Co-inibidores anti-LAG-3 e co-estimuladores utilizados em alguns ensaios clínicos..... | 37 |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|

LISTA DE FIGURAS

| | |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 1.3. Sinais de ativação e inibição durante a sinalização das células T. | 20 |
| Figura 1.4. Esquema comparando a estrutura dos anticorpos utilizados na clínica (quiméricos e humanizados) com os murinos e humanos. | 24 |
| Figura 1.4.1. Esquema de um receptor quimérico de antígeno (CAR). | 26 |
| Figura 1.5. Forma de ação dos anticorpos anti-PD-1 e anti-CTLA-4. | 31 |
| Figura 1.6. Representação esquemática da estrutura do receptor inibitório LAG-3. | 32 |
| Figura 1.6.1. Estrutura da porção intracelular do receptor inibitório LAG-3 | 33 |
| Figura 1.7. Técnica BioID | 40 |
| Figura 1.8. Diagrama esquemático do princípio do co-IP | 43 |
| Figura 4.1. Mapa esquemático do plasmídeo pcDNA 3.1 que contém sequência da BirA*2 | 57 |
| Figura 4.2. Histórico de síntese e clonagem de 20LAG-3 ao plasmídeo pcDNA 3.1 | 58 |
| Figura 4.3. Mapa final após clonagem de 20LAG-3 ao plasmídeo pcDNA 3.1 que contém sequência da BirA*2 | 59 |
| Figura 4.4. Gel de agarose mostrando bandas da digestão do CAR 20LAG-3BirA*2. | 59 |
| Figura 4.5. Expressão do CAR 20 LAG-3 WT BirA*2 nas células MOLT4. | 61 |
| Figura 4.6. <i>Western blot</i> mostrando a presença do CARLAG3-WT | 62 |
| Figura 4.7. <i>Western blot</i> mostrando a presença do CARLAG3-WT | 63 |
| Figura 4.8. <i>Western blot</i> mostrando o padrão de biotilação | 64 |
| Figura 4.9. Diagrama de Venn do teste BioID em MOLT4. | 65 |
| Figura 4.10. Expressão do CAR LAG-3 WT nas células MOLT4. | 66 |
| Figura 4.11. Análise da presença dos CARs por <i>Western blot</i> | 67 |
| Figura 4.12. Diagrama de Venn e proteínas encontradas no teste de imunoprecipitação em MOLT4. | 68 |
| Figura 4.13. Padrão esperado de localização das proteínas encontradas na imunoprecipitação com MOLT4 de acordo com a plataforma UNIPROT KB | 69 |
| Figura 4.14. Padrão de expressão dos CARs por imunofluorescência | 70 |
| Figura 4.15. Análise da presença do CAR LAG3-WT por <i>Western blot</i> . | 72 |
| Figura 4.16. Padrão de expressão dos CARs por imunofluorescência | 74 |

| | |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 4.17. Análise da presença dos CARs com construções mutantes (EPDEL, KMUT, DMUT) por SDS PAGE. | 75 |
| Figura 4.18. Volcano plot CAR LAG3WT x Controle | 76 |
| Figura 4.19. Volcano plot EPDEL x Controle. | 77 |
| Figura 4.20. Volcano plot KMUT x Controle | 77 |
| Figura 4.21. Volcano plot DMUT x Controle | 78 |
| Figura 4.22. Análise de componentes principais (PCA). | 79 |
| Figura 4.23. Diagrama de Venn CAR LAG3 WT x EDEL e proteínas presentes exclusivamente em LAG3WT. | 80 |
| Figura 4.24. Diagrama de Venn CAR LAG3 WT x KMUT e proteínas presentes exclusivamente em LAG3WT. | 80 |
| Figura 4.25. Diagrama de Venn CAR LAG3 WT x DMUT e proteínas presentes exclusivamente em LAG3WT. | 81 |
| Figura 4.26. Diagrama de Venn comparando as proteínas únicas presentes nas condições CAR LAG3WT, EPDEL, KMUT e DMUT | 82 |
| Figura 4.27. Representação das vias de sinalização relacionadas as proteínas encontradas exclusivamente na condição LAG3WT vs controles | 83 |
| Figura 4.28. Representação das vias de sinalização relacionadas as proteínas encontradas exclusivamente na condição LAG3WT vs mutantes. | 83 |
| Figura 4.29. Representação das vias de sinalização relacionadas as proteínas encontradas exclusivamente na condição EPDEL vs demais construções de LAG3 | 84 |
| Figura 4.30. Representação das vias de sinalização relacionadas as proteínas encontradas exclusivamente na condição KMUT vs demais construções de LAG3. | 84 |
| Figura 4.31. Representação das vias de sinalização relacionadas as proteínas encontradas exclusivamente na condição DMUT vs demais construções de LAG3. | 85 |

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

- APC**- Célula apresentadora de antígeno
- BSA**- *Bovine serum albumin* (albumina sérica bovina)
- CAR**- *Chimeric antigen receptor* (receptor quimérico de antígeno)
- CDR**- *Complementarity determining region* (região determinante de complementariedade)
- CIBio**- Comissão interna de biossegurança
- CLP**- Common lymphoid precursor (Progenitor linfoide comum)
- CMP**- Common myeloid precursor (Progenitor mieloide comum)
- CTLA-4**- *Cytotoxic T-lymphocyte protein 4*
- DECH**- Doença enxerto contra hospedeiro
- DLI**- Donor lymphocyte infusion (Infusões de linfócitos do doador)
- ECL**- Efeito enxerto contra leucemia
- FDA**- *Food and drug administration*
- HLA**- Human leukocyte antigen (antígeno leucocitário humano)
- HRP**- *Horseradish peroxidase*
- IL**- Interleucina
- ITIM**- motivos inibitórios baseado em tirosina
- LAG-3**- *Lymphocyte-Activation Gene 3*
- LMC**- Leucemia mielóide crônica
- MHC**- Complexo maior de histocompatibilidade
- NSCLC**- *Non small cell lung cancer* (câncer de pulmão de não pequenas células)
- OGM**- Organismo geneticamente modificado
- PBS**- *Phosphate-buffered saline*
- PD-1**- *Programmed cell death protein 1*
- PE**- *Phycoerythrin* (Ficoeritrina)
- PFA**- Paraformaldeído
- RE**- Retículo endoplasmático
- SPV**- *Streptavidin* (estreptavidina)
- TCR**- *T cell receptor* (receptor de célula T)
- TKI**- *Tirosine kinase inhibitor* (inibidor de tirosino quinase)
- TNF**- *Tumor necrosis factor* (fator de necrose tumoral)
- TPH**- Transplante de precursores hematopoiéticos
- Treg**- Célula T reguladora
- VDJ**- *Variable, diversity, junction*

1. INTRODUÇÃO

1.1. Epidemiologia

Em 2012, segundo as estimativas mundiais, ocorreram 14,1 milhões de casos novos de câncer e 8,2 milhões de óbitos. Tanto a incidência quanto a mortalidade foram maiores entre os indivíduos do sexo masculino (53% e 57%, respectivamente) (FERLAY et al., 2013). Os cânceres de pulmão, mama, intestino e próstata foram os mais incidentes no mundo de forma geral, sendo o de pulmão mais incidente nos homens, seguido pelo câncer de próstata, enquanto que nas mulheres, os tipos mais frequentes foram os de mama, intestino e pulmão (FERLAY et. al., 2013).

Para o Brasil, no triênio 2020-2022, estima-se a ocorrência de aproximadamente 625 mil casos novos de câncer para cada ano, excetuando-se deste total os 177 mil para o câncer de pele não melanoma. Dos possíveis 600.000 casos, os cânceres de mama e próstata (66 mil cada), seguido por cólon e reto 41 mil, pulmão (30 mil) e estômago (21 mil) serão os mais incidentes na população (INCA, 2019).

O câncer ocorre por meio de um processo de transformação de células normais em células neoplásicas. Estas células adquirem capacidade de replicação descontrolada, obtendo assim vantagem seletiva sobre as demais por meio de eventos genéticos como mutações no DNA, mudanças na expressão de genes pela ativação de oncogenes e inibição de genes supressores de tumor ou por eventos epigenéticos como metilação do DNA e modificação de histonas. Dessa forma, as células neoplásicas possuem capacidade de evadir os mecanismos de apoptose, além de serem insensíveis aos sinais anti-proliferativos fisiológicos, bem como visto mais recentemente, de evadir os mecanismos de defesa do sistema imune. Esta capacidade de evasão do sistema imune é considerada um hallmark emergente do câncer (HANAHAN; WEINBERG, 2011).

Há poucos anos atrás, os principais tratamentos para os mais variados tipos de câncer se baseavam apenas em cirurgia, radioterapia e quimioterapia, sendo estas

terapias pouco específicas e, com isso, responsáveis por graves efeitos colaterais aos pacientes.

Com o desenvolvimento significativo de áreas como biologia molecular e bioquímica estrutural, mais recentemente, a elucidação de várias vias importantes para o processo de carcinogênese começou a ser realizada. Isso possibilitou então o desenvolvimento de novas drogas específicas para determinadas moléculas, como os inibidores de tirosina quinase (TKIs). Ainda assim, com as terapias atuais empregadas na clínica, muitos pacientes desenvolvem resistência ao tratamento, ou são não responsivos. Desta forma, há a necessidade de se desenvolver novas terapias, principalmente com objetivo de se atingir mais especificamente as células tumorais sem comprometer os tecidos saudáveis, a fim de que os efeitos colaterais fossem menos intensos e obter melhor qualidade de vida do paciente e ,melhorias nas taxas de sobrevida. Com isso, passou-se a pensar na utilização de células do próprio paciente, como as células do sistema imune, como uma nova abordagem de tratamento. Hematopoese e Linfócitos T

O sistema imune é dividido e composto por dois grupos principais de células e moléculas, as que compõem o sistema imune inato e as que compõem o sistema imune adaptativo. As células efetoras deste último são os chamados linfócitos B, T. O processo pelo qual tanto as células do sistema imune inato quanto adaptativo são geradas é denominado hematopoese, e tem início na medula óssea.

Neste órgão, um precursor mielóide comum (CMP) e um precursor linfóide comum (CLP) são formados primeiramente. O CLP originará precursores comprometidos com a diferenciação dos linfócitos T que, ao migrarem para o timo, são capazes de gerar células T maduras.

Uma vez no timo, rearranjos ocorrem nas sequências das cadeias V (variável), D (diversidade), J (junção) que constituem o receptor da célula T (TCR). Estes rearranjos geram novas sequências gênicas que resultam em cadeias polipeptídicas que compõem os TCRs. Após o rearranjo, o linfócito T com seu TCR clonotípico é submetido a mecanismos de seleção positiva e negativa baseados nas afinidades de reconhecimento de antígenos pelo TCR recém rearranjado. Como co-reconhecimento das moléculas de MHC os linfócitos utilizam as moléculas CD4 ou CD8. A expressão de CD4 ou CD8 por linfócitos T determina estes dois subtipos celulares.

Os linfócitos CD8 possuem função citotóxica, sendo capazes de eliminar a célula alvo por meio da liberação de granzimas e perforinas, que são enzimas capazes de degranular e perfurar a membrana plasmática da célula alvo. A partir destes linfócitos T CD8⁺, linfócitos de memória central e linfócitos de memória efetora podem ser formados.

Já os linfócitos T CD4⁺, após reconhecerem o antígeno e se tornarem ativos, são capazes de produzir citocinas que podem modular a atividade de outras células, como linfócitos CD8⁺, macrófagos e células B. A partir destes linfócitos CD4⁺, outras subpopulações com seus respectivos fenótipos e funções são geradas, sendo as mais estudadas as células T helper (Th) do tipo Th1, Th2, e Th17, além das células T reguladoras (T reg). A primeira população, Th1, é capaz principalmente de produzir citocinas como IFN- γ , IL-2 e TNF- α em resposta a patógenos intracelulares e vírus. Células Th2 podem ativar células B e está envolvida em processos de alergia e ativação de eosinófilos, por meio da secreção de interleucinas (IL) como IL-4, IL-5, IL-6 e IL-10.

A população TH17 está relacionada à resposta a antígenos extracelulares, bem como no recrutamento de neutrófilos para locais de inflamação. Secretam principalmente IL17A e IL17F, além de IL-9 e IL-21. Já as células T reguladoras (Treg) atuam principalmente para regular a ação de outros linfócitos por meio da produção de citocinas como IL-10 e TGF- β . Assim como o início do processo de diferenciação a partir dos linfócitos T maduros, tanto os linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ podem se interconverter fenotipicamente se submetidos a estímulos que ainda não são bem esclarecidos (NAKAYAMADA *et al.*, 2012; COSMI *et al.*, 2014).

1.2. Hematopoese e linfócitos T

O sistema imune é dividido e composto por dois grupos principais de células e moléculas, as que compõem o sistema imune inato e as que compõem o sistema imune adaptativo. As células efetoras deste último são os chamados linfócitos B e T. O processo pelo qual tanto as células do sistema imune inato quanto adaptativo são geradas é denominado hematopoese, e tem início na medula óssea.

Neste órgão, um precursor mielóide comum (CMP) e um precursor linfóide comum (CLP) são formados primeiramente a partir de uma célula tronco hematopoética. O CLP originará precursores comprometidos com a diferenciação dos linfócitos T que, ao migrarem para o timo, são capazes de gerar células T maduras.

Uma vez no timo, rearranjos ocorrem nas sequências das cadeias V (variável), D (diversidade), J (junção) que constituem o receptor da célula T (TCR). Estes rearranjos geram novas sequências gênicas que resultam em cadeias polipeptídicas que compõe os TCRs. Após o rearranjo, o linfócito T com seu TCR clonotípico é submetido a mecanismos de seleção positiva e negativa baseados nas afinidades de reconhecimento de antígenos/MHC (complexo principal de histocompatibilidade) pelo TCR recém rearranjado. Para o co-reconhecimento das moléculas de MHC os linfócitos utilizam as moléculas CD4 ou CD8 e a utilização de CD4 ou CD8 para o reconhecimento funciona do peptído+MHC no timo determina a qual destes dois subtipos celulares pertencerá o linfócito T em desenvolvimento.

Os linfócitos CD8 possuem função citotóxica, sendo capazes de eliminar a célula alvo por meio da liberação de granzimas e perforinas, que são enzimas capazes de degranular e perfurar a membrana plasmática da célula alvo, respectivamente. A partir destes linfócitos T CD8⁺, linfócitos de memória central e linfócitos de memória efetora podem ser formados.

Já os linfócitos T CD4⁺, após reconhecerem o antígeno e se tornarem ativos, são capazes de diferenciar e produzir citocinas que podem modular a atividade de outras células, como linfócitos CD8⁺, macrófagos e células B. A partir destes linfócitos CD4⁺, outras subpopulações com seus respectivos fenótipos e funções são geradas, sendo as mais estudadas as células T helper (Th) do tipo Th1, Th2, e Th17, além das células T reguladoras (T reg). A população Th1 é capaz de produzir citocinas como IFN- γ , IL-2 e TNF- α em resposta a patógenos intracelulares e vírus. Células Th2 podem ativar células B e estão envolvidas em processos de alergia e ativação de eosinófilos, por meio da secreção de interleucinas (IL) como IL-4, IL-5, IL-6 e IL-10.

A população TH17 está relacionada à resposta a antígenos extracelulares, bem como no recrutamento de neutrófilos para locais de inflamação. Secretam principalmente IL17A e IL17F, além de IL-9 e IL-21. Já as células T reguladoras (Treg) atuam principalmente para regular a ação de outros linfócitos por meio da produção de citocinas como IL-10 e TGF- β . Assim como o início do processo de diferenciação

Um dos mecanismos de escape tumoral mais comuns que ocorrem nas células tumorais, por exemplo, consiste na redução da expressão das moléculas de MHC. Dessa forma, os antígenos ficam impossibilitados de serem apresentados às células T.

1.4. Sistema Imune e Câncer

As interações entre o sistema imunológico e o câncer são governadas por uma complexa rede de vias biológicas. A manipulação do sistema imune para utilização no tratamento do câncer (imunoterapia) é uma nova área de estudo que visa empregar seus componentes, como anticorpos, células dendríticas ou linfócitos T para reconhecer antígenos tumorais.

Contudo, para que possa ser efetiva, a imunoterapia precisa conseguir promover o aumento de linfócitos antitumorais, que consigam reconhecer o tumor mesmo em um ambiente imunossupressor.

Em 1893, houve a primeira manipulação documentada do sistema imune na tentativa de tratar o câncer. O médico e pesquisador William Coley tratou pacientes com sarcoma e carcinoma utilizando culturas de *Streptococcus pyogenes* (COLEY, 1893). Na época, houve registros de tumores que regrediram ocasionalmente após a ocorrência de infecções agudas. Em seu trabalho, o autor relatou casos de pacientes que apresentaram melhora no quadro clínico após receberem injeções de *S. pyogenes* ou infecções naturais por este microorganismo. Posteriormente, Coley tratou quase 1.000 pacientes com as que agora passaram a ser denominadas “toxinas de Coley”, com taxa de resposta de aproximadamente 10% (WIEMANN; STARNES, 1994; COLEY-NAUTS AND MCLAREN, 1990).

Posteriormente, através do transplante de precursores hematopoiéticos (TPH) em 1956, foi observado que em camundongos irradiados, as células leucêmicas foram eliminadas quando os camundongos receberam transplantes alogênicos, mas não singênicos (BARNES *et. al.*, 1956).

O transplante de células tronco hematopoiéticas do tipo alogênico foi elaborado como uma tentativa de superar a toxicidade observada em pacientes submetidos à quimio ou radioterapia intensiva. Contudo, as reações imunológicas entre as células do doador e receptor podem conferir desfechos benéficos ou não aos pacientes, devido à compatibilidade ou não das moléculas do antígeno leucocitário humano (HLA)- ortólogos do MHC de outras espécies-, que são proteínas expressas na superfície celular das células apresentadoras de antígeno (classe I e II) e demais células nucleadas (classe I) e que apresentam estes aos receptores das células T CD4+ ou CD8+ (KLEIN & SATO, 2000).

Dessa forma, células T presentes no enxerto podem reagir contra os complexos peptídeo-HLA do receptor, levando à chamada doença do enxerto contra o hospedeiro (DECH), causando reações no trato gastrointestinal, na pele e fígado, por exemplo (VOGELSANG & BENSON-KENNEDY, 2003). Com isso, o risco de DECH é maior quando o HLA de doador e receptor são incompatíveis, ou seja, possuem proteínas diferentes devido a polimorfismos genéticos. Essas proteínas polimórficas também são processadas e apresentadas como antígenos (chamados antígenos minoritários de histocompatibilidade – mHAGs). Com isso, linfócitos T presentes no enxerto que ainda não entraram em contato com estes peptídeos (não tolerizados para estes antígenos) reconhecem o complexo peptídeo-HLA diferente e se tornam ativados, exercendo sua função efetora. Uma vez expressos pelos clones leucêmicos, são reconhecidos e resultam no efeito do enxerto contra a leucemia (ECL) (BLEAKLEY; RIDDELL, 2004).

Após os experimentos de Barnes e colaboradores (1956), transplantes em humanos foram realizados e a mesma característica foi observada: recidivas aconteceram menos frequentemente em pacientes que receberam transplante alogênico em relação aos que receberam transplante de um irmão gêmeo por exemplo, reforçando o conceito do ECL, demonstrando que o sistema imune poderia eliminar o tumor.

Outra evidência do efeito ECL na eliminação da leucemia foi observado com a utilização de infusões de linfócitos do doador (DLI) para o tratamento de pacientes que sofreram recidivas de leucemia mielóide crônica (LMC) após o TPH alogênico. A DLI foi capaz de induzir remissão completa em

aproximadamente 70% dos pacientes, com chance de recidiva menor que 20% em 3 anos (KOLB; SCHATTENBERG; GOLDMAN, 1995).

Sendo assim, o denominado efeito ECL foi considerado um precursor da imunoterapia, uma vez que envolve o uso de linfócitos T de reconhecer antígenos leucêmicos e, assim, induzir a eliminação das células leucêmicas do hospedeiro.

1.4.1 Anticorpos monoclonais

A tecnologia do hibridoma foi desenvolvida em 1975, quando dois pesquisadores produziram anticorpos com especificidade conhecida em larga escala (KÖHLER; MILSTEIN, 1975). Dessa forma, pensou-se em utilizar estes anticorpos no tratamento do câncer, uma vez que poderiam reconhecer proteínas específicas que estariam superexpressas no tumor ou com expressão aumentada durante a progressão tumoral. Nos primeiros testes clínicos realizados, apesar da resposta anti-tumoral observada, alguns pacientes também desenvolveram resposta contra os anticorpos infundidos, sendo tal fato atribuído à origem murina destes anticorpos (MILLER et al., 1982). Este processo pôde ser superado com o desenvolvimento dos anticorpos monoclonais quiméricos (estrutura da IgG humana com as regiões variáveis derivadas de camundongo) humanizados (estrutura da IgG humana com as regiões determinantes de complementariedade – CDRs – de camundongo) (**Figura 1.4**).

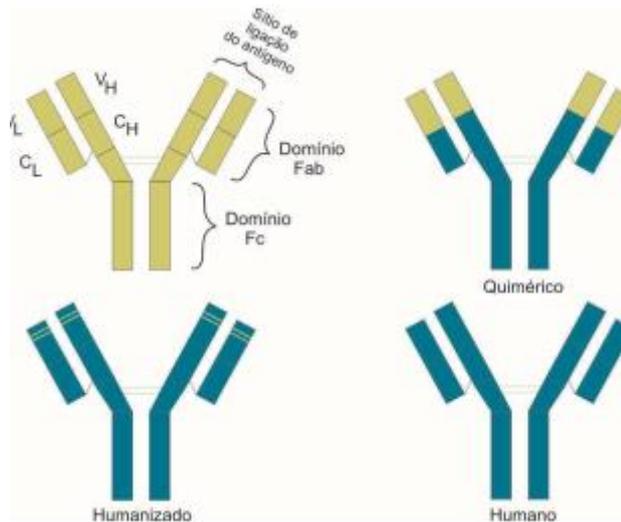


Figura 1.4. Esquema comparando a estrutura dos anticorpos utilizados na clínica (quiméricos e humanizados) com os murinos e humanos.

O isotipo de IgG dita o mecanismo de ação destas moléculas. A indução de citotoxicidade celular dependente de anticorpo (ADCC) e citotoxicidade dependente de complemento (CDC) ocorre por meio de anticorpos com estrutura IgG1, o que pode culminar diretamente na morte das células tumorais. Já o isotipo IgG2 atua através de suas propriedades de ligação ao antígeno. Essas moléculas são capazes de bloquear fisicamente a interação entre o ligante e o receptor ou impedindo a mudança de conformação necessária para a dimerização e sinalização, uma vez que muitos alvos são receptores de fatores de crescimento (WEINER; MURRAY; SHUPTRINE, 2012).

O primeiro anticorpo a ser utilizado na clínica foi o Rituximab, um anticorpo anti-CD20. Esta droga foi desenvolvida para o tratamento de pacientes com linfomas não Hodgkin de células B, onde cerca de 50% dos pacientes apresentaram resposta significativa (MCLAUGHLIN *et al.*, 1998). No entanto, uma vez que CD20 é expresso não só em células tumorais, mas em células normais, o tratamento com Rituximab pode atingir estas últimas, causando toxicidade aos pacientes.

Recentemente, anticorpos foram desenvolvidos para bloquear receptores inibitórios, como PD-1 (Programmed cell death protein 1), CTLA-4 (Cytotoxic T-lymphocyte protein 4) e LAG-3 (Lymphocyte-Activation Gene 3), presentes na membrana dos linfócitos T. Estes receptores inibem a função efetora das células T, culminando na diminuição da ativação, proliferação e produção de citocinas por estas

células (NIRSCHL; DRAKE, 2013) e serão discutidos com maiores detalhes posteriormente.

Alguns ensaios clínicos realizados com anticorpo anti-CTLA4 (Ipilimumab) aumentaram a sobrevida dos pacientes com melanoma metastático, com alguns pacientes apresentando regressão completa de lesões (HODI *et al.*, 2010; ROBERT *et al.*, 2011). Da mesma forma, pacientes com diferentes tipos de tumor, como melanoma, carcinoma renal e câncer de pulmão, aos quais foi administrado anticorpo anti- PD1 (BMS-936558, também conhecido como Nivolumab), apresentaram taxas de resposta 28%, 27% e 18% respectivamente (TOPALIAN *et al.*, 2012). Uma vez que os resultados foram promissores, passou-se então a pensar na possibilidade de combinar as imunoterapias com os regimes de quimioterapia ou radioterapia padrões. Wolchok e colaboradores (2013) mostraram os resultados de um ensaio clínico de fase I com essa proposta de combinação para pacientes com melanoma: 53% responderam ao tratamento, todos com mais de 80% de regressão das lesões, sendo este resultado provavelmente devido a uma maior função das células T em reconhecer os antígenos tumorais e então atacar as células do tumor

1.4.2. Transferência de linfócitos modificados

A transferência adotiva de células T consiste em isolar do paciente clones de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ específicos contra o tumor e modificar os mesmos para reconhecer especificamente determinado tipo de antígeno e reinfundí-los no paciente, com o objetivo de retardar ou eliminar o tumor e impedir recidivas da doença. Apesar da utilização de anticorpos monoclonais já apresentar resultados satisfatórios para alguns pacientes, utilizar linfócitos T modificados também se tornou uma abordagem terapêutica atrativa. Isso porque, fisiologicamente, os linfócitos T reconhecem antígenos através de seu receptor (TCR) e exercem sua função efetora através da eliminação do antígeno alvo. Além disso, os linfócitos T podem se distribuir ativamente nos tecidos e no ambiente do tumor, com potencial de expansão in vivo (HOYOS, SAVOLDO, DOTTI, 2012).

Esta abordagem tem se mostrado uma das mais promissoras no campo da imunoterapia do câncer uma vez que uma grande quantidade de linfócitos antitumorais infiltrantes do tumor pode ser gerada e infundida nos pacientes evitando

importantes mecanismos de imunossupressão tumoral associados à geração deste tipo in vivo.

1.4.3. CARs

Receptores quiméricos de antígenos (Chimeric antigen receptor-CAR) são proteínas de fusão formadas por um domínio extracelular advindo de um anticorpo monoclonal de interesse fusionado a moléculas de sinalização intracelular. Mais especificamente, as cadeias variáveis leve (VL- variable light) e pesada (VH- variable heavy) de determinado anticorpo são clonadas na forma de um fragmento simples de cadeia única, denominados scFv (Single chain fragmente variable), separadas por uma alça e unidas ao domínio intracelular através de uma porção transmembrana. Já a porção intracelular corresponde a moléculas de sinalização do complexo do TCR, bem como a moléculas responsáveis pelo co- estímulo para que o reconhecimento de antígenos pelo complexo TCR aconteça (**Figura 1.4.1**). Uma vez expresso em células T, esta molécula é capaz de promover a atividade citotóxica das células que a contém, reconhecendo o antígeno de forma independente de MHC.

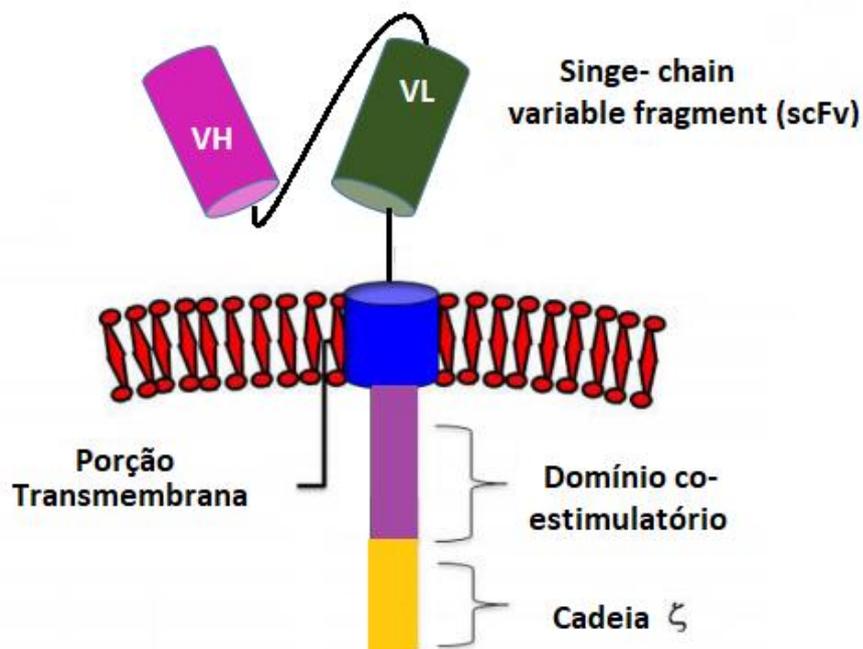


Figura 1.4.1. Esquema de um receptor quimérico de antígeno (CAR). VH: Variable heavy; VL: variable light. (Adaptado de Geldres et. al., 2015).

A especificidade de um CAR é dada pela sua porção extracelular. Já a alça que conecta as cadeias variáveis leve e pesada foi pensada para fornecer flexibilidade ao scFv.

A porção intracelular de um CAR é composta por sua porção transmembrana e moléculas de sinalização. A primeira conecta o CAR à membrana plasmática e, usualmente, esta sequência provém da região transmembrana da molécula CD28 (IMAI *et. al.*, 2004). Contudo, tal característica pode variar a depender do co-estímulo utilizado. Dentre as moléculas co-estimulatórias mais conhecidas e estudadas, pode-se citar o CD28, OX40 (CD134) e 4-1BB (CD137).

Dessa forma, na tentativa de reverter a falta do segundo sinal de ativação, os CARs passaram a conter na sua porção intracelular, além do sinal de ativação da cadeia ζ da molécula CD3-advinda do complexo TCR-CD3-(CARs de primeira geração), a sequência de alguma molécula co-estimulatória, como CD28 ou 4-1BB (CARs de segunda geração) (IMAI *et. al.*, 2004) ou ainda, a sequência de duas moléculas co-estimulatórias, como CD28/4-1BB ou CD28/OX40 (CAR de terceira geração) (PULE *et. al.*, 2005).

A partir do desenho destes receptores quiméricos de antígenos, tornou-se possível manipular as células T do próprio paciente, a fim de modificá-las com a presença de determinado CAR e reinfundí-las no paciente.

Dessa forma, a terapia com CARs é altamente promissora, uma vez que redireciona a especificidade de ligação antígeno- receptor e independe da molécula MHC para que o antígeno seja reconhecido, além de promover remissões em alguns pacientes para os quais as terapias padrão já não apresentavam resposta. Contudo, esta abordagem também apresenta alguns pontos críticos a serem considerados. Um deles consiste na toxicidade relacionada a este tipo de tratamento, uma vez que efeito *off target* pode ocorrer se o antígeno tumoral também estiver presente em células normais. Outro ponto se refere a uma ativação exacerbada das células T CAR⁺ como resultado da expansão rápida destas células, o que pode levar à síndrome de liberação de citocinas, fato este que pode levar o paciente a óbito. Uma forma de

prevenir este fenômeno seria através do mapeamento dos antígenos expressos pelo tumor antes da administração das células CAR⁺, a fim de prever quais pacientes poderiam responder ou não a este tipo de imunoterapia.

Outra forma de contornar estes efeitos é a utilização dos receptores quiméricos de antígenos inibitórios (iCARs). ICARs baseados em PD-1 e CTLA-4 foram desenhados a fim de diminuir a ativação das células T CAR⁺ em situações de síndrome de liberação de citocinas. Foi observado que estes iCARs foram capazes de limitar a secreção de citocinas, bem como a citotoxicidade e proliferação induzidas previamente pela utilização de CARs de ativação (FEDOROV *et. al.*,2013).

1.5. Checkpoints imunológicos

1.5.1 PD-1

O receptor de morte programada 1 (PD-1, CD279- Programmed cell death protein 1) é um receptor inibitório transmembrana tipo I que pertence à superfamília das imunoglobulinas (IgSF) e que pode ser detectado na superfície de células T durante o desenvolvimento tímico e em vários outros tipos de células hematopoiéticas. A expressão dele também ocorre indutivamente após a ativação de células T periféricas CD4⁺ e CD8⁺, bem como em células B, monócitos, células T, natural killer (NK) e algumas células dendríticas (DCs) (KEIR *et. al.*, 2008). A expressão persistente da PD-1 e sua ligação nas células T induz a exaustão destas e, uma vez exaustas- capacidade de proliferação reduzida devido à exposição prolongada aos antígenos- estas células também passam a secretar uma menor quantidade de citocinas citolíticas e pró-inflamatórias, como perforina e interleucina 2 (IL-2), respectivamente. Dessa forma, a atividade citotóxica fica comprometida, diminuindo como um todo a função efetora destas células.

PD-1 possui dois ligantes principais, sendo eles o chamado PD-L1 (B7-H1, CD274) (DONG *et. al.*, 1999) e PD-L2 (B7-DC, CD273) (LATCHMAN *et. al.*, 2001) sendo que PD-L1 parece ser mais proeminente na regulação. Assim como PD-1, PDL-

1 passa a ser expresso após estimulação. A expressão de PD-L1 por células tumorais, por exemplo, pode culminar na diminuição da ação de células T que possuem PD-1 e este se liga ao PD-L1 presente nas células tumorais. Dessa forma, tentar inibir esta interação de PD-1 com seus ligantes se tornou uma importante nova forma de terapia a ser explorada. Com isso, anticorpos monoclonais foram desenvolvidos a fim de se ligarem a PD-1 ou a PD-L1 ou PD-L2 e permitirem a restauração da atividade citotóxica de células T. Contudo, a imunoterapia baseada em células T requer não apenas a expressão de antígenos pelas células cancerígenas por exemplo, mas também que haja um número suficiente de células T efetoras que reconheçam esses antígenos para eliminar o tumor.

Um dos primeiros anticorpos anti PD-1 aprovados para tratamento de câncer pelo FDA (food and drug administration), órgão americano que, dentre outras funções, testa e aprova novos medicamentos, foi o denominado Nivolumab (Opdivo®) para melanoma metastático, câncer de pulmão de não pequenas células (NSCLC), linfoma de Hodgkin e carcinoma de células renais. Outro anticorpo anti- PD-1 aprovado também para melanoma e NSCLC é o chamado pembrolizumab (Keytruda®). Atezolizumab, um anticorpo desenvolvido para se ligar ao ligante de PD-1, logo, um anti-PD-L1 (Tecentriq®) também foi aprovado pelo FDA para câncer de bexiga e NSCLC (GUBIN, et. al., 2014).

1.5.2 CTLA-4

Assim como PD-1, CTLA-4 (Cytotoxic T-lymphocyte protein 4) é um receptor inibitório que passa a ser expresso na membrana das células T após ativação das mesmas, com a função de minimizar uma resposta além da adequada e evitar que danos ocorram aos tecidos normais. CTLA-4 possui dois ligantes conhecidos, sendo eles as proteínas CD80 e CD 86, pertencentes à família B7. Estes ligantes são os mesmos da molécula co-estimulatória CD28. Contudo, a afinidade de CTLA-4 pelos membros da família B7 é muito maior em relação a CD28 por CD80 e CD86. Dessa forma, este fenômeno também favorece a exaustão das células T quando expostas prolongadamente a determinado antígeno, uma vez que após a ativação dos linfócitos

T, a expressão de CTLA-4 começa a aumentar e, dessa forma, por compartilhar o mesmo ligante de CD28, o sinal inibitório passa a ser maior que o de ativação.

Com isso, o desenvolvimento de anticorpos anti- CTLA-4 também se tornou uma alternativa promissora para evitar os sinais inibitórios e favorecer a ativação das células T. Assim, anticorpos como Ipilimumab e Tremelimumab foram desenvolvidos.

Um estudo randomizado de fase III com pacientes de melanoma metastático, no qual Ipilimumab foi administrado, culminou no aumento de 3,7 meses na sobrevida global dos mesmos ($P=0,003$) (HODI *et. al.*, 2010). Um segundo estudo randomizado mais recente, de Fase III, revelou um aumento de 11,2 meses na sobrevida global dos pacientes que foram tratados com uma combinação de Ipilimumab e quimioterapia padrão (Dacarbazina), em relação 9,1 meses dos pacientes que receberam apenas dacarbazina (ROBERT *et. al.*, 2011).

Dessa forma, resumidamente, pode-se inferir que a manipulação destes sinais inibitórios constitui-se numa poderosa ferramenta para diminuir tais sinais permitindo que os sinais de ativação (TCR: MHC e sinais co-estimulatórios) possam atuar mais robustamente em detrimento dos inibitórios, permitindo uma melhor taxa de resposta pelos pacientes à imunoterapia. A ligação entre anticorpos tanto anti-PD-1 ou anti-CTLA-4 às suas respectivas moléculas alvo (PD-1 e CTLA-4) pode ser observada esquematicamente através da **figura 1.5**. Além destes primeiros receptores inibitórios, outros como TIM-3 e LAG-3 foram mais recentemente descritos.

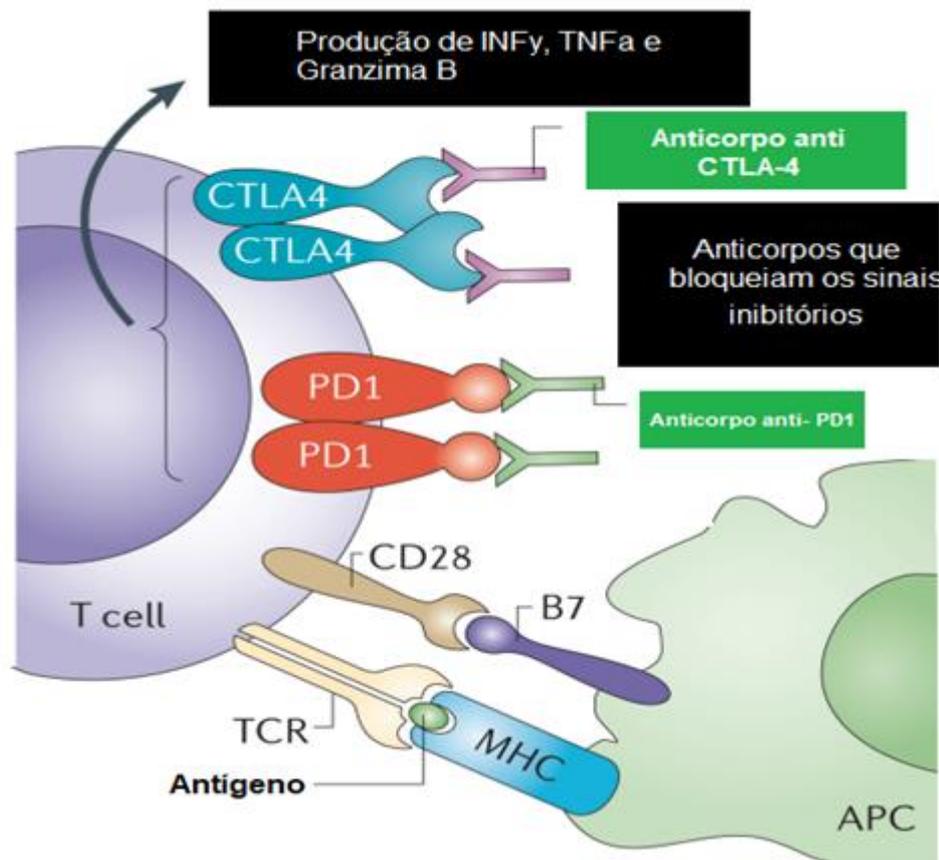


Figura 1.5. Forma de ação dos anticorpos anti-PD-1 e anti-CTLA-4. Ao se ligarem às suas moléculas alvo, os anticorpos anti PD-1 e anti CTLA-4 não permitem que aqueles receptores inibitórios se liguem à PD-L1 e B7, permitindo então que somente os sinais estimulatórios (TCR:MHC e CD28:B7) ocorram, restaurando a atividade das células T. (Adaptado de Sharma et. al., 2012).

1.6. LAG-3

1.6.1. Estrutura

LAG-3 foi descrito em 1990 como uma proteína de membrana identificada em linhagens de células Natural Killer e linfócitos T ativados (Triebel etl al., 1990). Esta molécula possui, assim como o CD4, 4 domínios extracelulares formados por proteínas da superfamília das imunoglobulinas (IgSF-like) (**Figura 1.6**). O gene desta molécula encontra-se no cromossomo 12 em humanos, adjacente à sequência gênica da molécula CD4. Além da proximidade espacial, 20% da sequência de aminoácidos entre LAG-3 e CD4 são compartilhadas e ambos os genes possuem similaridade também na organização entre íntros e éxons (8 éxons em cada gene). Desta forma, assim como CD4, LAG-3 é capaz de se ligar a moléculas MHC de classe II, com uma

afinidade 100 vezes maior quando comparado com CD4 (HUARD *et. al.*, 1995). Contudo, diferentemente de CD4, LAG-3 se liga ao MHC II através de um loop extra de 30 aminoácidos ausente na molécula CD4-, que se encontra adjacente ao primeiro domínio (D1).

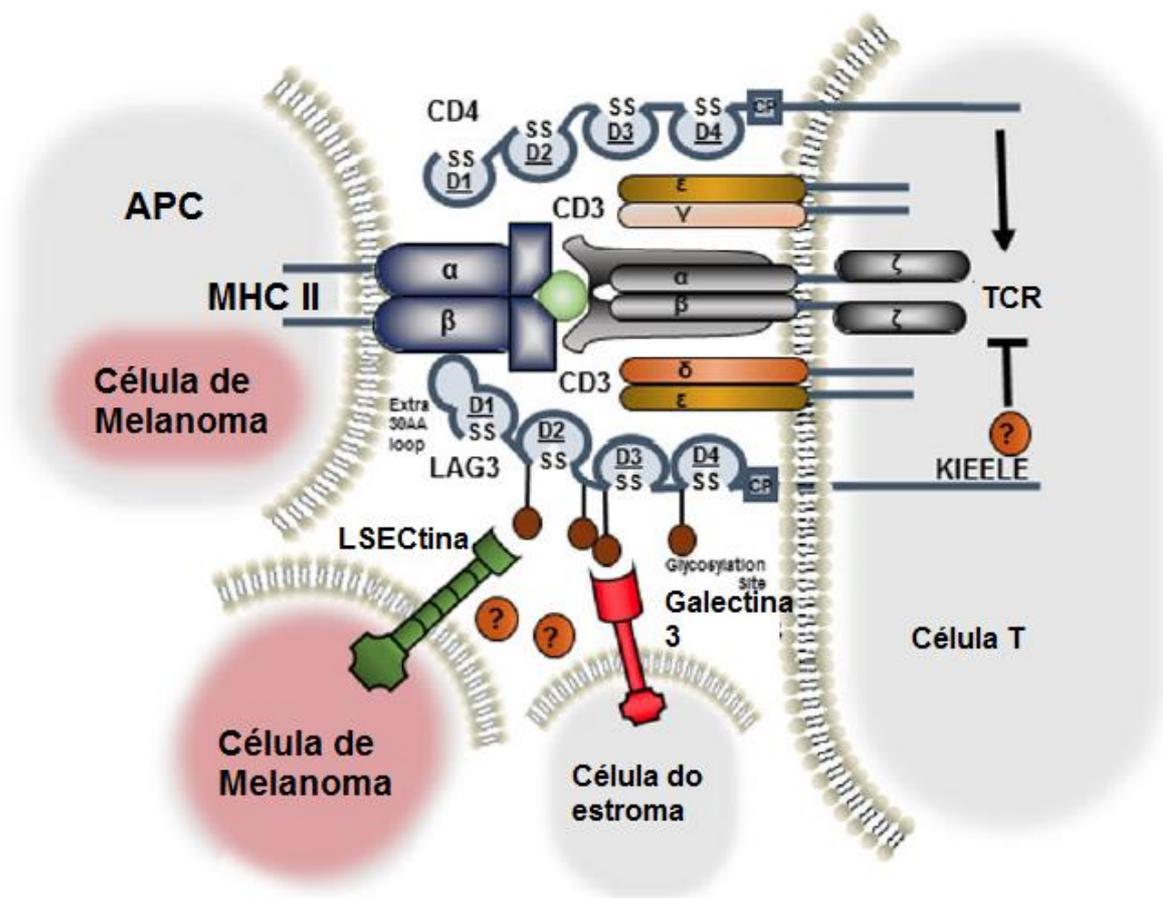


Figura 1.6. Representação esquemática da estrutura do receptor inibitório LAG-3. A interação de uma célula tumoral e a célula T se faz através do reconhecimento pelo receptor de célula T (TCR) do antígeno apresentado pela molécula de MHC II, na qual LAG-3, que possui 4 domínios, aqui representados D1 a D4, se liga através de seu loop extra. Fonte: Andrews *et. al.*, 2017.

Em relação a porção citoplasmática, LAG-3 possui 3 motivos conhecidos (Figura 1.6.1): um consiste numa sequência de repetição de ácido glutâmico e prolina, denominado domínio “EP”; o segundo, denominado KIEELLE, é caracterizado por possuir um resíduo de lisina, sendo ambos os motivos altamente conservados entre

humanos e murinos, com 70% de similaridade na sequência de aminoácidos destes grupos. O terceiro motivo é caracterizado por possuir resíduos de serina e, como um todo, a cauda intracelular de LAG-3 não possui motivos inibitórios baseado em tirosina (ITIM), os quais estão presentes em outros receptores inibitórios como o PD-1. Desta forma, pode-se pensar que os mecanismos utilizados por LAG-3 em sua sinalização são distintos dos utilizados pelos demais receptores inibitórios. Além disso, a importância da sinalização realizada pela cauda citoplasmática de LAG-3 parece ser crucial para a transmissão dos sinais inibitórios, uma vez que Workman e colaboradores (2002) demonstraram que células mutantes que não possuíam a porção intracelular desta molécula não foram capazes de competir com CD4 pela ligação ao MHC II bem, como não exerceram sua função inibitória, o que indica que estudos adicionais de caracterização da transdução de sinal e interações moleculares da porção intracelular de LAG-3 são necessários para melhor compreensão de seu funcionamento.

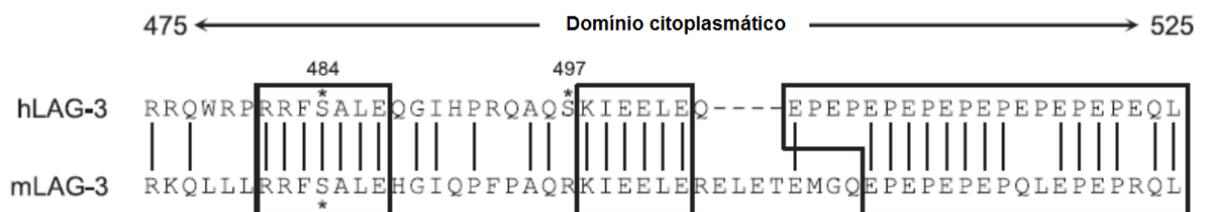


Figura 1.6.1. Estrutura da porção intracelular do receptor inibitório LAG-3. LAG-3 possui 3 motivos em sua cauda intracelular: um sítio com resíduo de lisina, um altamente conservado entre humanos e murinos (KIEELE) e uma sequência de repetições de prolina e ácido glutâmico (EP). Fonte: Bae et. Al., 2014.

1.6.2. Sinalização e expressão

Muito se tem especulado sobre as demais possíveis moléculas com as quais LAG-3 pode se ligar no seu domínio extracelular, bem como quais outras pode recrutar através de seu domínio citoplasmático, uma vez que, a princípio, LAG-3 não parece influenciar negativamente o reconhecimento de antígenos pelos linfócitos T em células alvo que possuem baixa expressão de MHC II.

A galectina-3 é uma lectina capaz de mediar a supressão de linfócitos T CD8⁺ *in vitro* e, como esta lectina é expressa em muitas células no microambiente tumoral e LAG-3 é muito glicosilado, a galectina-3 tornou-se um possível ligante alternativo de LAG-3 (DUMIC *et. al.*, 2006). Além desta lectina, uma outra, denominada lectina de célula endotelial sinusoidal (LSEctin) foi identificada em tecidos de melanoma humano, sendo associada com a inibição da resposta antitumoral pelas células T neste tecido, uma vez que associada a LAG-3, favoreceu a diminuição de produção de INF γ por células T efectoras (XU *et. al.*, 2014).

Apesar de Xu e colaboradores (2014) terem observado que LAG-3 é importante para inibir a proliferação e atividade de células T, alguns estudos anteriores mostraram que esta molécula apresenta menor expressão na membrana celular quando em condições sem estímulo, sendo degradada no compartimento lisossomal. Para averiguar esta questão, Bae e colaboradores (2014) elaboraram 2 construções baseadas na cauda citoplasmática de LAG-3: uma sem o motivo EP e outra sem toda a cauda citoplasmática de LAG-3. Ambas as construções foram transfectadas na linhagem celular Jurkat, de células T CD4⁺, que foram também tratadas com 1 μ g/mL de Ionomicina e 10 ng/mL de PMA, a fim de simular a ativação destas células. A expressão na membrana celular de LAG-3 WT e LAG-3 sem toda a porção citoplasmática foi similar na presença e na ausência de estímulo; contudo, LAG-3 sem o motivo EP aumentou na condição com estímulo quando comparada a sem estímulo, indicando que este motivo poderia ser essencial para a translocação de LAG-3 do compartimento lisossomal para a membrana celular.

O mesmo grupo observou também que a translocação para a membrana celular, bem como o consequente aumento na expressão de LAG-3 pode ser favorecido pela via de sinalização da proteína C quinase (PKC). Esta pode induzir mudança estrutural em moléculas que se ligam a LAG-3, que consequentemente terá sua estrutura modificada a fim de se translocar para a superfície celular.

Em 2001, Iouzalet e colaboradores encontraram uma proteína, denominada LAP associada ao domínio EP da cauda citoplasmática de LAG-3 através da técnica de captura por dois híbridos, sendo até o momento a única proteína encontrada associada a um dos motivos intracelulares deste receptor inibitório (IOUZALEN,

2001). Entretanto, posteriormente, foi verificado que mutantes de LAG-3 que não continham o domínio EP mantiveram sua função inibitória, o que sugeriu que a associação da proteína LAP a este domínio parece não ser crucial para a sinalização inibitória das funções imunológicas por parte de LAG-3 (IOUZALEN, 2001). Sendo assim, tornou-se necessário procurar novas técnicas que possibilitassem determinar possíveis novas interações entre proteínas e, neste caso, para encontrar novas moléculas com as quais LAG-3 poderia se ligar na sua porção extracelular, bem como encontrar moléculas que possam ser recrutadas pelos seus diferentes motivos intracelulares, a fim de se entender melhor a via de sinalização utilizada por este checkpoint imunológico para exercer sua função inibitória sobre as células T.

1.6.3. LAG-3 e imunoterapia

Apesar dos resultados positivos em relação ao tratamento de pacientes com tipos diferentes de câncer com anticorpos que tinham como alvo PD-1 e CTLA-4, como Pembrolizumab, Nivolumab e Ipilimumab, a maioria dos pacientes não respondem a este tipo de terapia (TOPALIAN *et. al.*, 2012). Um estudo com pacientes com carcinoma de células renais (RCC) e melanoma avançado, aos quais foi administrado Nivolumab, mostrou que apenas 28% dos pacientes com melanoma e 21% daqueles com RCC apresentaram respostas objetivas (HODI *et. al.*, 2010).

Alguns tipos de tumor como NSCLC, cujo tratamento não apresentava taxas de remissão muito altas com as terapias padrão, passaram a ser mais responsivos com terapia anti PD-1. Contudo, outros tumores como de pâncreas e próstata, não são tão responsivos a esta terapia. Sendo assim, a identificação de receptores inibitórios adicionais juntamente com uma melhor compreensão dos seus mecanismos de atuação é essencial para aumentar o leque de possibilidades de novas imunoterapias utilizadas isoladamente ou em combinação com terapias padrão. Dessa forma, a atenção se voltou para outros receptores inibitórios, incluindo LAG-3 (BRAHMER *et. al.*, 2012).

LAG-3 foi encontrado com expressão alta em células Tregs de sangue periférico e de células do tumor de pacientes com melanoma avançado e de câncer colorretal. Além disso, também foi observado uma correlação entre a expressão de LAG-3 em Tregs com a produção de citocinas como IL-10 e TGF- β em comparação a células que não tinham ou possuíam baixa expressão de LAG-3 (CAMISASCHI *et. al.*, 2010), revelando a potencial importância translacional deste receptor.

Em amostras de tumores de pacientes que apresentavam co-expressão de LAG-3 e PD-1, observou-se um estado de disfunção das células T, cujo fenótipo exausto foi identificado através de reduzida capacidade de produção de IFN γ e TNF α . Com o bloqueio duplo *in vitro* de ambos os IRs, houve aumento na taxa de proliferação e produção de citocinas (IFN γ) das células T CD8⁺ que estavam infiltradas no tumor (BAITSCH *et. al.*, 2011).

Em 2013, ensaios clínicos de fase I foram iniciados com um anticorpo anti-LAG3 (BMS-986016) tornando-se o terceiro IR a ser utilizado como alvo na clínica com um anticorpo antagonista. Atualmente, existem quatro agentes imunoterápicos que possuem LAG-3 como alvo que passaram a ser utilizados na imunoterapia do câncer, e vários estudos pré-clínicos em desenvolvimento.

Os ensaios clínicos iniciais envolvendo LAG-3 foram realizados com o agente IMP321(Prima BioMed / Immutep), que, na verdade, atua como um ativador das APCs. Três diferentes anticorpos monoclonais (mAbs), relacionados ao tratamento de câncer e específicos para LAG3 foram desenvolvidos, sendo eles: BMS-986016 (Bristol-Myers Squibb, IgG4 totalmente humana), LAG525 (Novartis, IgG4 humanizada) e MK-4280 (Merck). O **quadro 1** resume alguns estudos clínicos que já foram realizados ou estão em curso ou recrutando pacientes, nos quais LAG-3 foi alvo terapêutico.

Quadro 1. Co- inibidores anti-LAG-3 e co- estimuladores utilizados em alguns ensaios clínicos.

| Intervenção | Indicação | Fase | Identificação do ensaio clínico |
|--------------------------------------------------|---------------------------|-------|---------------------------------|
| BMS-986016 ± nivolumab | Glioblastoma recorrente | I | NCT02658981 |
| BMS-986016 ± nivolumab | Tumores sólidos avançados | I/IIa | NCT01968109 |
| BMS-986016 ± nivolumab vs nivolumab + ipilimumab | Câncer gástrico avançado | II | NCT02935634 |
| BMS-986016 + nivolumab vs 3 outros braços | NSCLC avançado | II | NCT02750514 |
| BMS-986016 ± nivolumab | CLL, HL, NHL, MM | I/II | NCT02061761 |
| LAG525 ± PDR001 | Tumores sólidos avançados | I/II | NCT02460224 |

NSCLC= câncer de pulmão de não pequenas células. **CLL**= leucemia linfocítica crônica. **HL**=linfoma de Hodgkin. **NHL**= linfoma não Hodgkin. **MM**= mieloma múltiplo.

O escalonamento da dose de IMP321 foi realizado em pacientes com CCR metastático avançado em um estudo clínico de fase I (NCT00351949). As doses foram administradas subcutaneamente, com concentração entre 0,05 a 30 mg para 21 pacientes. O tratamento demonstrou-se seguro, bem tolerado e induziu aumento significativo de células T efectoras de memória que expressam o co-ativador CD28 (BRIGNONE. et. al, 2009).

Em relação aos anticorpos monoclonais, BMS-986016 foi o primeiro mAb anti-LAG3 a ser desenvolvido e, atualmente, encontra-se sendo avaliado em estudos de fase I e fase II, tanto para tumores hematológicos quanto sólidos. Um ensaio clínico iniciado em 2013 pretende avaliar a eficácia do bloqueio de LAG-3 sozinho ou em combinação com Nivolumab para diversos tipos de câncer: cervical, ovário, bexiga, colorretal, HNSCC positivo para HPV, gástrico, hepatocelular, CCR (NCT01968109), com o objetivo inicial de matricular ao menos 360 pacientes até o fim do ano 2018. Um segundo ensaio de fase I/IIa pretende avaliar a tolerância ao bloqueio de LAG-3, também com BMS-986016, com ou sem Nivolumab em neoplasias hematológicas, incluindo linfoma não-Hodgkin linfoma de Hodgkin e mieloma múltiplo (NCT02061761).

Sendo assim, LAG-3 torna-se um novo importante alvo terapêutico a ser utilizado em diversos tipos tumorais. Contudo, além da possibilidade de bloquear a ação da molécula de forma direta através do bloqueio com mAbs, entender como ocorre a sinalização citoplasmática destas moléculas também pode resultar em importantes novas estratégias de intervenção. Sendo assim, identificar quais moléculas são recrutadas para que ocorra ativação destes receptores inibitórios também é um importante caminho a ser explorado para se entender a sinalização como um todo e descobrir potenciais novos alvos terapêuticos. Contudo, para isso, é necessário o desenvolvimento de técnicas que permitam a descoberta em larga escala das associações proteína- proteína, a fim de se entender o mecanismo de ação como um todo de determinada rede de sinalização.

Além da técnica de captura por dois híbridos, que permitiu a descoberta da interação da proteína LAP, recentemente uma nova técnica denominada BiID foi elaborada por Roux e colaboradores (2012), a fim de identificar interações proteína-

proteína. Tal técnica é baseada em captura por afinidade, além de ser baseada em proximidade.

1.7. BioID

A busca pelas interações que ocorrem entre proteínas é essencial para que os processos fisiológicos sejam melhor compreendidos e, assim, novos alvos terapêuticos sejam encontrados. Contudo, métodos como captura por dois híbridos, além de não fornecerem vários possíveis novos parceiros em um único ensaio, também não permitem obter proteínas que se associem transientemente àquela de interesse, fazendo com que dados que poderiam ser importantes para o entendimento daquela rede de sinalização possam ser perdidos.

A técnica BioID consiste na adição de biotina a uma concentração final de 50 μM diretamente ao meio de cultura das células de interesse, o que permite que as proteínas sejam biotiniladas e que estas sejam capturadas posteriormente com base em afinidade; neste caso, beads conjugadas a streptavidina são utilizadas, uma vez que a constante de dissociação entre biotina-streptavidina é a menor conhecida até o momento ($K_d = 10^{-14}$). Uma vez isoladas, as proteínas são concentradas e passam pelo processo de preparação para identificação e quantificação por espectrometria de massas, gerando então dados relacionados às proteínas que interagem com a proteína de interesse (**Figura 1.7**).

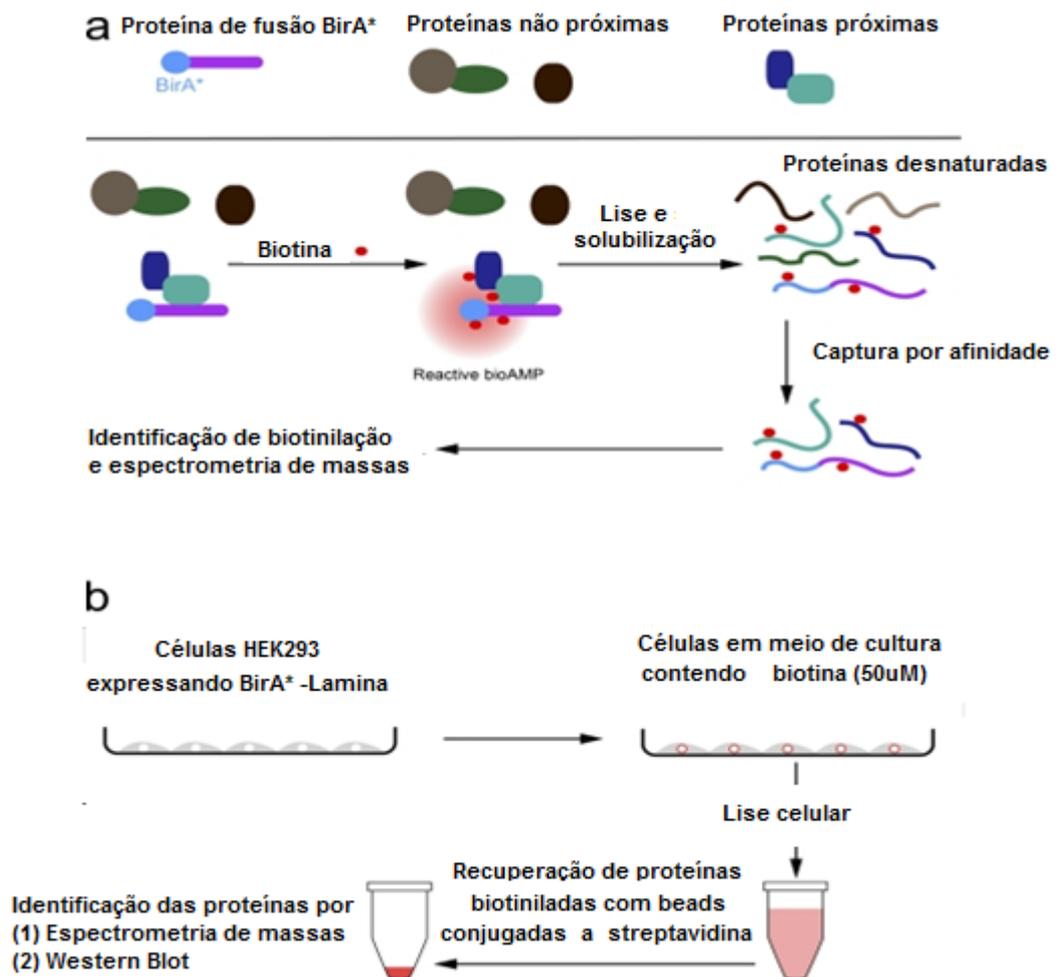


Figura 1.7. Técnica BioID. **a)** A adição de biotina no meio de cultura irá promover maior biotilação pela enzima BirA*. Após solubilização e captura por afinidade, as proteínas são identificadas e quantificadas por espectrometria de massas. **b)** Ilustração do método BioID com células HEK293 a fim de identificar proteínas parceiras da proteína Lamina A. (ROUX et.al., 2012).

Dessa forma, em 2012, Roux e colaboradores desenvolveram a técnica BioID-*proximity-dependent biotin identification*. Tal técnica é baseada na biotilação celular dependente de proximidade por uma biotina ligase bacteriana (BirA). BirA é uma biotina ligase, purificada a partir de *Escherichia coli*, que possui 35 kDa capaz de regular a biotilação de uma subunidade de acetil-CoA carboxilase (CHAPMAN-SMITH e CRONAN, 1999).

O processo de biotilação por BirA acontece em duas etapas: primeiramente, a combinação de biotina e ATP formam biotinoil-5'-AMP (bioAMP). Esta biotina

ativada é mantida no sítio ativo de BirA até que reaja com um resíduo de lisina específico da sequência BAT no segundo passo. Dessa forma, BirA possui uma forte seletividade por seu substrato endógeno. O que o grupo que desenvolveu a técnica desejava era que esta enzima fosse capaz de biotinar seus alvos de forma mais promíscua. Desta forma, desenvolveram algumas biotinas ligases mutantes que liberam prematuramente a molécula BioAMP, que é instável e altamente reativa. (KWON E BECKETT, 2000). Esta ligase mutante (BirA*) tem menor capacidade de ligação ao DNA (KWON et. al., 2000) e menor afinidade pelo bioAMP, cerca de duas ordens de magnitude menor em relação à enzima wild type (WT) (KWON E BECKETT, 2000). Na bactéria *Escherichia coli*, a expressão da BirA* resultou em uma biotinilação promíscua, uma vez que o bioAMP livre reage prontamente com aminas primárias. Posteriormente, outro grupo demonstrou que BirA* realiza a biotinilação de forma dependente de proximidade (CHOI-RHEE et al., 2004; CRONAN, 2005), e que as proteínas candidatas encontradas podem representar interações diretas, indiretas e proteínas vicinais.

Posteriormente, na tentativa de otimizar a biotinilação e reduzir problemas relacionados ao tamanho da sequência da enzima por si só, que poderia ocasionalmente impedir o direcionamento eficiente de certas proteínas de fusão, o grupo liderado novamente por Roux (2016) procurou pela menor biotina ligase conhecida, encontrando-a em uma bactéria termofílica denominada *Aquifex aeolicus*. A biotina ligase destas bactérias não contém o domínio de ligação ao DNA, sendo naturalmente menor (233 aminoácidos) que a primeira encontrada em *Escherichia coli*. Uma mutação no domínio catalítico de biotinilação (R40G) desta enzima foi realizada, para que fosse capaz de biotinar promiscuamente todas as proteínas que estejam próximas em até 20nm de determinada proteína de interesse (CHOI-RHEE et al., 2004; CRONAN, 2005).

1.8. Imunoprecipitação

Imunoprecipitação consiste em um dos tipos de técnicas que permitem identificar interações entre proteínas. Um anticorpo específico é adicionado a um lisado de células, permitindo assim a formação do complexo antígeno- anticorpo

após determinado tempo de incubação (TAYLOR RT, BEST SM. 2011). Finalizado este período, esferas de sefarose revestidas com proteína A, G ou L são adicionadas ao lisado e, após novo período de incubação, o complexo antígeno- anticorpo e beads é formado, uma vez que as proteínas A/G/L podem se ligar à região conservada do anticorpo (YOU B et. al., 2013). (**Figura 1.8**)

Posteriormente, após sucessivas etapas de lavagem, as esferas conjugadas aos anticorpos e estes, aos antígenos de interesse, são eluídos e desnaturados a 95C com a adição de SDS-PAGE Buffer (dodecilsulfato de sódio para gel de eletroforese em gel de poliacrilamida) (Lee C, 2007). Após esta etapa, os peptídeos da proteína de interesse podem ser visualizados diretamente no gel, através de coloração direta do mesmo por azul de comassie e através do convencional westen blot, utilizando- se 5% da amostra total. Desta forma, tais peptídeos presentes no gel podem ser digeridos e identificados por espectrometria de massas ou seguindo protocolo padrão ou otimizado para tal.

Esta técnica, apesar de amplamente utilizada, pode apresentar algumas limitações: o quão significativo pode ser a formação dos complexos anticorpo-antígeno e anticorpo-esferas é dependente de alguns fatores, como por exemplo, a concentração final de anticorpo e antígeno presentes no lisado celular.

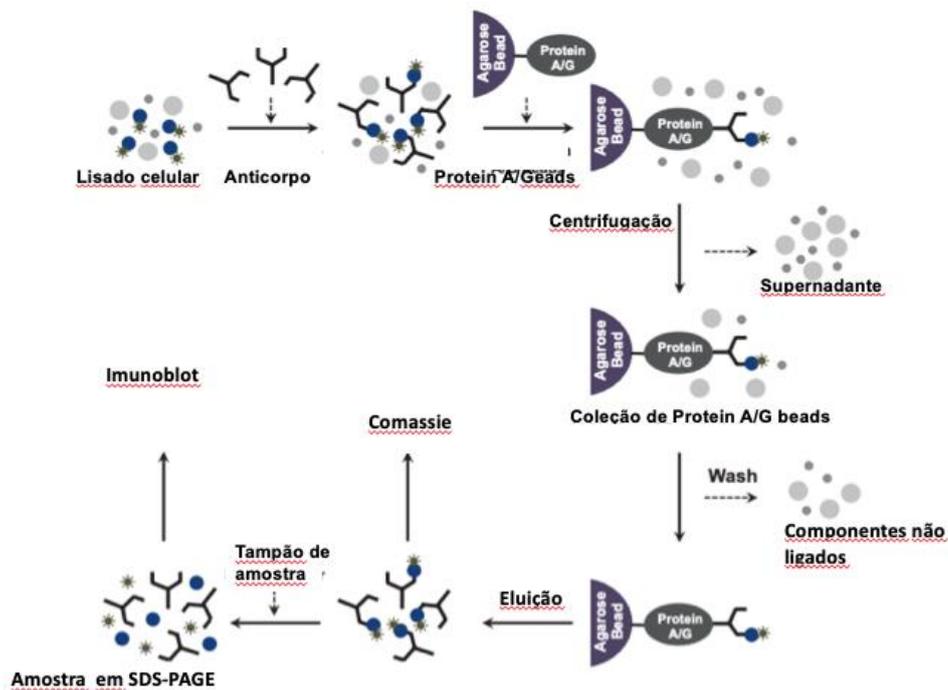


Figura 1.8. Diagrama esquemático do princípio do co-IP. Amostra de proteína contendo antígeno (geralmente um lisado celular), anticorpo específico e contas de afinidade (geralmente proteína A / G, que podem se ligar especificamente à região conservada do anticorpo) são adicionadas sequencialmente para a reação de ligação. As contas de afinidade com proteínas ligadas são coletadas por centrifugação. O sobrenadante contendo proteínas não ligadas é descartado e posteriormente lavado durante a etapas de lavagem. O anticorpo e o antígeno são eluídos com um tampão que dissocia proteínas das esferas de afinidade. Os complexos proteicos purificados podem ser utilizados ainda para imunotransferência ou outras análises bioquímicas. Fonte: LIN and LAI, 2017.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo primário

Realizar um *screening* de proteínas que interagem com o a proteína de *checkpoint* imunológico LAG-3.

2.2. Objetivos secundários

- Construir vetores para a expressão do CARs contendo o domínio intracelular de LAG-3 WT, LAG-3 Kmut (mutação lisina (K) para alanina (A) no motivo KIEELE), Lag3 EPdel (domínio EP deletado) e duplo mutado (Kmut e EPdel), todos fusionados ao domínio BirA.
- Induzir expressão destes CARs na linhagem HEK293FT.
- Induzir a expressão dos CARs em linhagem de linfócito T CD4+ (MOLT4).
- Identificar quais proteínas interagem com LAG-3 através da técnica de *screening* por BiID e Imunoprecipitação
- Realizar análise *in silico* para obter as possíveis vias de sinalização envolvidas *downstream* à sinalização de LAG-3.
- Realizar ensaios funcionais para identificar a relevância das proteínas encontradas.

3. METODOLOGIA

3.1. Plasmídeos

Este projeto tem autorização da comissão interna de biossegurança (CIBio) por manipular organismos geneticamente modificados (OGM) de classe I, sob número de protocolo 007/2012 (**Anexo A**).

Para simular a ativação de LAG-3, o receptor quimérico de antígeno (CAR) foi sintetizado com a porção extracelular scFv anti-CD20 pela empresa Genscript (Piscataway, Nova Jersey, EUA). Na parte intracelular, a sequência do LAG-3 Wild Type também foi sintetizada. Paralelamente, as demais sequências da porção intracelular de LAG-3, sem o domínio extracelular anti-CD20 foram sintetizadas: EPdel (deleção do motivo EP), Kmut (mutação de uma lisina-K- para uma alanina- A) e duplo mutante (Kmut e EPdel). O objetivo foi diminuir o custo de síntese e clonar posteriormente somente as sequências dos mutantes de LAG-3 ao vetor.

Em todas as sequências sintetizadas, foram adicionados os sítios de restrição das enzimas Age I e BamHI, uma vez que estas são enzimas disponíveis no laboratório e que estão presentes no plasmídeo pcDNA 3.1. Este plasmídeo foi adquirido comercialmente na empresa AddGene e contém a sequência da enzima BirA*2, já fusionada à sequência da proteína HA, utilizada como tag para permitir a detecção da presença do CAR por citometria de fluxo.

3.2. Multiplicação do DNA plasmidial

Após as clonagens das diferentes condições da cauda intracelular de LAG-3 no plasmídeo pcDNA 3.1, os plasmídeos foram transformados em bactéria competente (DH5 α). Após incubação em estufa a 37°C, selecionou-se algumas colônias isoladas para inóculo em meio LB (Luria Bertani). Em seguida, realizou a retirada do DNA plasmidial das bactérias, através de um processo denominado mini prep, com o kit Wizard Plus SV Minipreps (#A1460) seguindo as instruções do fabricante.

3.3. Linhagens celulares

A linhagem HEK 293T é uma linhagem de células aderentes, que consiste em fibroblastos de rim embrionário humano e foi mantida em cultura em meio DMEM (Gibco® #11330-032) completo: (10% soro fetal bovino, 1% L-glutamina, 1% penicilina/estreptomicina), a 37°C e 5% de CO₂ dentro de estufa. É conhecida por apresentar boas taxas de expressão de diferentes vetores devido à sua facilidade de transfecção. Além disso, o ensaio de BioID foi padronizado utilizando esta linhagem celular, de forma que, também por esta razão, este tipo celular foi escolhido para testar ao menos uma das técnicas aqui mencionadas.

Já a linhagem celular de células T CD4⁺/MOLT4 foi mantida em meio RPMI (Sigma), completo (10% soro fetal bovino, 1% L-glutamina, 1% penicilina/estreptomicina), também a 37°C e 5% de CO₂ dentro de estufa.

3.4. Eletroporação e Transfecção dos plasmídeos

3.4.1. Eletroporação com Nucleofactor II

1x10⁶ das células HEK 293FT foram eletroporadas no aparelho Nucleofactor II (Lonza), utilizando o tampão 1SM (CHICAYBAM et. al., 2013), e o programa Q-001, com os plasmídeos codificando os CARs 20LAG-3 WT BirA*2, 20EPdel BirA*2, 20Kmut BirA*2 e 20Dmut BirA*2. A droga G418 foi adicionada a concentração final de 900ug/mL posteriormente, a fim de selecionar clones expressando estavelmente o inserto, uma vez que o plasmídeo pcDNA 3.1 confere resistência a este antibiótico. A linhagem de células T CD4⁺ (MOLT4) foi eletroporada e também mostrou expressão dos CARs, que pôde ser analisada por citometria de fluxo.

3.4.2. Eletroporação com NEPA21

O eletroporador NEPA21 (NEPAGENE) foi utilizado para eletroporar as células MOLT4 durante o período de doutorado sanduíche na Itália com as construções mutantes EPdel, Kmut ou DMut.

Dessa forma, 1×10^6 células MOLT4 por condição foram lavadas com PBS. O pellet foi ressuspendido em 98 μ L do buffer Opt- MEM (Invitrogen Sku# 31985-062) e, a esta solução, 10 μ g de DNA foram adicionados. Todo este conteúdo foi então colocado no interior das cubetas de eletroporação (CU6000 Cuvette Stand Holder), e estas encaixadas na câmara de eletroporação (CU500 Cuvette chamber). Posteriormente, foi aplicada a condição de 175 volts, 5ms (length) e intervalo de 50milisegundos, por 2 vezes, uma vez que esta foi identificada como a melhor para este tipo celular., após realização de eletroporações com a finalidade de setar as melhores condições de voltagem para esta linhagem celular.

3.4.3. Transfecção com Fosfato de Cálcio

Para a transfecção de células HEK293T, as mesmas foram plaqueadas no dia anterior a transfecção em placas de cultura de células de 10cm, de forma a apresentarem entre 30 a 50% de confluência. No dia seguinte, o meio de cultura foi trocado 1 hora antes da transfecção. Em prosseguimento ao protocolo, por condição, foi necessária a utilização de 2 dois tubos de fundo cônico do tipo Falcon: 1 contendo 500 μ L de HBS 2x e outro no qual foi adicionado 439 μ L de dH₂O, 10 μ g de DNA e 61 μ L de CaCl₂ 2M. O borbulhamento foi realizado no tubo contendo HBS 2x, enquanto que todo o conteúdo do segundo tubo foi despejado gota a gota no primeiro tubo, a fim de permitir a formação do precipitado Ca₃(PO₄)₂ e DNA, auxiliando assim a entrada do DNA na célula alvo. A mistura foi deixada sob incubação a temperatura ambiente por 5 minutos, e depois adicionada em toda a superfície de cada placa contendo as células.

3.5. BioID

A técnica BioID foi realizada como projeto piloto em células HEK 293T e em larga escala na linhagem MOLT4.

Um total de 1×10^6 de células HEK293T foram lisadas com SDS- PAGE Buffer, sonicadas (Ultrasonic processor, modelo GEX 130PB) a fim de fragmentar qualquer ácido nucléico presente na amostra e então estocadas a -80° para posterior análise por *Western Blot*. A proporção de buffer: células foi de 200 μ L para 1×10^6 células, seguindo as instruções do protocolo descritos por Roux e colaboradores (ROUX *et. al.*, 2013). O western blot utilizando Streptavidin-HRP para identificar o padrão de biotilação foi realizado, comparando as condições controle sem DNA (com e sem adição de biotina 50 μ M ao meio de cultura), e com DNA (novamente, sem e com adição de biotina), após 24h da eletroporação das células. Vale ressaltar que a adição de biotina foi feita logo após a eletroporação dos plasmídeos nas células, seguindo as instruções do protocolo da técnica BioID (ROUX *et. al.*, 2013).

Seguindo as 24h de cultura celular com biotina adicionada ao meio de cultura, nas condições cabíveis, as células foram lisadas com buffer SDS-PAGE, sonicadas a fim de fragmentar qualquer ácido nucléico presente na amostra, e então estocadas a -80°C para posterior análise por *Western Blot*. A proporção de buffer: células foi de 200 μ L para 1×10^6 células, seguindo as instruções do protocolo descritos por Roux e colaboradores (ROUX *et. al.*, 2013).

Já para o mesmo ensaio de BioID realizado em MOLT4, em larga escala, 80×10^6 células por condição foram lisadas com 540 μ L de Lysis buffer (50 mM Tris·Cl, pH 7.4 , 500 mM NaCl, 0.2% SDS w/v). Foram adicionados 200 μ L de Triton X-100 a concentração final de 1%- de acordo com o volume de células e lysis buffer- à amostra. Posteriormente, as amostras foram sonicadas a 4C, usando o aparelho Bioruptor plus, com 30 ciclos com duração de 15 segundos cada.

No momento seguinte, os lisados foram centrifugados a 4°C , 16 g por 12 minutos; o sobrenadante foi transferido para novos tubos eppendorfs e a quantificação de proteínas por Bradford foi realizada. Ao final, 9.500ug de proteínas foram utilizadas para serem incubadas com as esferas conjugadas a streptavidina

(MyOne Streptavidin C1). Ao todo, 15 μ L de cada amostra foram separadas como INPUT, a fim de avaliar a presença do plasmídeo por western blot. Aos 100 μ L esferas que seriam posteriormente utilizados para cada amostra, 1 mL de lysis buffer foi utilizado, em novos tubos Eppendorf, para realizar a lavagem das mesmas, através de centrifugação por 2 min a 1000g. O sobrenadante foi descartado e as amostras foram adicionadas aos tubos Eppendorfs com as esferas. Nesta condição, as amostras permaneceram sob período de incubação de 12 horas.

Após incubação overnight, as esferas foram centrifugadas por 5 min a 10g, a fim de se coletar as esferas e, após descarte do sobrenadante, 1mL de Wash Buffer (50mM Tris.Cl, pH7.4; 8M ureia) foi adicionado ao pellet de esferas 4 vezes, a fim de realizar as etapas de lavagem das mesmas. Este processo foi realizado após 8 minutos de incubação das esferas com o Wash buffer em rotator e centrifugação por 2 min a 1000g. Ao final, o pellet foi ressuscitado em 1mL do Wash Buffer e 100 μ L desta solução foram separados para WB e 900 μ L para posterior análise em espectrômetro de massas. Após centrifugação, o pellet correspondente aos 100 μ L de amostra foi ressuscitado em 50mM TrisCl, pH 7.4, para remoção da uréia e, posteriormente, ressuscitado em 100 μ L do SDS-PAGE Buffer, para análise do perfil de biotilação por western blot. Já em relação ao pellet do tubo contendo os 900 μ L, foram adicionados 50 μ L de 1mM de biotina em 50mM de bicarbonato de amônio para deixar a amostra compatível com as soluções a serem utilizadas na preparação da amostra para análise em espectrômetro de massas.

3.6 Imunoprecipitação

Para a linhagem HEK293T, 4x10⁷ células por condição (em duplicata) foram centrifugadas a 1500 rpm por 5 minutos, após 24 horas de cultura pós transfeção dos plasmídeos. Já para a linhagem MOLT4, 1x10⁸ células foram utilizadas por condição, e também centrifugadas nas mesmas condições descritas acima. O pellet foi lavado 2 vezes com 2 mL de PBS e, posteriormente, 700 μ L de Lysis buffer (20mM Tris-HCl, pH: 7.4; 150mM NaCl; 5mM MgCl₂; 0.5% NP-40%; 10% Glycerol; Inibidor de protease 1:100 μ L de solução) foram adicionados ao pellet.

As amostras foram sonicadas de acordo com a setagem para este experimento, e deixadas a 4°C sob agitação por tempo determinado. Após esta etapa,

as amostras foram centrifugadas por 20 min a 16.000 rpm a 4°C, e o sobrenadante contendo a fração proteica foi transferido para outros tubos Eppendorf, sendo então a concentração proteica determinada por Bradford. Dessa forma, também foi calculado o volume do Buffer IBB (10mM Tris-HCl, pH: 7.6; 150mM NaCl; 0.4% NP-40%; Inibidor de protease 1100uL) a ser adicionado a amostra. Desta solução, 45 µL foram retirados como amostra INPUT, e a esta porção foi adicionado SDS PAGE Buffer, para posterior análise por western blot. Ao restante do mix de amostra, lisado e IBB buffer, o anticorpo anti-HA (#14675681eBioscience) foi adicionado, a concentração final de 1ug/uL. Novamente, a amostra foi submetida ao período de incubação de 12h (over night) e, no dia seguinte, incubadas com 50µL de esferas de sefarose revestidas com proteína G; estas, contudo, foram previamente lavadas com 500 µL de tampão IBB por 1 minuto a 800g e, posteriormente, incubadas com a amostra sob rotação por 2h a 4°C.

Após este período, os lisados com as esferas foram centrifugados novamente a 800g por 1 minuto, e 45 µL do sobrenadante retirado para posterior análise por western blot. Após descarte do restante do sobrenadante, o pellet de esferas, neste momento conjugado às proteínas, foi lavado algumas vezes com wash buffer e, novamente, 50 µL SDS-PAGE Buffer foi adicionado ao pellet ao fim das lavagens. Dessa forma, as amostras aquecidas a 95°C por 5 minutos, centrifugadas por 1 minuto a 800g e o sobrenadante, agora correspondente ao imunoprecipitado, foi estocado até posterior análise por western blot, coloração de gel por azul de comassie e espectrometria de massas.

3.7. Detecção da expressão dos CARs

3.7.1. Detecção por citometria de fluxo

Os CARs foram detectados por citometria de fluxo e, ocasionalmente, por microscopia de imunofluorescência. Para a primeira técnica foi utilizado, a depender da disponibilidade do equipamento, o citômetro Accuri ou FACS calibur. Anticorpo anti- HA (eBioscience, # 14-6756-81, diluição 1:20) foi utilizado como anticorpo primário. Anti F'(ab)₂ conjugado a ficoeritrina (PE) (eBioscience, #12-4739-81) foi utilizado como anticorpo secundário na diluição de 1:200. Da mesma forma, a depender da disponibilidade no laboratório, foi utilizado também como anticorpo

primário anti- Fab, conjugado a biotina e anti-streptavidina (SVP) conjugado a APC (eBioscience, # 17-4317-82).

3.7.2. Detecção por imunofluorescência

As células da linhagem HEK 293FT foram lavadas e fixadas com paraformaldeído (PFA) 4% overnight. Após este período, foram novamente lavadas com PBS e bloqueadas e permeabilizadas com BSA 1% e 0,3% triton X-100 por uma hora (1h). Após subseqüentes lavagens, foram incubadas com anticorpo primário (anti- HA 1:25) em BSA 1% e 0,3% triton X-100 overnight. Posteriormente, foram incubadas com anticorpo secundário (anti- rabbit conjugado a Alexa-fluor 546-marca), lavadas e incubadas com DAPI para marcação nuclear por um minuto. As células nas lâminas foram observadas então com utilização do microscópio confocal FUOVIEW FV10i (Olympus).

Alternativamente, para os dados gerados no laboratório colaborador na Itália, as células foram incubadas em PBS com Paraformaldeído 4% (300uL/poço), por 10 minutos; posteriormente, as mesmas foram lavadas 3 vezes com PBS +BSA 0,2%, seguido de permeabilização com 1mL de Triton 0.03% em PBS, por 10 minutos a temperatura ambiente. Após esta etapa, novas duas lavagens com PBS+BSA 0.2% foram feitas, e as lamínulas colocadas em contato com o anticorpo primário por 1 hora, a temperatura ambiente. Dessa forma, seguiu-se para lavagem das lamínulas com PBS + BSA 0.2% (1mL), por 3 vezes, e adição de 500uL de PBS + BSA 2% por 15 minutos, a fim de promover maior bloqueio da amostra.

Uma nova lavagem com PBS+BSA 0.2% (1mL) foi feita, e o anticorpo secundário (anti-Rabbit Alexa flúor 488) foi adicionado (1:1000), por 1 hora, novamente a temperatura ambiente. Finalizado o período de incubação com anticorpo, as lamínulas foram novamente lavadas 3 vezes com PBS + BSA 0.2%. Após, 1mL de PBS+ BSA 2% foi adicionado por 15 minutos, seguido de novas duas lavagens com PBS+BSA 0.2% (1mL) e uma com 1 PBS. Assim, pôde-se prosseguir para a incubação com DAPI (1:50) por 3 minutos, e PBS foi utilizado 2 vezes para lavar as lamínulas após a incubação com DAPI. 2,5 µL de glicerol foram utilizados para auxiliar na adesão da lamínula à lamínula, e as imagens foram adquiridas utilizando o microscópio confocal SP2 AOBS (Leica).

3.8. Western blot

Após preparação e polimerização dos géis *separating* (pH= 8.8) e *stacking* (pH= 6.8), as amostras foram rapidamente fervidas (5'-10'), centrifugadas (spin) e aplicadas no gel a uma corrente de 80V por 1h. Em seguida, aplicou-se uma corrente de 20V (overnight). O gel foi colocado junto à membrana de nitrocelulose (GE Healthcare, #10600003) e aos papéis filtro para transferência por 2h a 45 mA. Posteriormente, a membrana foi corada com Vermelho de Ponceau (30 minutos) para verificação da presença de extratos protéicos, descorada com água e bloqueada com BSA *blocking buffer* (ROUX et. al., 2013). Após bloqueio e lavagens de acordo com o protocolo, a membrana foi incubada com Streptavidina conjugada a HRP (Pierce™ High Sensitivity Streptavidin-HRP), em diluição 1:40.000. Após lavagem e revelação com ECL (Promega, #W1001) o filme (Hyperfilm ECL, # 28-9068-36, GE Healthcare) foi exposto a membrana.

Durante o período de doutorado sanduíche, o gel Bolt™ 4-12% Bis-Tris (#NW04122BOX- Plus Gels) foi utilizado para realizar todos os western-blots necessários. Running buffer foi preparado a partir da solução estoque 20X Bolt™ MES SDS Running Buffer (#B0002, Novex Life Technologies) e, após corrida a 150 V por 45 minutos, o gel foi colocado junto à membrana de nitrocelulose (GE Healthcare, #10600003) e aos papéis filtro para transferência por 12h (over night) a 4°C. O tampão de transferência foi preparado utilizando a proporção de 70% de água MilliQ, 20% de metanol e 10% de transfer buffer (Tris base #77861 e Glicina #56406). Já os géis destinados a coloração com azul de comassie foram corados com este reagente, e o gel estocado em água MilliQ a 4°C até momento oportuno para preparação do mesmo para posterior análise por espectrometria de massas.

Para a membrana submetida a transferência, após esta etapa, a membrana foi corada com vermelho de Ponceau para observação da presença de extratos proteicos na membrana, descorada com água destilada e, posteriormente, bloqueada por 1 hora com 5% de leite em pó em TBS-T. Após o bloqueio, à membrana foi adicionado o anticorpo primário anti- HA (#14675681, eBioscience) na proporção 1: 3000 por 1 hora a temperatura ambiente. Em seguida, a membrana foi lavada 3 vezes por 5 minutos em TBS-T, seguida de incubação com anticorpo secundário anti- mouse (#1706516, Bio-Rad) na diluição 1:3000, também por 1 hora a temperatura ambiente.

Posteriormente, a membrana foi lavada 3 vezes por 15 minutos cada, com TBS-T. Após lavagem e revelação com *ECL* (Promega, #W1001) o filme (Hyperfilm ECL, # 28-9068-36, GE Healthcare) foi exposto a membrana.

3.9. Preparação de amostras para análise por espectrometria de massas

Após coloração do gel com azul de comassie por 30 minutos e aquisição da imagem do gel, o mesmo foi lavado com água MilliQ, e o gel foi cortado na região que continha a banda atribuída a proteína de interesse. A partir deste momento, o gel- da amostra proveniente da imunoprecipitação, contendo as proteínas, precisa ser reduzido, alquilado, digerido e eluído, para que a amostra final seja injetada no espectrômetro de massas. As mesmas etapas foram aplicadas à amostra contendo as esferas conjugadas a streptavidina e estas, às proteínas biotinizadas- do ensaio de BiOD-, que neste caso, encontravam- se em solução. Contudo, de forma geral, as etapas seguintes foram realizadas para ambas as amostras (em solução e em gel), da seguinte forma:

3.9.1. Redução

Para a redução das proteínas em gel, 150uL de acetonitrila (ACN) foram adicionados ao gel, a fim de desidrata-lo. Após remover a ACN, a amostra foi concentrada no concentrador (SpeedVac) por 1 minuto e, à mesma, foram adicionados 150uL de DTT 1,4-Dithiothreitol (DTT) em bicarbonato de amônio (NH_4HCO_3) 50mM, a fim de reduzir as pontes dissulfeto entre os resíduos de cisteína das proteínas. Sob estas condições, a amostra ficou a 56°C por 30 minutos em shaker.

Posteriormente, a amostra foi novamente desidratada com 150uL de ACN, por duas vezes de 5 minutos cada. Uma vez desidratado e após a remoção de toda a ACN, o gel pode ser submetido a etapa de Alquilação.

3.9.2. Alquilação

Ao gel, nesta etapa já desidratado, foi adicionado 55mM de Iodacetamida (IAA) (#114924, Sigma), em 50mM de NH_4HCO_3 . A IAA, como um agente alquilante, é adicionada com a finalidade de alquilar resíduos de cisteína e impedir uma nova

reestruturação das proteínas, após a redução. Nestas condições, a amostra foi deixada por 20 minutos a temperatura ambiente (TA). Transcorrido este período de tempo, a IAA foi removida e o gel lavado 2 vezes com NH_4HCO_3 (50Mm) e colocado no concentrador por 1 minuto.

3.9.3. Digestão e injeção da amostra

As proteínas foram digeridas com tripsina ($0,1\mu\text{g} / \mu\text{l}$ em $50\text{mM NH}_4\text{HCO}_3$) e incubadas a 37°C durante a noite. Após digestão, os peptídeos foram extraídos dos pedaços de gel usando ACN e ácido fórmico (FA) a 5%. Os extratos peptídicos foram então purificados usando o procedimento StageTip32 (SOFFIENTINI and BACHI, 2016), secos em um SpeedVac e ressuspensos em ácido trifluoroacético (TFA) a 1% antes da análise por espectrometria de massa. $4\mu\text{L}$ dos peptídeos purificados foram injetados no sistema de cromatografia líquida EASY-nLC 1200 (Thermo Scientific) e separados na coluna capilar de fabricação própria (ReproSil-Pur 120 C18-AQ, $1,9\mu\text{m}$, Dr. Maisch GmbH, $360 \times 0,075\text{ mM}$), ressaltando-se que $10\mu\text{L}$ totais foram injetados por amostra, a fim de permitir a análise com réplica técnica e biológica. Os $2\mu\text{L}$ restantes, totalizando $10\mu\text{L}$, são adicionados para evitar formação de bolhas na coluna do instrumento

3.9.4. Eluição

A eluição foi realizada usando um gradiente linear de tampão B crescente (80% de acetonitrila, ácido fórmico a 0,1%) e tampão A decrescente (ácido fórmico a 0,1%) na vazão de $200\text{nL} / \text{min}$. O sistema LC foi acoplado ao espectrômetro de massa híbrido quadrupolo-Orbitrap da Thermo Scientific™ Q Exactive™ HF. O tempo total de execução (gradiente), incluindo carregamento de amostra e condicionamento de coluna, foi de 45 minutos.

3.10. Análise dos dados provenientes do espectrômetro de massas

3.10.1. Processamento dos dados brutos

Todos os arquivos brutos foram processados usando MaxQuant (Versão 1.5.2.8), através do qual é possível identificar as proteínas encontradas, bem como quantificá-las, utilizando o banco de dados humano UniProtKB / Swiss-Prot como referência. A carbamidometilação foi definida como modificação fixa e, para as análises em que o método BioID foi utilizado, a modificação biotinilação também foi acrescentada. Para dados estequiométricos, foi utilizada a opção iBAQ. Além do MaxQuant, o software Scaffold Viewer foi utilizado para visualizar os dados provenientes dos experimentos em que a técnica BioID foi utilizada, além do diagrama de venn (<https://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/>) para a visualização comparativa destes dados, bem como as plataformas KEGG (<http://amp.pharm.mssm.edu/Enrichr/enrich#>) e STRING (<http://version10.string-db.org/>) para análises de enriquecimento de vias das quais as proteínas encontradas participam.

3.10.2. Análises estatísticas

A análise estatística foi realizada com o programa Perseus, utilizando o teste t de duas amostras com correção de Benjamini-Hochberg fixada em FDR = 0,05. As áreas dos picos de proteína foram log₂ transformadas e plotadas no espaço componente principal. A análise de componentes principais (PCA) também foi realizada utilizando esta ferramenta.

4. RESULTADOS

4.1. Construção dos plasmídeos para expressão dos CARs 20LAG3 WT e mutantes

Para simular a ativação de LAG-3, o receptor quimérico de antígeno (CAR) foi sintetizado com a porção extracelular scFv anti-CD20 pela empresa Genscript (Piscataway, Nova Jersey, EUA). Na parte intracelular, a sequência do LAG-3 Wild Type também foi sintetizada. Paralelamente, as demais sequências da porção intracelular de LAG-3, sem o domínio extracelular anti-CD20 foram sintetizadas: EPdel (deleção do motivo EP), Kmut (mutação de uma lisina-K- para uma alanina- A) e duplo mutante (Kmut e EPdel). O objetivo foi diminuir o custo de síntese e clonar posteriormente somente as sequências dos mutantes de LAG-3 ao vetor.

Em todas as sequências sintetizadas, foram adicionados os sítios de restrição das enzimas Age I e BamHI, uma vez que estas são enzimas disponíveis no laboratório e que estão presentes no plasmídeo pcDNA 3.1 (**Figura 4.1**). Este plasmídeo foi adquirido comercialmente na empresa AddGene e contém a sequência da enzima BirA*2, já fusionada à sequência da proteína HA, utilizada como tag para permitir a detecção da presença do CAR. O mapa do histórico de clonagem do CAR anti- CD20- LAG3-BirA*2 pode ser observado na **figura 4.2**, bem como o mapa da construção final na **figura 4.3**, ambos feitos através do software SnapGene; já os demais mapas (EPDEL, KMUT e DMUT) podem ser conferidos no **Anexo B**. Por fim, na **figura 4.4** é possível observar o gel de agarose mostrando as bandas correspondentes à digestão do CAR 20LAG-3BirA*2, que foram purificadas para posteriormente serem utilizadas para a clonagem das demais construções.



Figura 4.1 Mapa esquemático do plasmídeo pcDNA 3.1 que contém sequência da BirA*2. O vetor contém o multiple cloning site (MCS) mostrando as enzimas que podem ser utilizadas para clonar a sequência de interesse à da biotina ligase 2 (BirA*). Age I e BamHI foram utilizadas para a clonagem dos CARs a este vetor.

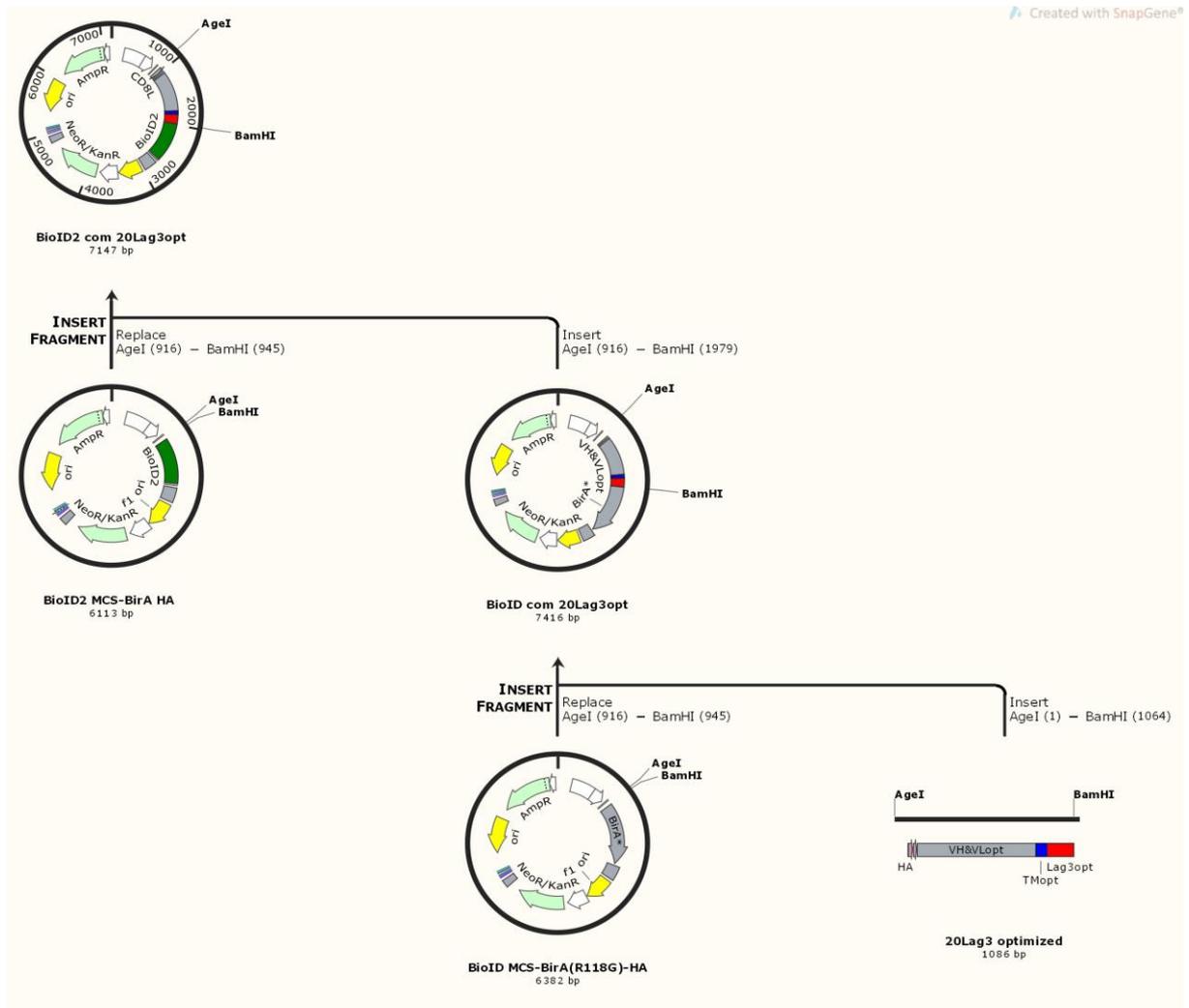


Figura 4.2. Histórico de síntese e clonagem de 20LAG-3 ao plasmídeo pcDNA 3.1. O vetor contém o multiple cloning site (MCS) mostrando as enzimas que foram utilizadas para clonar a sequência de de LAG-3 à da biotina ligase (BirA1*). Age I e BamHI foram utilizadas para a clonagem dos CARs a este vetor.

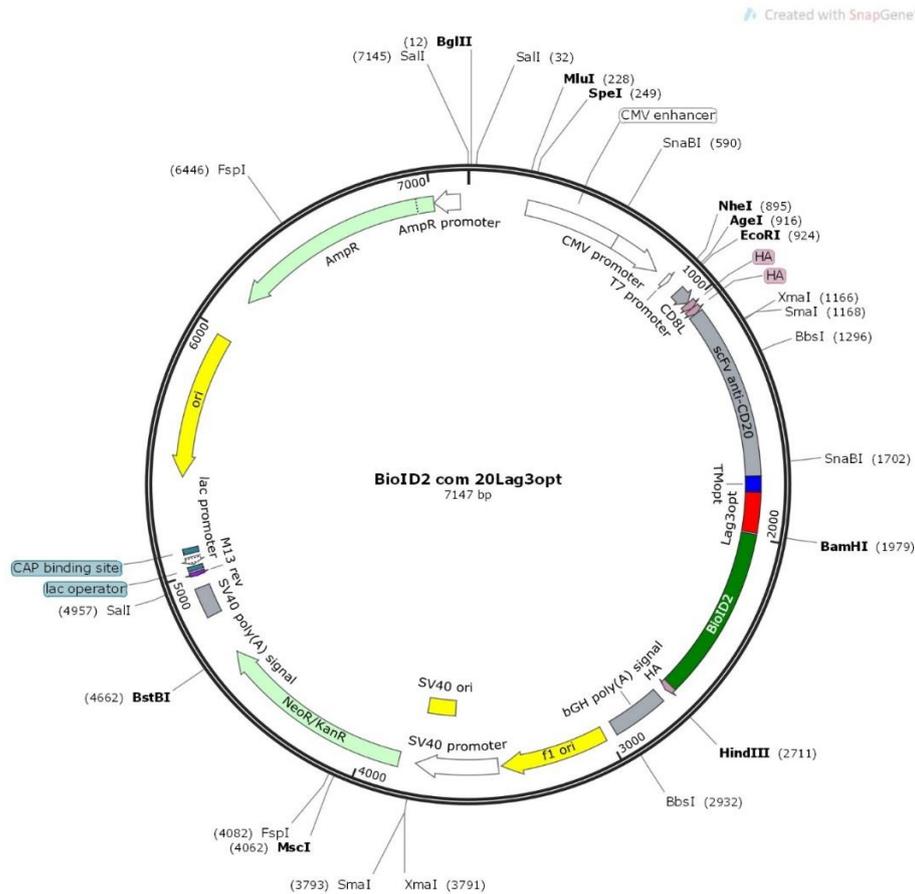


Figura 4.3. Mapa final após clonagem de 20LAG-3 ao plasmídeo pcDNA 3.1 que contém sequência da BirA*2. Age I e BamHI foram utilizadas para a clonagem dos CARs a este vetor. Demais mapas podem ser observados no **anexo B**

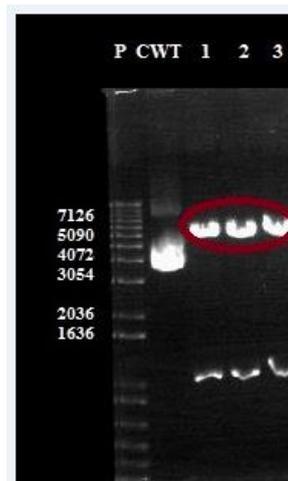


Figura 4.4. Gel de agarose mostrando bandas da digestão do CAR 20LAG-3BirA*2. Uma vez clonado, o plasmídeo contendo a sequência do CAR 20LAG-3BirA*2 foi digerido com as enzimas AgeI e BamHI para inserção das demais sequências mutantes da cauda intracelular de LAG-3 (EPDEL, KMUT e DMUT) *in frame* como sequência da enzima. Bandas circuladas indicam as bandas selecionadas para serem purificadas e ligadas às demais sequências (EPDEL, KMUT e DMUT). P= padrão de peso molecular; CWT= Controle não digerido; 1,2 e3= digestões do CAR 20LAG3.

4.2. BioID em MOLT4

4.2.1. Análise da expressão dos plasmídeos por citometria de fluxo

Para verificar a expressão dos CARs contendo os domínios intracelulares de LAG3, a linhagem de células T MOLT4 foi eletroporada com as construções e posteriormente utilizada para a realização da técnica BioID e, através de citometria de fluxo (**figura 4.5**), pode-se observar a expressão dos transgenes nestas células.

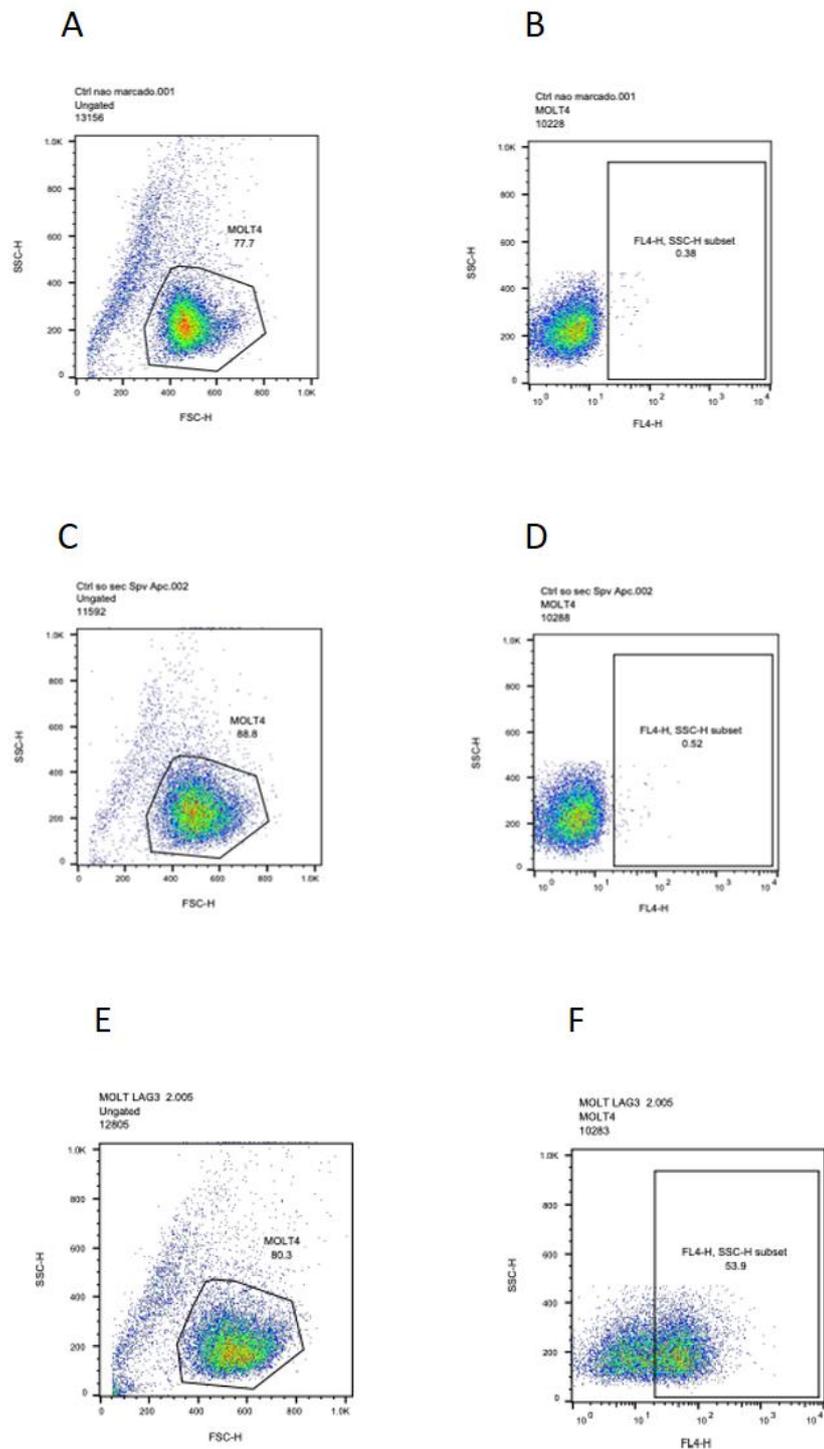


Figura 4.5. Expressão do CAR 20 LAG-3 WT BirA*2 nas células MOLT4. 10 µg do plasmídeo CAR 20Lag3 WT BirA*2 foram eletroporados na linhagem HEK 293FT e após 24h, as células foram incubadas com anticorpo primário (anti-Fab 1: 200) e anticorpo secundário (estreptavidina APC 1: 200) para detectar a presença do CAR. **A, C, E:** FSC x SSC das células viáveis. **B:** Células da condição controle (sem DNA) não marcadas. **D:** células marcadas apenas com anticorpo secundário (controle negativo para estreptavidina / APC). **F)** Porcentagem de células positivas para SPV / APC, indicando a expressão do CAR.

4.2.2. Análise da presença do CAR LAG3-WT por Western blot

Após a caracterização da expressão do transgene por citometria de fluxo, verificamos se a proteína poderia ser detectada por western blot e se o seu peso molecular correspondia ao esperado. Através dos ensaios representados na **figura 4.6**, pode-se analisar a presença do CAR 20 LAG3 WT nas amostras após a lise celular e antes da purificação com as esferas. Amostras após o período de incubação com as esferas também foram coletadas para análise por western blot, onde não foi possível evidenciar a presença da banda esperada.

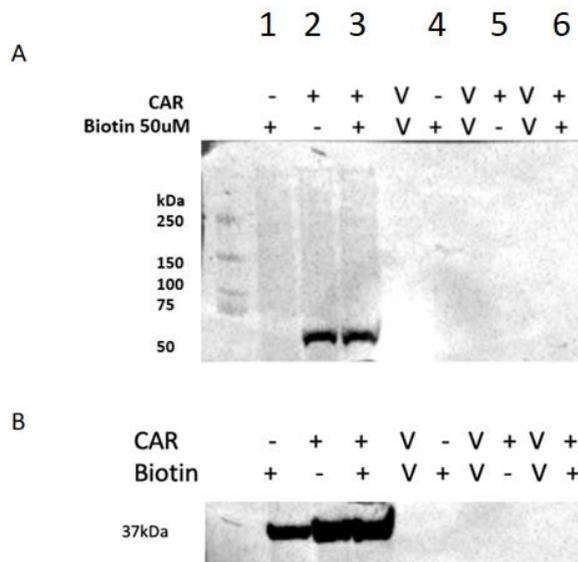


Figura 4.6. Western blot mostrando a presença do CARLAG3-WT. A: Nas condições em que o CAR LAG3WT é expresso (+ CAR, colunas 2 e 3), anteriormente a purificação com esferas (colunas 1, 2 e 3), pode-se observar a presença da banda referente ao peso molecular do CAR (65kDa). Já após a purificação com as esferas (colunas 4,5, e 6), a banda não foi observada. V= coluna vazia. **B :** presença da banda referente ao normalizador (B- actina, 41kDa).

Uma vez que, após a purificação com as esferas, utilizando ECL pico, não foi possível observar a banda correspondente ao CAR 20LAG3-WT, uma nova exposição da membrana ao ECL foi feita, utilizando-se neste momento ECL- femto, a fim de aumentar a sensibilidade do teste. Tal resultado pode ser observado na **figura 4.7**.

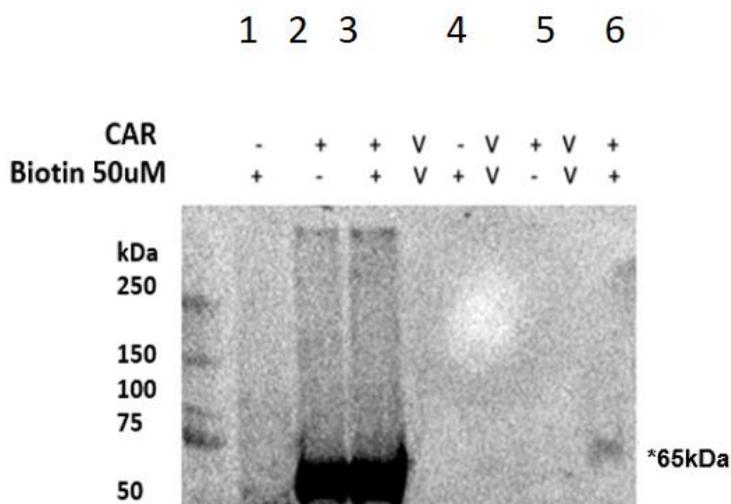


Figura 4.7. Western blot mostrando a presença do CARLAG3-WT. Nas condições em que o CAR LAG3WT é expresso (+ CAR, colunas 2 e 3), anteriormente a purificação com esferas (colunas 1, 2 e 3), pode-se observar a presença da banda referente ao peso molecular do CAR (65kDa). Após a purificação com as esferas (colunas 4,5, e 6), a banda pode ser observada. V= coluna vazia.

4.2.3. Análise do padrão de biotilação por Western Blot

A fim de se avaliar o padrão de biotilação das amostras submetidas ao teste de BioID, a técnica de western blot foi novamente realizada, utilizando Streptavidina conjugada a HRP para detecção das proteínas biotiniladas. Através da **figura 4.8**, pode-se analisar a presença do CAR 20 LAG3 WT nas amostras após a lise celular e antes e após a purificação com as esferas.

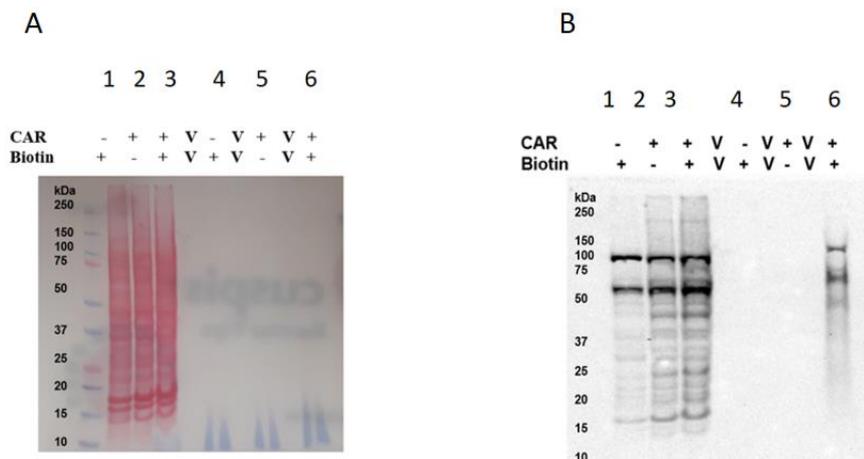


Figura 4.8. Western blot mostrando o padrão de biotinylação. **A:** extratos proteicos visualizados na membrana através da coloração com vermelho de Ponceou. **B:** nas condições em que o CAR LAG3WT é expresso (+ CAR, colunas 2 e 3), anteriormente a purificação com esferas (colunas 1, 2 e 3), pode-se observar a presença de biotinylação, indicada pelo rastro em análises de western blot. Após a purificação com as esferas (colunas 4, 5, e 6), observa-se este padrão somente na condição CAR + Biotina. V= coluna vazia.

4.2.4. Diagrama de Venn- BioID em MOLT 4

Após a adição de biotina ao meio de cultura das células e lise após 24h, as proteínas biotiniladas foram capturadas por afinidade, utilizando-se, para isto, esferas (beads) conjugadas a streptavidina. Dessa forma, pode-se observar que houve um enriquecimento do número de proteínas encontradas na condição que continha a construção CAR LAG3-WT, quando a comparamos com as demais condições controle (sem DNA com biotina, com CAR sem biotina). A análise do número de proteínas diferenciadas encontradas pode ser visualizada na **figura 4.9**. A lista com as proteínas encontradas pode ser analisada no **Apêndice 1**.

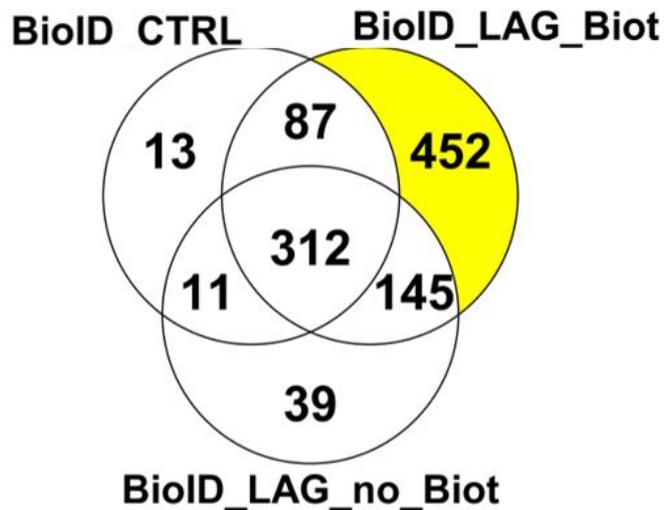


Figura 4.9. Diagrama de Venn do teste BioID em MOLT4. Diagrama de Venn representando o número de proteínas identificadas por espectrometria de massas, exclusivamente presentes nas condições Controle (sem plasmídeo e com adição de 50uM de biotina) e com o plasmídeo contendo a sequência CAR LAG3- WT sem e com adição de 50uM de biotina ao meio de cultura.

4.3. Imunoprecipitação em MOLT4

4.3.1. Análise da expressão do CARLAG3-WT por citometria de fluxo

Após serem eletroporadas com 10 µg do plasmídeo CAR 20Lag3 WT, as células da linhagem MOLT4 foram submetidas a seleção com a droga G418 (900ug/mL). Na data anterior ao ensaio de IP, as células foram marcadas com anticorpo primário (anti- Fab 1: 200) e anticorpo secundário (estreptavidina APC 1: 200) para detectar a presença do CAR. As células Wild type (sem plasmídeo) foram tanto não marcadas e marcadas apenas com o anticorpo secundário, correspondendo assim à condição controle. Já as células que continham a construção foram marcadas com os anticorpos primário e secundário e foi verificado que a porcentagem de expressão do CAR nestas células estava em torno de 64%. Tal dado pode ser observado na **figura 4.10**.

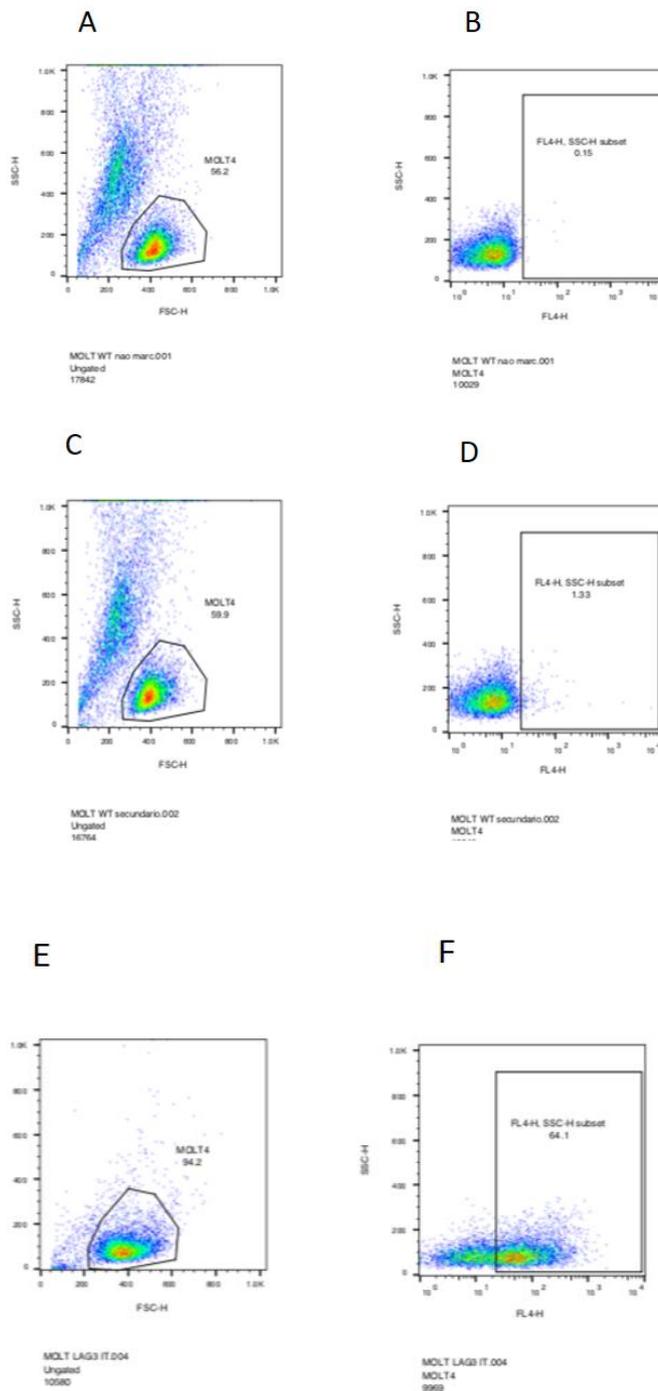


Figura 4.10. Expressão do CAR LAG-3 WT nas células MOLT4. 10 µg do plasmídeo CAR 20Lag3 WT BirA*2 foram eletroporados na linhagem MOLT4 e após 24h, as células foram incubadas com anticorpo primário (anti-Fab 1: 200) e anticorpo secundário (estreptavidina APC 1: 200) para detectar a presença do CAR. **A, C, E:** FSC x SSC das células viáveis. **B:** Células da condição controle (sem DNA) não marcadas. **D:** células da condição controle marcadas apenas com anticorpo secundário (controle negativo para estreptavidina / APC). **F)** Porcentagem de células CAR positivas para SPV / APC, indicando a expressão do CAR.

4.3.2. Análise da presença do CAR LAG3-WT por Western blot

No ensaio de western blot representado na **figura 4.11**, a fim de verificar a presença do CAR na célula, a membrana foi incubada com o anticorpo primário anti-HA e secundário anti- mouse. Para este ensaio, amostras correspondentes ao input celular (pós lise), após período de incubação com anticorpo anti- HA e proteína G (unbound) e após as etapas de lavagens das esferas de sefarose revestidas com proteína G- nas quais, neste momento, as proteínas encontrariam-se imunoprecipitadas- foram utilizadas, a fim de visualizar se o ensaio de imunoprecipitação ocorreu e se as amostras poderiam ser enviadas para análise por espectrometria de massas. Nesta etapa, o protocolo de imunoprecipitação foi realizado entre a amostra controle (células sem CAR, IP WT) e com o CAR 20LAG3 WT (IP LAG).

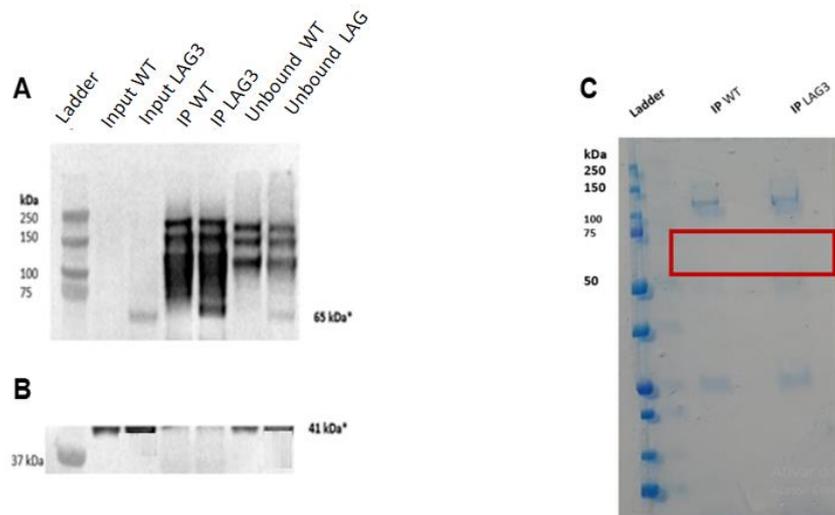


Figura 4.11. Análise da presença dos CARs por Western blot. As células MOLT4 foram eletroporadas com 10ug do plasmídeo contendo a sequência do CAR 30 LAG3 WT, lisadas e as proteínas imunoprecipitadas, utilizando anticorpo anti-HA e adsorvidas utilizando esferas de sefarose revestidas com proteína G. A análise de Western blot (WB) mostra em **A**) a presença da banda correspondente à construção (65kDa), após incubação com anticorpo primário anti-HA e secundário anti- mouse; **B**): presença da banda referente ao normalizador (B- actina, 41kDa) e **C**), Gel SDS-PAGE das proteínas purificadas corado com azul de comassie. A coluna de cada uma das amostras controle- IP WT e com CAR LAG3- WT (IP- LAG3)- foi excisada e as proteínas digeridas em gel.

4.3.3. Diagrama de Venn pós Imunoprecipitação em MOLT 4

O número e identificação das proteínas encontradas exclusivamente na condição controle (célula WT sem CAR) e CAR LAG3-WT, após a realização da técnica de imunoprecipitação em MOLT4, pode ser observado no diagrama de Venn (**Figura 4.12**). Além disso, a localização de tais proteínas está esquematizada na **figura 4.13**. Pode-se observar que a maior parte das proteínas encontradas exclusivamente na condição com o plasmídeo contendo a sequência LAG3 WT e 50uM de biotina adicionada ao meio de cultura possuem localização predominantemente nuclear.

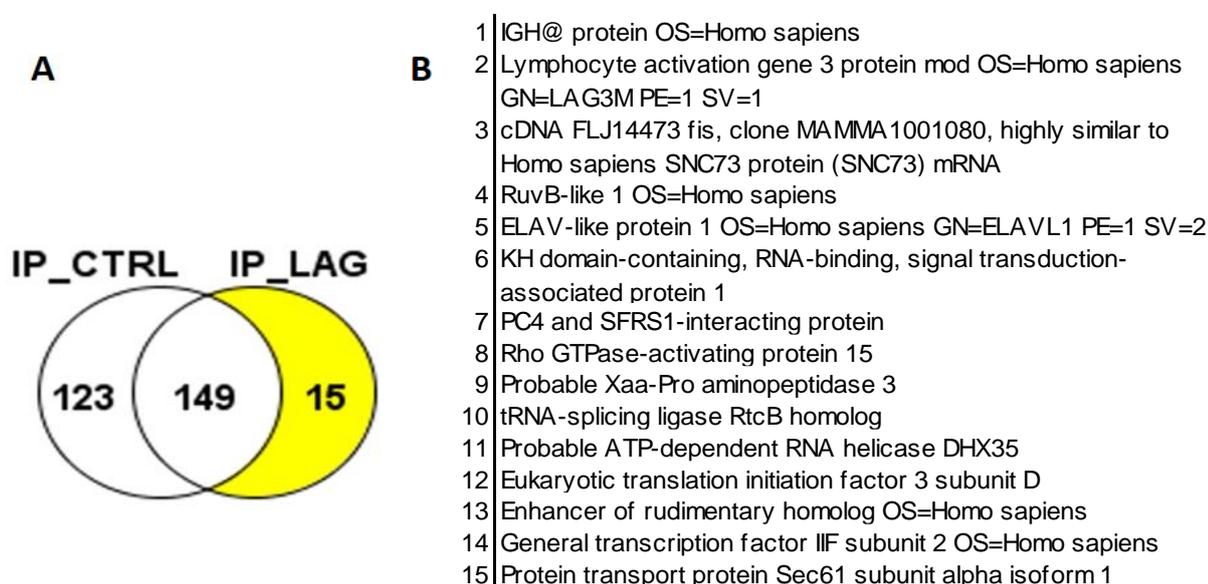


Figura 4.12. Diagrama de Venn e proteínas encontradas no teste de imunoprecipitação em MOLT4. **A)** Diagrama de Venn representando o número de proteínas identificadas por espectrometria de massas, exclusivamente presentes nas condições Controle- IP- CTRL (sem plasmídeo) e com o plasmídeo contendo a sequência CAR LAG3- WT (IP_LAG) e a sobreposição de proteínas encontradas nestas condições. **B)** Nome de acesso das proteínas exclusivamente encontradas na condição IP_LAG.

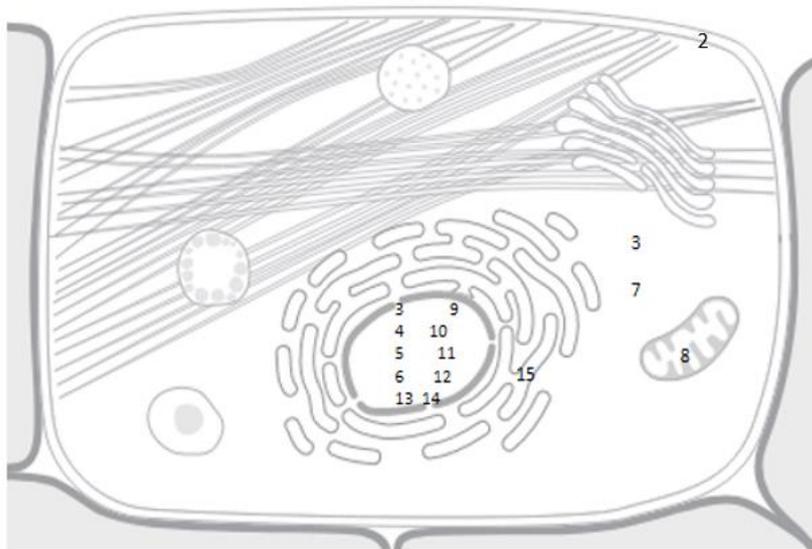


Figura 4.13. Padrão esperado de localização das proteínas encontradas na imunoprecipitação com MOLT4 de acordo com a plataforma UNIPROT KB. A maior parte das proteínas encontradas exclusivamente na condição com o plasmídeo contendo a sequência LAG3 WT e 50uM de biotina adicionada ao meio de cultura possuem localização predominantemente nuclear. Algumas proteínas são descritas como presentes no citoplasma e LAG3 tem sua expressão descrita na membrana da célula.

4.4. Imunoprecipitação em HEK 293T

As células HEK 293T, 24 horas após serem transfectadas com o CAR 20LAG3WT, foram lisadas e submetidas ao protocolo de imunoprecipitação. Contudo, antes de iniciar o experimento, com o objetivo de visualizar a expressão e o compartimento celular correspondente para cada construção realizada, as células foram marcadas com anticorpos específicos a fim de realizar o ensaio de imunofluorescência, de forma que a construção pudesse ser visualizada por microscopia confocal. Na **figura 4.14** podemos observar que a proteína CAR-LAGWT encontra-se distribuída no citoplasma e membrana celular.

4.4.1. Análise da presença do CAR LAG3 WT por imunofluorescência

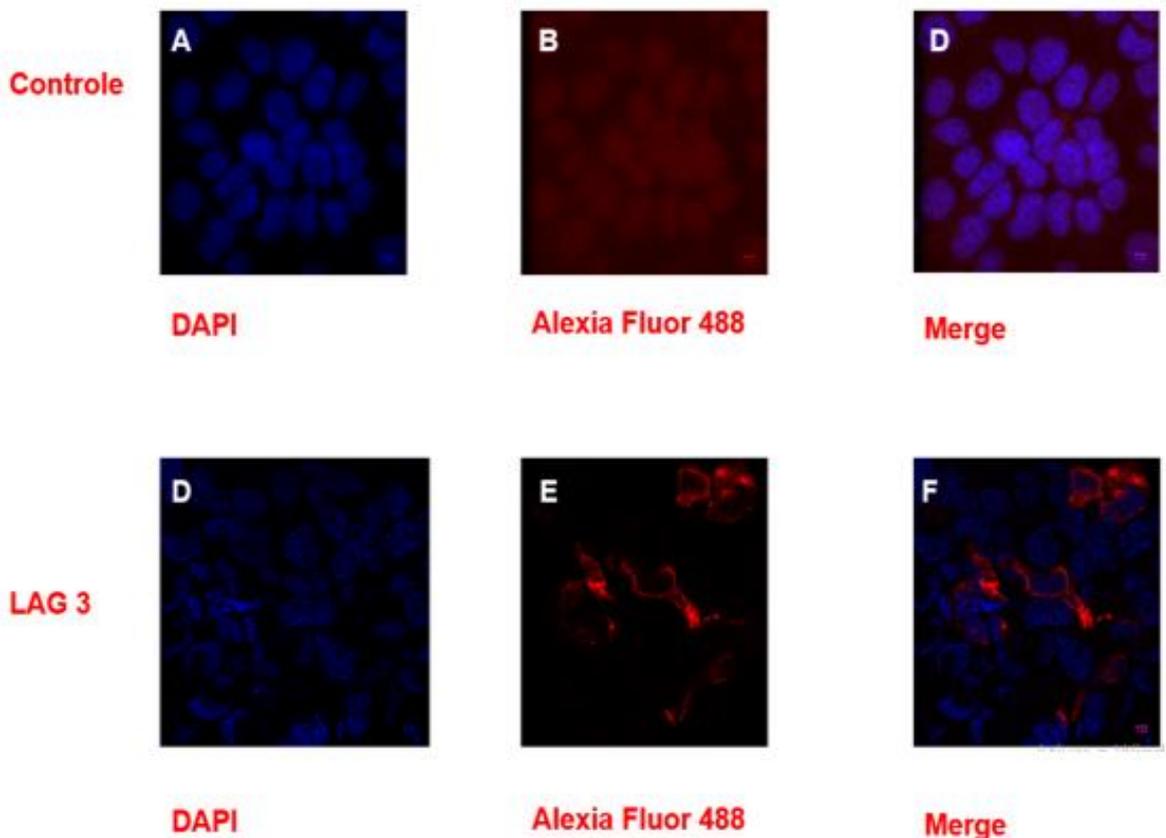


Figura 4.14. Padrão de expressão dos CARs por imunofluorescência. Células HEK 293T foram transfectadas com 10ug do plasmídeo que contém a sequência CAR LAG3-WT e, após 24h, foram incubadas com anticorpo anti-HA (1:25) e anti-rabbit/Alexa Fluor 488 (vermelho-1:200). DAPI foi utilizado para marcação nuclear (azul). **A e D:** marcação nuclear com DAPI; **B e E:** marcação positiva indicando presença do CAR LAG3-WT; **C e F:** sobreposição das marcações nucleares e do CAR.

4.4.2. Análise da presença do CAR LAG3 WT e do teste de imunoprecipitação por Western blot

A primeira imunoprecipitação em células HEK 293T foi realizada entre células Wild type e células transfectadas com o CAR 20LAG3 WT, com réplicas biológicas para cada amostra (CTRL 1, CTRL2, LAG1 e LAG2). Dessa forma, ao final do protocolo, 5% da amostra foi utilizada para verificação da presença do CAR (65kDa) por western blot, enquanto que os 95% restantes foram utilizados em outro SDS-PAGE, a fim de corar o mesmo com azul de comassie para verificar a presença do CAR e submeter este gel ao protocolo de preparação de amostras para análise por espectrometria de massas. Tal resultado pode ser observado na **figura 4.15**. Dessa forma, o quadro final de proteínas encontradas com diferença estatisticamente significativa na condição CAR 20LAG3 WT, quando comparada com a condição Controle (sem plasmídeo) pode ser observada no **Apêndice 2**.

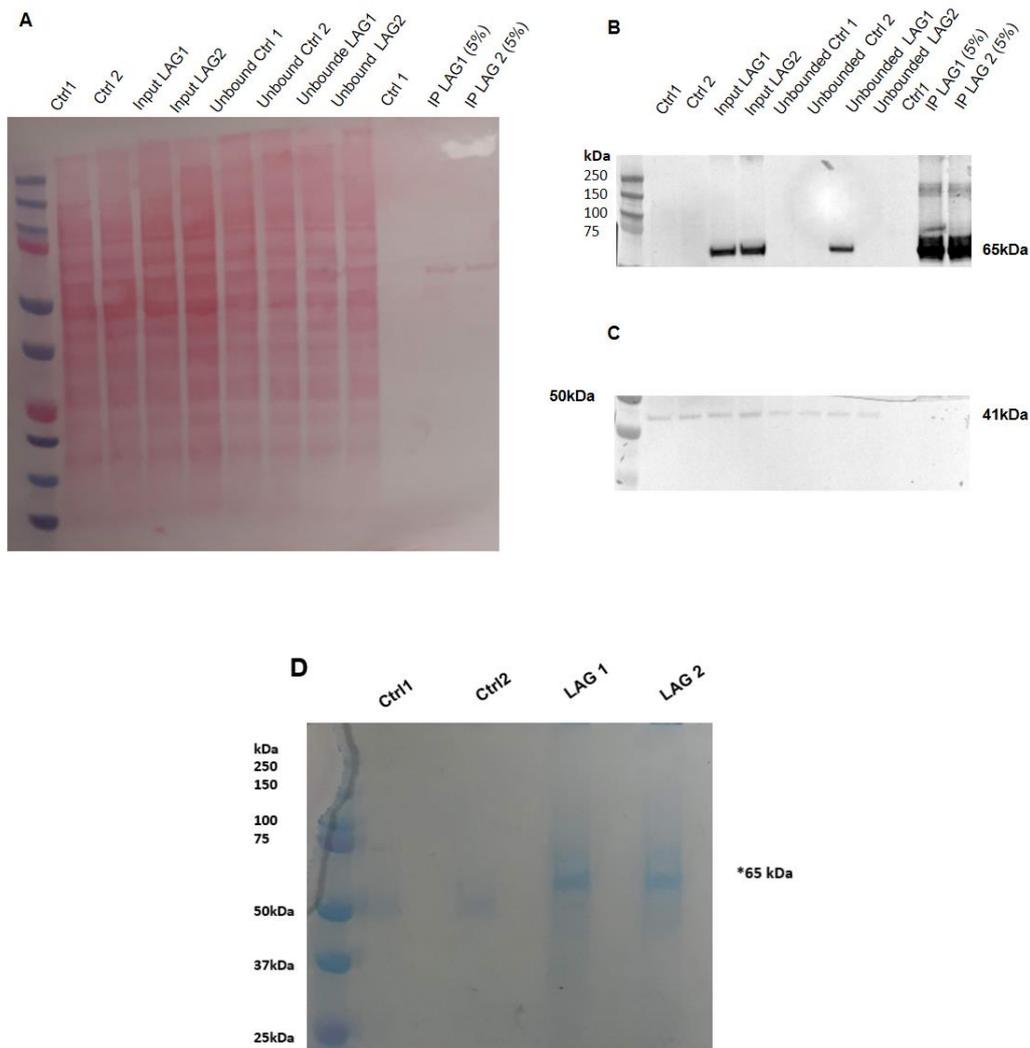


Figura 4.15. Análise da presença do CAR LAG3-WT por Western blot. As células HEK293T WT (CTRL 1 e CTRL 2, ambas sem plasmídeo) e as transfectadas com 10ug do plasmídeo contendo a sequência do CAR LAG3- WT (IP LAG1 e IP LAG2) foram lisadas e as proteínas foram imunoprecipitadas, utilizando anticorpo anti-HA e proteína G. A análise de Western blot (WB) mostra que **(A)** a presença dos extratos proteicos na membrana pela coloração com vermelho de ponceou, **(B)** presença da banda atribuída à construção (65kDa) pós incubação com anticorpo primário anti- HA (1:3000) e secundário anti- mouse (1:2500); **(C)** presença da banda referente ao normalizador (B-actina, 41kDa) e **D**, SDS-PAGE das proteínas purificadas, mostrado após coloração do gel com azul de comassie. As colunas do gel de cada uma das réplicas foi excisado e as proteínas digeridas em gel.

4.4.3. Análise da presença dos CARs com construções mutantes (EPDEL, KMUT e DMUT) por imunofluorescência

Novamente, as células HEK 293T foram transfectadas com os demais CARs (EPDEL, KMUT e DMUT) e, posteriormente, foram submetidas ao protocolo de imunoprecipitação. Dessa forma, com o objetivo de visualizar a expressão e o compartimento celular correspondente a cada construção realizada, as células foram marcadas com anticorpos específicos e visualizadas por microscopia confocal para avaliar a presença dos CARs. Na **figura 4.16** podemos observar as proteínas transfectadas distribuídas no citoplasma e membrana celular.

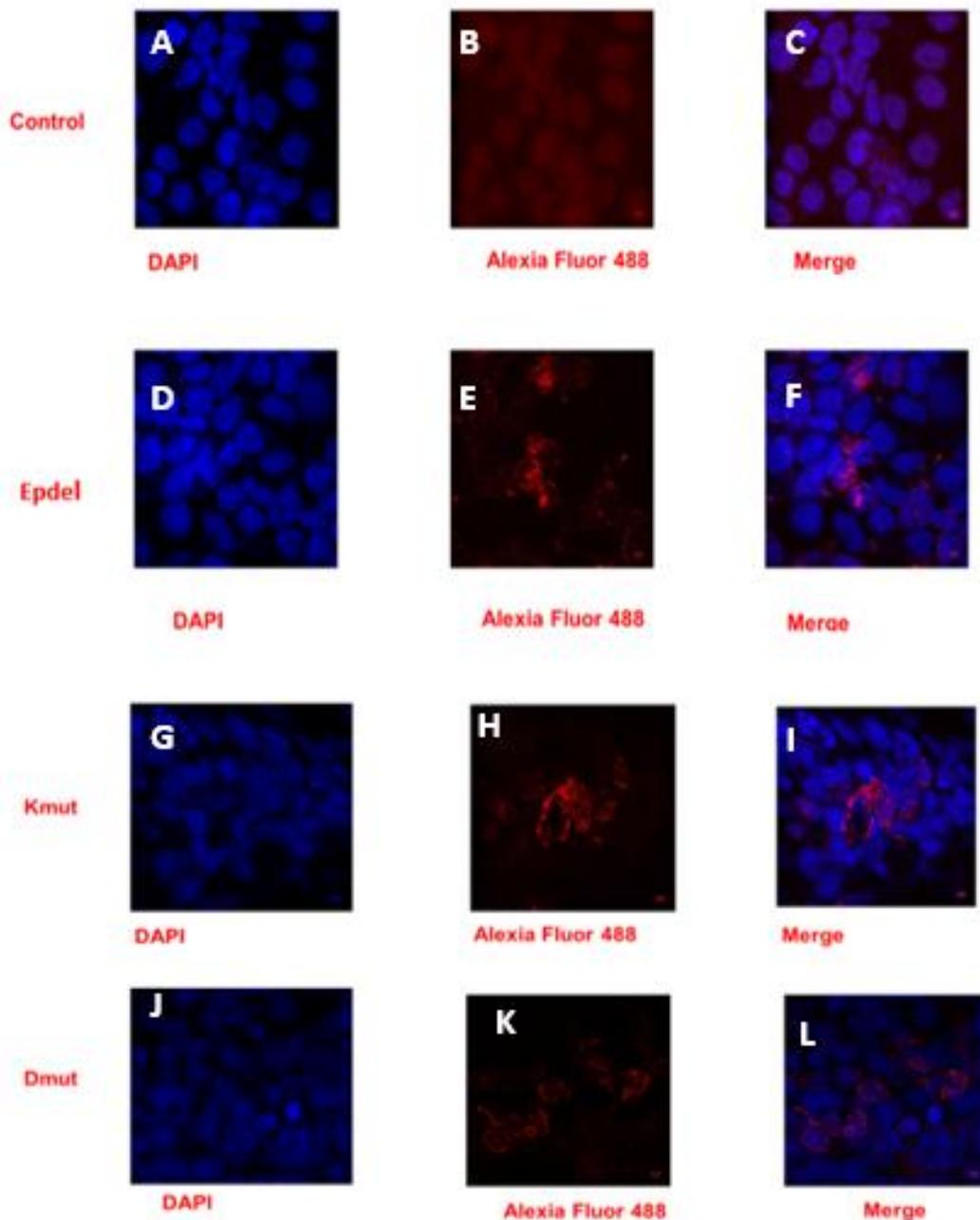


Figura 4.16. Padrão de expressão dos CARs por imunofluorescência. Células HEK 293T foram transfectadas com 10ug do plasmídeo das condições EPDEL, KMUT e DMUT, incubadas com anticorpo anti-HA (1:25) e anti- rabbit/Alexa Fluor 488 (vermelho-1:200). DAPI foi utilizado para marcação nuclear (1:3000 azul). Pode- se observar ausência do CAR na condição controle (**A,B,C**) e presença do mesmo na condição EPDEL (**D,E,F**), KMUT (**G,H,I**) e DMUT (**J,K,L**).

4.4.4. Análise da expressão dos CARs EPDEL, KMUT e DMUT e da presença das bandas correspondentes às construções de CARs após imunoprecipitação por SDS PAGE

Após serem eletroporadas com 10ug dos plasmídeos que continham as sequências mutantes EPDEL, KMUT E DMUT, as células HEK 293T foram lisadas e as proteínas, imunoprecipitadas, utilizando anticorpo anti-HA e esferas de sefarose revestidas com proteína G. A fim de verificar se a banda correspondente ao peso molecular referente ao CAR (65kDa) estaria presente, fazendo com que a amostra estivesse apta a ser submetida ao protocolo de preparação para análise por espectrometria de massas, as amostras foram utilizadas para SDS PAGE. A **figura 4.17** mostra o resultado destes testes, o que permitiu a digestão do gel referente a cada condição, em réplicas biológicas (EPDEL 1, EPDEL 2, KMUT1, KMUT2, DMUT1, DMUT2) para posterior análise por espectrometria de massas. Os quadros com as proteínas encontradas em cada uma destas condições (EPDEL, KMUT e DMUT) podem ser observados nos **apêndices 3, 4 e 5**, respectivamente.

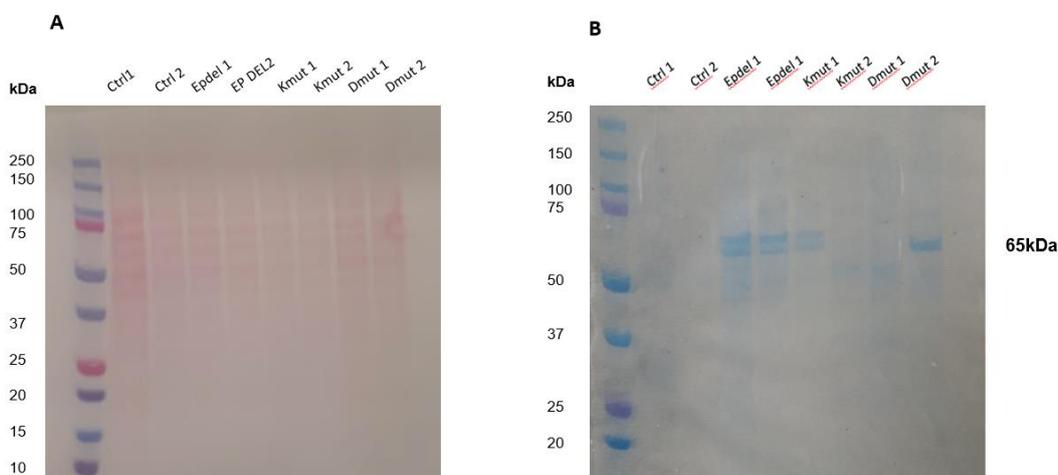


Figura 4.17. Análise da presença dos CARs com construções mutantes (EPDEL, KMUT, DMUT) por SDS PAGE. As células HEK293T WT e eletroporadas com 10ug dos plasmídeos que continham as sequências mutantes EPdel, Kmut e Dmut foram lisadas e as proteínas, imunoprecipitadas, utilizando anticorpo anti-HA e esferas de sefarose revestidas com proteína G. A análise mostra em **(A)** a presença dos extratos proteicos na membrana pela coloração com vermelho de ponceou, **(B)** SDS-PAGE das proteínas purificadas, com a presença da banda relativa ao tamanho esperado (65kDa), mostrado após coloração do gel com azul de comassie. As colunas de cada uma das réplicas foram excisadas e as proteínas digeridas em gel.

4.5. Análises estatísticas

4.5.1. Análises diferenciais dos dados de interação das construções contendo domínios intracitoplasmáticos de LAG3

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o programa Perseus, no qual os dados brutos advindos da análise por espectrometria de massas (de ambas as réplicas técnicas e biológicas das construções LAG3-WT, EPDEL, KMUT e DMUT) foram adicionados. O teste t de duas amostras com correção de Benjamini-Hochberg fixada em FDR = 0,05 foi realizado. Dessa forma, foi realizada a análise entre cada uma das construções (CAR LAG3WT, EPDEL, KMUT e DMUT) versus a condição controle (células WT, sem os plasmídeos), a fim de avaliar a presença e o enriquecimento de cada uma das construções quando comparadas com o controle. Os resultados mostram que houve enriquecimento das construções CAR LAG3 WT, EPDEL, KMUT e DMUT. Tais resultados estão representados nas **figuras 4.18 a 4.21**, e o quadro com as proteínas encontradas

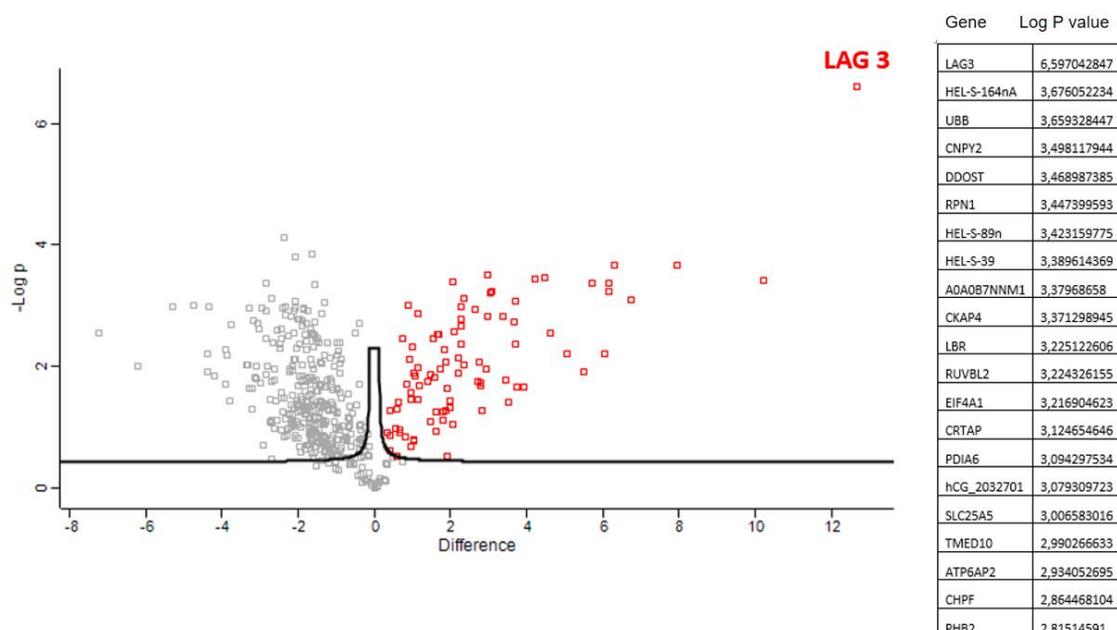


Figura 4.18. Volcano plot CAR LAG3WT x Controle. Volcano plot mostrando as proteínas encontradas com diferença estatisticamente significativa entre a condição CAR LAG3- WT (vermelho, direita) em relação a condição controle (preto, esquerda). As proteínas à direita e acima da linha do gráfico exibiram presença aumentada na condição LAG3 WT, com destaque para a própria proteína LAG3 WT que se encontra enriquecida. Já as proteínas a esquerda estão diminuídas em relação a LAG3 WT.

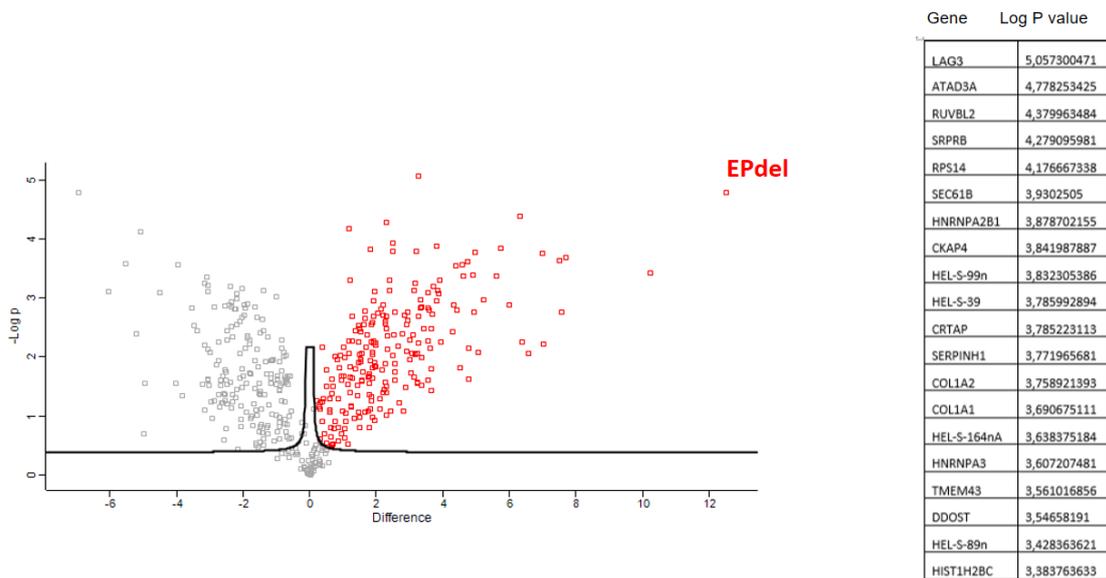


Figura 4.19. Volcano plot EPDEL x Controle. Volcano plot mostrando as proteínas encontradas com diferença estatisticamente significativa entre a condição EPDEL (vermelho, direita) em relação a condição controle (preto, esquerda). As proteínas à direita e acima da linha do gráfico exibiram presença aumentada na condição EPDEL, com destaque para a própria proteína EPDEL que se encontra enriquecida. Já as proteínas a esquerda estão diminuídas em relação a EPDEL.

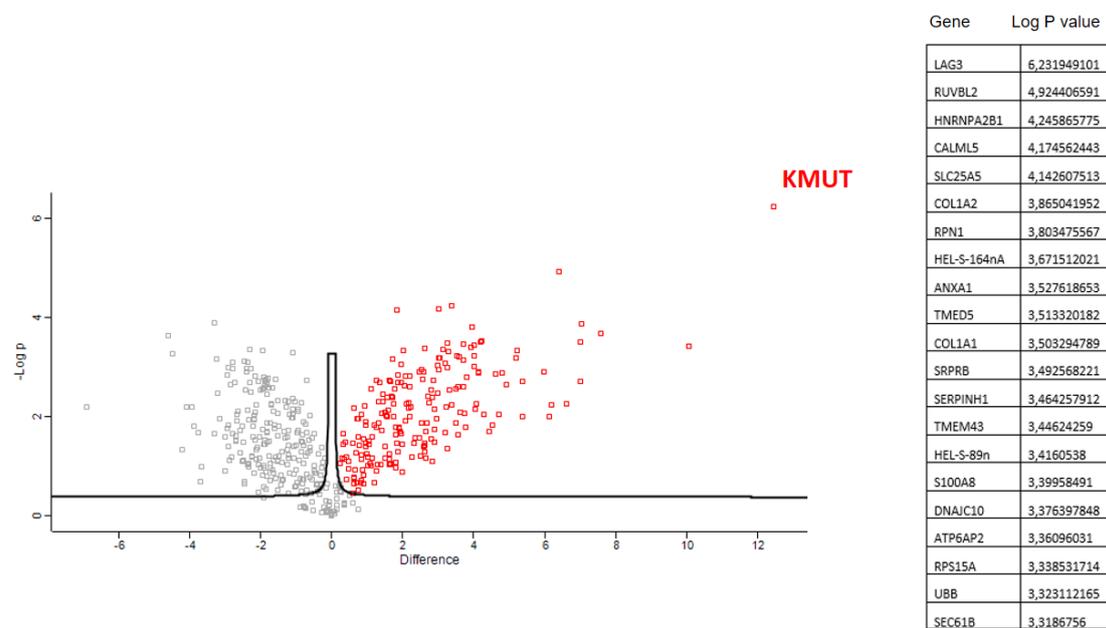


Figura 4.20. Volcano plot KMUT x Controle. Volcano plot mostrando as proteínas encontradas com diferença estatisticamente significativa entre a condição KMUT (vermelho, direita) em relação a condição controle (preto, esquerda). As proteínas a direita e acima da linha do gráfico exibiram presença aumentada na condição KMUT, com destaque para a própria proteína KMUT que se encontra enriquecida. Já as proteínas a esquerda estão diminuídas em relação a KMUT.

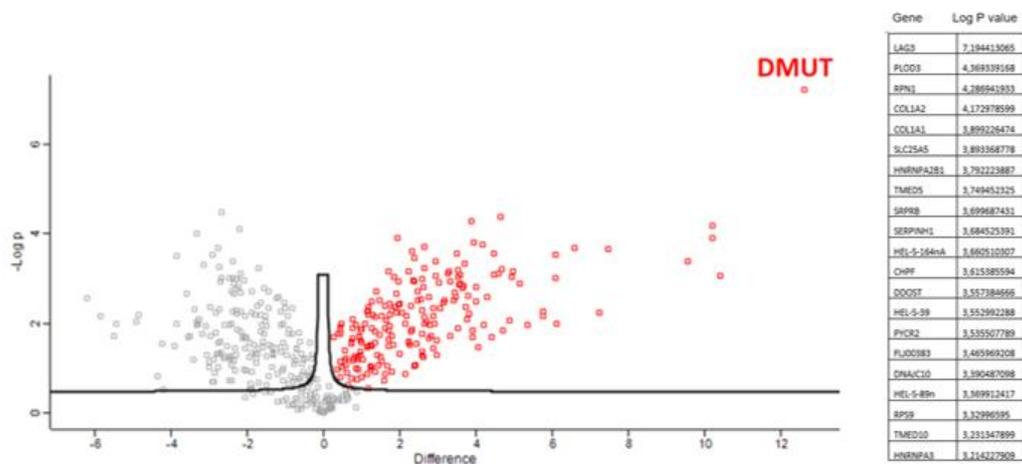


Figura 4.21. Volcano plot DMUT x Controle. Volcano plot mostrando as proteínas encontradas com diferença estatisticamente significativa entre a (continua próxima página) condição DMUT (vermelho, direita) em relação a condição controle (preto, esquerda). As proteínas a direita e acima da linha do gráfico exibiram expressão aumentada na condição DMUT, com destaque para a própria proteína DMUT que se encontra enriquecida. Já as proteínas a esquerda estão diminuídas em relação a DMUT.

4.5.2. Análise de componentes principais (PCA)

A análise de componentes principais (PCA), que avalia a diferença entre todas as diferentes condições envolvidas em um experimento, neste caso, CAR 20LAG3WT, EPDEL, KMUT e DMUT, também foi realizada. Pode-se observar que o padrão de distribuição das réplicas KMUT2 e EPDEL1 no gráfico da PCA corrobora o padrão destas duas amostras no gel, corado com azul de comassie e mostrando ausência de expressão consistente da construção transgênica, razão pela qual somente estas duas encontram-se mais próximas do controle, enquanto que as demais apresentam boa separação do mesmo. Tal resultado pode ser observado na **figura 4.22**.

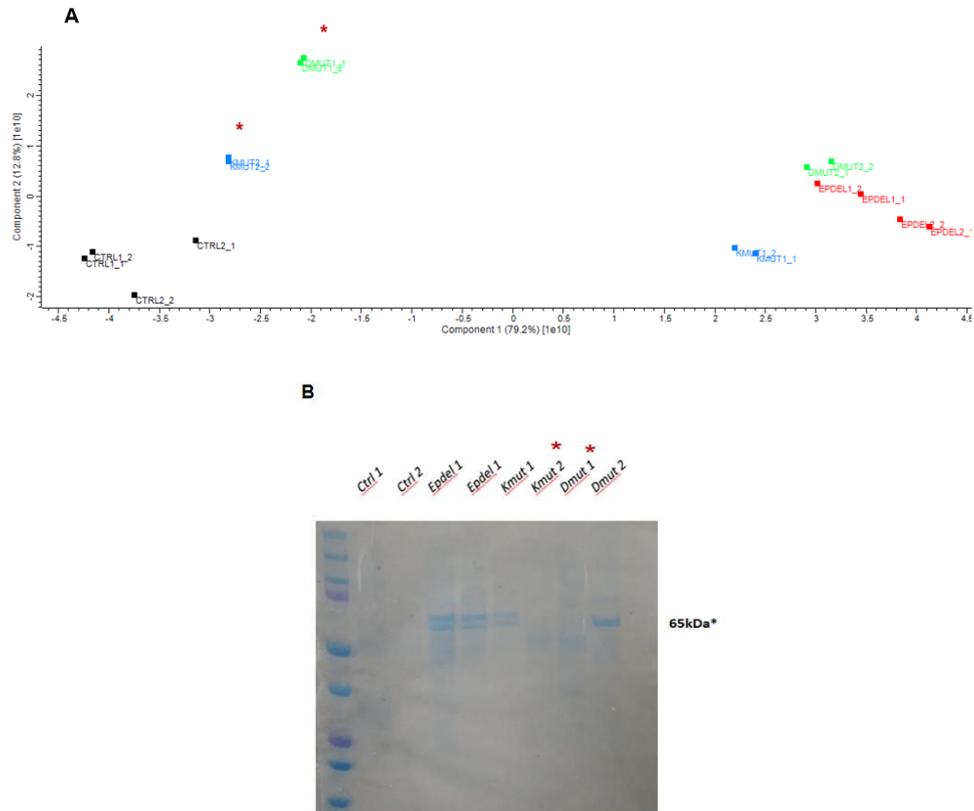


Figura 4.22. Análise de componentes principais (PCA). **A)** A análise de componentes principais mostra que houve similaridade entre as réplicas técnicas e biológicas de cada amostra (Preto= controle, Vermelho= EPDEL, Azul= KMUT, Verde= DMUT) e uma boa separação das mesmas em relação ao controle, com exceção da réplica KMUT2 e DMUT1, corroborando o padrão encontrado no **B)** respectivo gel corado com azul de comassie.

4.6. Localização da proteínas

4.6.1. Comparação de proteínas presentes entre LAG3WT e condições mutantes EPDEL, KMUT e DMUT

Proteínas que sejam encontradas na imunoprecipitação da condição CAR-LAGWT e não nas condições contendo as construções mutadas podem indicar que os domínios mutados comprometem determinadas interações proteicas. Desta forma, análises diferenciais foram realizadas.

O número de proteínas encontradas exclusivamente nas condições CARLAG3-WT quando comparada com as demais condições EPDEL, KMUT e DMUT, após o ensaio de imunoprecipitação, bem como a identificação das mesmas em células HEK 293T, pode ser observado nas **figuras 4.23, 4.24 e 4.25**, respectivamente.

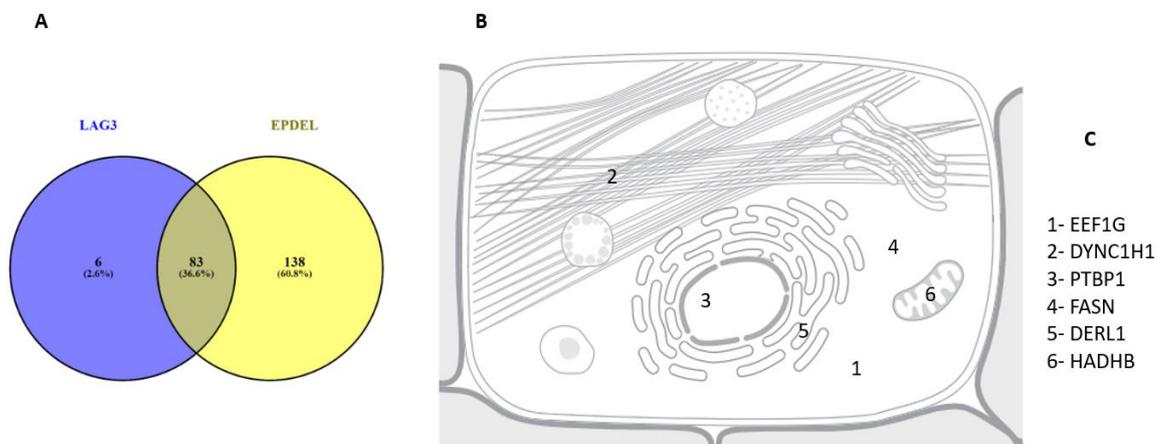


Figura 4.23. Diagrama de Venn CAR LAG3 WT x EDEL e proteínas presentes exclusivamente em LAG3WT. A= Diagrama de Venn representando o número de proteínas identificadas por espectrometria de massas, exclusivamente presentes nas condições CAR LAG3 WT, EPDEL, a sobreposição de proteínas encontradas nestas condições, bem como a localização das proteínas exclusivas de CAR-LAG3WT na célula (B). C: identificação das proteínas presentes apenas na condição CAR LAG3 WT..

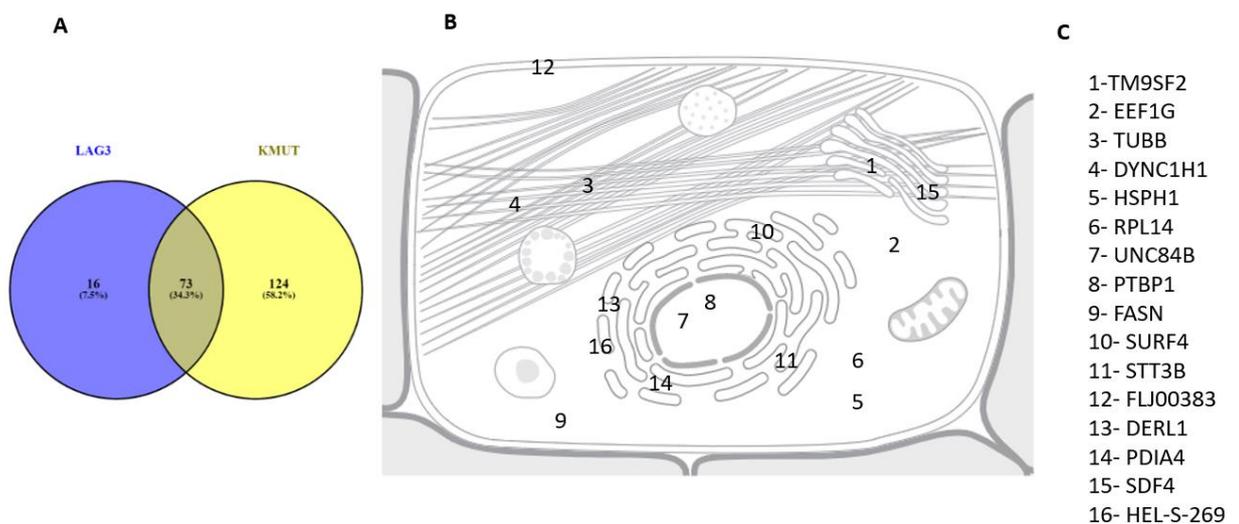


Figura 4.24. Diagrama de Venn CAR LAG3 WT x KMUT e proteínas presentes exclusivamente em LAG3WT. A: Diagrama de Venn representando o número de proteínas identificadas por espectrometria de massas, exclusivamente presentes nas condições CAR LAG3 WT, KMUT, a sobreposição de proteínas encontradas nestas condições, bem como a localização das mesmas na célula (B). C: identificação das proteínas.

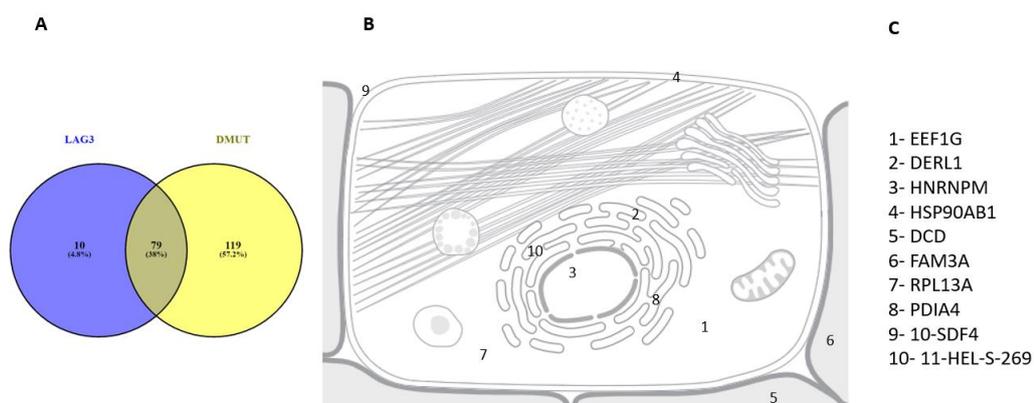


Figura 4.25. Diagrama de Venn CAR LAG3 WT x DMUT e proteínas presentes exclusivamente em LAG3WT. **A:** Diagrama de Venn representando o número de proteínas identificadas por espectrometria de massas, exclusivamente presentes nas condições CAR LAG3 WT, DMUT, a sobreposição de proteínas encontradas nestas condições, bem como a localização das mesmas na célula (**B**). **C:** identificação das proteínas.

Já o número de proteínas exclusivas encontradas em cada condição (CAR LAG3WT, EPDEL, KMUT e DMUT), quando comparadas simultaneamente entre si, permitem uma visualização ampla de cada interação exclusiva para cada uma das construções. Esta análise pode ser visualizada **figura 4.26**, e o quadro com as proteínas encontradas em cada uma destas condições pode ser observado no **apêndice 6**.

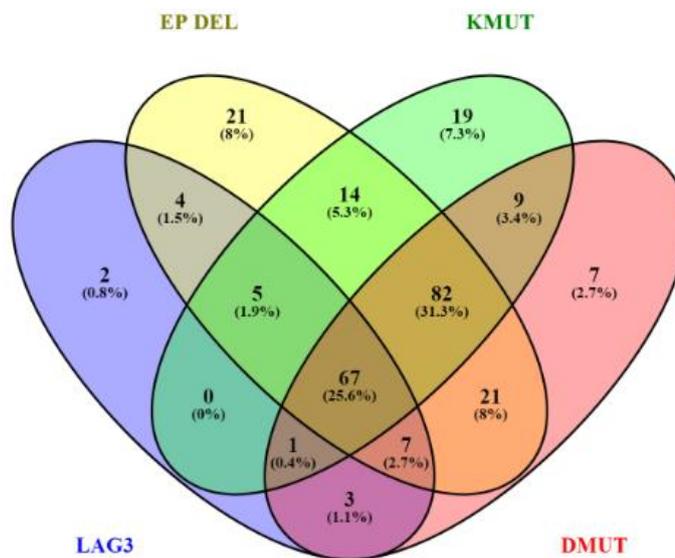


Figura 4.26. Diagrama de Venn comparando as proteínas únicas presentes nas condições CAR LAG3WT, EPDEL, KMUT e DMUT. Diagrama de Venn representando o número de proteínas identificadas por espectrometria de massas, exclusivamente presentes nas condições LAG3 WT, EPDEL, KMUT e DMUT e a sobreposição de proteínas encontradas nestas condições.

4.7. Vias de enriquecimento

A fim de identificar com quais vias de sinalização as proteínas encontradas como potenciais interações na condição CAR-LAG3WT estão relacionadas, quando comparada com a condição controle (sem o CAR LAG3-WT e demais mutantes), os nomes dos genes correspondentes às proteínas detectadas foram utilizados como Input na ferramenta KEGG. As vias de sinalização nas quais tais proteínas estão envolvidas podem ser observadas na **figura 4.27**.

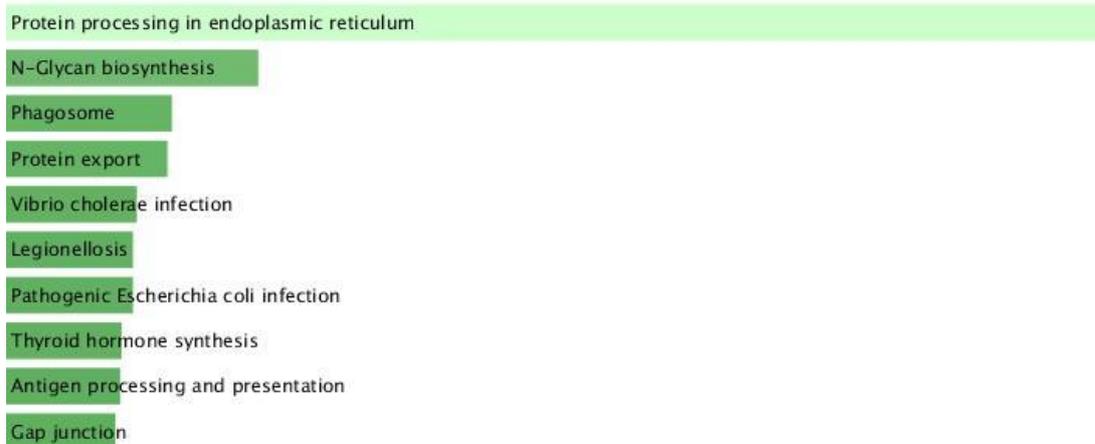


Figura 4.27. Representação das vias de sinalização relacionadas as proteínas encontradas exclusivamente na condição LAG3WT vs controles. As proteínas encontradas com diferença estatisticamente significativa na condição LAG3WT, quando comparada com a condição controle (células WT, sem CAR), foram utilizadas nesta análise de vias de enriquecimento.

Além disso, a fim de identificar com quais vias de sinalização as proteínas encontradas exclusivamente em cada uma das demais condições (CAR LAG3 WT, EPDEL, KMUT e DMUT) estavam relacionadas, a mesma análise foi feita mas, neste momento, baseada no diagrama de venn gerado quando todas as condições foram comparadas simultaneamente (**figura 4.26**). Tais vias podem ser analisadas através das figuras **4.28**, **4.29**, **4.30** e **4.31** respectivamente, para as condições LAG3WT, EPDEL, KMUT e DMUT.



Figura 4.28. Representação das vias de sinalização relacionadas as proteínas encontradas exclusivamente na condição LAG3WT vs mutantes. As proteínas encontradas com diferença estatisticamente significativa na condição LAG3WT, quando comparada com todas as demais condições (EPDEL, KMUT, DMUT), foram utilizadas nesta análise de vias de enriquecimento

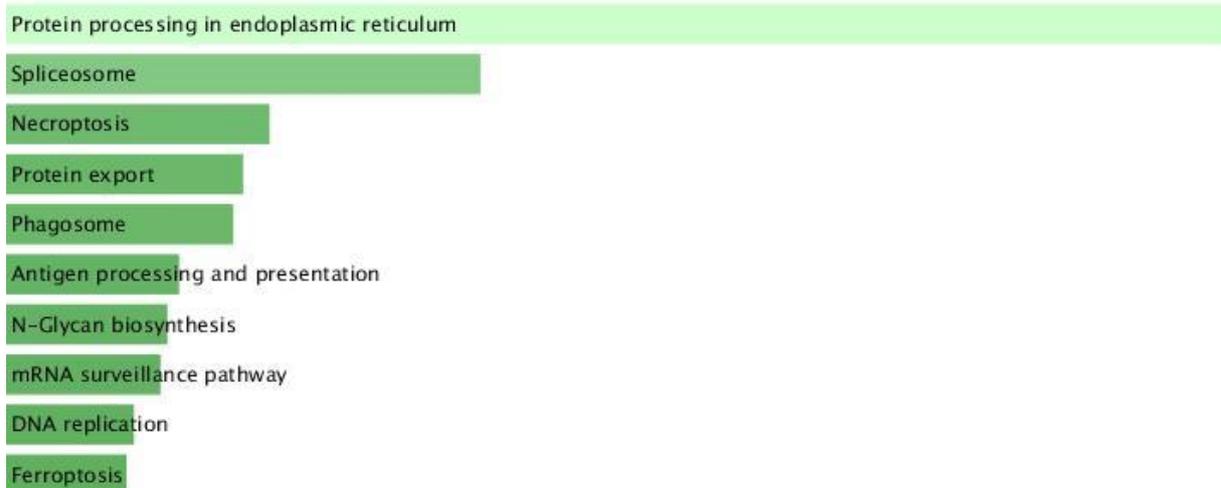


Figura 4.29. Representação das vias de sinalização relacionadas as proteínas encontradas exclusivamente na condição EPDEL vs demais construções de LAG3. As proteínas encontradas com diferença estatisticamente significativa na condição EPDEL, quando comparada com todas as demais condições (LAG3WT, KMUT, DMUT), foram utilizadas nesta análise de vias de enriquecimento.

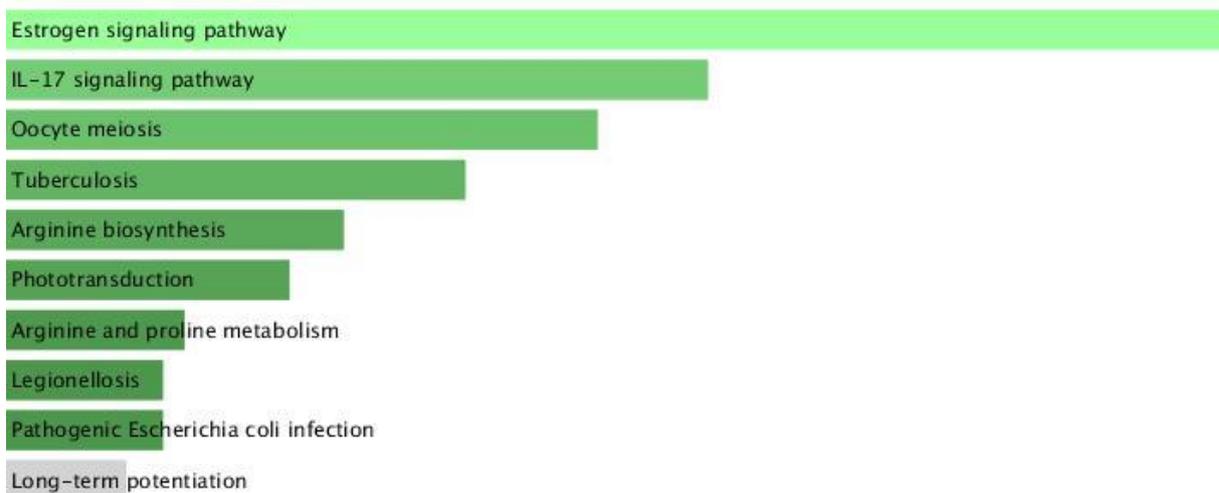


Figura 4.30. Representação das vias de sinalização relacionadas as proteínas encontradas exclusivamente na condição KMUT vs demais construções de LAG3. As proteínas encontradas com diferença estatisticamente significativa na condição KMUT, quando comparada com todas as demais condições (LAG3WT, EPDEL e DMUT), foram utilizadas nesta análise de vias de enriquecimento..

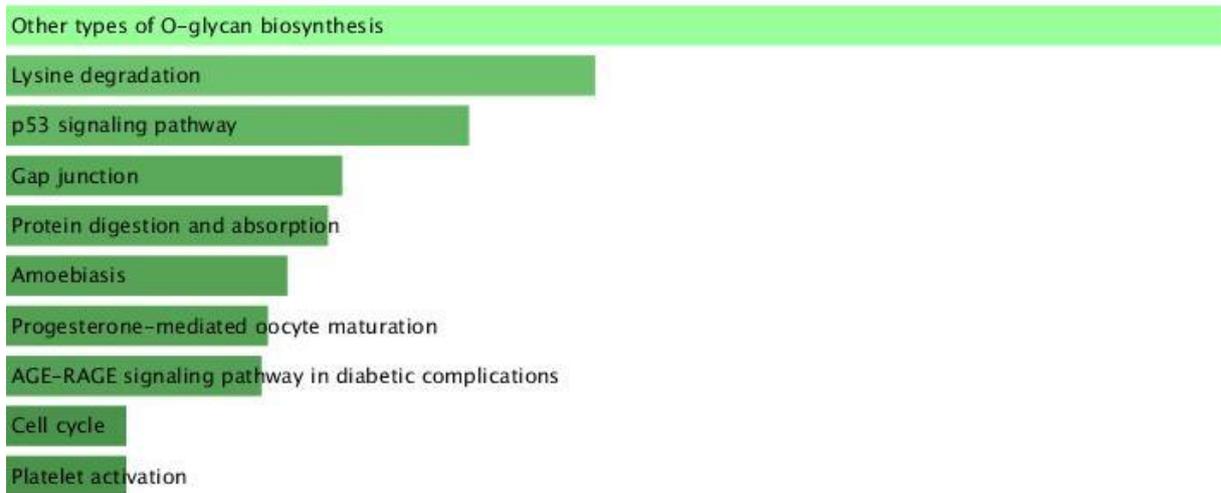


Figura 4.31. Representação das vias de sinalização relacionadas as proteínas encontradas exclusivamente na condição DMUT vs demais construções de LAG3. As proteínas encontradas com diferença estatisticamente significativa na condição DMUT, quando comparada com todas as demais condições (LAG3WT, EPDEL e KMUT), foram utilizadas nesta análise de vias de enriquecimento.

5. DISCUSSÃO

5.1. BioID em MOLT4

LAG-3 é atualmente considerado um importante receptor inibitório, com expressão aumentada, dentre outras subpopulações, em células T ativadas, Tregs e linfócitos infiltrantes de tumor (TILs) que apresentam um fenótipo de exaustão devido à exposição crônica ao antígeno. Dessa forma, alguns anticorpos bloqueadores foram desenvolvidos tanto para LAG-3 (DENG et al., 2016), quanto para outros receptores inibitórios como CTLA-4 e PD-1, a fim de reverter o quadro de exaustão das células T, fortalecendo ainda mais a área da imunoterapia como uma das abordagens terapêuticas mais promissoras das últimas décadas.

Foi observado que LAG-3 tende a ficar em compartimentos lisossomais em condições não ativadas (BAE *et. al.*, 2014) e identificar os mecanismos moleculares pelos quais este receptor é translocado para a superfície, bem como tem sua sinalização citoplasmática ativada, tem sido um desafio.

Para tentar responder a estas questões, BAE e colaboradores (2014) se basearam nos três motivos que constituem a cauda citoplasmática de LAG-3: um com sítios de fosforilação de serina, um com repetições de prolina e glutamina (motivo EP) e o mais conservado entre humanos, murinos e outras espécies, denominado KIEELE. Este grupo criou mutantes de cada um destes domínios a fim de identificar a relevância de um ou mais deles na sinalização de LAG-3.

Nas células T ativadas com PMA, a expressão deste receptor inibitório aumentou, devido à ativação da via de sinalização PKC induzida por PMA. A fim de comprovar a relação desta via com o aumento da expressão de LAG-3, foram utilizados inibidores de PKC, fato que culminou na diminuição da expressão deste IR, o que permitiu inferir a interação da via de sinalização da PKC com o aumento da expressão de LAG-3. Contudo, quando utilizaram os mutantes de LAG-3- um deles com a troca de uma serina do sítio de fosforilação por uma alanina, não houve aumento de expressão deste receptor, indicando que PKC na verdade não induz mudanças conformacionais diretamente em algum dos motivos da cauda citoplasmática de LAG-3, mas sim que pode interagir com alguns ligantes recrutados pelos seus motivos citoplasmáticos.

Dessa forma, a técnica BioID (ROUX *et. al.*, 2012), que se baseia na utilização de uma biotina ligase (BirA*2) mutada para biotinar proteínas de forma dependente de proximidade, vem ao encontro da tentativa de identificar proteínas que estejam interagindo com determinada proteína alvo, neste caso LAG-3, para exercer sua função.

Nossos resultados mostram que, após a geração dos receptores quiméricos de antígenos fusionados à cauda citoplasmática WT de LAG-3, bem como os mutantes sem o motivo EP (EPDEL), com o motivo KIEELE mutado (KMUT) e o duplo mutante (DMUT, contendo as duas últimas mutações simultaneamente), os CARs foram eletroporados na linhagem MOLT4 e estas células foram submetidas a seleção com a droga G418, a fim de gerar uma linhagem com expressão estável. O *western blot* realizado posteriormente para esta condição revelou um padrão de biotinação extenso somente na condição que continha, além do CAR com o motivo intracelular de LAG-3, a adição de biotina ao meio de cultura. Contudo, quando o western blot foi realizado para avaliar a presença do CARLAG3WT, a banda não foi observada. Com isso, uma nova tentativa de observá-la foi feita, incubando novamente a membrana ao reagente ECL femto, a fim de aumentar a sensibilidade de detecção. Neste experimento, pôde-se observar a banda de 65kDa referente ao CAR, mas em baixa intensidade.

Contudo, uma vez que o sinal de biotinação foi claro, a amostra foi submetida ao protocolo de preparação para análise no espectrômetro de massas. Após finalizado, a análise dos dados brutos utilizando o software Max Quant nos revelou que um baixo número de peptídeos (3) atribuídos ao CAR foi detectado na amostra, apesar do número de proteínas encontradas ter sido maior na condição com CAR e com biotina (452), quando comparada com as amostras controle (13 e 39 respectivamente para as células WT com biotina e com CAR sem biotina), indicando possível enriquecimento de proteínas após a purificação com esferas conjugadas a streptavidina. Este baixo número de peptídeos atribuídos a CARLAG3WT não nos permitiu analisar os dados sob o ponto de vista de diferença estatisticamente significativa, de forma que os mesmos foram visualizados através do software Scaffold viewer. De forma geral, o ensaio de BioID em células T nos permitiu inferir que a técnica pode ser realizada, mas que precisa de ampla otimização quando células T forem utilizadas como modelo, uma vez que tal técnica foi estabelecida em células

aderentes, como HEK293T e HeLa, e, até o momento, não há publicações utilizando a mesma em células do sistema imune. Este resultado também sugere que os níveis de expressão alcançado para a proteína carreando o BirA pode ser crítico para as aplicações do protocolo de BioID. Com isso, baseado na experiência do grupo colaborador na Itália em Imunoprecipitação, o processo de co-imunoprecipitar as proteínas foi escolhido para dar continuidade aos experimentos, tanto em células T como em células HEK 293T.

5.2. Imunoprecipitação em MOLT4

Após a realização da técnica BioID em células MOLT4, foi realizada com esta mesma linhagem celular a técnica de imunoprecipitação. Após realização do protocolo, o gel resultante foi corado com azul de comassie, no qual não pôde ser observada a banda corresponde ao peso molecular do CARLAG3WT (65kDa). No entanto, uma vez que no western blot a banda pôde ser claramente observada na condição com o CAR (IP_LAG3), as amostras foram preparadas para análise por espectrometria de massas.

O resultado revelou 15 proteínas exclusivamente presentes na condição com CARLAG3WT, quando comparada com a condição controle (IP_CTRL- sem o plasmídeo), e com a maior parte destas apresentando localização nuclear. Contudo, novamente, um baixo número de peptídeos atribuídos a LAG-3 foi encontrado na amostra com o CAR, o que não permitiu a realização de análises estatísticas. Dessa forma, os dados foram visualizados utilizando o software Scaffold viewer, o que nos permitiu averiguar, qualitativamente, que além de LAG3, a proteína RuvB-like 1 (Q9Y265) estava presente em ambos os ensaios (BioID e IP).

Esta proteína faz parte do complexo de proteínas capazes de ativar programas transcricionais associados a crescimento celular, mediados por proto-oncogenes e oncogenes. Além disso, através da análise utilizando a plataforma STRING, foi possível observar que RuvB-like 1 interage com Catenina beta 1 (CTNNB1), uma proteína associada à caderina. Tal proteína é componente chave da via de sinalização canônica de Wnt. Na ausência de Wnt, forma um complexo com outras proteínas, como AXIN1, AXIN2, APC, CSNK1A1 e GSK3B, o que permite a fosforilação nos resíduos de serina e treonina N-terminais das proteínas. LAG3 possui em seu domínio intracitoplasmático um motivo que possui 2 sítios de fosforilação de serina, de forma

que pode-se levantar a hipótese que RuvB-like 1 pode interagir com CTNNB1 para que a fosforilação destes sítios ocorra e desencadeie ativação das funções inibitórias de LAG3.

Contudo, uma vez que grande parte dos estudos de interações entre proteínas é realizado em células aderentes, bem como o próprio estabelecimento das técnicas, a linhagem de células HEK 293T foi escolhida como modelo para a realização dos experimentos seguintes.

5.3. Imunoprecipitação em HEK 293T

Primeiramente, as células WT (sem plasmídeo) e as que foram transfectadas com o plasmídeo que continha a sequência do CARLAG3WT foram submetidas à técnica de imunofluorescência para avaliar a presença do CAR nas células, o que indicou presença majoritariamente citoplasmática do CAR. Posteriormente, as amostras foram submetidas ao protocolo de imunoprecipitação, no qual pôde-se observar as bandas referentes ao CAR das diferentes construções e, dessa forma, as mesmas seguiram para preparação para análise por espectrometria de massas.

Os resultados indicaram que a construção CARLAG3WT estava presente de forma aumentada com diferença estatisticamente significativa em relação à amostra controle, e que o mesmo ocorreu para os CARs LAG3 EPDEL, KMUT e DMUT. Quando analisadas simultaneamente, através da análise de componente principal (PCA), também foi observada reprodutibilidade entre as réplicas e diferença entre as mesmas e as réplicas do controle, com exceção de uma réplica da condição KMUT e DMUT, o que foi consistente com o gel referente a todas estas amostras onde amostras com baixa expressão do transgene se comportavam no PCA de forma semelhante aos controles celulares não transfectados.

Após obtenção da lista final das proteínas presentes em cada condição, foi possível observar que, novamente, a proteína RubV-LIKE1, que estava presente no ensaio de IP com células MOLT4- CARLAG3WT, também estava presente no mesmo ensaio em células HEK 293T, na condição CAR 20LAG3WT, reforçando a hipótese que aponta esta célula como tendo uma potencial interação com LAG3.

Posteriormente, a lista de proteínas presentes na condição CARLAG3WT foi comparada separadamente com cada uma das demais construções com a finalidade de identificar potenciais parceiros de LAG3 que venham a ser perdidos quando

diferentes domínios intracelulares são mutados. As análises entre CARLAG3WT versus CARLAG3EPDEL e CAR 20LAG3WT versus CARLAG3KMUT mostrou que cinco proteínas se mantiveram, em ambas as análises, presentes exclusivamente na condição LAG3WT, sendo elas EEF1G (Fator de alongamento 1- gama), DYNC1H1 (Dineína citoplasmática 1 de cadeia pesada 1), PTBP1 (Proteína de ligação ao trato de polipirimidina 1), FASN (ácido graxo sintetase) e DERL1.

EEF1G age no alongamento de cadeias durante a síntese de polipeptídeos no ribossomo, além de interagir não covalentemente com caderina, uma proteína de membrana tipo I envolvida na adesão celular. Foi mostrado que desregulações em EEF1 podem resultar em perfis epigenéticos diferenciais, fato este que pode afetar o perfil transcricional como um todo, contribuindo para a carcinogênese (BITERGE-SUT, 2019). Já DYNC1H1 atua como um motor da motilidade retrógrada intracelular das vesículas e organelas ao longo dos microtúbulos (ARUN et al., 2013), e também já foi observado que mutações no gene desta proteína estão associadas a vários tipos de câncer (SUCULARI and ARSLANTAS, 2017). A proteína PTBP1 atua principalmente como reguladora negativa de splicing de mRNAs, enquanto que FASN catalisa a formação de ácidos graxos de cadeia longa a partir de acetil-CoA, malonil-CoA e NADPH. Por fim, é sabido que DERL1 é uma das componentes dos complexos responsáveis pela degradação associada ao retículo endoplasmático de proteínas com erros na sua configuração final (missfolding), uma vez que pode atuar formando um canal que permite a retrotranslocação destas proteínas que, posteriormente, serão ubiquitinadas e degradadas pelo proteassoma. Além disso, alguns estudos já mostraram que DERL1 pode funcionar como um oncogene em câncer do colo do útero através da via de sinalização AKT/ mTOR(LI et al., 2019), assim como sua superexpressão foi associada a um pior prognóstico em pacientes com câncer de pulmão de não pequenas células (MAO, ZHANG AND JIANG, 2018).

Apesar de estarem presentes exclusivamente na condição CARLAG3WT quando a comparadas com as condições EPDEL e KMUT, não se tem dados na literatura que realmente suportem uma possível interação destas proteínas com o domínio citoplasmático de LAG3 de forma que, neste momento, estes resultados fornecem apenas subsídios para futura confirmação destes possíveis candidatos a interações proteicas com LAG3.

Quando, por fim, a condição CARLAG3WT foi comparada com as proteínas encontradas na condição DMUT, foi observado que, das cinco proteínas presentes na condição CARLAG3WT quando comparada com LAG3 EPDEL e KMUT, apenas as proteínas EEF1G e DERL1 continuaram presentes exclusivamente na condição Wild Type. Por outro lado, foi observado que 3 novas proteínas estavam presentes tanto na condição LAG3 KMUT como DMUT, quando estas foram comparadas com CARLAG3WT, sendo elas: PDIA4 (dissulfito isomerase A4), HEL-S-269 (dissulfito isomerase) e SDF4 (calcium binding protein).

As proteínas PDIA4 e HEL-S-269 são capazes de realizar rearranjos das pontes dissulfito das proteínas (XU, SANKAR and NEAMATI, 2014), enquanto SDF44 pode regular atividades dependentes de cálcio no retículo endoplasmático. PDIA4 ainda está relacionada ao processamento e transporte de proteínas secretadas, e um estudo recém publicado (PENG et al., 2020) mostrou que PDIA4 se apresenta superexpressa em gliomas, e que tal proteína possui importância clínica na tumorigênese e progressão deste tipo tumoral. Contudo, novamente, não há dados na literatura que corroborem a interação destas proteínas com o domínio citoplasmático de LAG-3, sendo necessária futura validação destes dados, que estão inclusos nas perspectivas deste projeto.

Em um segundo momento, visando entender em quais vias de sinalização tais proteínas poderiam estar envolvidas, análises preliminares de enriquecimento de vias foram realizadas utilizando a plataforma KEGG. Com isso, quando a condição CARLAG3WT foi comparada com a condição controle, pôde-se observar que as vias de processamento de proteínas no retículo endoplasmático, de biossíntese de N-glicanos e exportação de proteínas foram encontradas como enriquecidas. Andrews (2017) postulou que LAG-3 pode ser glicosilada, de forma que podemos correlacionar preliminarmente esta informação e o enriquecimento da via de biossíntese de N-glicanos com base nos dados obtidos da análise por espectrometria de massas.

Posteriormente, a mesma análise foi feita entre todas as condições (CARLAG3WT, EPDEL, KMUT e DMUT), simultaneamente, considerando-se somente as proteínas únicas presentes em cada condição. Desta forma, foi observado que a via de processamento de proteínas no retículo endoplasmático e a via de exportação de proteínas estiveram presentes como enriquecidas em quase todas as condições. Já na condição KMUT, a via de sinalização de estrógeno e da interleucina

17 (IL-17) foram obtidas como enriquecidas. Além destas, a via de exportação de proteínas também esteve presente para a condição KMUT e DMUT, sendo que nesta última, a de síntese de N- glicanos também foi observada, novamente nos levando a inferir uma possível correlação entre a necessidade de glicosilação de LAG-3 para sua função inibitória, além da via da proteína p53, para a qual se tem vários dados na literatura mostrando que a perda ou mutação desse gene supressor de tumor (TP53) resulta em um risco fortemente aumentado de desenvolvimento de câncer. Além disso, perdas ou mutações neste gene podem afetar também o recrutamento e a atividade de mielóides e Células T, permitindo a evasão imunológica e promovendo a progressão do câncer (BLAGIH, BUCK and VOUSDEN, 2020), o que nos permite inferir preliminarmente que as vias de sinalização de p53 e LAG-3 podem compartilhar proteínas comuns, cruciais para a atividade inibitória de LAG-3.

6. CONCLUSÕES

- Os receptores quiméricos de antígenos (CARs) contendo o domínio extracelular scFv anti-CD20 e intracelular com os diferentes motivos de LAG-3 (Wild Type, EPDEL, KMUT e DMUT), foram sintetizados e clonados in frame ao domínio BirA*2.
- Os CARs foram eletroporados nas linhagens MOLT4 e transfectados na linhagem HEK293FT, com expressão verificada através de citometria de fluxo, western blot e imunofluorescência.
- Para a técnica de BioID, foi verificado o padrão esperado de biotinylation, bem como aumento do número de proteínas na condição CAR com biotina, mas não para a presença do CAR pós purificação com esferas conjugadas a streptavidina, indicando necessidade de otimização da técnica em células T.
- Para a técnica de imunoprecipitação em MOLT4 foi observada por western blot a presença do CAR após purificação com esferas de sefarose revestidas com proteína G por western blot, e a lista final mostrou 15 potenciais novos interatores de LAG3WT. Contudo, o número de peptídeos atribuídos a LAG3 WT foi baixo, o que não permitiu a realização de análises estatísticas, também indicando necessidade de otimização em células T.
- A realização da técnica de imunoprecipitação em células HEK 293T revelou novamente a proteína RuV-LIKE1, também presente nos ensaios com a linhagem MOLT4.
- A imunoprecipitação em HEK293T permitiu observar que as proteínas EEF1G, DYNC1H1, PTBP1, FASN e DERL1 estavam presentes exclusivamente na condição LAG-3WT, quando esta foi comparada com as condições EPDEL e KMUT
- O ensaio de IP em células HEK293T mostrou que três proteínas, PDIA4, SDF4 e HEL-S-269, estavam presentes exclusivamente na lista da condição LAG3WT, quando esta foi comparada com as condições KMUT e DMUT.

- Vias de processamento de proteínas no retículo endoplasmático, de biossíntese de N- glicanos e exportação de proteínas foram encontradas como enriquecidas em diversas análises.
- A via de processamento de proteínas no retículo endoplasmático esteve presente como enriquecida em todas as condições avaliadas, assim como a via de spliceossomo, que só não se apresentou enriquecida na análise considerando as proteínas exclusivas do CARLAG3WT.
- Na condição KMUT, além via de processamento de proteínas no retículo endoplasmático e spliceossomo, a via de processamento e apresentação de antígenos, assim como a via da interleucina 17 (IL-17) foram obtidas como enriquecidas.
- A via de exportação de proteínas aparece como enriquecida nas condições KMUT e DMUT, sendo que, nesta última, a de síntese de N- glicanos também foi observada.

7. PERSPECTIVAS

- Validar as proteínas identificadas por citometria de fluxo e / ou análise de western blot, além de ensaios de co imunoprecipitação.
- Realizar testes funcionais para analisar a função das proteínas validadas em termos da atividade inibitória de LAG3 na ativação de linfócitos T.

REFERÊNCIAS

- ARUN V, WORRELL L, WILEY JC, KAPLAN DR, GUHA A. NEUROFIBROMIN INTERACTS WITH THE CYTOPLASMIC DYNEIN HEAVY CHAIN IN MELANOSOMES OF HUMAN MELANOCYTES. **FEBS LETT.** 587(10):1466-73. 2013.
- BAE J, LEE SJ, PARK CG, LEE YS, CHUN T. TRAFFICKING OF LAG-3 TO THE SURFACE ON ACTIVATED T CELLS VIA ITS CYTOPLASMIC DOMAIN AND PROTEIN KINASE C SIGNALING. **J IMMUNOL.** 193(6):3101-12. 2014.
- BAITSCH L, BAUMGAERTNER P, DEVÈVRE E, *ET AL.* EXHAUSTION OF TUMORSPECIFIC CD8(+) T CELLS IN METASTASES FROM MELANOMA PATIENTS. **J CLIN INVESTIG.** 121:2350–2360. 2011.
- BARNES, D.W.H., CORP, M.J., LOUTIT, J.F. & NEAL, F.E. TREATMENT OF MURINE LEUKAEMIA WITH X-RAYS AND HOMOLOGOUS BONE MARROW. **BRITISH MEDICAL JOURNAL.** II, 626–627. 1956.
- BITERGE-SUT B. ALTERATIONS IN EUKARYOTIC ELONGATION FACTOR COMPLEX PROTEINS (EEF1S) IN CANCER AND THEIR IMPLICATIONS IN EPIGENETIC REGULATION. **LIFE SCI.** 1;238:116977. 2019.
- BLAGIH J, BUCK MD AND VOUSDEN KH. P53, CANCER AND THE IMMUNE RESPONSE. **JOURNAL OF CELL SCIENCE.** 2020.
- BLEAKLEY, M.; RIDDELL, S. R. MOLECULES AND MECHANISMS OF THE GRAFT-VERSUS-LEUKAEMIA EFFECT. **NATURE REVIEWS CANCER**, V. 4, N. 5, P. 371–380. 2004.
- BRAHMER JR, TYKODI SS, CHOW LQ, *ET AL.* SAFETY AND ACTIVITY OF ANTIPD-L1 ANTIBODY IN PATIENTS WITH ADVANCED CANCER. **N ENGL J MED.** 366:2455–2465. 2012.
- BRIGNONE C, ESCUDIER B, GRYGAR C, MARCU M, TRIEBEL F. A PHASE I PHARMACOKINETIC AND BIOLOGICAL CORRELATIVE STUDY OF IMP321, A NOVEL MHC CLASS II AGONIST, IN PATIENTS WITH ADVANCED RENAL CELL CARCINOMA. **CLIN CANCER RES.** 15:6225–6231. 2009.
- CAMISASCHI C, CASATI C, RINI F, *ET AL.* LAG-3 EXPRESSION DEFINES A SUBSET OF CD4(+)CD25(HIGH)FOXP3(+) REGULATORY T CELLS THAT ARE EXPANDED AT TUMOR SITES. **J IMMUNOL.** 184:6545–6551. 2010.
- CHAPMAN-SMITH, A., AND J.E. CRONAN JR. MOLECULAR BIOLOGY OF BIOTIN ATTACHMENT TO PROTEINS. **J. NUTR.** 129(2S, SUPPL):477S–484S. 1999.
- CHICAYBAM L, SODRE AL, CURZIO BA, BONAMINO MH. AN EFFICIENT LOW COST METHOD FOR GENE TRANSFER TO T LYMPHOCYTES. **PLOS ONE.** 8(3):E60298. 2013.

CHOI-RHEE, E., H. SCHULMAN, AND J.E. CRONAN. PROMISCUOUS PROTEIN BIOTINYLATION BY ESCHERICHIA COLI BIOTIN PROTEIN LIGASE. **PROTEIN SCI.** 13:3043– 3050. 2004.

clinicaltrials.gov. Disponível em: <<https://www.clinicaltrials.gov/>> Acesso em 28 de Maio de 2018.

COLEY, W. B. THE TREATMENT OF MALIGNANT TUMORS BY REPEATED INOCULATIONS OF ERYSIPELAS: WITH A REPORT OF TEN ORIGINAL CASES. **THE AMERICAN JOURNAL OF THE MEDICAL SCIENCES**, V. 105, N. 5, P. 487. 1893.

COLEY H, MCLAREN JR. COLEY TOXINS – THE FIRST CENTURY. **ADV EXP MED BIOL.** 1990;267:483.

CRONAN, J.E. 2005. TARGETED AND PROXIMITY-DEPENDENT PROMISCUOUS PROTEIN BIOTINYLATION BY A MUTANT ESCHERICHIA COLI BIOTIN PROTEIN LIGASE. **J. NUTR. BIOCHEM.** 16:416–418. [HTTP://DX.DOI.ORG/10.1016/J.JNUTBIO.2005.03.017](http://dx.doi.org/10.1016/j.jnutbio.2005.03.017).

DAIGLE, N., J. BEAUDOUIN, L. HARTNELL, G. IMREH, E. HALLBERG, J. LIPPINCOTT-SCHWARTZ, AND J. ELLENBERG. NUCLEAR PORE COMPLEXES FORM IMMOBILE NETWORKS AND HAVE A VERY LOW TURNOVER IN LIVE MAMMALIAN CELLS. **J. CELL BIOL.** 154:71–84. 2001.

DENG WW, MAO L, YU GT, ET AL. LAG-3 CONFERS POOR PROGNOSIS AND ITS BLOCKADE RESHAPES ANTITUMOR RESPONSE IN HEAD AND NECK SQUAMOUS CELL CARCINOMA. **ONCOIMMUNOLOGY.** 2016.

DONG H, ET AL. B7-H1, A THIRD MEMBER OF THE B7 FAMILY, CO-STIMULATES T- CELL PROLIFERATION AND INTERLEUKIN-10 SECRETION. **NAT MED.** 5:1365–1369. 1999.

DUMIC J, DABELIC S, FLOGEL M. GALECTIN-3: AN OPEN-ENDED STORY. **BIOCHIMICA ET BIOPHYSICA ACTA.** 1760:616–635. 2006.

FEDOROV VD, THEMELI M AND SADELAIN M. PD-1– AND CTLA-4–BASED INHIBITORY CHIMERIC ANTIGEN RECEPTORS (ICARS) DIVERT OFF-TARGET IMMUNOTHERAPY RESPONSES. **SCI TRANSL MED.** 11; 5(215): 215RA172. 2013.

FERLAY, J. et al. CANCER INCIDENCE AND MORTALITY WORLDWIDE: SOURCES, METHODS AND MAJOR PATTERNS IN GLOBOCAN 2012. **INTERNATIONAL JOURNAL OF CANCER.** V. 136, N. 5, P. 359-386. 2015.

GELDRES C, SAVOLDO B, DOTTI G. CHIMERIC ANTIGEN RECEPTOR-REDIRECTED T CELLS RETURN TO THE BENCH CLAUDIA GELDRES, EXPERIMENTAL TRANSPLANTATION AND IMMUNOLOGY BRANCH. **SEMIN IMMUNOL.** 28(1): 3–9. 2015.

GUBIN MM, ZHANG X, SCHUSTER H, CARON E, WARD JP, NOGUCHI T, IVANOVA Y, HUNDAL J, ARTHUR CD, KREBBER WJ, ET AL. CHECKPOINT BLOCKADE CANCER IMMUNOTHERAPY TARGETS TUMOUR-SPECIFIC MUTANT ANTIGENS. **NATURE**. 515(7528):577–81. 2014.

HALLMARKS OF CANCER: THE NEXT GENERATION HANAHAN D AND WEINBERG R. **CELL** 144. 646-674. 2011.

HODI FS, ET AL. IMPROVED SURVIVAL WITH IPILIMUMAB IN PATIENTS WITH METASTATIC MELANOMA. **N. ENGL. J. MED.** 363:711–723. 2010.

HOYOS V, SAVOLDO B, DOTTI G. GENETIC MODIFICATION OF HUMAN T LYMPHOCYTES FOR THE TREATMENT OF HEMATOLOGIC MALIGNANCIES. **HAEMATOLOGICA**. 97(11): 1622–1631. 2012.

HUARD B, PRIGENT P, TOURNIER M, BRUNIQUEL D, TRIEBEL F. CD4/MAJOR HISTOCOMPATIBILITY COMPLEX CLASS II INTERACTION ANALYZED WITH CD4- AND LYMPHOCYTE ACTIVATION GENE-3 (LAG-3)-IG FUSION PROTEINS. **EUROPEAN JOURNAL OF IMMUNOLOGY**. 25:2718–2721. 1995.

IMAI C, MIHARA K, ANDREANSKY M, NICHOLSON IC, PUI CH, GEIGER TL, ET AL. CHIMERIC RECEPTORS WITH 4-1BB SIGNALING CAPACITY PROVOKE POTENT CYTOTOXICITY AGAINST ACUTE LYMPHOBLASTIC LEUKEMIA. **LEUKEMIA**. 18(4):676–84. 2004.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA. COORDENAÇÃO DE PREVENÇÃO E VIGILÂNCIA. **ESTIMATIVA 2020 : INCIDÊNCIA DE CÂNCER NO BRASIL / INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA**. COORDENAÇÃO DE PREVENÇÃO E VIGILÂNCIA. – RIO DE JANEIRO,: INCA, 2019.

IOUZALEN N, ANDREAE S, HANNIER S, TRIEBEL F. LAP, A LYMPHOCYTE ACTIVATION GENE-3 (LAG-3)-ASSOCIATED PROTEIN THAT BINDS TO A REPEATED EP MOTIF IN THE INTRACELLULAR REGION OF LAG-3, MAY PARTICIPATE IN THE DOWN-REGULATION OF THE CD3/TCR ACTIVATION PATHWAY. **EUROPEAN JOURNAL OF IMMUNOLOGY**. 31:2885–2891. 2001.

KEIR ME, ET AL. PD-1 AND ITS LIGANDS IN TOLERANCE AND IMMUNITY. **ANNU REV IMMUNOL**. 26:677– 704. 2008.

KESSLER, J. H.; MELIEF, C. J. M. IDENTIFICATION OF T-CELL EPITOPES FOR CANCER IMMUNOTHERAPY. **LEUKEMIA**. V. 21, N. 9, P. 1859–1874. 2007.

KLEIN, J. & SATO, A. THE HLA SYSTEM. **N. ENGL. J. MED.** 343, 702–709. 2000.

KOLB, H. J.; SCHATTENBERG, A.; GOLDMAN, J. M. GRAFT-VERSUS-LEUKEMIA EFFECT OF DONOR LYMPHOCYTE TRANSFUSIONS IN MARROW GRAFTED PATIENTS. EUROPEAN GROUP FOR BLOOD AND MARROW TRANSPLANTATION WORKING PARTY. **BLOOD**. 1;86(5):2041-50. 1995.

KWON, K., AND D. BECKETT. FUNCTION OF A CONSERVED SEQUENCE MOTIF IN BIOTIN HOLOENZYME SYNTHETASES. **PROTEIN SCI**. 9:1530–1539. 2000.

KWON, K., E.D. STREAKER, S. RUPARELIA, AND D. BECKETT. MULTIPLE DISORDERED LOOPS FUNCTION IN COREPRESSOR-INDUCED DIMERIZATION OF THE BIOTIN REPRESSOR. **J. MOL. BIOL**. 304:821–833. 2000.

LATCHMAN Y, ET AL. PD-L2 IS A SECOND LIGAND FOR PD-1 AND INHIBITS T CELL ACTIVATION. **NAT IMMUNOL**. 2:261–268. 2001.

LEE C. COIMMUNOPRECIPITATION ASSAY. **Methods Mol Biol**. 362:401–406. 2007.

LI L, LIU M, ZHANG Z, ZHANG W, LIU N, SHENG X, WEI P. DERLIN1 FUNCTIONS AS AN ONCOGENE IN CERVICAL CANCER VIA AKT/MTOR SIGNALING PATHWAY. **BIOL RES**. 2019 27;52(1):8.

LIN, JS and LA,EM. **PROTEIN–PROTEIN INTERACTIONS: CO-IMMUNOPRECIPITATION**. SPRINGER PROTOCOLS, 2017.

MAO M, ZHANG J, JIANG J. OVEREXPRESSION OF DERLIN-1 IS ASSOCIATED WITH POOR PROGNOSIS IN PATIENTS WITH NON-SMALL CELL LUNG CANCER. **ANN CLIN LAB SCI**. JAN;48(1):29-34. 2018.

MILLER, R. A. et al. TREATMENT OF B-CELL LYMPHOMA WITH MONOCLONAL ANTI-IDIOTYPE ANTIBODY. **THE NEW ENGLAND JOURNAL OF MEDICINE**, V. 306, n. 9, p. 517–522. 1982.

NIRSCHL, C. J.; DRAKE, C. G. MOLECULAR PATHWAYS: COEXPRESSION OF IMMUNE CHECKPOINT MOLECULES: SIGNALING PATHWAYS AND IMPLICATIONS FOR CANCER IMMUNOTHERAPY. **CLINICAL CANER RESEARCH: AN OFFICIAL JOURNAL OF THE AMERICAN ASSOCIATION FOR CANCER RESEARCH**. V. 19, N. 18, P. 4917–4924. 2013.

Peng Z, Chen Y, Cao H, Zou H, Wan X, Zeng W, Liu Y, Hu J, Zhang N, Xia Z, Liu Z, Cheng Q. Protein disulfide isomerases are promising targets for predicting the survival and tumor progression in glioma patients. **AGING** (Albany NY). v.12(3); 2020.

PULE MA, STRAATHOF KC, DOTTI G, HESLOP HE, ROONEY CM, BRENNER MK. A CHIMERIC T CELL ANTIGEN RECEPTOR THAT AUGMENTS CYTOKINE RELEASE AND SUPPORTS CLONAL EXPANSION OF PRIMARY HUMAN T CELLS. **MOL THER**. 12(5):933–41. 2005.

ROBERT C, ET AL. IPILIMUMAB PLUS DACARBAZINE FOR PREVIOUSLY UNTREATED METASTATIC MELANOMA. **N. ENGL. J. MED.** 364:2517–2526. 2011.

ROUX KJ, KIM IN D, BURKE B. BIOID: A SCREEN FOR PROTEIN-PROTEIN INTERACTIONS. **CURRENT PROTOCOLS IN PROTEIN SCIENCE.** 19.23.1-19.23.14. 2013.

SHARMA P, WAGNER K, WOLCHOK JD, ALISSON JP. NOVEL CANCER IMMUNOTHERAPY AGENTS WITH SURVIVAL BENEFIT: RECENT SUCCESSES AND NEXT STEPS. **NAT REV CANCER.** 11(11): 805–812. 2012.

SOFFIENTINI, PAOLO and BACHI, ANGELA. STAGE-digging: A novel in-gel digestion processing for proteomics samples. **Journal of Proteomics.** 140 (2016) 48–54. 2016.

SUCULARLI, C., & ARSLANTAS, M. Computational prediction and analysis of deleterious cancer associated missense mutations in DYNC1H1. **Molecular and Cellular Probes,** 34, 21–29. .2017.

TAYLOR RT, BEST SM. 2011. Assessing ubiquitination of viral proteins: Lessons from flavivirus NS5. *Methods* 55: 166–171. CrossRefMedlineGoogle Scholar

YOU B, HUANG S, QIN Q, YI B, YUAN Y, XU Z, SUN J. 2013. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase interacts with proapoptotic kinase mst1 to promote cardiomyocyte apoptosis. *PLoS One* 8: e58697. Google Scholar

TOPALIAN SL, HODI FS, BRAHMER JR, ET AL. SAFETY, ACTIVITY, AND IMMUNE CORRELATES OF ANTI-PD-1 ANTIBODY IN CANCER. **N ENGL J MED.** v.366, n26, p. 2443–2454. 2012.

TRIEBEL F, JITSUKAWA S, BAIXERAS E, ROMAN-ROMAN S, GENEVEE C, VIEGAS-PEQUIGNOT E, HERCEND T. LAG-3, A NOVEL LYMPHOCYTE ACTIVATION GENE CLOSELY RELATED TO CD4. **THE JOURNAL OF EXPERIMENTAL MEDICINE.** 171:1393–1405. 1990.

(<https://bioinfoqpcnbcn.csic.es/tools/venny/>)

VOGELSANG, G. B., LEE, L. & BENSON-KENNEDY, D. M. PATHOGENESIS AND TREATMENT OF GRAFT-VERSUS-HOST DISEASE AFTER BONE MARROW TRANSPLANT. **ANNU. REV. MED.** 54, 29–52. 2003.

XU F, LIU J, LIU D, LIU B, WANG M, HU Z, DU X, ET AL. LSECTIN EXPRESSED ON MELANOMA CELLS PROMOTES TUMOR PROGRESSION BY INHIBITING ANTITUMOR T-CELL RESPONSES. **CANCER RESEARCH.** 74:3418–3428. 2014.

XU S, SANKAR S, NEAMATI N. PROTEIN DISULFIDE ISOMERASE: A PROMISING TARGET FOR CANCER THERAPY. **DRUG DISCOV TODAY.** 19:222–40. 2014.

WEINER, L. M.; MURRAY, J. C.; SHUPTRINE, C. W. ANTIBODY-BASED IMMUNOTHERAPY OF CANCER. **CELL**. V. 148, N. 6, P. 1081–1084. 2012.

WIEMANN, B.; STARNES, C. O. COLEY'S TOXINS, TUMOR NECROSIS FACTOR AND CANCER RESEARCH: A HISTORICAL PERSPECTIVE. **PHARMACOLOGY & THERAPEUTICS**, V. 64, N. 3, P. 529–564. 1994.

WOLCHOK, J. D. ET AL. NIVOLUMAB PLUS IPILIMUMAB IN ADVANCED MELANOMA. **THE NEW ENGLAND JOURNAL OF MEDICINE**. V 369, N. 2, P. 122–133. 2013.

WORKMAN CJ, DUGGER KJ, VIGNALI DA. CUTTING EDGE: MOLECULAR ANALYSIS OF THE NEGATIVE REGULATORY FUNCTION OF LYMPHOCYTE ACTIVATION GENE-3. **JOURNAL OF IMMUNOLOGY**. 169:5392–5395. 2002.

WYKES MN, LEWIN SR. IMMUNE CHECKPOINT BLOCKADE IN INFECTIOUS DISEASES. **NAT REV IMMUNOL**.18(2):91-104. 2018.

8. APÊNDICES

8.1. Apêndice 1: Quadro de proteínas encontradas no ensaio de BiID em células MOLT4

| Accession | Protein Name | Accession | Protein Name |
|------------|----------------------------------------|-----------|-------------------------------------------------|
| P46063 | ATP-dependent DNA helicase Q1 O | Q9BSJ8 | Extended synaptotagmin-1 OS=Homo sapie |
| Q13423 | NAD(P) transhydrogenase, mitoch | P61011 | Signal recognition particle 54 kDa protein OS |
| Q9NQ55 | Suppressor of SWI4 1 homolog OS | P11766 | Alcohol dehydrogenase class-3 OS=Homo s |
| P46013 | Proliferation marker protein Ki-67 O | Q9H4L4 | Sentrin-specific protease 3 OS=Homo sapie |
| P49916 | DNA ligase 3 OS=Homo sapiens G | P63241 | Eukaryotic translation initiation factor 5A-1 O |
| Q53HW7 | Sulfide dehydrogenase like (Fragm | Q96A26 | Protein FAM162A OS=Homo sapiens GN=FA |
| Q96CW1 | AP-2 complex subunit mu OS=Hom | O95758 | Polypyrimidine tract-binding protein 3 OS=H |
| B2RWN5 | HEAT repeat containing 1 OS=Hom | P14635 | G2/mitotic-specific cyclin-B1 OS=Homo sapi |
| Q96F07 | Cytoplasmic FMR1-interacting prote | P51649 | Succinate-semialdehyde dehydrogenase, m |
| P08574 | Cytochrome c1, heme protein, mito | Q15008 | 26S proteasome non-ATPase regulatory sub |
| Q6PKG0 | La-related protein 1 OS=Homo sapi | Q9Y512 | Sorting and assembly machinery componen |
| Q14527 | Helicase-like transcription factor OS | Q5T9A4 | ATPase family AAA domain-containing protei |
| O75691 | Small subunit processome compor | Q14669 | E3 ubiquitin-protein ligase TRIP12 OS=Hom |
| P57088 | Transmembrane protein 33 OS=Ho | Q9NXG2 | THUMP domain-containing protein 1 OS=Ho |
| O00410 | Importin-5 OS=Homo sapiens GN= | P20618 | Proteasome subunit beta type-1 OS=Homo s |
| Q5JY65 | Crooked neck-like protein 1 OS=Ho | Q6IPN0 | Reticulon OS=Homo sapiens GN=RTN4 PE |
| Q9Y2L1 | Exosome complex exonuclease RR | P18031 | Tyrosine-protein phosphatase non-receptor |
| P00387 | NADH-cytochrome b5 reductase 3 C | P19525 | Interferon-induced, double-stranded RNA-ac |
| Q9NXF1 | Testis-expressed sequence 10 prot | P62258 | 14-3-3 protein epsilon OS=Homo sapiens G |
| P55039 | Developmentally-regulated GTP-bin | O75746 | Calcium-binding mitochondrial carrier protei |
| P51148 | Ras-related protein Rab-5C OS=Ho | P55084 | Trifunctional enzyme subunit beta, mitochon |
| O94874 | E3 UFM1-protein ligase 1 OS=Hom | Q96QC0 | Serine/threonine-protein phosphatase 1 reg |
| P52701 | DNA mismatch repair protein Msh6 | E7EVA0 | Microtubule-associated protein OS=Homo s |
| Q9BZZ5 | Apoptosis inhibitor 5 OS=Homo sap | Q9P016 | Thymocyte nuclear protein 1 OS=Homo sapi |
| Q9H9Y2 | Ribosome production factor 1 OS=H | Q86WJ1 | Chromodomain-helicase-DNA-binding prote |
| Q96P11 | Probable 28S rRNA (cytosine-C(5)) | P17612 | cAMP-dependent protein kinase catalytic sub |
| P30041 | Peroxiredoxin-6 OS=Homo sapiens | A0A090N8G | Glycyl-tRNA synthetase OS=Homo sapiens C |
| Q1KMD3 | Heterogeneous nuclear ribonucleop | O95470 | Sphingosine-1-phosphate lyase 1 OS=Homo |
| Q8NI36 | WD repeat-containing protein 36 OS | A3KN83 | Protein strawberry notch homolog 1 OS=Hor |
| Q13303 | Voltage-gated potassium channel s | Q86W50 | Methyltransferase-like protein 16 OS=Homo |
| P42166 | Lamina-associated polypeptide 2, is | P43490 | Nicotinamide phosphoribosyltransferase OS |
| O14949 | Cytochrome b-c1 complex subunit 8 | O43516 | WAS/WASL-interacting protein family membe |
| A6NHR9 | Structural maintenance of chromos | Q9UNL2 | Translocon-associated protein subunit gam |
| P61619 | Protein transport protein Sec61 sub | Q15004 | PCNA-associated factor OS=Homo sapiens |
| Q9UBM7 | 7-dehydrocholesterol reductase OS | P36915 | Guanine nucleotide-binding protein-like 1 OS |
| O60231 | Putative pre-mRNA-splicing factor A | Q9BWD1 | Acetyl-CoA acetyltransferase, cytosolic OS=H |
| Q9NYP7 | Elongation of very long chain fatty ac | Q15022 | Polycomb protein SUZ12 OS=Homo sapiens |
| P61006 | Ras-related protein Rab-8A OS=Ho | Q9Y2P8 | RNA 3'-terminal phosphate cyclase-like prot |
| P60709 | Actin, cytoplasmic 1 OS=Homo sapi | Q9Y265 | RuvB-like 1 OS=Homo sapiens GN=RUVBL1 |
| P04844 | Dolichyl-diphosphooligosaccharide | O15144 | Actin-related protein 2/3 complex subunit 2 C |
| O43660 | Pleiotropic regulator 1 OS=Homo sa | O43148 | mRNA cap guanine-N7 methyltransferase O |
| O75390 | Citrate synthase, mitochondrial OS | Q9HDC9 | Adipocyte plasma membrane-associated pr |
| Q9BW19 | Kinesin-like protein KIFC1 OS=Hom | P32121 | Beta-arrestin-2 OS=Homo sapiens GN=ARR |
| P24928 | DNA-directed RNA polymerase II su | Q969X6 | U3 small nucleolar RNA-associated protein |
| Q99829 | Copine-1 OS=Homo sapiens GN=C | O00411 | DNA-directed RNA polymerase, mitochondri |
| A0A087X211 | 26S protease regulatory subunit 10 | Q9NZ01 | Very-long-chain enoyl-CoA reductase OS=H |
| P12235 | ADP/ATP translocase 1 OS=Homo s | P52789 | Hexokinase-2 OS=Homo sapiens GN=HK2 |
| Q9UBU9 | Nuclear RNA export factor 1 OS=Ho | Q96GD4 | Aurora kinase B OS=Homo sapiens GN=AU |
| Q6MZM4 | Putative uncharacterized protein DK | Q13616 | Cullin-1 OS=Homo sapiens GN=CUL1 PE= |
| Q13045 | Protein flightless-1 homolog OS=H | O15228 | Dihydroxyacetone phosphate acyltransferas |

Continuação do quadro.

| Accession | Protein Name | Accession | Protein Name |
|-----------|----------------------------------------------------|------------|--------------------------------------------------------|
| Q53HB9 | DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide | Q06210 | Glutamine--fructose-6-phosphate aminotransferase |
| Q9BQ52 | Zinc phosphodiesterase ELAC protein | Q95563 | Mitochondrial pyruvate carrier 2 OS=Homo sapiens |
| Q8TA92 | Similar to AFG3 ATPase family gene | Q14562 | ATP-dependent RNA helicase DHX8 OS=Homo sapiens |
| P08240 | Signal recognition particle receptor | P41252 | Isoleucine--tRNA ligase, cytoplasmic OS=Homo sapiens |
| Q8WWW9 | Cytoskeleton-associated protein 2 (COP2) | Q96T37 | Putative RNA-binding protein 15 OS=Homo sapiens |
| P30153 | Serine/threonine-protein phosphatase 1B | Q5H909 | Melanoma-associated antigen D2 OS=Homo sapiens |
| P09960 | Leukotriene A-4 hydrolase OS=Homo sapiens | Q13451 | Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase FKBP5 C |
| Q92925 | SWI/SNF-related matrix-associated protein 1 | Q9Y4Z0 | U6 snRNA-associated Sm-like protein LSm4 |
| O14965 | Aurora kinase A OS=Homo sapiens | Q15021 | Condensin complex subunit 1 OS=Homo sapiens |
| Q86U86 | Protein polybromo-1 OS=Homo sapiens | Q8TBP6 | Solute carrier family 25 member 40 OS=Homo sapiens |
| Q15067 | Peroxisomal acyl-coenzyme A oxidase 10 | Q6ZNB6 | NF-X1-type zinc finger protein NFXL1 OS=Homo sapiens |
| Q9Y285 | Phenylalanine--tRNA ligase alpha subunit | Q9NY12 | H/ACA ribonucleoprotein complex subunit 1 |
| Q9BYG3 | MKI67 FHA domain-interacting nuclear protein | Q15629 | Translocating chain-associated membrane protein |
| O15260 | Surfeit locus protein 4 OS=Homo sapiens | Q6UB35 | Monofunctional C1-tetrahydrofolate synthase |
| P0DN76 | Splicing factor U2AF 35 kDa subunit | Q02218 | 2-oxoglutarate dehydrogenase, mitochondrial |
| O60488 | Long-chain-fatty-acid--CoA ligase 4 | Q8IYB8 | ATP-dependent RNA helicase SUPV3L1, mitochondrial |
| Q9BPW8 | Protein NipSnap homolog 1 OS=Homo sapiens | P50570 | Dynamin-2 OS=Homo sapiens GN=DNM2 P |
| P22392 | Nucleoside diphosphate kinase B (beta) | O75369 | Filamin-B OS=Homo sapiens GN=FLNB PE |
| Q02790 | Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase | Q9U110 | Translation initiation factor eIF-2B subunit delta |
| O75251 | NADH dehydrogenase [ubiquinone] | Q7Z460 | CLIP-associating protein 1 OS=Homo sapiens |
| Q15054 | DNA polymerase delta subunit 3 OS=Homo sapiens | Q9H9G7 | Protein argonaute-3 OS=Homo sapiens GN=AGO3 |
| Q9BQ39 | ATP-dependent RNA helicase DDX50 | Q9UN52 | COP9 signalosome complex subunit 3 OS=Homo sapiens |
| Q9UIA9 | Exportin-7 OS=Homo sapiens GN=EXPT7 | Q71U36 | Tubulin alpha-1A chain OS=Homo sapiens |
| Q14232 | Translation initiation factor eIF-2B subunit delta | Q7L2H7 | Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit 1 |
| P26368 | Splicing factor U2AF 65 kDa subunit | A0A087WXU3 | Extended synaptotagmin-2 OS=Homo sapiens |
| Q9NRX1 | RNA-binding protein PNO1 OS=Homo sapiens | Q3SXM5 | Inactive hydroxysteroid dehydrogenase-like protein |
| O60762 | Dolichol-phosphate mannosyltransferase | P62495 | Eukaryotic peptide chain release factor subunit 1 |
| O00425 | Insulin-like growth factor 2 mRNA-binding protein | Q9P031 | Thyroid transcription factor 1-associated protein |
| Q9Y5M8 | Signal recognition particle receptor | P61081 | NEDD8-conjugating enzyme Ubc12 OS=Homo sapiens |
| P10768 | S-formylglutathione hydrolase OS=Homo sapiens | O96011 | Peroxisomal membrane protein 11B OS=Homo sapiens |
| Q8N1F7 | Nuclear pore complex protein Nup93 | P78346 | Ribonuclease P protein subunit p30 OS=Homo sapiens |
| P17706 | Tyrosine-protein phosphatase non-receptor type 1 | P49006 | MARCKS-related protein OS=Homo sapiens |
| P19174 | 1-phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate 3-kinase | P56589 | Peroxisomal biogenesis factor 3 OS=Homo sapiens |
| Q13177 | Serine/threonine-protein kinase PAK1 | Q16401 | 26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 1 |
| Q5SY16 | Polynucleotide 5'-hydroxyl-kinase N | P11216 | Glycogen phosphorylase, brain form OS=Homo sapiens |
| O43395 | U4/U6 small nuclear ribonucleoprotein | O95239 | Chromosome-associated kinesin KIF4A OS=Homo sapiens |
| Q05DU1 | GNL3L protein (Fragment) OS=Homo sapiens | P07384 | Calpain-1 catalytic subunit OS=Homo sapiens |
| P25789 | Proteasome subunit alpha type-4 OS=Homo sapiens | O75190 | DnaJ homolog subfamily B member 6 OS=Homo sapiens |
| Q9BRJ6 | Uncharacterized protein C7orf50 OS=Homo sapiens | P33176 | Kinesin-1 heavy chain OS=Homo sapiens GN=KIF5B |
| Q6YN16 | Hydroxysteroid dehydrogenase-like protein | Q9BY42 | Protein RTF2 homolog OS=Homo sapiens |
| Q15269 | Periodic tryptophan protein 2 homolog | Q9BUT1 | 3-hydroxybutyrate dehydrogenase type 2 OS=Homo sapiens |
| P14550 | Alcohol dehydrogenase [NADP(+)] class 1 | O14950 | Myosin regulatory light chain 12B OS=Homo sapiens |
| O43324 | Eukaryotic translation elongation factor 1B | P60900 | Proteasome subunit alpha type-6 OS=Homo sapiens |
| P78371 | T-complex protein 1 subunit beta OS=Homo sapiens | Q5T7U1 | General transcription factor 3C polypeptide 5 |
| Q5QJE6 | Deoxynucleotidyltransferase terminal | Q9H3N1 | Thioredoxin-related transmembrane protein |
| Q96S44 | TP53-regulating kinase OS=Homo sapiens | Q9UNX4 | WD repeat-containing protein 3 OS=Homo sapiens |
| P04818 | Thymidylate synthase OS=Homo sapiens | O75323 | Protein NipSnap homolog 2 OS=Homo sapiens |
| Q9NWH9 | SAFB-like transcription modulator OS=Homo sapiens | P50750 | Cyclin-dependent kinase 9 OS=Homo sapiens |
| P22830 | Ferrochelatase, mitochondrial OS=Homo sapiens | Q8IXI2 | Mitochondrial Rho GTPase 1 OS=Homo sapiens |
| Q9BVI4 | Nucleolar complex protein 4 homolog | Q99543 | DnaJ homolog subfamily C member 2 OS=Homo sapiens |
| Q7L014 | Probable ATP-dependent RNA helicase | Q13094 | Lymphocyte cytosolic protein 2 OS=Homo sapiens |
| P48651 | Phosphatidylserine synthase 1 OS=Homo sapiens | Q8IY37 | Probable ATP-dependent RNA helicase DHX |

Continuação do quadro.

| Accession | Protein Name | Accession | Protein Name |
|-----------|---------------------------------------|-----------|-------------------------------------------------|
| P0DMV9 | Heat shock 70 kDa protein 1B OS=H | Q9BVJ6 | U3 small nucleolar RNA-associated protein |
| Q9NV31 | U3 small nucleolar ribonucleoprote | Q53GF0 | Cytidine 5'-monophosphate N-acetylneuram |
| P28482 | Mitogen-activated protein kinase 1 C | Q59EK3 | Adaptor-related protein complex 1, mu 1 sub |
| P50502 | Hsc70-interacting protein OS=Homo | Q8NE86 | Calcium uniporter protein, mitochondrial OS |
| P24941 | Cyclin-dependent kinase 2 OS=Homo | Q9BY44 | Eukaryotic translation initiation factor 2A OS= |
| O00767 | Acyl-CoA desaturase OS=Homo sap | O43303 | Centriolar coiled-coil protein of 110 kDa OS= |
| P49720 | Proteasome subunit beta type-3 OS | Q9Y3Y2 | Chromatin target of PRMT1 protein OS=Homo |
| Q13131 | 5'-AMP-activated protein kinase cata | F8WAJ0 | Probable ATP-dependent RNA helicase DD |
| Q92797 | Symplekin OS=Homo sapiens GN=P | P23921 | Ribonucleoside-diphosphate reductase larg |
| Q9HAV4 | Exportin-5 OS=Homo sapiens GN= | Q53GT4 | Dipeptidylpeptidase III isoform 1 variant (Fra |
| P67812 | Signal peptidase complex catalytic s | Q9NQS7 | Inner centromere protein OS=Homo sapiens |
| Q99661 | Kinesin-like protein KIF2C OS=Homo | P21796 | Voltage-dependent anion-selective channel |
| Q8NBT6 | cDNA FLJ90758 fis, clone SKNMC1 | P00505 | Aspartate aminotransferase, mitochondrial C |
| Q53G58 | Coronin (Fragment) OS=Homo sapi | P22033 | Methylmalonyl-CoA mutase, mitochondrial C |
| P61201 | COP9 signalosome complex subun | P30566 | Adenylosuccinate lyase OS=Homo sapiens |
| P35232 | Prohibitin OS=Homo sapiens GN=F | P40937 | Replication factor C subunit 5 OS=Homo sap |
| Q15029 | 116 kDa U5 small nuclear ribonucle | Q9Y2T2 | AP-3 complex subunit mu-1 OS=Homo sapi |
| O15258 | Protein RER1 OS=Homo sapiens GN | Q8N1G2 | Cap-specific mRNA (nucleoside-2'-O)-meth |
| Q9UJA5 | tRNA (adenine(58)-N(1))-methyltran | Q9NYH9 | U3 small nucleolar RNA-associated protein |
| Q8WVV9 | Heterogeneous nuclear ribonucleop | P53985 | Monocarboxylate transporter 1 OS=Homo sa |
| Q9P1F3 | Costars family protein ABRACL OS= | Q15005 | Signal peptidase complex subunit 2 OS=Homo |
| P60059 | Protein transport protein Sec61 sub | Q96HE7 | ERO1-like protein alpha OS=Homo sapiens |
| Q53F35 | Acidic (Leucine-rich) nuclear phosph | Q9Y230 | RuvB-like 2 OS=Homo sapiens GN=RUVBL |
| Q5U5X0 | Complex III assembly factor LYRM7 | Q9Y320 | Thioredoxin-related transmembrane protein |
| Q7Z4W1 | L-xylulose reductase OS=Homo sap | Q07955 | Serine/arginine-rich splicing factor 1 OS=Ho |
| O43818 | U3 small nucleolar RNA-interacting | P84090 | Enhancer of rudimentary homolog OS=Homo |
| O75694 | Nuclear pore complex protein Nup1 | Q8NEJ9 | Neuroguidin OS=Homo sapiens GN=NGDN |
| Q9NQG5 | Regulation of nuclear pre-mRNA do | Q12788 | Transducin beta-like protein 3 OS=Homo sa |
| Q9Y2K7 | Lysine-specific demethylase 2A OS | Q96TA2 | ATP-dependent zinc metalloprotease YME1L |
| O15145 | Actin-related protein 2/3 complex su | O75306 | NADH dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulf |
| P08758 | Annexin A5 OS=Homo sapiens GN= | Q9H061 | Transmembrane protein 126A OS=Homo sa |
| O60524 | Nuclear export mediator factor NEM | P36871 | Phosphoglucomutase-1 OS=Homo sapiens |
| Q6PD62 | RNA polymerase-associated protein | O14744 | Protein arginine N-methyltransferase 5 OS= |
| O43684 | Mitotic checkpoint protein BUB3 OS= | Q8WYA6 | Beta-catenin-like protein 1 OS=Homo sapier |
| P17858 | ATP-dependent 6-phosphofructokin | P11021 | 78 kDa glucose-regulated protein OS=Homo |
| O15254 | Peroxisomal acyl-coenzyme A oxida | Q92621 | Nuclear pore complex protein Nup205 OS=H |
| Q9NZZB2 | Constitutive activator of PPAR-gar | Q86YP4 | Transcriptional repressor p66-alpha OS=Ho |
| Q6U8A4 | Ubiquitin-specific protease 7 isoforr | Q06203 | Amidophosphoribosyltransferase OS=Homo |
| P41240 | Tyrosine-protein kinase CSK OS=H | Q9BWS9 | Chitinase domain-containing protein 1 OS=H |
| O75027 | ATP-binding cassette sub-family B r | O43592 | Exportin-T OS=Homo sapiens GN=XPOT PE |
| P11908 | Ribose-phosphate pyrophosphokin | Q08881 | Tyrosine-protein kinase ITK/TSK OS=Homo |
| O14646 | Chromodomain-helicase-DNA-bind | Q96N66 | Lysophospholipid acyltransferase 7 OS=Homo |
| Q03519 | Antigen peptide transporter 2 OS=H | Q9BTX1 | Nucleoporin NDC1 OS=Homo sapiens GN= |
| P25440 | Bromodomain-containing protein 2 | Q9NZL4 | Hsp70-binding protein 1 OS=Homo sapiens |
| P09622 | Dihydrolipoyl dehydrogenase, mitoc | P29372 | DNA-3-methyladenine glycosylase OS=Homo |
| Q5UIP0 | Telomere-associated protein RIF1 C | Q9Y678 | Coatomer subunit gamma-1 OS=Homo sap |
| O60216 | Double-strand-break repair protein | Q13492 | Phosphatidylinositol-binding clathrin assem |
| P54577 | Tyrosine--tRNA ligase, cytoplasmic | P22695 | Cytochrome b-c1 complex subunit 2, mitoch |
| Q9NTJ3 | Structural maintenance of chromos | Q8IX18 | Probable ATP-dependent RNA helicase DH |
| Q7Z6Z7 | E3 ubiquitin-protein ligase HUWE1 | Q13505 | Metaxin-1 OS=Homo sapiens GN=MTX1 PE= |
| O43252 | Bifunctional 3'-phosphoadenosine 5 | Q9GZR5 | Elongation of very long chain fatty acids prote |
| Q7Z3K3 | Pogo transposable element with ZN | Q59GP4 | IlvB (Bacterial acetolactate synthase)-like isc |

Continuação do quadro.

| Accession | Protein Name | Accession | Protein Name |
|------------|-----------------------------------------|------------|-----------------------------------------------|
| Q9HC03 | Dolichyl-phosphate beta-glucosyltra | P18085 | ADP-ribosylation factor 4 OS=Homo sapiens |
| O95864 | Fatty acid desaturase 2 OS=Homo s | Q16512 | Serine/threonine-protein kinase N1 OS=Hon |
| Q96QE3 | ATPase family AAA domain-containi | P46926 | Glucosamine-6-phosphate isomerase 1 OS |
| Q9NRK6 | ATP-binding cassette sub-family B r | Q8WUY8 | N-acetyltransferase 14 OS=Homo sapiens C |
| P49748 | Very long-chain specific acyl-CoA de | P27708 | CAD protein OS=Homo sapiens GN=CAD PI |
| Q13041 | P67 OS=Homo sapiens PE=2 SV=1 | Q16891 | MICOS complex subunit MIC60 OS=Homo s |
| Q96BW9 | Phosphatidate cytidyltransferase, | Q96G03 | Phosphoglucomutase-2 OS=Homo sapiens |
| Q13155 | Aminoacyl tRNA synthase complex- | Q9NP50 | Protein FAM60A OS=Homo sapiens GN=FA |
| Q9P275 | Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolas | Q9Y315 | Deoxyribose-phosphate aldolase OS=Homc |
| P49589 | Cysteine--tRNA ligase, cytoplasmic | Q8TED0 | U3 small nucleolar RNA-associated protein |
| Q8IY18 | Structural maintenance of chromos | Q9BXW7 | Cat eye syndrome critical region protein 5 O |
| Q9NPQ8 | Synembryn-A OS=Homo sapiens G | Q12789 | General transcription factor 3C polypeptide 1 |
| Q6F5E8 | Capping protein, Arp2/3 and myosin | Q6DHz8 | Activity-dependent neuroprotector homeobox |
| Q14146 | Unhealthy ribosome biogenesis pr | P35610 | Sterol O-acyltransferase 1 OS=Homo sapier |
| O75880 | Protein SCO1 homolog, mitochondr | Q9Y221 | 60S ribosome subunit biogenesis protein N |
| Q15691 | Microtubule-associated protein RP/ | P61088 | Ubiquitin-conjugating enzyme E2 N OS=Hon |
| Q9Y394 | Dehydrogenase/reductase SDR fan | Q7Z478 | ATP-dependent RNA helicase DHX29 OS=H |
| Q969Z0 | Protein TBRG4 OS=Homo sapiens | Q92600 | Cell differentiation protein RCD1 homolog O |
| Q8NBU5 | ATPase family AAA domain-containi | P48730 | Casein kinase I isoform delta OS=Homo sa |
| A0A076MIL9 | NADH-ubiquinone oxidoreductase d | P52907 | F-actin-capping protein subunit alpha-1 OS= |
| P13489 | Ribonuclease inhibitor OS=Homo s | Q86SK9 | Stearoyl-CoA desaturase 5 OS=Homo sapie |
| P20073 | Annexin A7 OS=Homo sapiens GN= | Q6PI48 | Aspartate--tRNA ligase, mitochondrial OS=H |
| P31948 | Stress-induced-phosphoprotein 1 C | Q9H9T3 | Elongator complex protein 3 OS=Homo sapi |
| Q13555 | Calcium/calmodulin-dependent pro | P27448 | MAP/microtubule affinity-regulating kinase 3 |
| P61966 | AP-1 complex subunit sigma-1A OS | Q02241 | Kinesin-like protein KIF23 OS=Homo sapier |
| Q8NF37 | Lysophosphatidylcholine acyltransfe | Q13098 | COP9 signalosome complex subunit 1 OS= |
| Q71VH6 | 1-acyl-sn-glycerol-3-phosphate acyl | A0A0F7KYT8 | Fragile X mental retardation autosomal hom |
| O75821 | Eukaryotic translation initiation facto | Q53GW1 | Vesicle transport-related protein isoform a v |
| P41743 | Protein kinase C iota type OS=Hom | P09884 | DNA polymerase alpha catalytic subunit OS= |
| Q52LJ0 | Protein FAM98B OS=Homo sapiens | Q9NVH1 | DnaJ homolog subfamily C member 11 OS= |
| O00178 | GTP-binding protein 1 OS=Homo s | Q9HBL7 | Plasminogen receptor (KT) OS=Homo sapie |
| Q8N9T8 | Protein KRI1 homolog OS=Homo s | Q92900 | Regulator of nonsense transcripts 1 OS=Ho |
| Q8TEQ6 | Gem-associated protein 5 OS=Hom | Q86XN6 | Zinc finger protein 761 OS=Homo sapiens G |
| Q96CS3 | FAS-associated factor 2 OS=Homo | Q12873 | Chromodomain-helicase-DNA-binding prote |
| Q9NUU7 | ATP-dependent RNA helicase DDX1 | P25788 | Proteasome subunit alpha type-3 OS=Homc |
| Q9Y2Z4 | Tyrosine--tRNA ligase, mitochondria | Q15070 | Mitochondrial inner membrane protein OXA1 |
| Q92890 | Ubiquitin fusion degradation protein | O00743 | Serine/threonine-protein phosphatase 6 cata |
| Q6NUR1 | Non-SMC condensin I complex, sub | O75400 | Pre-mRNA-processing factor 40 homolog A |
| Q8IWA0 | WD repeat-containing protein 75 OS | O95707 | Ribonuclease P protein subunit p29 OS=Ho |
| Q15785 | Mitochondrial import receptor subur | P28070 | Proteasome subunit beta type-4 OS=Homo s |
| Q6L8Q7 | 2',5'-phosphodiesterase 12 OS=Ho | P49588 | Alanine--tRNA ligase, cytoplasmic OS=Hom |
| Q9BZL6 | Serine/threonine-protein kinase D2 | P53004 | Biliverdin reductase A OS=Homo sapiens G |
| Q5HYL4 | Putative uncharacterized protein DK | Q10471 | Polypeptide N-acetylgalactosaminyltransfer |
| P51665 | 26S proteasome non-ATPase regul | Q13112 | Chromatin assembly factor 1 subunit B OS= |
| Q12931 | Heat shock protein 75 kDa, mitoch | Q15120 | [Pyruvate dehydrogenase (acetyl-transferring |
| Q14258 | E3 ubiquitin/ISG15 ligase TRIM25 C | Q2TBD5 | Staufen, RNA binding protein, homolog 2 (D |
| Q6DD88 | Atlastin-3 OS=Homo sapiens GN=A | Q59FH1 | Transformation/transcription domain-associ |
| Q6P1A2 | Lysophospholipid acyltransferase 5 | Q59FR0 | Basic FGF-repressed Zic binding protein iso |
| Q02040 | A-kinase anchor protein 17A OS=Hc | Q6IBT1 | Proteasome subunit beta type OS=Homo sa |
| Q9H7Z3 | Protein NRDE2 homolog OS=Homc | Q6NUQ4 | Transmembrane protein 214 OS=Homo sap |
| Q6UXN9 | WD repeat-containing protein 82 OS | Q7KZI7 | Serine/threonine-protein kinase MARK2 OS= |
| O43709 | Probable 18S rRNA (guanine-N(7))- | Q8WVY3 | U4/U6 small nuclear ribonucleoprotein Prp3 |

Continuação do quadro.

| Accession | Protein Name |
|-----------|----------------------------------------|
| Q969V3 | Nicalin OS=Homo sapiens GN=NCI |
| Q96CM8 | Acyl-CoA synthetase family member |
| Q96FV9 | THO complex subunit 1 OS=Homo s |
| Q96H79 | Zinc finger CCCH-type antiviral prote |
| Q96PU4 | E3 ubiquitin-protein ligase UHRF2 C |
| Q9BQA9 | Uncharacterized protein C17orf62 O |
| Q9BRJ7 | Protein syndesmos OS=Homo sapi |
| Q9H4M9 | EH domain-containing protein 1 OS: |
| Q9NUD5 | Zinc finger CCHC domain-containin |
| Q2M2R1 | ANAPC7 protein (Fragment) OS=Ho |
| Q15526 | Surfeit locus protein 1 OS=Homo sa |
| Q96G23 | Ceramide synthase 2 OS=Homo sa |
| P53990 | IST1 homolog OS=Homo sapiens G |
| Q15637 | Splicing factor 1 OS=Homo sapiens |
| O94925 | Glutaminase kidney isoform, mitoch |
| P28702 | Retinoic acid receptor RXR-beta OS |
| Q10570 | Cleavage and polyadenylation spec |
| Q12824 | SWI/SNF-related matrix-associated |
| Q13472 | DNA topoisomerase 3-alpha OS=Ho |
| Q5TI65 | Mitochondrial pyruvate carrier OS=H |
| Q8N8A6 | ATP-dependent RNA helicase DDX5 |
| Q96L91 | E1A-binding protein p400 OS=Homo |
| Q9BV44 | THUMP domain-containing protein 3 |
| Q9H4L7 | SWI/SNF-related matrix-associated |
| Q8IX01 | SURP and G-patch domain-containi |
| Q13459 | Unconventional myosin-IXb OS=Hor |
| Q13724 | Mannosyl-oligosaccharide glucosid |
| Q53EL6 | Programmed cell death protein 4 OS |
| P40763 | Signal transducer and activator of tra |
| P23025 | DNA repair protein complementing X |
| Q9BUN8 | Derlin-1 OS=Homo sapiens GN=DE |
| O95373 | Importin-7 OS=Homo sapiens GN=I |
| P53350 | Serine/threonine-protein kinase PLK |
| Q9Y2U8 | Inner nuclear membrane protein Ma |
| Q01831 | DNA repair protein complementing X |
| Q6IBS0 | Twinfilin-2 OS=Homo sapiens GN= |
| P00813 | Adenosine deaminase OS=Homo s |
| Q8WVC6 | Dephospho-CoA kinase domain-co |
| P49642 | DNA primase small subunit OS=Ho |
| Q9Y241 | HIG1 domain family member 1A, mi |

8.2. Apêndice 2: Quadro de proteínas encontradas na condição LAG3WT através do ensaio de imunoprecipitação em HEK293T

| Protein names | Gene names | MS/MS | *Log t-test P-value | t-test Difference | CTRL2_1 | CTRL2_2 | LAGWT2_1 | LAGWT2_2 |
|-------------------------------------------------------------------------------|-------------|-------|---------------------|-------------------|---------|---------|----------|----------|
| LAG3 | LAG3 | 1035 | 6,597042847 | 12,65856361 | 23,3484 | 23,3547 | 36,00456 | 36,01565 |
| 78 kDa glucose-regulated protein | HEL-S-89n | 844 | 3,423159775 | 10,215415 | 23,0858 | 23,4806 | 33,47762 | 33,51958 |
| Neutral alpha-glucosidase AB | HEL-S-164nA | 346 | 3,676052234 | 7,956451416 | 22,9768 | 22,7559 | 30,85683 | 30,78877 |
| Tubulin beta-4B chain | TUBB2C | 257 | 1,252714769 | 1,808396339 | 27,616 | 26,7262 | 28,94207 | 29,01694 |
| RuvB-like 2 | RUVBL2 | 231 | 3,224326155 | 6,140708923 | 23,9888 | 23,9445 | 30,25575 | 29,95892 |
| Tubulin alpha-1B chain | TUBA1B | 184 | 2,515975564 | 1,657465935 | 27,9513 | 27,7684 | 29,52444 | 29,51026 |
| Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein M | HNRNPM | 175 | 0,910168658 | 0,335488319 | 27,2655 | 27,4743 | 27,78282 | 27,62798 |
| RuvB-like 1 | RUVBL1 | 144 | 1,909917807 | 5,500315666 | 22,1608 | 23,3925 | 28,27075 | 28,28317 |
| Cytoskeleton-associated protein 4 | CKAP4 | 141 | 3,371298945 | 5,703004837 | 23,2707 | 23,4066 | 28,94559 | 29,1377 |
| Protein disulfide-isomerase A6 | PDIA6 | 141 | 3,094297534 | 6,75274086 | 22,866 | 22,4829 | 29,42033 | 29,434 |
| Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H | HNRNPH1 | 137 | 2,457906245 | 0,738482475 | 26,664 | 26,5779 | 27,36695 | 27,35187 |
| ADP/ATP translocase 2 | SLC25A5 | 114 | 3,006583016 | 0,899544716 | 27,7206 | 27,7449 | 28,60678 | 28,65779 |
| Endoplasmic reticulum resident protein 44 | ERP44 | 111 | 2,206400512 | 6,06226635 | 22,5386 | 23,4991 | 29,08335 | 29,07887 |
| Heat shock protein HSP 90-beta | HSP90AB1 | 110 | 1,703780443 | 0,859577179 | 26,037 | 26,2583 | 26,95416 | 27,06023 |
| Ubiquitin-60S ribosomal protein L40 | UBB | 101 | 3,659328447 | 6,310359955 | 24,6521 | 24,8221 | 31,00865 | 31,0862 |
| Probable ATP-dependent RNA helicase DDX5 | DDX5 | 97 | 1,670938105 | 1,163775444 | 23,4729 | 23,6383 | 24,87103 | 24,56767 |
| Dolichyl-diphosphooligosaccharide--protein glycosyltransferase subunit 1 | RPN1 | 94 | 3,447399593 | 4,216856003 | 23,3621 | 23,4006 | 27,67553 | 27,52088 |
| Prohibitin-2 | PHB2 | 77 | 2,81514591 | 3,38186264 | 23,1565 | 23,4147 | 26,63796 | 26,69697 |
| Transitional endoplasmic reticulum ATPase | HEL-S-70 | 71 | 1,265642817 | 2,824842453 | 22,1894 | 23,4742 | 25,41558 | 25,89772 |
| Endoplasmin | TRA1 | 68 | 2,197646965 | 5,0748806 | 22,0532 | 22,8647 | 27,55149 | 27,51616 |
| Elongation factor 1-gamma | EEF1G | 67 | 0,863251289 | 0,411684036 | 26,368 | 26,0338 | 26,64609 | 26,57903 |
| Coatmer subunit alpha | COPA | 61 | 0,521631845 | 0,591024399 | 22,831 | 23,4641 | 24,02572 | 23,45136 |
| UDP-glucose:glycoprotein glycosyltransferase 1 | UGGT1 | 59 | 2,353860831 | 3,704839706 | 23,2461 | 22,752 | 26,71516 | 26,69259 |
| Transmembrane protein 43 | TMEM43 | 58 | 1,747331692 | 2,724755287 | 22,9375 | 23,0892 | 25,37653 | 26,09969 |
| Protein transport protein Sec61 subunit alpha isoform 1 | SEC61A1 | 55 | 1,663435002 | 3,921247482 | 23,2453 | 24,3829 | 27,88163 | 27,58899 |
| Eukaryotic initiation factor 4A-I | EIF4A1 | 50 | 3,216904623 | 3,027636528 | 23,8108 | 23,6981 | 26,83099 | 26,73312 |
| Tubulin beta chain | TUBB | 49 | 1,738634528 | 1,401581764 | 26,6203 | 27,0024 | 28,23215 | 28,19371 |
| Peroxisome protein 4 | HEL-S-97n | 49 | 2,549034429 | 4,622456551 | 22,9901 | 23,4819 | 27,86968 | 27,84721 |
| 60S acidic ribosomal protein P0-like | RPLP0 | 47 | 0,52250796 | 1,900420189 | 22,3211 | 22,502 | 25,68089 | 22,94299 |
| Clathrin heavy chain 1 | CLTC | 47 | 1,736771571 | 2,788381577 | 22,8349 | 22,9914 | 26,07625 | 25,32677 |
| Prolyl 3-hydroxylase 1 | LEPRE1 | 46 | 1,404685593 | 3,517126083 | 23,9342 | 22,4955 | 26,72025 | 26,74368 |
| DnaJ homolog subfamily B member 11 | DNAJB11 | 46 | 1,770732504 | 3,434140205 | 21,9604 | 22,8663 | 25,84967 | 25,84529 |
| Dolichyl-diphosphooligosaccharide--protein glycosyltransferase 48 kDa subunit | DDOST | 44 | 3,468987385 | 4,45522213 | 23,2684 | 23,1206 | 27,61386 | 27,68559 |
| Dolichyl-diphosphooligosaccharide--protein glycosyltransferase subunit STT3A | hCG_2032701 | 43 | 3,079309723 | 3,69060421 | 23,2585 | 23,3949 | 27,09919 | 26,9354 |

Continuação do quadro.

| Protein names | Gene names | MS/MS | *Log t-test P-value | t-test Difference | CTRL2_1 | CTRL2_2 | LAGWT2_1 | LAGWT2_2 |
|--------------------------------------------------------------------------|------------|-------|---------------------|-------------------|---------|---------|----------|----------|
| Renin receptor | ATP6AP2 | 42 | 2,934052695 | 2,629953384 | 23,6957 | 23,8114 | 26,45218 | 26,31479 |
| Thioredoxin-related transmembrane protein 1 | TMX1 | 42 | 1,963838326 | 2,917134285 | 23,5528 | 22,9581 | 26,09768 | 26,24744 |
| Translocon-associated protein subunit delta | SSR4 | 39 | 1,640870221 | 1,904263496 | 23,8621 | 23,2785 | 25,4485 | 25,5006 |
| Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase | HEL-S-39 | 36 | 3,389614369 | 2,073381424 | 22,6944 | 22,7744 | 24,79541 | 24,82022 |
| 60S ribosomal protein L11 | RPL11 | 36 | 1,095748909 | 1,465678215 | 22,5508 | 23,3762 | 24,27042 | 24,58795 |
| Exportin-2 | CSE1L | 35 | 1,432260518 | 1,977770805 | 22,7684 | 23,531 | 25,21479 | 25,04018 |
| 60S ribosomal protein L18 | RPL18 | 33 | 2,279732708 | 1,827908516 | 22,1787 | 22,3664 | 24,19468 | 24,00624 |
| DnaJ homolog subfamily C member 10 | DNAJC10 | 33 | 2,02052001 | 2,366347313 | 22,9211 | 22,8136 | 25,4602 | 25,00723 |
| Dolichyl-diphosphooligosaccharide--protein glycosyltransferase subunit 2 | RPN2 | 30 | 1,455853023 | 0,97403717 | 23,2623 | 23,5494 | 24,50003 | 24,25976 |
| Cytoplasmic dynein 1 heavy chain 1 | DYNC1H1 | 29 | 2,057229706 | 1,879732132 | 23,0438 | 22,71 | 24,69732 | 24,81592 |
| Heat shock protein 105 kDa | HSPH1 | 28 | 1,406524507 | 0,627655983 | 23,1389 | 23,2811 | 23,73107 | 23,94423 |
| Sigma non-opioid intracellular receptor 1 | hCG_20471 | 28 | 2,665641942 | 2,289582253 | 22,5367 | 22,7074 | 24,97548 | 24,84785 |
| MHC class I antigen | HLA-C | 27 | 3,37968658 | 6,157993317 | 22,4454 | 22,6204 | 28,78126 | 28,60049 |
| Erlin-2 | ERLIN1 | 27 | 1,853651747 | 1,474782944 | 23,8144 | 23,9317 | 25,51418 | 25,18147 |
| 40S ribosomal protein S11 | RPS11 | 27 | 1,895357187 | 1,020382881 | 23,0794 | 23,2834 | 24,146 | 24,25753 |
| Cartilage-associated protein | CRTP | 26 | 3,124654646 | 2,346422195 | 23,188 | 23,1846 | 25,59702 | 25,46843 |
| DnaJ homolog subfamily A member 1 | DNAJA1 | 26 | 1,67752447 | 2,791212082 | 23,1217 | 22,3221 | 25,60899 | 25,41722 |
| Transmembrane emp24 domain-containing protein 10 | TMED10 | 25 | 2,990266633 | 2,287139893 | 24,0469 | 24,1459 | 26,43748 | 26,32965 |
| Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein F | HNRPF | 25 | 2,313462044 | 0,999993324 | 23,39 | 23,5202 | 24,48075 | 24,4295 |
| Torsin-3A | TOR3A | 25 | 1,893907864 | 2,19653511 | 22,9911 | 22,8723 | 24,88474 | 25,37166 |
| Transmembrane 9 superfamily member 2 | TM9SF2 | 24 | 2,127305345 | 2,186163902 | 23,1814 | 23,3215 | 25,26112 | 25,61409 |
| Nicastrin | NCSTN | 24 | 2,518316353 | 1,674696922 | 23,514 | 23,4903 | 25,08517 | 25,26849 |
| DnaJ homolog subfamily C member 3 | DNAJC3 | 23 | 1,119790128 | 1,812433243 | 23,0247 | 24,0797 | 25,31389 | 25,41538 |
| 60S ribosomal protein L4 | RPL4 | 23 | 0,68664315 | 0,969013214 | 23,4958 | 22,4559 | 24,01129 | 23,87839 |
| Chondroitin sulfate synthase 2 | CHPF | 23 | 2,864468104 | 1,153781891 | 22,6482 | 22,5845 | 23,79858 | 23,7417 |
| Dermcidin | DCD | 21 | 1,819944489 | 1,568832397 | 23,3143 | 23,5907 | 24,88339 | 25,15919 |
| Probable glutathione peroxidase 8 | GPX8 | 21 | 1,040634727 | 2,0487957 | 22,2473 | 23,5669 | 25,03523 | 24,87647 |
| GPI-anchor transamidase | PIGK | 20 | 0,957424881 | 0,678478241 | 22,7322 | 22,5687 | 23,09674 | 23,56116 |
| 60S ribosomal protein L14 | RPL14 | 19 | 1,284724319 | 0,590397835 | 23,5768 | 23,3089 | 23,99231 | 24,07415 |
| SUN domain-containing protein 2 | UNC84B | 18 | 1,572383544 | 0,953226089 | 22,8402 | 22,9965 | 24,01026 | 23,73293 |
| Transmembrane emp24 domain-containing protein 9 | TMED9 | 18 | 2,573049932 | 2,085073471 | 23,1973 | 23,3367 | 25,26953 | 25,4346 |
| Very-long-chain (3R)-3-hydroxyacyl-CoA dehydratase 3 | PTPLAD1 | 18 | 2,065967936 | 2,744077682 | 22,9611 | 23,4488 | 25,87117 | 26,02684 |
| Glypican-4 | GPC4 | 18 | 2,814550849 | 2,961140633 | 22,9387 | 22,7275 | 25,84235 | 25,74609 |
| Nucleophosmin | NPM1 | 17 | 2,766341466 | 2,289698601 | 22,4848 | 22,658 | 24,89989 | 24,82231 |
| Polypyrimidine tract-binding protein 1 | PTBP1 | 17 | 1,273307122 | 0,405250549 | 24,1449 | 24,2393 | 24,68266 | 24,51202 |
| Glutaminy-peptide cyclotransferase-like protein | QPCTL | 17 | 2,370811923 | 2,281787872 | 22,689 | 22,3918 | 24,80725 | 24,83711 |

Continuação do quadro.

| Protein names | Gene names | MS/MS | *Log t-test P-value | t-test Difference | CTRL2_1 | CTRL2_2 | LAGWT2_1 | LAGWT2_2 |
|------------------------------------------------------------------------------|------------|-------|---------------------|-------------------|---------|---------|----------|----------|
| Protein ERGIC-53 | LMAN1 | 16 | 1,648425012 | 3,746775627 | 22,3734 | 22,5518 | 26,77367 | 25,6451 |
| Fatty acid synthase | FASN | 16 | 1,254242541 | 1,636387825 | 22,7078 | 22,8704 | 24,82036 | 24,03053 |
| Ribosomal protein L15 | RPL15 | 15 | 1,988024335 | 1,126606941 | 23,0906 | 23,235 | 24,19978 | 24,37908 |
| Surfeit locus protein 4 | SURF4 | 15 | 0,980922024 | 0,548944473 | 23,9198 | 23,5392 | 24,31001 | 24,24685 |
| Signal peptidase complex subunit 3 | SPCS3 | 15 | 1,310164659 | 1,994932175 | 22,5449 | 23,444 | 24,89948 | 25,07928 |
| Dolichyl-diphosphooligosaccharide--protein glycosyltransferase subunit STT3B | STT3B | 15 | 0,831088217 | 0,822174072 | 23,1244 | 22,4317 | 23,51545 | 23,68496 |
| UPF0556 protein C19orf10 | C19orf10 | 15 | 1,272208326 | 1,858776093 | 23,5709 | 22,676 | 24,96437 | 24,99998 |
| Heat shock 70 kDa protein 6 | HSPA6 | 14 | 2,724707677 | 3,675924301 | 25,155 | 25,4725 | 28,97123 | 29,00804 |
| Nicalin | NCLN | 12 | 1,458027142 | 1,157338142 | 22,9902 | 23,4336 | 24,36152 | 24,37696 |
| Protein canopy homolog 2 | CNPY2 | 12 | 3,498117944 | 2,96132946 | 22,6891 | 22,6415 | 25,57954 | 25,67376 |
| Protein FAM3A | FAM3A | 11 | 0,760432169 | 1,024338722 | 22,3911 | 23,3781 | 23,91442 | 23,90343 |
| Phospholipase D3 | PLD3 | 10 | 0,785704311 | 1,03638649 | 22,6553 | 22,8204 | 23,30076 | 24,24771 |
| 60S ribosomal protein L13a | RPL13A | 10 | 0,907133078 | 0,649272919 | 22,6744 | 22,6732 | 23,0705 | 23,57565 |
| Lamin-B receptor | LBR | 9 | 3,225122606 | 3,06463623 | 23,1456 | 23,2874 | 26,25724 | 26,30503 |
| V-type proton ATPase subunit S1 | FLJ00383 | 9 | 1,832150441 | 1,067667007 | 22,1343 | 22,219 | 23,12038 | 23,36826 |
| Derlin-1 | DERL1 | 8 | 0,616904577 | 0,413043022 | 22,8964 | 23,2987 | 23,36038 | 23,6608 |
| Trifunctional enzyme subunit beta, mitochondrial | HADHB | 8 | 2,467305201 | 1,540206909 | 23,0532 | 22,9426 | 24,6093 | 24,46688 |
| Protein disulfide-isomerase A4 | PDIA4 | 7 | 1,9473198 | 1,727966309 | 22,9361 | 23,0878 | 24,9088 | 24,57097 |
| 45 kDa calcium-binding protein | SDF4 | 5 | 2,110687639 | 0,91945076 | 23,044 | 23,1906 | 24,07218 | 24,00136 |
| Protein disulfide-isomerase | HEL-S-269 | 5 | 0,918355339 | 1,628412247 | 23,5599 | 22,3241 | 24,48597 | 24,65485 |

8.3 Apêndice 3: Quadro de proteínas encontradas na condição EPDEL através do ensaio de imunoprecipitação em HEK 293T.

| Protein names | Gene names | MS/MS | *-Log t-test P-value | t-test Difference | EPDEL1_1 | EPDEL1_2 | CTRL2_1 | CTRL2_2 |
|--------------------------------------------------------------------------|-------------|-------|----------------------|-------------------|----------|----------|----------|----------|
| LAG3 | LAG3 | 1035 | 4,778253425 | 12,50608444 | 35,90858 | 35,80667 | 23,34842 | 23,35467 |
| 78 kDa glucose-regulated protein | HEL-S-89n | 844 | 3,428363621 | 10,22432232 | 33,5013 | 33,51371 | 23,08578 | 23,48059 |
| Neutral alpha-glucosidase AB | HEL-S-164nA | 346 | 3,638375184 | 7,515329361 | 30,40993 | 30,35342 | 22,97677 | 22,75592 |
| Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins A2/B1 | HNRNPA2B1 | 316 | 3,878702155 | 3,82615757 | 31,32753 | 31,41261 | 27,53267 | 27,55516 |
| Tubulin beta-4B chain | TUBB2C | 257 | 1,264987037 | 1,85012722 | 29,08747 | 28,95499 | 27,61597 | 26,72624 |
| Collagen alpha-1(I) chain | COL1A1 | 253 | 2,754504034 | 7,55567646 | 30,83387 | 30,95982 | 23,03009 | 23,65225 |
| Glycogen phosphorylase, liver form | PYGL | 243 | 2,220803896 | 7,030456543 | 29,97719 | 29,92592 | 22,37399 | 23,46821 |
| RuvB-like 2 | RUVBL2 | 231 | 4,379963484 | 6,311936378 | 30,24434 | 30,31279 | 23,98876 | 23,94449 |
| Tubulin alpha-1B chain | TUBA1B | 184 | 2,560390901 | 2,264921188 | 30,04856 | 30,20105 | 27,95133 | 27,76844 |
| Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein M | HNRNPM | 175 | 2,250530594 | 1,461369514 | 28,79662 | 28,86594 | 27,26553 | 27,47429 |
| Serpin H1 | SERPINH1 | 154 | 3,771965681 | 4,970438957 | 28,46813 | 28,48865 | 23,44413 | 23,57176 |
| RuvB-like 1 | RUVBL1 | 144 | 2,062500215 | 6,58538723 | 29,39758 | 29,32648 | 22,16084 | 23,39245 |
| Cytoskeleton-associated protein 4 | CKAP4 | 141 | 3,841987887 | 5,736765862 | 29,06438 | 29,08644 | 23,27071 | 23,40657 |
| Protein disulfide-isomerase A6 | PDIA6 | 141 | 2,875393877 | 5,982365608 | 28,55153 | 28,76205 | 22,86599 | 22,48286 |
| Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H | HNRNPH1 | 137 | 3,307571744 | 2,400627136 | 29,05297 | 28,99013 | 26,66397 | 26,57788 |
| 60 kDa heat shock protein, mitochondrial | HSPD1 | 132 | 2,160953736 | 0,364505768 | 27,68365 | 27,66675 | 27,33994 | 27,28145 |
| Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1 | HNRNPA1 | 132 | 1,789550669 | 3,638505936 | 28,69661 | 28,745 | 25,55101 | 24,61358 |
| ADP/ATP translocase 2 | SLC25A5 | 114 | 3,307945124 | 1,203399658 | 28,95992 | 28,91236 | 27,72058 | 27,7449 |
| Endoplasmic reticulum resident protein 44 | ERP44 | 111 | 2,247295521 | 6,367563248 | 29,35888 | 29,41393 | 22,5386 | 23,49909 |
| Heat shock protein HSP 90-beta | HSP90AB1 | 110 | 1,371103932 | 0,680562973 | 26,73441 | 26,92196 | 26,03695 | 26,25829 |
| Ubiquitin-60S ribosomal protein L40 | UBB | 101 | 2,754395525 | 4,950551033 | 29,87744 | 29,49779 | 24,65207 | 24,82206 |
| Probable ATP-dependent RNA helicase DDX5 | DDX5 | 97 | 3,362088432 | 4,629313469 | 28,13511 | 28,23466 | 23,47288 | 23,63827 |
| Collagen alpha-2(I) chain | COL1A2 | 96 | 3,758921393 | 6,986451149 | 29,71093 | 29,796 | 22,68518 | 22,84884 |
| Dolichyl-diphosphooligosaccharide--protein glycosyltransferase subunit 1 | RPN1 | 94 | 3,300969263 | 3,900416374 | 27,36686 | 27,19667 | 23,36207 | 23,40063 |
| Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein U | HNRNPU | 92 | 1,058357713 | 0,608447075 | 27,80741 | 27,78862 | 27,38212 | 26,99701 |
| Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A3 | HNRNPA3 | 84 | 3,607207481 | 4,735040665 | 27,79166 | 27,80236 | 23,13622 | 22,98773 |
| Prohibitin-2 | PHB2 | 77 | 2,8274012 | 3,561724663 | 26,79996 | 26,8947 | 23,15647 | 23,41473 |
| Histone H4 | HIST1H4H | 74 | 1,285976341 | 0,425871849 | 28,83156 | 28,89842 | 28,53427 | 28,34397 |
| Transitional endoplasmic reticulum ATPase | HEL-S-70 | 71 | 1,632091048 | 4,76527977 | 27,22803 | 27,96615 | 22,18939 | 23,47422 |
| Endoplasmic | TRA1 | 68 | 2,1456771 | 4,772791862 | 27,23416 | 27,22931 | 22,05319 | 22,8647 |
| 40S ribosomal protein S4 | RPS4X | 67 | 1,10997014 | 0,303587914 | 27,09386 | 26,99075 | 26,81238 | 26,66506 |
| Leucine-rich repeat-containing protein 59 | LRRC59 | 66 | 2,126070202 | 2,350209236 | 27,05538 | 27,21771 | 24,59872 | 24,97395 |
| | HLA-C | 65 | 2,474256167 | 3,665873528 | 26,62937 | 26,7239 | 23,21833 | 22,80319 |
| 40S ribosomal protein S3 | RPS3 | 64 | 2,050311975 | 3,184276581 | 26,21819 | 25,76221 | 22,60706 | 23,00478 |
| Collagen, type I, alpha 1, isoform CRA_a | COL1A1 | 62 | 3,690675111 | 7,704072952 | 31,18258 | 31,24774 | 23,406 | 23,61616 |
| Coatamer subunit alpha | COPA | 61 | 1,957623321 | 3,007906914 | 26,12035 | 26,1905 | 22,83099 | 23,46405 |
| UDP-glucose:glycoprotein glucosyltransferase 1 | UGGT1 | 59 | 2,427059387 | 4,282186508 | 27,19216 | 27,37028 | 23,24611 | 22,75196 |
| Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H3 | HNRPH3 | 58 | 2,942945103 | 3,806698799 | 28,43655 | 28,42482 | 24,75251 | 24,49546 |
| Transmembrane protein 43 | TMEM43 | 58 | 3,561016856 | 4,575815201 | 27,59114 | 27,58721 | 22,93752 | 23,0892 |

Continuação do quadro.

| Protein names | Gene names | MS/MS | *-Log t-test P-value | t-test Difference | EPDEL1_1 | EPDEL1_2 | CTRL2_1 | CTRL2_2 |
|-------------------------------------------------------------------------------|-------------|-------|----------------------|-------------------|----------|----------|----------|----------|
| Pyrroline-5-carboxylate reductase 2 | PYCR2 | 55 | 2,752146445 | 2,54958725 | 25,78564 | 25,62692 | 23,08434 | 23,22905 |
| Protein transport protein Sec61 subunit alpha isoform 1 | SEC61A1 | 55 | 1,810078279 | 4,52167511 | 28,36005 | 28,31142 | 23,24527 | 24,38286 |
| 40S ribosomal protein S13 | RPS13 | 54 | 1,649880873 | 3,142150879 | 26,24771 | 26,10891 | 23,50937 | 22,56295 |
| Pyrroline-5-carboxylate reductase | PYCR1 | 53 | 1,454894374 | 2,238375664 | 25,89661 | 25,74953 | 23,16034 | 24,00905 |
| Procollagen-lysine,2-oxoglutarate 5-dioxygenase 3 | PLOD3 | 53 | 2,823173563 | 3,319024086 | 26,5611 | 26,30861 | 23,14134 | 23,09032 |
| 40S ribosomal protein S9 | RPS9 | 51 | 3,065479772 | 3,867195129 | 26,72338 | 26,8889 | 22,8613 | 23,0166 |
| Glycogen phosphorylase, brain form | PYGB | 51 | 2,287986 | 3,001077652 | 26,32146 | 26,50484 | 23,21622 | 23,60793 |
| Eukaryotic initiation factor 4A-I | EIF4A1 | 50 | 2,48649308 | 2,318430901 | 26,19304 | 25,95265 | 23,81075 | 23,69808 |
| Tubulin beta chain | TUBB | 49 | 0,574894967 | 0,864922523 | 27,14336 | 28,20918 | 26,62031 | 27,00239 |
| Peroxiredoxin-4 | HEL-S-97n | 49 | 2,2703658 | 3,553525925 | 26,87795 | 26,70108 | 22,99005 | 23,48192 |
| ATP synthase subunit O, mitochondrial | ATP5O | 48 | 1,606201248 | 0,963583946 | 26,45419 | 26,53321 | 25,38073 | 25,67949 |
| 60S acidic ribosomal protein P0-like | RPLP0 | 47 | 2,751151166 | 2,960114479 | 25,28563 | 25,45764 | 22,32105 | 22,502 |
| Clathrin heavy chain 1 | CLTC | 47 | 2,074458739 | 1,898426056 | 24,65464 | 24,96847 | 22,83485 | 22,9914 |
| Cleavage and polyadenylation specificity factor subunit 5 | NUDT21 | 46 | 1,390954857 | 1,212602615 | 26,68083 | 27,05082 | 25,48176 | 25,82469 |
| DnaJ homolog subfamily C member 16 | DNAJC16 | 46 | 2,380587611 | 3,102706909 | 26,40873 | 26,57888 | 23,57301 | 23,20919 |
| Prolyl 3-hydroxylase 1 | LEPRE1 | 46 | 1,438228302 | 3,669945717 | 26,92739 | 26,84218 | 23,93416 | 22,49553 |
| DnaJ homolog subfamily B member 11 | DNAJB11 | 46 | 2,074334885 | 5,051042557 | 27,35212 | 27,57665 | 21,96042 | 22,86626 |
| RNA-binding protein FUS | FUS | 45 | 2,786310488 | 4,421087265 | 27,32457 | 27,40479 | 22,76912 | 23,11806 |
| 4F2 cell-surface antigen heavy chain | SLC3A2 | 45 | 1,608882778 | 3,542699814 | 27,1033 | 26,07218 | 23,27928 | 22,8106 |
| ATPase family AAA domain-containing protein 3A | ATAD3A | 45 | 5,075300471 | 3,275008202 | 26,45494 | 26,46925 | 23,18055 | 23,19363 |
| Dolichyl-diphosphooligosaccharide--protein glycosyltransferase 48 kDa subunit | DDOST | 44 | 3,54658191 | 4,386033058 | 27,58341 | 27,57766 | 23,26838 | 23,12062 |
| ATP-dependent RNA helicase DDX3X | DDX3X | 44 | 3,244341935 | 3,164800644 | 26,60244 | 26,68097 | 23,41233 | 23,54147 |
| Dolichyl-diphosphooligosaccharide--protein glycosyltransferase subunit STT3A | hCG_2032701 | 43 | 3,130540973 | 3,129749298 | 26,40539 | 26,50749 | 23,25846 | 23,39491 |
| ATP synthase subunit gamma | ATP5C1 | 43 | 1,502244278 | 2,293542862 | 25,62517 | 25,38103 | 23,60798 | 22,81114 |
| Signal recognition particle receptor subunit beta | SRPRB | 43 | 4,279095981 | 2,315096855 | 25,83687 | 25,86785 | 23,53079 | 23,54374 |
| Renin receptor | ATP6AP2 | 42 | 2,975699419 | 3,331410408 | 26,99324 | 27,17665 | 23,69569 | 23,81137 |
| Thioredoxin-related transmembrane protein 1 | TMX1 | 42 | 2,24790807 | 3,957089424 | 27,18376 | 27,24127 | 23,55276 | 22,95809 |
| Translocon-associated protein subunit delta | SSR4 | 39 | 2,053473219 | 3,088815689 | 26,641 | 26,67721 | 23,86211 | 23,27847 |
| 40S ribosomal protein S2 | RPS2 | 38 | 1,402112427 | 2,290045738 | 25,27252 | 25,42111 | 23,52075 | 22,59279 |
| 40S ribosomal protein S19 | RPS19 | 36 | 1,902573154 | 1,946872711 | 25,97552 | 26,00125 | 23,82203 | 24,261 |
| Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase | HEL-S-39 | 36 | 3,785992894 | 3,189793587 | 25,91611 | 25,93233 | 22,69443 | 22,77443 |
| 60S ribosomal protein L11 | RPL11 | 36 | 1,731826712 | 3,030469894 | 25,9244 | 26,06355 | 22,55082 | 23,37619 |
| Mitochondrial import inner membrane translocase subunit TIM50 | TIMM50 | 35 | 2,684389415 | 3,269205093 | 25,85353 | 25,61501 | 22,37589 | 22,55424 |
| Exportin-2 | CSE1L | 35 | 1,354405249 | 1,802783966 | 24,86055 | 25,04444 | 22,76842 | 23,531 |
| 60S ribosomal protein L18 | RPL18 | 33 | 2,795030482 | 3,600845337 | 25,76373 | 25,98307 | 22,1787 | 22,36641 |
| RNA-binding protein 14 | RBM14 | 33 | 2,598215705 | 2,268118858 | 26,24264 | 26,44784 | 24,02714 | 24,12709 |
| DnaJ homolog subfamily C member 10 | DNAJC10 | 33 | 3,092744883 | 3,551804543 | 26,50469 | 26,33366 | 22,92112 | 22,81362 |
| 60S ribosomal protein L7 | RPL7 | 32 | 2,037109783 | 1,875477791 | 25,55473 | 25,21605 | 23,44614 | 23,57368 |
| 40S ribosomal protein S3a | RPS3A | 31 | 2,554972671 | 2,93081665 | 26,10855 | 25,83535 | 22,96782 | 23,11445 |
| Procollagen-lysine,2-oxoglutarate 5-dioxygenase 2 | PLOD2 | 31 | 2,687105135 | 1,280054092 | 24,56802 | 24,62461 | 23,36703 | 23,26549 |
| Procollagen-lysine,2-oxoglutarate 5-dioxygenase 1 | PLOD1 | 30 | 2,026514393 | 2,489171982 | 25,27299 | 25,73505 | 22,93904 | 23,09065 |

Continuação do quadro.

| Protein names | Gene names | MS/MS | *-Log t-test P-value | t-test Difference | EPDEL1_1 | EPDEL1_2 | CTRL2_1 | CTRL2_2 |
|--------------------------------------------------------------------------|--------------|-------|----------------------|-------------------|----------|----------|----------|----------|
| DAZ-associated protein 1 | DAZAP1 | 30 | 3,200938138 | 3,720050812 | 26,30859 | 26,38487 | 22,54144 | 22,71192 |
| Dolichyl-diphosphooligosaccharide--protein glycosyltransferase subunit 2 | RPN2 | 30 | 2,10243246 | 2,906638145 | 26,52911 | 26,09587 | 23,2623 | 23,54941 |
| Transferrin receptor protein 1 | TFRC | 29 | 1,638477069 | 1,894395828 | 25,13481 | 25,31178 | 23,60748 | 23,05032 |
| Alpha-galactosidase A | GLA | 29 | 1,523656799 | 3,379590034 | 25,93344 | 26,45317 | 22,27473 | 23,3527 |
| Histone H2A | HIST1H2AH | 28 | 2,961101741 | 5,22509861 | 28,02675 | 28,01866 | 22,9705 | 22,62471 |
| Heat shock protein 105 kDa | HSPH1 | 28 | 1,666866094 | 1,745597839 | 24,70509 | 25,20609 | 23,13893 | 23,28105 |
| Sigma non-opioid intracellular receptor 1 | hCG_20471 | 28 | 2,849279619 | 3,369976044 | 25,89816 | 26,08596 | 22,53673 | 22,70744 |
| Heat shock protein HSP 90-alpha | HSP90AA1 | 28 | 0,911635031 | 1,07562542 | 24,20494 | 24,00992 | 22,62759 | 23,43602 |
| Emerin | EMD | 28 | 2,246339928 | 1,857542038 | 25,6593 | 25,72161 | 23,69593 | 23,9699 |
| | IGL@ | 28 | 1,251593983 | 0,223276138 | 25,62433 | 25,65322 | 25,36222 | 25,46877 |
| Voltage-dependent anion-selective channel protein 2 | VDAC2 | 27 | 2,541009625 | 1,63084507 | 24,26999 | 24,23052 | 22,53399 | 22,70483 |
| MHC class I antigen | | 27 | 2,876809487 | 4,324882507 | 26,7265 | 26,98902 | 22,44536 | 22,6204 |
| Erlin-2 | ERLIN1 | 27 | 2,537906848 | 1,4740448 | 25,29341 | 25,40077 | 23,81437 | 23,93172 |
| 40S ribosomal protein S11 | RPS11 | 27 | 2,705680869 | 2,857913971 | 25,96356 | 26,11504 | 23,07942 | 23,28335 |
| 60S ribosomal protein L30 | RPL30 | 26 | 1,893023735 | 2,570137024 | 25,91964 | 25,9077 | 23,637 | 23,05007 |
| Cartilage-associated protein | CRTAP | 26 | 3,785223113 | 2,497595787 | 25,65196 | 25,71584 | 23,18801 | 23,18459 |
| Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A/B | HNRNPAB | 26 | 0,979344823 | 1,888800621 | 24,75267 | 24,8931 | 22,27263 | 23,59554 |
| DnaJ homolog subfamily A member 1 | DNAJA1 | 26 | 1,611458476 | 2,553215027 | 25,3507 | 25,19952 | 23,12167 | 22,32212 |
| 40S ribosomal protein S25 | RPS25 | 26 | 1,78949634 | 1,374920845 | 25,44313 | 25,63281 | 24,01317 | 24,31293 |
| Transmembrane emp24 domain-containing protein 10 | TMED10 | 25 | 2,394474512 | 2,773283005 | 26,70015 | 27,03926 | 24,04691 | 24,14593 |
| Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein F | HNRPF | 25 | 1,775370939 | 0,496627808 | 23,95411 | 23,9494 | 23,39003 | 23,52023 |
| Torsin-3A | TOR3A | 25 | 3,118227545 | 2,397633553 | 25,30002 | 25,35857 | 22,99105 | 22,87228 |
| Transmembrane 9 superfamily member 2 | TM9SF2 | 24 | 1,929068995 | 1,550219536 | 24,95624 | 24,64708 | 23,18139 | 23,32149 |
| Nodal modulator 1 | NOMO3 | 24 | 1,934476006 | 1,816302299 | 25,39562 | 25,02357 | 23,32668 | 23,45989 |
| Nicastrin | NCSTN | 24 | 2,543323517 | 1,845629692 | 25,44601 | 25,24952 | 23,51395 | 23,49032 |
| ADP/ATP translocase 3 | SLC25A6 | 24 | 1,118118375 | 2,107949257 | 24,9623 | 24,98255 | 23,4821 | 22,24685 |
| 60S ribosomal protein L10 | RPL10 | 23 | 2,233506264 | 1,918206215 | 24,90132 | 25,15653 | 23,03725 | 23,18419 |
| DnaJ homolog subfamily C member 3 | DNAJC3 | 23 | 1,574467335 | 3,232398987 | 26,67694 | 26,89227 | 23,02468 | 24,07973 |
| Protein S100 | S100A9 | 23 | 1,287203467 | 2,106087685 | 24,82469 | 24,88409 | 22,25121 | 23,2454 |
| Histone H3 | H3F3B | 23 | 3,362512334 | 5,621631622 | 28,56289 | 28,68104 | 23,1015 | 22,89916 |
| 60S ribosomal protein L4 | RPL4 | 23 | 0,971988228 | 1,487475395 | 24,36533 | 24,56128 | 23,49578 | 22,45588 |
| ATP synthase subunit beta | ATP5B | 23 | 1,165150783 | 1,242033958 | 24,03649 | 24,21416 | 23,21415 | 22,55243 |
| Chondroitin sulfate synthase 2 | CHPF | 23 | 2,87936575 | 2,219545364 | 24,76172 | 24,91008 | 22,6482 | 22,58452 |
| Probable ATP-dependent RNA helicase DDX17 | DDX17 | 22 | 2,189525652 | 2,668822289 | 25,6108 | 25,52707 | 22,6886 | 23,11162 |
| RNA-binding motif protein, X chromosome | RBMX | 22 | 1,083380907 | 2,818949699 | 25,64287 | 25,63716 | 23,68534 | 21,95679 |
| Pre-mRNA-processing-splicing factor 8 | PRPF8 | 22 | 0,899525411 | 0,391539574 | 23,78487 | 24,05978 | 23,60011 | 23,46145 |
| Dermcidin | DCD | 21 | 1,105289128 | 0,612594604 | 23,94584 | 24,18427 | 23,31425 | 23,59067 |
| Tetratricopeptide repeat protein 13 | DKFZp667K091 | 21 | 1,600847577 | 1,563407898 | 24,96667 | 25,4474 | 23,56691 | 23,72034 |
| Probable glutathione peroxidase 8 | GPX8 | 21 | 1,214177566 | 2,703454971 | 25,37494 | 25,84608 | 22,24726 | 23,56685 |
| GPI-anchor transamidase | PIGK | 20 | 2,816370485 | 2,129608154 | 24,76421 | 24,79595 | 22,73224 | 22,5687 |

Continuação do quadro.

| Protein names | Gene names | MS/MS | *-Log t-test P-value | t-test Difference | EPDEL1_1 | EPDEL1_2 | CTRL2_1 | CTRL2_2 |
|-----------------------------------------------------------|------------|-------|----------------------|-------------------|----------|----------|----------|----------|
| 60S ribosomal protein L8 | RPL8 | 20 | 1,718475675 | 1,777355194 | 25,49293 | 25,55897 | 23,50142 | 23,99576 |
| GRAM domain-containing protein 1A | GRAMD1A | 20 | 2,7728373 | 1,664058685 | 24,87056 | 24,98355 | 23,30162 | 23,22437 |
| Lamin-B1 | LMNB1 | 20 | 1,827922866 | 1,215792656 | 23,88036 | 24,16092 | 22,75204 | 22,85765 |
| 60S ribosomal protein L13 | RPL13 | 19 | 2,169720897 | 1,686372757 | 24,71487 | 24,78526 | 23,19859 | 22,9288 |
| Splicing factor 3B subunit 3 | SF3B3 | 19 | 0,699691182 | 0,430153847 | 24,22486 | 24,13281 | 23,97185 | 23,52552 |
| 60S ribosomal protein L14 | RPL14 | 19 | 1,668191107 | 0,959360123 | 24,35239 | 24,45199 | 23,57675 | 23,30891 |
| Interleukin enhancer-binding factor 2 | ILF2 | 19 | 2,237726838 | 1,981848717 | 24,64894 | 24,6457 | 22,51409 | 22,81686 |
| Annexin | ANXA1 | 19 | 2,621532969 | 2,952353477 | 25,49399 | 25,23202 | 22,47192 | 22,34939 |
| Small nuclear ribonucleoprotein Sm D2 | SNRPD2 | 19 | 2,148787729 | 3,638132095 | 26,22916 | 26,04642 | 22,20533 | 22,79398 |
| SUN domain-containing protein 2 | UNC84B | 18 | 1,741084666 | 2,552222252 | 25,13085 | 25,81034 | 22,84022 | 22,99652 |
| Transmembrane emp24 domain-containing protein 9 | TMED9 | 18 | 2,696276896 | 1,934209824 | 25,14927 | 25,25314 | 23,19732 | 23,33666 |
| Very-long-chain (3R)-3-hydroxyacyl-CoA dehydratase 3 | PTPLAD1 | 18 | 1,514415247 | 1,440454483 | 24,72926 | 24,56151 | 22,96106 | 23,4488 |
| Glypican-4 | GPC4 | 18 | 2,065596036 | 1,562170029 | 24,29474 | 24,49576 | 22,93869 | 22,72747 |
| 60S ribosomal protein L12 | RPL12 | 18 | 1,849087265 | 1,967338562 | 25,37395 | 25,08784 | 23,45199 | 23,07512 |
| 60S ribosomal protein L10a | RPL10A | 18 | 1,073213073 | 2,446565628 | 25,7984 | 26,03783 | 24,22224 | 22,72086 |
| Nuclear pore membrane glycoprotein 210 | NUP210 | 18 | 1,291745809 | 0,871339798 | 24,29243 | 24,02115 | 23,43898 | 23,13192 |
| Protein THEM6 | THEM6 | 18 | 1,326677838 | 1,866890907 | 25,42924 | 24,97937 | 22,98236 | 23,69247 |
| Histone H2B | HIST1H2BC | 17 | 3,383763633 | 4,920100212 | 27,43245 | 27,53193 | 22,47528 | 22,6489 |
| Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein U-like protein 1 | HNRNPUL1 | 17 | 2,19812445 | 1,996297836 | 25,44266 | 25,15449 | 23,23346 | 23,37109 |
| Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein D-like | HNRPDL | 17 | 2,656877688 | 1,66840744 | 25,07725 | 24,99632 | 23,30117 | 23,43559 |
| Nucleophosmin | NPM1 | 17 | 2,734597649 | 2,046837807 | 24,63384 | 24,60264 | 22,48481 | 22,65799 |
| 60S ribosomal protein L18a | RPL18A | 17 | 1,784130808 | 2,179079056 | 25,01253 | 24,57375 | 22,79265 | 22,43547 |
| 60S ribosomal protein L37a | RPL37A | 17 | 1,341321393 | 1,429466248 | 25,14367 | 24,57039 | 23,56072 | 23,29441 |
| Glutaminy-peptide cyclotransferase-like protein | QPCTL | 17 | 2,381026312 | 2,517108917 | 24,99097 | 25,12404 | 22,68901 | 22,39177 |
| 40S ribosomal protein S8 | RPS8 | 17 | 0,789198602 | 0,74468708 | 23,99369 | 24,08213 | 22,95254 | 23,63391 |
| Nucleolar RNA helicase 2 | DDX21 | 17 | 1,477732695 | 2,899018288 | 25,22041 | 25,14748 | 21,7436 | 22,82625 |
| Transmembrane emp24 domain-containing protein 5 | TMED5 | 17 | 3,129929772 | 3,849409103 | 26,99529 | 27,20378 | 23,26159 | 23,23866 |
| Protein ERGIC-53 | LMAN1 | 16 | 1,948569225 | 1,535593033 | 23,86022 | 24,13618 | 22,37338 | 22,55184 |
| Cytochrome c oxidase subunit NDUFA4 | NDUFA4 | 16 | 0,509528402 | 0,673003197 | 24,22575 | 24,22251 | 24,04945 | 23,0528 |
| Peroxiredoxin-2 | HEL-S-2a | 16 | 1,53820879 | 1,14070034 | 23,87764 | 23,74776 | 22,48447 | 22,85953 |
| 60S ribosomal protein L7a | RPL7A | 16 | 0,80465992 | 1,487797737 | 24,93728 | 24,92447 | 22,77237 | 24,11379 |
| Serine/threonine-protein phosphatase PGAM5, mitochondrial | PGAM5 | 16 | 0,93282632 | 1,966328621 | 24,52307 | 25,70812 | 23,58931 | 22,70922 |
| Coiled-coil domain-containing protein 134 | CCDC134 | 16 | 1,074780129 | 1,757308006 | 24,72578 | 25,30911 | 22,79988 | 23,72039 |
| Ribosomal protein L15 | RPL15 | 15 | 2,379029279 | 1,713126183 | 24,96036 | 24,79154 | 23,09062 | 23,23503 |
| Transmembrane protein 33 | TMEM33 | 15 | 0,505865825 | 0,665481567 | 24,28898 | 24,34773 | 23,15741 | 24,14834 |
| DnaJ homolog subfamily A member 3, mitochondrial | DNAJA3 | 15 | 1,814760014 | 1,891464233 | 25,45095 | 25,00731 | 23,42067 | 23,25467 |
| Chondroitin sulfate glucuronyltransferase | CHPF2 | 15 | 0,519456622 | 1,142219543 | 24,59867 | 24,61824 | 24,29565 | 22,63681 |
| 40S ribosomal protein S7 | RPS7 | 15 | 2,4358057061 | 1,535809517 | 24,85239 | 24,67449 | 23,25588 | 23,19938 |
| Surfeit locus protein 4 | SURF4 | 15 | 0,797529119 | 0,624034882 | 24,14227 | 24,56477 | 23,91979 | 23,53918 |

Continuação do quadro.

| Protein names | Gene names | MS/MS | *-Log t-test P-value | t-test Difference | EPDEL1_1 | EPDEL1_2 | CTRL2_1 | CTRL2_2 |
|------------------------------------------------------------------------------|------------|-------|----------------------|-------------------|----------|----------|----------|----------|
| Signal peptidase complex subunit 3 | SPCS3 | 15 | 1,402932241 | 2,197885513 | 25,16216 | 25,22251 | 22,54493 | 23,44397 |
| Protein transport protein Sec61 subunit beta | SEC61B | 15 | 3,9302505 | 2,489889145 | 25,35494 | 25,33429 | 22,8298 | 22,87966 |
| Stromal cell-derived factor 2-like protein 1 | SDF2L1 | 15 | 2,349955251 | 2,353818893 | 25,6319 | 25,46463 | 23,32833 | 23,06057 |
| Dolichyl-diphosphooligosaccharide--protein glycosyltransferase subunit STT3B | STT3B | 15 | 1,156566569 | 1,252182007 | 24,07496 | 23,98546 | 23,12435 | 22,43171 |
| UPF0556 protein C19orf10 | C19orf10 | 15 | 1,065930296 | 1,481356621 | 24,73019 | 24,47933 | 23,57085 | 22,67595 |
| UDP-glucose:glycoprotein glucosyltransferase 2 | UGGT2 | 15 | 0,958854319 | 1,353531837 | 24,16331 | 23,7494 | 23,04716 | 22,15849 |
| Protein disulfide-isomerase | P4HB | 14 | 2,711800904 | 2,197939873 | 24,35232 | 24,34184 | 22,05229 | 22,24599 |
| 40S ribosomal protein S16 | RPS16 | 14 | 1,240844122 | 0,37667942 | 24,39931 | 24,56023 | 24,05374 | 24,15243 |
| DNA replication licensing factor MCM3 | HCC5 | 14 | 2,00282438 | 0,773213387 | 23,7494 | 23,77706 | 22,91361 | 23,06642 |
| Importin subunit alpha | KPNA2 | 14 | 0,905615755 | 0,777379036 | 24,40555 | 25,01133 | 23,94115 | 23,92097 |
| 60S ribosomal protein L23a | RPL23A | 14 | 0,611489706 | 0,327097893 | 24,00427 | 24,11227 | 23,53793 | 23,92443 |
| Heat shock 70 kDa protein 6 | HSPA6 | 14 | 2,716560876 | 3,670981407 | 29,01215 | 28,95723 | 25,15495 | 25,47246 |
| Ig heavy chain V-I region V35 | scFv | 14 | 1,5551891 | 3,238845825 | 26,91274 | 26,81873 | 23,07679 | 24,17698 |
| 60S ribosomal protein L27 | RPL27 | 13 | 2,581139573 | 1,893737793 | 24,80956 | 24,69795 | 22,78045 | 22,93959 |
| Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein D0 | HNRNPD | 13 | 2,053862415 | 1,170953751 | 23,89791 | 23,75471 | 22,57081 | 22,7399 |
| Probable ATP-dependent RNA helicase DDX46 | DDX46 | 13 | 1,584516937 | 1,583357811 | 24,08497 | 24,57946 | 22,66658 | 22,83113 |
| 40S ribosomal protein S6 | RPS6 | 13 | 2,270500643 | 1,196531296 | 24,07227 | 24,1529 | 22,83785 | 22,99426 |
| 60S ribosomal protein L28 | RPL28 | 13 | 1,746196609 | 1,605439186 | 24,24641 | 24,23294 | 22,41637 | 22,8521 |
| Melanoma inhibitory activity protein 3 | MIA3 | 13 | 1,110947533 | 1,824431419 | 24,54498 | 25,02445 | 22,47684 | 23,44373 |
| Cell cycle progression protein 1 | CCPG1 | 12 | 2,693855993 | 2,302983284 | 25,05155 | 25,182 | 22,7331 | 22,89448 |
| Nascent polypeptide-associated complex subunit alpha | NACA | 12 | 1,658074918 | 1,212135315 | 24,26678 | 24,04852 | 22,79897 | 23,09205 |
| Nicalin | NCLN | 12 | 1,831570706 | 1,971876144 | 25,28097 | 25,08659 | 22,9902 | 23,4336 |
| Protein canopy homolog 2 | CNPY2 | 12 | 2,041535493 | 1,489494324 | 24,01385 | 24,29579 | 22,68914 | 22,64151 |
| 40S ribosomal protein S14 | RPS14 | 12 | 4,176667338 | 1,185420036 | 24,73381 | 24,72682 | 23,53588 | 23,55391 |
| Magnesium transporter protein 1 | MAGT1 | 11 | 2,479194106 | 3,432559013 | 25,37607 | 25,72101 | 22,01832 | 22,21364 |
| Protein FAM3A | FAM3A | 11 | 1,063061285 | 1,676497459 | 24,74853 | 24,37365 | 22,39108 | 23,3781 |
| 40S ribosomal protein S15a | RPS15A | 11 | 2,954501655 | 1,92372036 | 24,66693 | 24,57115 | 22,73801 | 22,65262 |
| Exostosin-2 | EXT2 | 11 | 1,003446987 | 2,302105904 | 25,92863 | 24,59224 | 23,36984 | 22,54682 |
| Reticulocalbin-2 | RCN2 | 11 | 1,887239196 | 2,268537521 | 24,9486 | 25,14892 | 22,53937 | 23,02107 |
| Rab-like protein 3 | RABL3 | 11 | 0,798364282 | 0,84560585 | 23,92316 | 23,83316 | 23,41471 | 22,65039 |
| Phospholipase D3 | PLD3 | 10 | 1,077601713 | 1,003127098 | 23,44228 | 24,03967 | 22,65531 | 22,82039 |
| 60S ribosomal protein L5 | RPL5 | 10 | 2,448721409 | 1,364168167 | 24,14118 | 24,14973 | 22,6998 | 22,86277 |
| Very-long-chain enoyl-CoA reductase | TECR | 10 | 1,496561731 | 0,688131332 | 23,84345 | 23,97185 | 23,11123 | 23,3278 |
| Cleavage and polyadenylation specificity factor subunit 7 | CPSF7 | 10 | 0,693046682 | 0,96844101 | 23,73707 | 24,39454 | 22,6964 | 23,49832 |
| Tubulin alpha-1C chain | TUBA1C | 10 | 0,519591253 | 0,704667091 | 24,03229 | 23,59035 | 22,64524 | 23,56807 |
| Cleavage and polyadenylation specificity factor subunit 6 | CPSF6 | 10 | 1,567496294 | 2,283096313 | 25,46874 | 25,63918 | 22,89698 | 23,64475 |
| 60S ribosomal protein L13a | RPL13A | 10 | 1,822251283 | 0,883137703 | 23,44733 | 23,66655 | 22,67438 | 22,67323 |
| Lamin-B receptor | LBR | 9 | 1,950266331 | 0,843203545 | 24,00419 | 24,11521 | 23,1456 | 23,2874 |
| 60S ribosomal protein L34 | RPL34 | 9 | 1,994531163 | 1,062259674 | 23,91223 | 23,77143 | 22,69805 | 22,8611 |

Continuação do quadro.

| Protein names | Gene names | MS/MS | *-Log t-test P-value | t-test Difference | EPDEL1_1 | EPDEL1_2 | CTRL2_1 | CTRL2_2 |
|----------------------------------------------------|------------|-------|----------------------|-------------------|----------|----------|----------|----------|
| Single-stranded DNA-binding protein | SSBP1 | 9 | 1,643970823 | 1,290665627 | 24,15653 | 23,79808 | 22,60286 | 22,77043 |
| V-type proton ATPase subunit S1 | FLJ00383 | 9 | 3,1154666 | 1,958343506 | 24,10109 | 24,1689 | 22,1343 | 22,21901 |
| Calreticulin | HEL-S-99n | 9 | 3,832305386 | 1,820560455 | 24,96715 | 24,92316 | 23,12259 | 23,12659 |
| MHC class I antigen | HLA-A | 9 | 2,054532709 | 3,251774788 | 26,48866 | 26,30775 | 23,44025 | 22,85261 |
| Small nuclear ribonucleoprotein Sm D1 | SNRPD1 | 9 | 1,6676519 | 1,805399895 | 24,99503 | 25,01721 | 23,46954 | 22,93189 |
| Deleted in autism protein 1 | C3orf58 | 9 | 0,782936072 | 1,045331001 | 23,63589 | 24,18548 | 22,46355 | 23,26716 |
| IgG H chain | | 9 | 1,986072886 | 3,36107254 | 26,13046 | 26,09313 | 23,09443 | 22,40702 |
| Calcyclin-binding protein | CACYBP | 8 | 0,462778677 | 0,663274765 | 23,36466 | 23,17779 | 22,07572 | 23,14019 |
| DNA replication licensing factor MCM7 | MCM7 | 8 | 2,269827752 | 1,907888412 | 23,58095 | 23,76466 | 21,65872 | 21,87111 |
| Nucleotide exchange factor SIL1 | SIL1 | 8 | 1,498935867 | 0,508934021 | 23,85918 | 23,98963 | 23,34941 | 23,48153 |
| Nucleolysin TIAR | TIAL1 | 8 | 1,549883262 | 1,777097702 | 24,4632 | 24,70208 | 23,08603 | 22,52505 |
| Chitinase domain-containing protein 1 | CHID1 | 8 | 1,216305229 | 0,313123703 | 23,89541 | 23,79907 | 23,46909 | 23,59915 |
| 40S ribosomal protein S27 | RPS27 | 8 | 0,802548252 | 1,790747643 | 25,03225 | 25,16511 | 22,50081 | 24,11505 |
| Polyadenylate-binding protein 1 | PABPC1 | 7 | 1,668384004 | 1,01388073 | 24,16974 | 24,35111 | 23,36724 | 23,12585 |
| Protein disulfide-isomerase A4 | PDIA4 | 7 | 2,483035864 | 1,515439987 | 24,48456 | 24,57016 | 22,93605 | 23,0878 |
| Small nuclear ribonucleoprotein-associated protein | SNRPN | 7 | 0,531920081 | 0,512774467 | 23,49167 | 23,62109 | 23,40134 | 22,68588 |
| DNA replication licensing factor MCM5 | MCM5 | 6 | 1,053209379 | 1,084015846 | 24,20985 | 24,10462 | 22,73144 | 23,415 |
| 45 kDa calcium-binding protein | SDF4 | 5 | 2,163751575 | 1,018387794 | 24,09313 | 24,17828 | 23,04401 | 23,19063 |
| RNA-binding protein EWS | EWSR1 | 5 | 1,62676882 | 0,677641869 | 24,47358 | 24,29733 | 23,64886 | 23,76677 |
| Beta-hexosaminidase | HEXA | 5 | 1,159756634 | 0,281116486 | 23,30299 | 23,34557 | 22,96805 | 23,11828 |
| Protein disulfide-isomerase | HEL-S-269 | 5 | 0,630471654 | 1,048315048 | 24,0653 | 23,91534 | 23,55989 | 22,32412 |
| Prolyl 3-hydroxylase 3 | LEPREL2 | 5 | 1,299973783 | 0,612211227 | 23,64218 | 23,8825 | 23,22668 | 23,07358 |
| | | 4 | 1,89524441 | 1,469449043 | 23,87708 | 23,83682 | 22,22134 | 22,55367 |
| Myosin-9 | MYH9 | 3 | 2,265315946 | 1,284116745 | 23,51316 | 23,52719 | 22,14132 | 22,3308 |
| DnaJ homolog subfamily A member 2 | DNAJA2 | 3 | 2,242958355 | 3,264153481 | 25,0258 | 25,47865 | 21,8873 | 22,08884 |
| Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase-like 4 | PPIL4 | 3 | 2,028174365 | 0,911890984 | 23,05547 | 22,97456 | 22,02395 | 22,18229 |
| Probable Xaa-Pro aminopeptidase 3 | XPNPEP3 | 3 | 0,653491708 | 0,641004562 | 23,10189 | 22,4977 | 22,36563 | 21,95196 |

8.4. Apêndice 4: Quadro de proteínas encontradas na condição KMUT através do ensaio de imunoprecipitação em HEK293T.

| Protein names | Gene names | MS/MS | *-Log t-test | P-value | t-test | Difference | CTRL2_1 | CTRL2_2 | KMUT1_1 | KMUT1_2 |
|--------------------------------------------------------------------------|-------------|-------|--------------|-------------|---------|------------|----------|----------|---------|---------|
| LAG3 | LAG3 | 1035 | 6,231949101 | 12,45568657 | 23,3484 | 23,35467 | 35,81624 | 35,79822 | | |
| 78 kDa glucose-regulated protein | HEL-S-89n | 844 | 3,4160538 | 10,07700253 | 23,0858 | 23,48059 | 33,36372 | 33,35666 | | |
| Neutral alpha-glucosidase AB | HEL-S-164nA | 346 | 3,671512021 | 7,5809021 | 22,9768 | 22,75592 | 30,43986 | 30,45464 | | |
| Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins A2/B1 | HNRNPA2B1 | 316 | 4,245865775 | 3,389583588 | 27,5327 | 27,55516 | 30,95643 | 30,91056 | | |
| Tubulin beta-4B chain | TUBB2C | 257 | 1,034137057 | 1,386425018 | 27,616 | 26,72624 | 28,4689 | 28,64616 | | |
| Collagen alpha-1(I) chain | COL1A1 | 253 | 2,706384968 | 7,021533966 | 23,0301 | 23,65225 | 30,34149 | 30,38391 | | |
| Glycogen phosphorylase, liver form | PYGL | 243 | 1,988777139 | 5,37640667 | 22,374 | 23,46821 | 28,34143 | 28,25359 | | |
| RuvB-like 2 | RUVBL2 | 231 | 4,924406591 | 6,415947914 | 23,9888 | 23,94449 | 30,38288 | 30,38227 | | |
| Tubulin alpha-1B chain | TUBA1B | 184 | 2,381367113 | 1,570446968 | 27,9513 | 27,76844 | 29,38616 | 29,4745 | | |
| Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein M | HNRNPM | 175 | 1,580774951 | 0,762541771 | 27,2655 | 27,47429 | 28,20313 | 28,06178 | | |
| Serpin H1 | SERPINH1 | 154 | 3,464257912 | 3,702266693 | 23,4441 | 23,57176 | 27,18499 | 27,23544 | | |
| RuvB-like 1 | RUVBL1 | 144 | 1,999362208 | 6,141654015 | 22,1608 | 23,39245 | 28,98378 | 28,85281 | | |
| Cytoskeleton-associated protein 4 | CKAP4 | 141 | 2,709244169 | 5,390148163 | 23,2707 | 23,40657 | 28,95748 | 28,5001 | | |
| Protein disulfide-isomerase A6 | PDIA6 | 141 | 2,9115788 | 5,977258682 | 22,866 | 22,48286 | 28,73641 | 28,56696 | | |
| Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H | HNRNPH1 | 137 | 2,379129668 | 1,721993446 | 26,664 | 26,57788 | 28,23991 | 28,44593 | | |
| Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1 | HNRNPA1 | 132 | 1,389542057 | 2,580280304 | 25,551 | 24,61358 | 27,92598 | 27,39917 | | |
| ADP/ATP translocase 2 | SLC25A5 | 114 | 4,142607513 | 1,844290733 | 27,7206 | 27,7449 | 29,56718 | 29,58689 | | |
| Endoplasmic reticulum resident protein 44 | ERP44 | 111 | 2,223439 | 6,184350967 | 22,5386 | 23,49909 | 29,19481 | 29,21157 | | |
| Heat shock protein HSP 90-beta | HSP90AB1 | 110 | 1,454237018 | 0,583042145 | 26,037 | 26,25829 | 26,74957 | 26,71175 | | |
| Ubiquitin-60S ribosomal protein L40 | UBB | 101 | 3,323112165 | 5,23729229 | 24,6521 | 24,82206 | 29,89807 | 30,05064 | | |
| Probable ATP-dependent RNA helicase DDX5 | DDX5 | 97 | 2,596876594 | 3,570314407 | 23,4729 | 23,63827 | 27,28569 | 26,96609 | | |
| Collagen alpha-2(I) chain | COL1A2 | 96 | 3,865041952 | 7,034892082 | 22,6852 | 22,84884 | 29,80951 | 29,7943 | | |
| Dolichyl-diphosphooligosaccharide--protein glycosyltransferase subunit 1 | RPN1 | 94 | 3,803475567 | 3,967469215 | 23,3621 | 23,40063 | 27,30295 | 27,39468 | | |
| Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein U | HNRNPU | 92 | 1,433120551 | 1,041158676 | 27,3821 | 26,99701 | 28,30308 | 28,15837 | | |
| Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A3 | HNRNPA3 | 84 | 3,005314238 | 4,007293701 | 23,1362 | 22,98773 | 26,96741 | 27,17112 | | |
| Annexin | HEL-S-270 | 81 | 1,896900361 | 0,948515892 | 27,5505 | 27,34494 | 28,42882 | 28,36369 | | |
| 40S ribosomal protein S18 | RPS18 | 81 | 0,451768151 | 0,603560448 | 26,6775 | 27,67122 | 27,6967 | 27,85911 | | |
| Prohibitin-2 | PHB2 | 77 | 3,177324679 | 5,196936607 | 23,1565 | 23,41473 | 28,51856 | 28,44652 | | |
| Transitional endoplasmic reticulum ATPase | HEL-S-70 | 71 | 1,691745293 | 4,44414711 | 22,1894 | 23,47422 | 27,23681 | 27,3151 | | |
| Endoplasmin | TRA1 | 68 | 2,045446426 | 4,276843071 | 22,0532 | 22,8647 | 26,78432 | 26,68726 | | |
| 40S ribosomal protein S4 | RPS4X | 67 | 1,944182402 | 0,7084589 | 26,8124 | 26,66506 | 27,42766 | 27,46669 | | |
| Leucine-rich repeat-containing protein 59 | LRRC59 | 66 | 1,722835551 | 1,405217171 | 24,5987 | 24,97395 | 26,13436 | 26,24875 | | |
| MHC class I antigen | HLA-C | 65 | 2,154391396 | 4,041217804 | 23,2183 | 22,80319 | 27,32139 | 26,78257 | | |
| 40S ribosomal protein S3 | RPS3 | 64 | 2,190764298 | 3,243466377 | 22,6071 | 23,00478 | 25,87933 | 26,21945 | | |
| Collagen, type I, alpha 1, isoform CRA_ | COL1A1 | 62 | 3,503294789 | 7,012119293 | 23,406 | 23,61616 | 30,45689 | 30,58951 | | |
| Coatomer subunit alpha | COPA | 61 | 1,946394381 | 2,952898979 | 22,831 | 23,46405 | 26,0878 | 26,11303 | | |
| UDP-glucose:glycoprotein glucosyltransferase 1 | UGGT1 | 59 | 1,183211194 | 2,248038292 | 23,2461 | 22,75196 | 24,69381 | 25,80033 | | |

Continuação do quadro.

| Protein names | Gene names | MS/MS | *-Log t-test | P-value | t-test | Difference | CTRL2_1 | CTRL2_2 | KMUT1_1 | KMUT1_2 |
|-------------------------------------------------------------------------------|-------------|-------|--------------|-------------|---------|------------|----------|----------|---------|---------|
| Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H3 | HNRPH3 | 58 | 2,550836012 | 3,512687683 | 24,7525 | 24,49546 | 28,27209 | 28,00126 | | |
| Transmembrane protein 43 | TMEM43 | 58 | 3,44624259 | 4,009382248 | 22,9375 | 23,0892 | 27,02062 | 27,02485 | | |
| Protein transport protein Sec61 subunit alpha isoform 1 | SEC61A1 | 55 | 1,814748652 | 4,54324913 | 23,2453 | 24,38286 | 28,36778 | 28,34685 | | |
| 40S ribosomal protein S13 | RPS13 | 54 | 1,672066888 | 3,21258831 | 23,5094 | 22,56295 | 26,3025 | 26,195 | | |
| Pyrroline-5-carboxylate reductase | PYCR1 | 53 | 1,030436433 | 1,300148964 | 23,1603 | 24,00905 | 24,83326 | 24,93643 | | |
| 40S ribosomal protein S9 | RPS9 | 51 | 3,21738313 | 4,016237259 | 22,8613 | 23,0166 | 26,89389 | 27,01648 | | |
| Glycogen phosphorylase, brain form | PYGB | 51 | 0,733558957 | 0,428039551 | 23,2162 | 23,60793 | 23,92868 | 23,75154 | | |
| Eukaryotic initiation factor 4A-I | EIF4A1 | 50 | 3,061282642 | 1,958576202 | 23,8108 | 23,69808 | 25,72573 | 25,70026 | | |
| Peroxiredoxin-4 | HEL-S-97n | 49 | 2,228009608 | 3,381700516 | 22,9901 | 23,48192 | 26,52955 | 26,70583 | | |
| ATP synthase subunit O, mitochondrial | ATP5O | 48 | 1,416856393 | 0,781986237 | 25,3807 | 25,67949 | 26,26189 | 26,3623 | | |
| 60S acidic ribosomal protein P0-like | RPLP0 | 47 | 2,990263683 | 3,270418167 | 22,3211 | 22,502 | 25,73456 | 25,62931 | | |
| Clathrin heavy chain 1 | CLTC | 47 | 2,938701593 | 2,521722794 | 22,8349 | 22,9914 | 25,40009 | 25,46961 | | |
| DnaJ homolog subfamily C member 16 | DNAJC16 | 46 | 2,375913874 | 2,83365345 | 23,573 | 23,20919 | 26,25497 | 26,19453 | | |
| Prolyl 3-hydroxylase 1 | LEPRE1 | 46 | 1,33945121 | 3,25682354 | 23,9342 | 22,49553 | 26,53092 | 26,41241 | | |
| DnaJ homolog subfamily B member 11 | DNAJB11 | 46 | 2,035875974 | 4,71036911 | 21,9604 | 22,86626 | 27,16844 | 27,07898 | | |
| RNA-binding protein FUS | FUS | 45 | 2,466365893 | 2,99092865 | 22,7691 | 23,11806 | 25,91768 | 25,95136 | | |
| 4F2 cell-surface antigen heavy chain | SLC3A2 | 45 | 1,685930798 | 2,64054966 | 23,2793 | 22,8108 | 25,99121 | 25,37997 | | |
| ATPase family AAA domain-containing protein 3A | ATAD3A | 45 | 2,941740274 | 3,029415131 | 23,1806 | 23,19363 | 26,31883 | 26,11418 | | |
| Dolichyl-diphosphooligosaccharide--protein glycosyltransferase 48 kDa subunit | DDOST | 44 | 2,896924856 | 4,143089294 | 23,2684 | 23,12062 | 27,46544 | 27,20974 | | |
| ATP-dependent RNA helicase DDX3X | DDX3X | 44 | 2,090315937 | 1,496660233 | 23,4123 | 23,54147 | 25,09293 | 24,85419 | | |
| Dolichyl-diphosphooligosaccharide--protein glycosyltransferase subunit STT3A | hCG_2032701 | 43 | 3,191513317 | 3,032499313 | 23,2585 | 23,39491 | 26,32358 | 26,3948 | | |
| ATP synthase subunit gamma | ATP5C1 | 43 | 1,72751583 | 2,887060165 | 23,608 | 22,81114 | 26,05354 | 26,1397 | | |
| Desmoplakin | DSP | 43 | 1,865886963 | 3,509824753 | 22,7018 | 23,1987 | 26,12914 | 26,79104 | | |
| Signal recognition particle receptor subunit beta | SRPRB | 43 | 3,492568221 | 3,249379158 | 23,5308 | 23,54374 | 26,72871 | 26,84458 | | |
| Renin receptor | ATP6AP2 | 42 | 3,36096031 | 3,124045372 | 23,6957 | 23,81137 | 26,84745 | 26,9077 | | |
| Thioredoxin-related transmembrane protein 1 | TMX1 | 42 | 2,256491484 | 4,072306633 | 23,5528 | 22,95809 | 27,26266 | 27,3928 | | |
| Protein S100-A8 | S100A8 | 39 | 3,39958491 | 3,9292593 | 25,7912 | 25,92477 | 29,74606 | 29,82845 | | |
| Translocon-associated protein subunit delta | SSR4 | 39 | 1,873345491 | 2,687375069 | 23,8621 | 23,27847 | 26,37382 | 26,14151 | | |
| 40S ribosomal protein S2 | RPS2 | 38 | 1,539935879 | 2,811915398 | 23,5208 | 22,59279 | 26,02052 | 25,71686 | | |
| 40S ribosomal protein S19 | RPS19 | 36 | 1,98654398 | 2,202260017 | 23,822 | 24,261 | 26,29511 | 26,19244 | | |
| Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase | HEL-S-39 | 36 | 3,183989856 | 3,01947403 | 22,6944 | 22,77443 | 25,82004 | 25,68777 | | |
| 60S ribosomal protein L11 | RPL11 | 36 | 1,572584073 | 2,472076416 | 22,5508 | 23,37619 | 25,43336 | 25,43781 | | |
| Mitochondrial import inner membrane translocase subunit TIM50 | TIMM50 | 35 | 3,079856189 | 3,192710876 | 22,3759 | 22,55424 | 25,63453 | 25,68102 | | |
| Exportin-2 | CSE1L | 35 | 0,999379056 | 1,11264801 | 22,7684 | 23,531 | 24,2548 | 24,26992 | | |
| 60S ribosomal protein L18 | RPL18 | 33 | 2,738714198 | 2,865243912 | 22,1787 | 22,36641 | 25,05895 | 25,21664 | | |
| RNA-binding protein 14 | RBM14 | 33 | 1,238424875 | 1,000385284 | 24,0271 | 24,12709 | 25,32392 | 24,83108 | | |
| DnaJ homolog subfamily C member 10 | DNAJC10 | 33 | 3,376397848 | 2,622220993 | 22,9211 | 22,81362 | 25,48794 | 25,49124 | | |
| 60S ribosomal protein L7 | RPL7 | 32 | 2,692091093 | 1,963946342 | 23,4461 | 23,57368 | 25,41225 | 25,53546 | | |

Continuação do quadro.

| Protein names | Gene names | MS/MS | *-Log t-test | P-value | t-test | Difference | CTRL2_1 | CTRL2_2 | KMUT1_1 | KMUT1_2 |
|--------------------------------------------------------------------------|-------------|-------|--------------|-------------|---------|------------|----------|----------|---------|---------|
| 40S ribosomal protein S3a | RPS3A | 31 | 2,542144597 | 3,329368591 | 22,9678 | 23,11445 | 26,20749 | 26,53352 | | |
| Procollagen-lysine,2-oxoglutarate 5-dioxygenase 1 | PLOD1 | 30 | 1,814829954 | 1,203413963 | 22,939 | 23,09065 | 24,08805 | 24,34848 | | |
| DAZ-associated protein 1 | DAZAP1 | 30 | 2,812297694 | 2,201642036 | 22,5414 | 22,71192 | 24,84312 | 24,81353 | | |
| Prohibitin | PHB | 30 | 2,171966582 | 0,639590263 | 23,2408 | 23,33788 | 23,94958 | 23,9083 | | |
| Dolichyl-diphosphooligosaccharide--protein glycosyltransferase subunit 2 | RPN2 | 30 | 2,278385388 | 2,755785942 | 23,2623 | 23,54941 | 26,30205 | 26,02124 | | |
| Transferrin receptor protein 1 | TFRC | 29 | 1,691492928 | 1,923204422 | 23,6075 | 23,05032 | 25,25566 | 25,24855 | | |
| Alpha-galactosidase A | GLA | 29 | 0,513279218 | 0,737332344 | 22,2747 | 23,3527 | 23,49448 | 23,60761 | | |
| Histone H2A | HIST1H2AH | 28 | 2,871501726 | 4,796886444 | 22,9705 | 22,62471 | 27,56129 | 27,6277 | | |
| Sigma non-opioid intracellular receptor 1 | hCG_20471 | 28 | 3,231665399 | 3,523334503 | 22,5367 | 22,70744 | 26,14715 | 26,14369 | | |
| Heat shock protein HSP 90-alpha | HSP90AA1 | 28 | 1,246079273 | 1,626210213 | 22,6276 | 23,43602 | 24,636 | 24,68003 | | |
| Emerin | EMD | 28 | 2,543383893 | 2,792724609 | 23,6959 | 23,9699 | 26,56522 | 26,68606 | | |
| Voltage-dependent anion-selective channel protein 2 | VDAC2 | 27 | 3,025605386 | 2,994970322 | 22,534 | 22,70483 | 25,64861 | 25,58015 | | |
| Phosphate carrier protein, mitochondrial | SLC25A3 | 27 | 1,150350771 | 0,3005476 | 25,6354 | 25,57644 | 25,82728 | 25,98564 | | |
| MHC class I antigen | | 27 | 2,791866443 | 3,803584099 | 22,4454 | 22,6204 | 26,21093 | 26,462 | | |
| Erlin-2 | ERLIN1 | 27 | 2,691910265 | 1,350933075 | 23,8144 | 23,93172 | 25,20728 | 25,24067 | | |
| 40S ribosomal protein S11 | RPS11 | 27 | 2,13943054 | 2,892237663 | 23,0794 | 23,28335 | 26,29934 | 25,8479 | | |
| 60S ribosomal protein L30 | RPL30 | 26 | 0,654006702 | 0,720029831 | 23,637 | 23,05007 | 24,35118 | 23,77595 | | |
| Cartilage-associated protein | CRTAP | 26 | 2,627089199 | 2,061815262 | 23,188 | 23,18459 | 25,34844 | 25,14779 | | |
| Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A/B | HNRNPAB | 26 | 0,951652822 | 1,820981979 | 22,2726 | 23,59554 | 24,67745 | 24,83268 | | |
| DnaJ homolog subfamily A member 1 | DNAJA1 | 26 | 1,561974192 | 2,365900993 | 23,1217 | 22,32212 | 25,07366 | 25,10193 | | |
| 40S ribosomal protein S25 | RPS25 | 26 | 2,284320669 | 2,164251328 | 24,0132 | 24,31293 | 26,28185 | 26,37275 | | |
| Transmembrane emp24 domain-containing protein 10 | TMED10 | 25 | 2,190363059 | 2,227769852 | 24,0469 | 24,14593 | 26,49704 | 26,15134 | | |
| Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein F | HNRPF | 25 | 1,055467645 | 0,235230446 | 23,39 | 23,52023 | 23,72723 | 23,65349 | | |
| Torsin-3A | TOR3A | 25 | 2,743740828 | 2,55960083 | 22,9911 | 22,87228 | 25,58251 | 25,40002 | | |
| Tran+B2:B28smembrane 9 superfamily member 2 | TM9S+C2:C19 | 24 | 2,72067965 | 1,627555847 | 23,1814 | 23,32149 | 24,89111 | 24,86689 | | |
| Nodal modulator 1 | NOMO3 | 24 | 2,690146256 | 1,862455368 | 23,3267 | 23,45989 | 25,20411 | 25,30737 | | |
| Nicastrin | NCSTN | 24 | 1,40026308 | 1,498908997 | 23,514 | 23,49032 | 25,30907 | 24,69301 | | |
| ADP/ATP translocase 3 | SLC25A6 | 24 | 1,281431597 | 2,616166115 | 23,4821 | 22,24685 | 25,56273 | 25,39855 | | |
| 60S ribosomal protein L10 | RPL10 | 23 | 2,305272352 | 1,443133354 | 23,0373 | 23,18419 | 24,6245 | 24,48321 | | |
| DnaJ homolog subfamily C member 3 | DNAJC3 | 23 | 1,412749919 | 2,614311218 | 23,0247 | 24,07973 | 26,12084 | 26,21219 | | |
| Protein S100 | S100A9 | 23 | 2,252765632 | 6,622759819 | 22,2512 | 23,2454 | 29,37803 | 29,36409 | | |
| Histone H3 | H3F3B | 23 | 2,872417888 | 4,145756721 | 23,1015 | 22,89916 | 27,03265 | 27,25953 | | |
| 60S ribosomal protein L4 | RPL4 | 23 | 0,648537037 | 0,908484459 | 23,4958 | 22,45588 | 23,8261 | 23,94253 | | |
| ATP synthase subunit beta | ATP5B | 23 | 0,646791556 | 0,630981445 | 23,2142 | 22,55243 | 23,66709 | 23,36145 | | |
| Chondroitin sulfate synthase 2 | CHPF | 23 | 2,840290992 | 1,880997658 | 22,6482 | 22,58452 | 24,56145 | 24,43326 | | |
| Junction plakoglobin | JUP | 22 | 1,862395656 | 2,526101112 | 22,3361 | 22,51632 | 24,66714 | 25,23747 | | |
| Probable ATP-dependent RNA helicase DDX17 | DDX17 | 22 | 1,015694677 | 1,654712677 | 22,6886 | 23,11162 | 24,04185 | 25,0678 | | |
| RNA-binding motif protein, X chromosome | RBMX | 22 | 1,082569266 | 2,826601028 | 23,6853 | 21,95679 | 25,57239 | 25,72294 | | |

Continuação do quadro.

| Protein names | Gene names | MS/MS | *-Log t-test | P-value | t-test | Difference | CTRL2_1 | CTRL2_2 | KMUT1_1 | KMUT1_2 |
|----------------------------------------------------------|-------------|-------|--------------|-------------|---------|------------|----------|----------|---------|---------|
| Pre-mRNA-processing-splicing factor 8 | PRPF8 | 22 | 1,476579994 | 0,377855301 | 23,6001 | 23,46145 | 23,89421 | 23,92307 | | |
| 40S ribosomal protein S5 | RPS5 | 21 | 1,533458195 | 0,894647598 | 23,6711 | 23,78796 | 24,76941 | 24,47896 | | |
| Mitochondrial 2-oxoglutarate/malate carrier protein | SLC25A11 | 21 | 0,935729549 | 0,487668991 | 24,2829 | 24,50731 | 24,73908 | 25,02648 | | |
| Dermcidin | DCD | 21 | 2,174418971 | 2,177476883 | 23,3143 | 23,59067 | 25,51614 | 25,74373 | | |
| Tetratricopeptide repeat protein 13 | DKFZp667K09 | 21 | 0,911823389 | 0,646499634 | 23,5669 | 23,72034 | 24,05234 | 24,52791 | | |
| Probable glutathione peroxidase 8 | GPX8 | 21 | 1,195782141 | 2,496476173 | 22,2473 | 23,56685 | 25,34702 | 25,46005 | | |
| GPI-anchor transamidase | PIGK | 20 | 2,295800448 | 1,315583229 | 22,7322 | 22,5687 | 23,9198 | 24,01231 | | |
| 60S ribosomal protein L8 | RPL8 | 20 | 1,748577626 | 1,89172554 | 23,5014 | 23,99576 | 25,70744 | 25,5732 | | |
| GRAM domain-containing protein 1A | GRAMD1A | 20 | 1,007585442 | 1,019053459 | 23,3016 | 23,22437 | 24,62533 | 23,93876 | | |
| Lamin-B1 | LMNB1 | 20 | 2,734362916 | 1,264288902 | 22,752 | 22,85765 | 24,05623 | 24,08205 | | |
| Serpin B3 | SCCA2 | 20 | 2,644410317 | 4,921766281 | 23,3097 | 23,77267 | 28,50218 | 28,42374 | | |
| 60S ribosomal protein L13 | RPL13 | 19 | 1,780278287 | 1,806912422 | 23,1986 | 22,9288 | 24,6774 | 25,06382 | | |
| Interleukin enhancer-binding factor 2 | ILF2 | 19 | 1,401419644 | 0,956497192 | 22,5141 | 22,81686 | 23,74714 | 23,4968 | | |
| Annexin | ANXA1 | 19 | 3,527618653 | 4,236124992 | 22,4719 | 22,34939 | 26,6071 | 26,68646 | | |
| Fatty acid-binding protein, epidermal | FABP5 | 19 | 1,439672201 | 0,339419365 | 26,7323 | 26,76294 | 27,02232 | 27,1518 | | |
| Small nuclear ribonucleoprotein Sm D2 | SNRPD2 | 19 | 2,084153264 | 3,633728027 | 22,2053 | 22,79398 | 26,28673 | 25,98005 | | |
| Transmembrane emp24 domain-containing protein 9 | TMED9 | 18 | 2,245954241 | 2,11775589 | 23,1973 | 23,33666 | 25,52904 | 25,24045 | | |
| Very-long-chain (3R)-3-hydroxyacyl-CoA dehydratase 3 | PTPLAD1 | 18 | 1,7879069 | 1,904356003 | 22,9611 | 23,4488 | 25,07606 | 25,1425 | | |
| Glypican-4 | GPC4 | 18 | 1,986552155 | 1,550761223 | 22,9387 | 22,72747 | 24,50233 | 24,26535 | | |
| 60S ribosomal protein L12 | RPL12 | 18 | 1,578922438 | 1,137694359 | 23,452 | 23,07512 | 24,40581 | 24,39669 | | |
| 60S ribosomal protein L10a | RPL10A | 18 | 1,147384586 | 2,662602425 | 24,2222 | 22,72086 | 26,10322 | 26,16509 | | |
| Nuclear pore membrane glycoprotein 210 | NUP210 | 18 | 1,255578209 | 0,688184738 | 23,439 | 23,13192 | 24,04494 | 23,90233 | | |
| Protein THEM6 | THEM6 | 18 | 1,456365315 | 1,848633766 | 22,9824 | 23,69247 | 25,18492 | 25,18718 | | |
| Histone H2B | HIST1H2BC | 17 | 3,195064976 | 3,585255623 | 22,4753 | 22,6489 | 26,17331 | 26,12137 | | |
| Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein U-like protein 1 | HNRNPUL1 | 17 | 1,954559605 | 0,760465622 | 23,2335 | 23,37109 | 24,10509 | 24,02039 | | |
| Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein D-like | HNRPDL | 17 | 2,258997987 | 1,741279602 | 23,3012 | 23,43559 | 24,99865 | 25,22066 | | |
| Nucleophosmin | NPM1 | 17 | 2,902028775 | 2,466677666 | 22,4848 | 22,65799 | 25,02618 | 25,04997 | | |
| 60S ribosomal protein L18a | RPL18A | 17 | 1,984967863 | 1,74966526 | 22,7927 | 22,43547 | 24,38093 | 24,34652 | | |
| 60S ribosomal protein L37a | RPL37A | 17 | 1,136009115 | 0,836754799 | 23,5607 | 23,29441 | 24,46351 | 24,06513 | | |
| Glutaminyl-peptide cyclotransferase-like protein | QPCTL | 17 | 2,408884715 | 2,715770721 | 22,689 | 22,39177 | 25,17341 | 25,33892 | | |
| Keratin, type II cytoskeletal 6B | KRT6B | 17 | 2,445698768 | 1,449094772 | 28,2234 | 28,11212 | 29,68372 | 29,55003 | | |
| Protein S100-A7 | S100A7 | 17 | 2,86079422 | 4,63203907 | 22,9227 | 23,26461 | 27,74586 | 27,70556 | | |
| 40S ribosomal protein S8 | RPS8 | 17 | 1,052126832 | 1,085959435 | 22,9525 | 23,63391 | 24,31368 | 24,44468 | | |
| Keratinocyte proline-rich protein | KPRP | 17 | 3,150566363 | 1,710810661 | 23,6551 | 23,56414 | 25,3181 | 25,32272 | | |
| Nucleolar RNA helicase 2 | DDX21 | 17 | 1,469499084 | 2,888973236 | 21,7436 | 22,82625 | 25,10189 | 25,2459 | | |
| Transmembrane emp24 domain-containing protein 5 | TMED5 | 17 | 3,513320182 | 4,190151215 | 23,2616 | 23,23866 | 27,36778 | 27,51277 | | |
| Protein ERGIC-53 | LMAN1 | 16 | 2,904422438 | 2,607959747 | 22,3734 | 22,55184 | 25,09358 | 25,04756 | | |
| Cytochrome c oxidase subunit NDUFA4 | NDUFA4 | 16 | 1,055580565 | 1,66071701 | 24,0495 | 23,0528 | 25,03695 | 25,38673 | | |

Continuação do quadro.

| Protein names | Gene names | MS/MS | *-Log t-test | P-value | t-test | Difference | CTRL2_1 | CTRL2_2 | KMUT1_1 | KMUT1_2 |
|-----------------------------------------------------------|------------|-------|--------------|---------|-------------|------------|---------|----------|----------|----------|
| Peroxiredoxin-2 | HEL-S-2a | 16 | 1,905172769 | | 2,074017525 | | 22,4845 | 22,85953 | 24,88516 | 24,60688 |
| 60S ribosomal protein L7a | RPL7A | 16 | 0,658260065 | | 1,193095207 | | 22,7724 | 24,11379 | 24,72119 | 24,55116 |
| Serine/threonine-protein phosphatase PGAM5, mitochondrial | PGAM5 | 16 | 1,277094855 | | 1,867847443 | | 23,5893 | 22,70922 | 24,93715 | 25,09708 |
| Ribosomal protein L15 | RPL15 | 15 | 2,712395366 | | 1,65564537 | | 23,0906 | 23,23503 | 24,80764 | 24,82929 |
| Interleukin enhancer-binding factor 3 | ILF3 | 15 | 2,205866506 | | 0,928769112 | | 23,2279 | 23,36577 | 24,2514 | 24,19978 |
| 40S ribosomal protein S7 | RPS7 | 15 | 2,11600434 | | 1,583895683 | | 23,2559 | 23,19938 | 24,94802 | 24,67503 |
| Signal peptidase complex subunit 3 | SPCS3 | 15 | 1,447586283 | | 2,328504562 | | 22,5449 | 23,44397 | 25,27551 | 25,37039 |
| Protein transport protein Sec61 subunit beta | SEC61B | 15 | 3,3186756 | | 3,281378746 | | 22,8298 | 22,87966 | 26,20357 | 26,06864 |
| UPF0556 protein C19orf10 | C19orf10 | 15 | 1,127695488 | | 1,633406639 | | 23,5709 | 22,67595 | 24,60422 | 24,9094 |
| Matrin-3 | MATR3 | 14 | 2,605155636 | | 2,211011887 | | 22,7255 | 22,88722 | 24,94226 | 25,09245 |
| 60S ribosomal protein L23a | RPL23A | 14 | 1,221367446 | | 0,828323364 | | 23,5379 | 23,92443 | 24,6484 | 24,4706 |
| Heat shock 70 kDa protein 6 | HSPA6 | 14 | 2,58974251 | | 3,726830482 | | 25,155 | 25,47246 | 28,93731 | 29,14377 |
| Ig heavy chain V-I region V35 | scFv | 14 | 1,635525432 | | 3,564970016 | | 23,0768 | 24,17698 | 27,14608 | 27,23763 |
| 60S ribosomal protein L27 | RPL27 | 13 | 1,817965392 | | 0,956049919 | | 22,7805 | 22,93959 | 23,9049 | 23,72723 |
| Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein D0 | HNRNPD | 13 | 2,403471765 | | 1,679406166 | | 22,5708 | 22,7399 | 24,39846 | 24,27106 |
| 40S ribosomal protein S6 | RPS6 | 13 | 2,819975335 | | 2,076603889 | | 22,8379 | 22,99426 | 24,97202 | 25,01329 |
| 60S ribosomal protein L28 | RPL28 | 13 | 1,631079433 | | 1,821205139 | | 22,4164 | 22,8521 | 24,27405 | 24,63683 |
| Cell cycle progression protein 1 | CCPG1 | 12 | 2,548225601 | | 1,769523621 | | 22,7331 | 22,89448 | 24,63218 | 24,53445 |
| Nascent polypeptide-associated complex subunit alpha | NACA | 12 | 1,857563506 | | 1,328483582 | | 22,799 | 23,09205 | 24,21445 | 24,33354 |
| Nicalin | NCLN | 12 | 1,151117858 | | 1,155891418 | | 22,9902 | 23,4336 | 24,13069 | 24,6049 |
| Voltage-dependent anion-selective channel protein 1 | VDAC1 | 12 | 1,7870632 | | 1,248230934 | | 21,9854 | 22,25899 | 23,45626 | 23,28461 |
| Protein canopy homolog 2 | CNPY2 | 12 | 2,022994015 | | 1,525592804 | | 22,6891 | 22,64151 | 24,04318 | 24,33865 |
| 40S ribosomal protein S14 | RPS14 | 12 | 1,641575106 | | 1,954537392 | | 23,5359 | 23,55391 | 25,1991 | 25,79976 |
| Pre-mRNA-processing factor 19 | PRPF19 | 12 | 0,738267347 | | 0,624862671 | | 22,7035 | 22,44813 | 23,48481 | 22,91652 |
| Magnesium transporter protein 1 | MAGT1 | 11 | 3,128603124 | | 3,721116066 | | 22,0183 | 22,21364 | 25,80931 | 25,86488 |
| Protein FAM3A | FAM3A | 11 | 0,895286144 | | 1,249361038 | | 22,3911 | 23,3781 | 24,10821 | 24,15969 |
| 40S ribosomal protein S15a | RPS15A | 11 | 3,338531714 | | 2,032434464 | | 22,738 | 22,65262 | 24,71921 | 24,73629 |
| Exostosin-2 | EXT2 | 11 | 1,01980221 | | 1,630449295 | | 23,3698 | 22,54682 | 24,94418 | 24,23338 |
| 14-3-3 protein theta | YWHAQ | 11 | 0,76390405 | | 0,619713783 | | 22,8489 | 23,41446 | 23,84221 | 23,66058 |
| 60S ribosomal protein L35 | RPL35 | 11 | 1,150310324 | | 1,500152588 | | 24,0145 | 23,18424 | 25,02526 | 25,17379 |
| Rab-like protein 3 | RABL3 | 11 | 0,701978748 | | 0,836080551 | | 23,4147 | 22,65039 | 23,64801 | 24,08926 |
| Skin-specific protein 32 | XP32 | 11 | 1,083652734 | | 0,467812538 | | 23,4361 | 23,68871 | 23,96235 | 24,09812 |
| Phospholipase D3 | PLD3 | 10 | 1,183645018 | | 1,018039703 | | 22,6553 | 22,82039 | 23,49436 | 24,01742 |
| 60S ribosomal protein L5 | RPL5 | 10 | 2,044563439 | | 0,852108002 | | 22,6998 | 22,86277 | 23,63168 | 23,63511 |
| Cleavage and polyadenylation specificity factor subunit 6 | CPSF6 | 10 | 1,440202906 | | 1,983541489 | | 22,897 | 23,64475 | 25,14876 | 25,36005 |
| 60S ribosomal protein L13a | RPL13A | 10 | 1,656642857 | | 0,323013306 | | 22,6744 | 22,67323 | 22,94805 | 23,04559 |
| Lamin-B receptor | LBR | 9 | 2,069033227 | | 1,426970482 | | 23,1456 | 23,2874 | 24,75557 | 24,53136 |
| 60S ribosomal protein L34 | RPL34 | 9 | 1,129382052 | | 0,360962868 | | 22,6981 | 22,8611 | 23,2055 | 23,07557 |

Continuação do quadro.

| Protein names | Gene names | MS/MS | *-Log t-test | P-value | t-test | Difference | CTRL2_1 | CTRL2_2 | KMUT1_1 | KMUT1_2 |
|--------------------------------------------------|------------|-------|--------------|-------------|-------------|------------|----------|----------|----------|---------|
| Calreticulin | HEL-S-99n | 9 | 2,565827026 | 1,113488197 | 1,113488197 | 23,1226 | 23,12659 | 24,17995 | 24,29621 | |
| MICOS complex subunit MIC60 | IMMT | 9 | 1,169865084 | 0,407704353 | 0,407704353 | 23,5322 | 23,72783 | 23,98364 | 24,09176 | |
| MHC class I antigen | HLA-A | 9 | 1,770985925 | 3,758730888 | 3,758730888 | 23,4403 | 22,85261 | 26,50606 | 27,30426 | |
| 60S ribosomal protein L3 | RPL3 | 9 | 1,066804448 | 1,793375969 | 1,793375969 | 21,7487 | 22,83855 | 23,94985 | 24,22413 | |
| IgG H chain | | 9 | 2,059570326 | 3,745063782 | 3,745063782 | 23,0944 | 22,40702 | 26,41987 | 26,5717 | |
| Trifunctional enzyme subunit beta, mitochondrial | HADHB | 8 | 1,499436919 | 1,037169456 | 1,037169456 | 23,0532 | 22,94258 | 23,85424 | 24,21586 | |
| 40S ribosomal protein S27 | RPS27 | 8 | 0,876848244 | 1,988359451 | 1,988359451 | 22,5008 | 24,11505 | 25,31261 | 25,27998 | |
| Calmodulin-like protein 5 | CALML5 | 5 | 4,174562443 | 3,030061722 | 3,030061722 | 23,1112 | 23,15165 | 26,14717 | 26,17577 | |
| Arginase-1 | ARG1 | 4 | 0,804650317 | 0,896270752 | 0,896270752 | 23,2645 | 22,45787 | 23,73252 | 23,78237 | |
| | | 4 | 1,455949118 | 0,959042549 | 0,959042549 | 22,2213 | 22,55367 | 23,26685 | 23,42624 | |
| Cathepsin D | CTSD | 2 | 1,462125174 | 2,610394478 | 2,610394478 | 21,3689 | 21,59504 | 24,57721 | 23,6075 | |
| 40S ribosomal protein S20 | RPS20 | 2 | 0,90772559 | 0,878825188 | 0,878825188 | 22,7175 | 23,10351 | 24,0712 | 23,50749 | |
| Heat shock cognate 71 kDa protein | HSPA8 | 1 | 0,659654564 | 0,817744255 | 0,817744255 | 23,153 | 23,12395 | 24,41828 | 23,49412 | |

8.5. Apêndice 5: Quadro de proteínas encontradas na condição DMUT através do ensaio de imunoprecipitação em HEK 293T.

| Protein names | Gene names | MS/MS | *-Log t-test P-value | t-test Difference | CTRL2_1 | CTRL2_2 | DMUT2_1 | DMUT2_2 |
|--------------------------------------------------------------------------|-------------|-------|----------------------|-------------------|----------|----------|----------|----------|
| LAG3 | LAG3 | 1035 | 7,194413065 | 12,6245594 | 23,34842 | 23,35467 | 35,97675 | 35,97545 |
| 78 kDa glucose-regulated protein | HEL-S-89n | 844 | 3,369912417 | 9,554034233 | 23,08578 | 23,48059 | 32,83854 | 32,8359 |
| Neutral alpha-glucosidase AB | HEL-S-164nA | 346 | 3,660510307 | 7,482055664 | 22,97677 | 22,75592 | 30,34181 | 30,355 |
| Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins A2/B1 | HNRNPA2B1 | 316 | 3,792223887 | 3,944531441 | 27,53267 | 27,55516 | 31,43961 | 31,53728 |
| Tubulin beta-4B chain | TUBB2C | 257 | 1,081197446 | 1,446839333 | 27,61597 | 26,72624 | 28,6159 | 28,61999 |
| Collagen alpha-1(I) chain | COL1A1 | 253 | 3,049265393 | 10,41242218 | 23,03009 | 23,65225 | 33,76584 | 33,74134 |
| Glycogen phosphorylase, liver form | PYGL | 243 | 2,244614979 | 7,232824326 | 22,37399 | 23,46821 | 30,1209 | 30,18695 |
| RuvB-like 2 | RUVBL2 | 231 | 1,976957596 | 5,359638214 | 23,98876 | 23,94449 | 29,88059 | 28,77194 |
| Tubulin alpha-1B chain | TUBA1B | 184 | 2,419813405 | 1,985358238 | 27,95133 | 27,76844 | 29,76329 | 29,92719 |
| Serpin H1 | SERPINH1 | 154 | 3,684525391 | 6,589337349 | 23,44413 | 23,57176 | 30,16734 | 30,02723 |
| RuvB-like 1 | RUVBL1 | 144 | 2,000083622 | 6,139361382 | 22,16084 | 23,39245 | 28,97394 | 28,85807 |
| Cytoskeleton-associated protein 4 | CKAP4 | 141 | 3,04379702 | 4,959010124 | 23,27071 | 23,40657 | 28,1648 | 28,4305 |
| Protein disulfide-isomerase A6 | PDIA6 | 141 | 3,006141351 | 6,110081673 | 22,86599 | 22,48286 | 28,77162 | 28,79739 |
| Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H | HNRNPH1 | 137 | 2,431789242 | 1,757035255 | 26,66397 | 26,57788 | 28,47611 | 28,27981 |
| 60 kDa heat shock protein, mitochondrial | HSPD1 | 132 | 1,868102355 | 0,467556953 | 27,33994 | 27,28145 | 27,82481 | 27,73169 |
| Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1 | HNRNPA1 | 132 | 1,852209103 | 3,917358398 | 25,55101 | 24,61358 | 29,02422 | 28,97509 |
| ADP/ATP translocase 2 | SLC25A5 | 114 | 3,893368778 | 1,965352058 | 27,72058 | 27,7449 | 29,71669 | 29,67949 |
| Endoplasmic reticulum resident protein 44 | ERP44 | 111 | 2,164554187 | 5,777684212 | 22,5386 | 23,49909 | 28,78013 | 28,81293 |
| Ubiquitin-60S ribosomal protein L40 | UBB | 101 | 3,159278322 | 4,974134445 | 24,65207 | 24,82206 | 29,61151 | 29,81089 |
| Probable ATP-dependent RNA helicase DDX5 | DDX5 | 97 | 2,791059608 | 3,658189774 | 23,47288 | 23,63827 | 27,33569 | 27,09184 |
| Collagen alpha-2(I) chain | COL1A2 | 96 | 4,172978599 | 10,20104122 | 22,68518 | 22,84884 | 32,95097 | 32,98514 |
| Dolichyl-diphosphooligosaccharide--protein glycosyltransferase subunit 1 | RPN1 | 94 | 4,286941933 | 3,892596245 | 23,36207 | 23,40063 | 27,25368 | 27,29421 |
| Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein U | HNRNPU | 92 | 0,894166317 | 0,618017197 | 27,38212 | 26,99701 | 27,65635 | 27,95881 |
| Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A3 | HNRNPA3 | 84 | 3,214227909 | 4,68476963 | 23,13622 | 22,98773 | 27,65785 | 27,83563 |
| Prohibitin-2 | PHB2 | 77 | 2,877182472 | 5,166620255 | 23,15647 | 23,41473 | 28,31506 | 28,58939 |
| Transitional endoplasmic reticulum ATPase | HEL-S-70 | 71 | 1,683792048 | 4,433562279 | 22,18939 | 23,47422 | 27,17921 | 27,35153 |
| Endoplasmic reticulum chaperone | TRA1 | 68 | 1,97628526 | 4,228302956 | 22,05319 | 22,8647 | 26,52228 | 26,85222 |
| 40S ribosomal protein S4 | RPS4X | 67 | 1,721154233 | 0,954001427 | 26,81238 | 26,66506 | 27,58147 | 27,80397 |
| Leucine-rich repeat-containing protein 59 | LRRRC59 | 66 | 2,283137929 | 2,593103409 | 24,59872 | 24,97395 | 27,39002 | 27,36886 |
| | HLA-C | 65 | 2,474622896 | 3,999951363 | 23,21833 | 22,80319 | 26,90667 | 27,11476 |
| 40S ribosomal protein S3 | RPS3 | 64 | 2,173983698 | 2,890515327 | 22,60706 | 23,00478 | 25,8268 | 25,56607 |
| | COL1A1 | 62 | 3,899226474 | 10,20715141 | 23,406 | 23,61616 | 33,76406 | 33,67241 |
| Coatamer subunit alpha | COPA | 61 | 1,757739262 | 2,606811523 | 22,83099 | 23,46405 | 25,90164 | 25,60702 |
| UDP-glucose:glycoprotein glycosyltransferase 1 | UGGT1 | 59 | 1,892221016 | 3,539646149 | 23,24611 | 22,75196 | 26,85911 | 26,21825 |

Continuação do quadro.

| Protein names | Gene names | MS/MS | *-Log t-test | P-value | t-test | Difference | CTRL2_1 | CTRL2_2 | DMUT2_1 | DMUT2_2 |
|-------------------------------------------------------------------------------|-------------|-------|--------------|---------|-------------|------------|----------|----------|----------|---------|
| Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H3 | HNRPH3 | 58 | 2,815993945 | | 4,014359474 | 24,75251 | 24,49546 | 28,54804 | 28,72865 | |
| Transmembrane protein 43 | TMEM43 | 58 | 3,09191755 | | 4,476594925 | 22,93752 | 23,0892 | 27,59235 | 27,38755 | |
| Pyrroline-5-carboxylate reductase 2 | PYCR2 | 55 | 3,535507789 | | 6,084233284 | 23,08434 | 23,22905 | 29,16639 | 29,31547 | |
| Protein transport protein Sec61 subunit alpha isoform 1 | SEC61A1 | 55 | 1,846757148 | | 4,71769619 | 23,24527 | 24,38286 | 28,52141 | 28,54211 | |
| 40S ribosomal protein S13 | RPS13 | 54 | 1,709488036 | | 3,337138176 | 23,50937 | 22,56295 | 26,37078 | 26,37582 | |
| Pyrroline-5-carboxylate reductase | PYCR1 | 53 | 2,266049977 | | 5,760612488 | 23,16034 | 24,00905 | 29,31012 | 29,38049 | |
| Procollagen-lysine,2-oxoglutarate 5-dioxygenase 3 | PLOD3 | 53 | 4,369339168 | | 4,648978233 | 23,14134 | 23,09032 | 27,7483 | 27,78132 | |
| 40S ribosomal protein S9 | RPS9 | 51 | 3,32996595 | | 3,729194641 | 22,8613 | 23,0166 | 26,64623 | 26,69006 | |
| Glycogen phosphorylase, brain form | PYGB | 51 | 2,029266016 | | 2,72886467 | 23,21622 | 23,60793 | 26,3205 | 25,96137 | |
| Eukaryotic initiation factor 4A-I | EIF4A1 | 50 | 3,03592701 | | 1,862524986 | 23,81075 | 23,69808 | 25,61198 | 25,6219 | |
| Tubulin beta chain | TUBB | 49 | 1,228533265 | | 0,80476284 | 26,62031 | 27,00239 | 27,68992 | 27,5423 | |
| Peroxiredoxin-4 | HEL-S-97n | 49 | 2,363778929 | | 3,743388176 | 22,99005 | 23,48192 | 27,00282 | 26,95593 | |
| ATP synthase subunit O, mitochondrial | ATP5O | 48 | 1,620814898 | | 0,995389938 | 25,38073 | 25,67949 | 26,57335 | 26,47766 | |
| 60S acidic ribosomal protein P0-like | RPLP0 | 47 | 2,574233796 | | 3,489142418 | 22,32105 | 22,502 | 25,74448 | 26,05685 | |
| Clathrin heavy chain 1 | CLTC | 47 | 2,963216332 | | 2,370847702 | 22,83485 | 22,9914 | 25,28457 | 25,28337 | |
| Cleavage and polyadenylation specificity factor subunit 5 | NUDT21 | 46 | 1,555729292 | | 1,00780201 | 25,48176 | 25,82469 | 26,65239 | 26,66966 | |
| DnaJ homolog subfamily C member 16 | DNAJC16 | 46 | 2,466972271 | | 3,143205643 | 23,57301 | 23,20919 | 26,56248 | 26,50612 | |
| Prolyl 3-hydroxylase 1 | LEPRE1 | 46 | 1,474936879 | | 4,079630852 | 23,93416 | 22,49553 | 27,55808 | 27,03086 | |
| DnaJ homolog subfamily B member 11 | DNAJB11 | 46 | 2,069781326 | | 4,879859924 | 21,96042 | 22,86626 | 27,27693 | 27,30947 | |
| RNA-binding protein FUS | FUS | 45 | 2,508014164 | | 3,188055038 | 22,76912 | 23,11806 | 26,16714 | 26,09615 | |
| 4F2 cell-surface antigen heavy chain | SLC3A2 | 45 | 1,988652446 | | 2,656476974 | 23,27928 | 22,8108 | 25,56477 | 25,83827 | |
| ATPase family AAA domain-containing protein 3A | ATAD3A | 45 | 3,097909857 | | 3,288248062 | 23,18055 | 23,19363 | 26,38261 | 26,56806 | |
| Dolichyl-diphosphooligosaccharide--protein glycosyltransferase 48 kDa subunit | DDOST | 44 | 3,557384666 | | 4,482904434 | 23,26838 | 23,12062 | 27,66682 | 27,68799 | |
| ATP-dependent RNA helicase DDX3X | DDX3X | 44 | 1,052120139 | | 1,253174782 | 23,41233 | 23,54147 | 24,33497 | 25,12518 | |
| Dolichyl-diphosphooligosaccharide--protein glycosyltransferase subunit STT3A | hCG_2032701 | 43 | 3,063390674 | | 2,946089745 | 23,25846 | 23,39491 | 26,21934 | 26,32622 | |
| ATP synthase subunit gamma | ATP5C1 | 43 | 1,706471662 | | 2,824486732 | 23,60798 | 22,81114 | 26,08726 | 25,98083 | |
| Signal recognition particle receptor subunit beta | SRPRB | 43 | 3,699687431 | | 2,664616585 | 23,53079 | 23,54374 | 26,23898 | 26,16479 | |
| Renin receptor | ATP6AP2 | 42 | 2,343466502 | | 3,075130463 | 23,69569 | 23,81137 | 27,02823 | 26,62909 | |
| Thioredoxin-related transmembrane protein 1 | TMX1 | 42 | 2,225191048 | | 3,842849731 | 23,55276 | 22,95809 | 27,11585 | 27,08071 | |
| Translocon-associated protein subunit delta | SSR4 | 39 | 1,999341538 | | 2,93501091 | 23,86211 | 23,27847 | 26,55457 | 26,45602 | |
| 40S ribosomal protein S2 | RPS2 | 38 | 1,623567892 | | 2,986965179 | 23,52075 | 22,59279 | 26,11313 | 25,97434 | |
| 40S ribosomal protein S19 | RPS19 | 36 | 1,987050319 | | 2,146895409 | 23,82203 | 24,261 | 26,18098 | 26,19584 | |
| Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase | HEL-S-39 | 36 | 3,552992288 | | 3,506594658 | 22,69443 | 22,77443 | 26,28396 | 26,19809 | |
| 60S ribosomal protein L11 | RPL11 | 36 | 1,668049484 | | 2,784891129 | 22,55082 | 23,37619 | 25,79052 | 25,70628 | |
| Mitochondrial import inner membrane translocase subunit TIM50 | TIMM50 | 35 | 3,178813925 | | 3,553341866 | 22,37589 | 22,55424 | 25,99787 | 26,03894 | |
| Exportin-2 | CSE1L | 35 | 1,142098987 | | 1,528883934 | 22,76842 | 23,531 | 24,47054 | 24,88665 | |
| 60S ribosomal protein L18 | RPL18 | 33 | 2,897139258 | | 3,026893616 | 22,1787 | 22,36641 | 25,35259 | 25,2463 | |
| RNA-binding protein 14 | RBM14 | 33 | 1,921195123 | | 0,458824158 | 24,02714 | 24,12709 | 24,52743 | 24,54445 | |
| DnaJ homolog subfamily C member 10 | DNAJC10 | 33 | 3,390487098 | | 2,942177773 | 22,92112 | 22,81362 | 25,78434 | 25,83475 | |

Continuação do quadro.

| Protein names | Gene names | MS/MS | *-Log t-test | P-value | t-test | Difference | CTRL2_1 | CTRL2_2 | DMUT2_1 | DMUT2_2 |
|--------------------------------------------------------------------------|------------|-------|--------------|---------|-------------|------------|----------|----------|----------|---------|
| 60S ribosomal protein L7 | RPL7 | 32 | 2,92550751 | | 2,388046265 | 23,44614 | 23,57368 | 25,95007 | 25,84585 | |
| 40S ribosomal protein S3a | RPS3A | 31 | 3,084105325 | | 3,59184742 | 22,96782 | 23,11445 | 26,5604 | 26,70556 | |
| Procollagen-lysine,2-oxoglutarate 5-dioxygenase 2 | PLOD2 | 31 | 2,595057542 | | 4,293208122 | 23,36703 | 23,26549 | 27,82025 | 27,39869 | |
| Procollagen-lysine,2-oxoglutarate 5-dioxygenase 1 | PLOD1 | 30 | 2,890121791 | | 3,597732544 | 22,93904 | 23,09065 | 26,50791 | 26,71725 | |
| DAZ-associated protein 1 | DAZAP1 | 30 | 2,589553777 | | 2,776439667 | 22,54144 | 22,71192 | 25,29067 | 25,51557 | |
| Prohibitin | PHB | 30 | 1,181047255 | | 0,762658119 | 23,24082 | 23,33788 | 24,25234 | 23,85167 | |
| Dolichyl-diphosphooligosaccharide--protein glycosyltransferase subunit 2 | RPN2 | 30 | 1,86342885 | | 2,337803841 | 23,2623 | 23,54941 | 25,97989 | 25,50743 | |
| Transferrin receptor protein 1 | TFRC | 29 | 1,81911359 | | 2,312627792 | 23,60748 | 23,05032 | 25,71495 | 25,56811 | |
| Alpha-galactosidase A | GLA | 29 | 1,380046449 | | 2,604754448 | 22,27473 | 23,3527 | 25,31351 | 25,52343 | |
| Cytoplasmic dynein 1 heavy chain 1 | DYNC1H1 | 29 | 1,200155796 | | 0,884784698 | 23,04382 | 22,70995 | 23,92479 | 23,59855 | |
| Histone H2A | HIST1H2AH | 28 | 2,512445706 | | 3,424043655 | 22,9705 | 22,62471 | 26,30103 | 26,14227 | |
| Heat shock protein 105 kDa | HSPH1 | 28 | 1,966256395 | | 0,87840271 | 23,13893 | 23,28105 | 24,02985 | 24,14694 | |
| Sigma non-opioid intracellular receptor 1 | hCG_20471 | 28 | 2,870382041 | | 3,559427261 | 22,53673 | 22,70744 | 26,08239 | 26,28063 | |
| Heat shock protein HSP 90-alpha | HSP90AA1 | 28 | 1,013567879 | | 1,270474434 | 22,62759 | 23,43602 | 24,16392 | 24,44063 | |
| Emerin | EMD | 28 | 2,513889475 | | 2,493506432 | 23,69593 | 23,9699 | 26,30729 | 26,34555 | |
| Voltage-dependent anion-selective channel protein 2 | VDAC2 | 27 | 3,166333922 | | 3,301903725 | 22,53399 | 22,70483 | 25,90928 | 25,93335 | |
| Phosphate carrier protein, mitochondrial | SLC25A3 | 27 | 1,691187898 | | 0,278784752 | 25,63539 | 25,57644 | 25,85707 | 25,91232 | |
| MHC class I antigen | | 27 | 2,823021857 | | 3,682452202 | 22,44536 | 22,6204 | 26,32833 | 26,10233 | |
| Erlin-2 | ERLIN1 | 27 | 2,352326987 | | 1,180685997 | 23,931437 | 23,93172 | 25,00089 | 25,10658 | |
| 40S ribosomal protein S11 | RPS11 | 27 | 2,150349672 | | 2,668999672 | 23,07942 | 23,28335 | 26,05171 | 25,64905 | |
| 60S ribosomal protein L30 | RPL30 | 26 | 0,981173446 | | 0,914406776 | 23,637 | 23,05007 | 24,12731 | 24,38857 | |
| Cartilage-associated protein | CRTAP | 26 | 2,941760531 | | 3,348528862 | 23,18801 | 23,18459 | 26,42151 | 26,64815 | |
| Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A/B | HNRNPAB | 26 | 0,920505794 | | 1,802514076 | 22,27263 | 23,59554 | 24,92674 | 24,54646 | |
| DnaJ homolog subfamily A member 1 | DNAJA1 | 26 | 1,549879538 | | 2,456383705 | 23,12167 | 22,32212 | 25,31154 | 25,04502 | |
| 40S ribosomal protein S25 | RPS25 | 26 | 2,233973942 | | 2,078663826 | 24,01317 | 24,31293 | 26,18722 | 26,29621 | |
| Transmembrane emp24 domain-containing protein 10 | TMED10 | 25 | 3,231347899 | | 2,66262722 | 24,04691 | 24,14593 | 26,80045 | 26,71764 | |
| Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein F | HNRPF | 25 | 1,154888635 | | 0,46018219 | 23,39003 | 23,52023 | 24,02623 | 23,8044 | |
| Torsin-3A | TOR3A | 25 | 3,155122471 | | 2,251994133 | 22,99105 | 22,87228 | 25,17862 | 25,18869 | |
| Transmembrane 9 superfamily member 2 | TM9SF2 | 24 | 2,429126466 | | 2,002321243 | 23,18139 | 23,32149 | 25,35427 | 25,15325 | |
| Nodal modulator 1 | NOMO3 | 24 | 2,93389406 | | 1,976464272 | 23,32668 | 23,45989 | 25,35877 | 25,38073 | |
| Nicastrin | NCSTN | 24 | 2,382152693 | | 1,634372711 | 23,51395 | 23,49032 | 25,24144 | 25,03158 | |
| ADP/ATP translocase 3 | SLC25A6 | 24 | 1,282200718 | | 2,595935822 | 23,4821 | 22,24685 | 25,45538 | 25,46544 | |
| 60S ribosomal protein L10 | RPL10 | 23 | 1,93805732 | | 1,737556458 | 23,03725 | 23,18419 | 24,67498 | 25,02158 | |
| DnaJ homolog subfamily C member 3 | DNAJC3 | 23 | 1,294202783 | | 2,987906456 | 23,02468 | 24,07973 | 27,00078 | 26,07944 | |
| Histone H3 | H3F3B | 23 | 2,818036224 | | 2,639209747 | 23,1015 | 22,89916 | 25,65903 | 25,62006 | |
| 60S ribosomal protein L4 | RPL4 | 23 | 0,918924901 | | 1,367456436 | 23,49578 | 22,45588 | 24,40217 | 24,2844 | |
| ATP synthase subunit beta | ATP5B | 23 | 1,292912055 | | 1,437644005 | 23,21415 | 22,55243 | 24,38765 | 24,25422 | |
| Chondroitin sulfate synthase 2 | CHPF | 23 | 3,615385594 | | 2,320487022 | 22,6482 | 22,58452 | 24,95394 | 24,91975 | |
| Junction plakoglobin | JUP | 22 | 1,299481881 | | 0,992529869 | 22,33609 | 22,51632 | 23,63157 | 23,2059 | |

Continuação do quadro.

| Protein names | Gene names | MS/MS | *-Log t-test P-value | t-test Difference | CTRL2_1 | CTRL2_2 | DMUT2_1 | DMUT2_2 |
|-----------------------------------------------------------|------------|-------|----------------------|-------------------|----------|----------|----------|----------|
| Probable ATP-dependent RNA helicase DDX17 | DDX17 | 22 | 1,828148084 | 1,71907711 | 22,6886 | 23,11162 | 24,60654 | 24,63184 |
| RNA-binding motif protein, X chromosome | RBMX | 22 | 0,883853538 | 2,151885033 | 23,68534 | 21,95679 | 24,93679 | 25,00911 |
| 40S ribosomal protein S5 | RPS5 | 21 | 2,703703923 | 1,385580063 | 23,67111 | 23,78796 | 25,135 | 25,09523 |
| Probable glutathione peroxidase 8 | GPX8 | 21 | 1,235331414 | 2,642683983 | 22,24726 | 23,56685 | 25,64614 | 25,45334 |
| GPI-anchor transamidase | PIGK | 20 | 2,513590857 | 1,484107971 | 22,73224 | 22,56687 | 24,14437 | 24,12479 |
| GRAM domain-containing protein 1A | GRAMD1A | 20 | 2,491734177 | 1,275039673 | 23,30162 | 23,22437 | 24,59946 | 24,47661 |
| Lamin-B1 | LMNB1 | 20 | 1,684544848 | 0,957695961 | 22,75204 | 22,85765 | 23,89208 | 23,63301 |
| 60S ribosomal protein L13 | RPL13 | 19 | 2,197103109 | 1,73913002 | 23,19859 | 22,9288 | 24,83745 | 24,7682 |
| 60S ribosomal protein L14 | RPL14 | 19 | 1,027535306 | 0,509519577 | 23,57675 | 23,30891 | 24,05408 | 23,85062 |
| Interleukin enhancer-binding factor 2 | ILF2 | 19 | 1,743326704 | 1,469337463 | 22,51409 | 22,81686 | 24,26578 | 24,00385 |
| Annexin | ANXA1 | 19 | 2,622145847 | 3,812892914 | 22,47192 | 22,34939 | 26,04727 | 26,39983 |
| Small nuclear ribonucleoprotein Sm D2 | SNRPD2 | 19 | 1,967414272 | 2,813794136 | 22,20533 | 22,79398 | 25,30264 | 25,32426 |
| SUN domain-containing protein 2 | UNC84B | 18 | 2,177653701 | 1,317429543 | 22,84022 | 22,99652 | 24,16139 | 24,31022 |
| Transmembrane emp24 domain-containing protein 9 | TMED9 | 18 | 1,486565037 | 1,194284439 | 23,19732 | 23,33666 | 24,2514 | 24,67115 |
| Very-long-chain (3R)-3-hydroxyacyl-CoA dehydratase 3 | PTPLAD1 | 18 | 1,726818254 | 1,792539597 | 22,96106 | 23,4488 | 24,94708 | 25,04785 |
| Glypican-4 | GPC4 | 18 | 2,0732335 | 1,671201706 | 22,93869 | 22,72747 | 24,39139 | 24,61717 |
| 60S ribosomal protein L12 | RPL12 | 18 | 1,558800166 | 1,352017403 | 23,45199 | 23,07512 | 24,74653 | 24,48462 |
| 60S ribosomal protein L10a | RPL10A | 18 | 1,067558989 | 2,41516304 | 24,22224 | 22,72086 | 25,97629 | 25,79714 |
| Nuclear pore membrane glycoprotein 210 | NUP210 | 18 | 1,271948297 | 0,836162567 | 23,43898 | 23,13192 | 24,25212 | 23,9911 |
| Protein THEM6 | THEM6 | 18 | 1,589795887 | 2,240392685 | 22,98236 | 23,69247 | 25,6682 | 25,48742 |
| Histone H2B | HIST1H2BC | 17 | 3,113561406 | 4,604929924 | 22,47528 | 22,6489 | 27,07316 | 27,26087 |
| Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein D-like | HNRPDL | 17 | 2,660881001 | 1,937105179 | 23,30117 | 23,43559 | 25,24463 | 25,36633 |
| Nucleophosmin | NPM1 | 17 | 2,713754046 | 2,472942352 | 22,48481 | 22,65799 | 24,97832 | 25,11036 |
| Polypyrimidine tract-binding protein 1 | PTBP1 | 17 | 1,765410075 | 0,403458595 | 24,14491 | 24,23927 | 24,57022 | 24,62087 |
| 60S ribosomal protein L18a | RPL18A | 17 | 2,173292595 | 2,176042557 | 22,79265 | 22,43547 | 24,80425 | 24,77595 |
| 60S ribosomal protein L37a | RPL37A | 17 | 1,215190872 | 0,588425636 | 23,56072 | 23,29441 | 24,0899 | 23,94208 |
| Glutaminy-peptide cyclotransferase-like protein | QPCTL | 17 | 2,376300798 | 2,303936005 | 22,68901 | 22,39177 | 24,86358 | 24,82508 |
| Nucleolar RNA helicase 2 | DDX21 | 17 | 1,447800431 | 2,881692886 | 21,7436 | 22,82625 | 25,30709 | 25,02614 |
| Transmembrane emp24 domain-containing protein 5 | TMED5 | 17 | 3,749452325 | 4,177705765 | 23,26159 | 23,23866 | 27,37327 | 27,48239 |
| Protein ERGIC-53 | LMAN1 | 16 | 1,518173464 | 1,841568947 | 22,37338 | 22,55184 | 24,62003 | 23,98833 |
| Fatty acid synthase | FASN | 16 | 1,984615108 | 1,086340904 | 22,70776 | 22,87035 | 23,95163 | 23,79917 |
| Peroxiredoxin-2 | HEL-S-2a | 16 | 1,888061847 | 1,643317223 | 22,48447 | 22,85953 | 24,33695 | 24,29369 |
| Serine/threonine-protein phosphatase PGAM5, mitochondrial | PGAM5 | 16 | 1,326289172 | 2,024197578 | 23,58931 | 22,70922 | 25,29281 | 25,05412 |
| Ribosomal protein L15 | RPL15 | 15 | 1,484179785 | 1,274399757 | 23,09062 | 23,23503 | 24,21186 | 24,66259 |
| Interleukin enhancer-binding factor 3 | ILF3 | 15 | 1,884761916 | 0,761807442 | 23,22787 | 23,36577 | 24,11307 | 24,00419 |
| DnaJ homolog subfamily A member 3, mitochondrial | DNAJA3 | 15 | 1,877395812 | 0,993494987 | 23,42067 | 23,25467 | 24,25075 | 24,41158 |
| Chondroitin sulfate glucuronyltransferase | CHPF2 | 15 | 0,536970691 | 1,198494911 | 24,29565 | 22,63681 | 24,52235 | 24,8071 |
| 40S ribosomal protein S7 | RPS7 | 15 | 1,465605339 | 1,151931763 | 23,25588 | 23,19938 | 24,16262 | 24,59651 |
| Surfeit locus protein 4 | SURF4 | 15 | 0,985420009 | 0,850805283 | 23,91979 | 23,53918 | 24,80853 | 24,35205 |

Continuação do quadro.

| Protein names | Gene names | MS/MS | *-Log t-test P-value | t-test Difference | CTRL2_1 | CTRL2_2 | DMUT2_1 | DMUT2_2 |
|------------------------------------------------------------------------------|------------|-------|----------------------|-------------------|----------|----------|----------|----------|
| Signal peptidase complex subunit 3 | SPCS3 | 15 | 1,040443149 | 2,400913239 | 22,54493 | 23,44397 | 24,75918 | 26,03154 |
| Protein transport protein Sec61 subunit beta | SEC61B | 15 | 2,992471091 | 2,602204323 | 22,8298 | 22,87966 | 25,53617 | 25,37769 |
| Stromal cell-derived factor 2-like protein 1 | SDF2L1 | 15 | 2,681972722 | 3,445310593 | 23,32833 | 23,06057 | 26,55704 | 26,72247 |
| Dolichyl-diphosphooligosaccharide--protein glycosyltransferase subunit STT3B | STT3B | 15 | 0,754604364 | 0,893523216 | 23,12435 | 22,43171 | 23,93373 | 23,40938 |
| UPF0556 protein C19orf10 | C19orf10 | 15 | 0,872587982 | 1,145800591 | 23,57085 | 22,67595 | 24,13195 | 24,40646 |
| UDP-glucose:glycoprotein glucosyltransferase 2 | UGGT2 | 15 | 0,808280802 | 1,001756668 | 23,04716 | 22,15849 | 23,5386 | 23,67055 |
| Protein disulfide-isomerase | P4HB | 14 | 2,524160455 | 2,561414719 | 22,05229 | 22,24599 | 24,8122 | 24,60891 |
| Matrin-3 | MATR3 | 14 | 2,165025255 | 1,526816368 | 22,72547 | 22,88722 | 24,23535 | 24,43097 |
| DNA replication licensing factor MCM3 | HCC5 | 14 | 0,965532247 | 0,354480743 | 22,91361 | 23,06642 | 23,4462 | 23,2428 |
| Importin subunit alpha | KPNA2 | 14 | 1,767899762 | 0,460846901 | 23,94115 | 23,92097 | 24,45205 | 24,33176 |
| 60S ribosomal protein L23a | RPL23A | 14 | 0,803438092 | 0,442083359 | 23,53793 | 23,92443 | 24,12305 | 24,22347 |
| Heat shock 70 kDa protein 6 | HSPA6 | 14 | 2,345138049 | 2,901069641 | 25,15495 | 25,47246 | 28,10044 | 28,32911 |
| Ig heavy chain V-I region V35 | scFv | 14 | 1,684601317 | 3,909097672 | 23,07679 | 24,17698 | 27,68886 | 27,38311 |
| 60S ribosomal protein L27 | RPL27 | 13 | 1,856726007 | 1,006387711 | 22,78045 | 22,93959 | 23,95615 | 23,77666 |
| Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein D0 | HNRNPD | 13 | 2,182706387 | 1,190097809 | 22,57081 | 22,7399 | 23,79808 | 23,89282 |
| 40S ribosomal protein S6 | RPS6 | 13 | 2,24956749 | 1,930316925 | 22,83785 | 22,99426 | 24,96899 | 24,72375 |
| U1 small nuclear ribonucleoprotein A | SNRPA | 13 | 1,977407958 | 0,47969532 | 25,36963 | 25,27991 | 25,78324 | 25,82568 |
| Procollagen galactosyltransferase 1 | COLGALT1 | 13 | 1,238798463 | 1,52355957 | 23,27407 | 22,63773 | 24,69221 | 24,26671 |
| Cell cycle progression protein 1 | CCPG1 | 12 | 1,237067837 | 0,930131912 | 22,7331 | 22,89448 | 23,96376 | 23,52409 |
| Nicalin | NCLN | 12 | 1,644469732 | 1,731191635 | 22,9902 | 23,4336 | 24,79754 | 25,08865 |
| Voltage-dependent anion-selective channel protein 1 | VDAC1 | 12 | 1,063287266 | 0,604449272 | 21,98541 | 22,25899 | 22,85892 | 22,59439 |
| Protein canopy homolog 2 | CNPY2 | 12 | 1,8911577 | 1,279083252 | 22,68914 | 22,64151 | 23,79996 | 24,08886 |
| 40S ribosomal protein S14 | RPS14 | 12 | 1,600820839 | 0,736926079 | 23,53588 | 23,55391 | 24,40041 | 24,16323 |
| Pre-mRNA-processing factor 19 | PRPF19 | 12 | 1,175012912 | 0,562304497 | 22,70347 | 22,44813 | 23,05351 | 23,2227 |
| Magnesium transporter protein 1 | MAGT1 | 11 | 3,038560332 | 3,525270462 | 22,01832 | 22,21364 | 25,68426 | 25,59824 |
| 40S ribosomal protein S15a | RPS15A | 11 | 3,154888313 | 1,71206665 | 22,73801 | 22,65262 | 24,42259 | 24,39218 |
| Exostosin-2 | EXT2 | 11 | 0,871042201 | 1,628356934 | 23,36984 | 22,54682 | 25,11112 | 24,06225 |
| 60S ribosomal protein L35 | RPL35 | 11 | 0,974504467 | 1,26036644 | 24,0145 | 23,18424 | 25,02492 | 24,69456 |
| Reticulocalbin-2 | RCN2 | 11 | 1,480453069 | 1,717873573 | 22,53937 | 23,02107 | 24,28673 | 24,70946 |
| Phospholipase D3 | PLD3 | 10 | 2,280652858 | 1,174494743 | 22,65531 | 22,82039 | 23,93409 | 23,8906 |
| 60S ribosomal protein L5 | RPL5 | 10 | 1,809199726 | 1,357585907 | 22,6998 | 22,86277 | 24,28933 | 23,98841 |
| Very-long-chain enoyl-CoA reductase | TECR | 10 | 1,658021952 | 0,784826279 | 23,11123 | 23,3278 | 24,052 | 23,95669 |
| Cleavage and polyadenylation specificity factor subunit 7 | CPSF7 | 10 | 1,527599529 | 2,279045105 | 22,6964 | 23,49832 | 25,39901 | 25,3538 |
| Cleavage and polyadenylation specificity factor subunit 6 | CPSF6 | 10 | 1,57652884 | 2,260205269 | 22,89698 | 23,64475 | 25,56628 | 25,49586 |
| Lamin-B receptor | LBR | 9 | 2,264675285 | 1,156486511 | 23,1456 | 23,2874 | 24,32499 | 24,42098 |
| Single-stranded DNA-binding protein | SSBP1 | 9 | 2,142531413 | 1,357949257 | 22,60286 | 22,77043 | 24,12463 | 23,96455 |
| V-type proton ATPase subunit S1 | FLJ00383 | 9 | 3,465969208 | 2,392756462 | 22,1343 | 22,21901 | 24,55655 | 24,58228 |
| Small nuclear ribonucleoprotein Sm D1 | SNRPD1 | 9 | 1,198814931 | 1,03190136 | 23,46954 | 22,93189 | 24,27824 | 24,18699 |
| | | 9 | 2,085314583 | 3,768479347 | 23,09443 | 22,40702 | 26,52175 | 26,51665 |

Continuação do quadro.

| Protein names | Gene names | MS/MS | *-Log t-test P-value | t-test Difference | CTRL2_1 | CTRL2_2 | DMUT2_1 | DMUT2_2 |
|----------------------------------------------------------------------------|-------------|-------|----------------------|-------------------|----------|----------|----------|----------|
| DNA replication licensing factor MCM7 | MCM7 | 8 | 2,286023423 | 1,794559479 | 21,65872 | 21,87111 | 23,63378 | 23,48517 |
| Trifunctional enzyme subunit beta, mitochondrial | HADHB | 8 | 2,100449261 | 0,782142639 | 23,05318 | 22,94258 | 23,82309 | 23,73696 |
| Putative eukaryotic translation initiation factor 2 subunit 3-like protein | EIF2S3L | 8 | 1,405694159 | 0,583797455 | 22,97196 | 23,05058 | 23,48247 | 23,70767 |
| 40S ribosomal protein S27 | RPS27 | 8 | 0,733254375 | 1,611922264 | 22,50081 | 24,11505 | 24,98637 | 24,85334 |
| DNA replication licensing factor MCM5 | MCM5 | 6 | 0,768632708 | 0,747047424 | 22,73144 | 23,415 | 23,91798 | 23,72255 |
| 60S ribosomal protein L9 | RPL9 | 6 | 0,616263401 | 0,655093193 | 23,2148 | 23,08485 | 23,41171 | 24,19813 |
| Cyclin-dependent kinase 1 | CDK1 | 3 | 2,352162111 | 1,895723343 | 22,79618 | 22,95457 | 24,67206 | 24,87014 |
| Myosin-9 | MYH9 | 3 | 1,547806172 | 0,749660492 | 22,14132 | 22,3308 | 23,07316 | 22,89828 |
| Fatty aldehyde dehydrogenase | DKFZp686E23 | 3 | 1,054795932 | 1,680128098 | 24,03621 | 22,97649 | 25,11358 | 25,25936 |
| Probable Xaa-Pro aminopeptidase 3 | XPNPEP3 | 3 | 1,365575711 | 0,97256279 | 22,36563 | 21,95196 | 23,15923 | 23,10348 |
| Collagen alpha-1(III) chain | COL3A1 | 1 | 1,516214425 | 1,244774818 | 23,52863 | 23,08588 | 24,57311 | 24,53095 |

8.6. Apêndice 6: Quadro de proteínas encontradas exclusivamente em CARLAG3WT,EPDEL,KMUT e DMUT, quando comparadas simultaneamente,através do ensaio de imunoprecipitação

| PROTEIN NAME | GENE NAME | MS/MS | *Log t-test P-value | t-test Difference | CTRL2_1 | CTRL2_2 | LAGWT2_1 | LAGWT2_2 |
|----------------------------------------------------|-----------|-------|---------------------|-------------------|----------|----------|----------|----------|
| EXCLUSIVAS LAG3 WT | | | | | | | | |
| Elongation factor 1-gamma | EEF1G | 67 | 0,863251289 | 0,411684036 | 26,36796 | 26,03378 | 26,64609 | 26,57903 |
| Derlin-1 | DERL1 | 8 | 0,616904577 | 0,413043022 | 22,89644 | 23,29865 | 23,36038 | 23,6608 |
| EXCLUSIVAS EPDEL | | | | | | | | |
| Endoplasmic reticulum resident protein 44 | ERP44 | 111 | 2,247295521 | 6,367563248 | 29,35888 | 29,41393 | 22,5386 | 23,49909 |
| Splicing factor 3B subunit 3 | SF3B3 | 19 | 0,699691182 | 0,430153847 | 24,22486 | 24,13281 | 23,97185 | 23,52552 |
| Coiled-coil domain-containing protein 134 | CCDC134 | 16 | 1,074780129 | 1,757308006 | 24,72578 | 25,30911 | 22,79988 | 23,72039 |
| Transmembrane protein 33 | TMEM33 | 15 | 0,505865825 | 0,665481567 | 24,28898 | 24,34773 | 23,15741 | 24,14834 |
| 40S ribosomal protein S16 | RPS16 | 14 | 1,240844122 | 0,37667942 | 24,39931 | 24,56023 | 24,05374 | 24,15243 |
| Probable ATP-dependent RNA helicase DDX46 | DDX46 | 13 | 1,584516937 | 1,583357811 | 24,08497 | 24,57946 | 22,66658 | 22,83113 |
| Melanoma inhibitory activity protein 3 | MIA3 | 13 | 1,110947533 | 1,824431419 | 24,54498 | 25,02445 | 22,47684 | 23,44373 |
| Tubulin alpha-1C chain | TUBA1C | 10 | 0,519591253 | 0,704667091 | 24,03229 | 23,59035 | 22,64524 | 23,56807 |
| Deleted in autism protein 1 | C3orf58 | 9 | 0,782936072 | 1,045331001 | 23,63589 | 24,18548 | 22,46355 | 23,26716 |
| Calcyclin-binding protein | CACYBP | 8 | 0,462778677 | 0,663274765 | 23,36466 | 23,17779 | 22,07572 | 23,14019 |
| Nucleotide exchange factor SIL1 | SIL1 | 8 | 1,498935867 | 0,508934021 | 23,85918 | 23,98963 | 23,34941 | 23,48153 |
| Nucleolysin TIAR | TIAL1 | 8 | 1,549883262 | 1,777097702 | 24,4632 | 24,70208 | 23,08603 | 22,52505 |
| Chitinase domain-containing protein 1 | CHID1 | 8 | 1,216305229 | 0,313123703 | 23,89541 | 23,79907 | 23,46909 | 23,59915 |
| Polyadenylate-binding protein 1 | PABPC1 | 7 | 1,668384004 | 1,01388073 | 24,16974 | 24,35111 | 23,36724 | 23,12585 |
| Small nuclear ribonucleoprotein-associated protein | SNRPN | 7 | 0,531920081 | 0,512774467 | 23,49167 | 23,62109 | 23,40134 | 22,68588 |
| RNA-binding protein EWS | EWSR1 | 5 | 1,62676882 | 0,677641869 | 24,47358 | 24,29733 | 23,64886 | 23,76677 |
| Beta-hexosaminidase | HEXA | 5 | 1,159756634 | 0,281116486 | 23,30299 | 23,34557 | 22,96805 | 23,11828 |
| Prolyl 3-hydroxylase 3 | LEPREL2 | 5 | 1,299973783 | 0,612211227 | 23,64218 | 23,8825 | 23,22668 | 23,07358 |
| DnaJ homolog subfamily A member 2 | DNAJA2 | 3 | 2,242958355 | 3,264153481 | 25,0258 | 25,47865 | 21,8873 | 22,08884 |
| Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase-like 4 | PPIL4 | 3 | 2,028174365 | 0,911890984 | 23,05547 | 22,97456 | 22,02395 | 22,18229 |

Continuação do quadro.

| PROTEIN NAME | GENE NAME | MS/MS | *Log t-test P-value | t-test Difference | CTRL2_1 | CTRL2_2 | LAGWT2_1 | LAGWT2_2 |
|-------------------------------------------------------------|----------------|-------|---------------------|-------------------|----------|----------|----------|----------|
| EXCLUSIVAS KMUT | | | | | | | | |
| Annexin | HEL-S-270 | 81 | 1,896900361 | 0,948515892 | 27,55054 | 27,34494 | 28,42882 | 28,36369 |
| 40S ribosomal protein S18 | RPS18 | 81 | 0,451768151 | 0,603560448 | 26,67748 | 27,67122 | 27,6967 | 27,85911 |
| Desmoplakin | DSP | 43 | 1,865886963 | 3,509824753 | 22,70183 | 23,1987 | 26,12914 | 26,79104 |
| Protein S100-A8 | S100A8 | 39 | 3,39958491 | 3,9292593 | 25,79122 | 25,92477 | 29,74606 | 29,82845 |
| 60S ribosomal protein L30 | RPL30 | 26 | 0,654006702 | 0,720029831 | 23,637 | 23,05007 | 24,35118 | 23,77595 |
| Mitochondrial 2-oxoglutarate/malate carrier protein | SLC25A11 | 21 | 0,935729549 | 0,487668991 | 24,28292 | 24,50731 | 24,73908 | 25,02648 |
| Serpin B3 | SCCA2 | 20 | 2,644410317 | 4,921766281 | 23,30972 | 23,77267 | 28,50218 | 28,42374 |
| Fatty acid-binding protein, epidermal | FABP5 | 19 | 1,439672201 | 0,339419365 | 26,73234 | 26,76294 | 27,02232 | 27,1518 |
| Keratin, type II cytoskeletal 6B | KRT6B | 17 | 2,445698768 | 1,449094772 | 28,22343 | 28,11212 | 29,68372 | 29,55003 |
| Protein S100-A7 | S100A7 | 17 | 2,86079422 | 4,63203907 | 22,92274 | 23,26461 | 27,74586 | 27,70556 |
| Keratinocyte proline-rich protein | KPRP | 17 | 3,150566363 | 1,710810661 | 23,65506 | 23,56414 | 25,3181 | 25,32272 |
| 14-3-3 protein theta | YWHAQ | 11 | 0,76390405 | 0,619713783 | 22,84889 | 23,41446 | 23,84221 | 23,66058 |
| Skin-specific protein 32 | XP32 | 11 | 1,083652734 | 0,467812538 | 23,43613 | 23,68871 | 23,96235 | 24,09812 |
| MICOS complex subunit MIC60 | IMMT | 9 | 1,169865084 | 0,407704353 | 23,53216 | 23,72783 | 23,98364 | 24,09176 |
| Calmodulin-like protein 5 | CALML5 | 5 | 4,174562443 | 3,030061722 | 23,11116 | 23,15165 | 26,14717 | 26,17577 |
| Arginase-1 | ARG1 | 4 | 0,804650317 | 0,896270752 | 23,26447 | 22,45787 | 23,73252 | 23,78237 |
| Cathepsin D | CTSD | 2 | 1,462125174 | 2,610394478 | 21,36889 | 21,59504 | 24,57721 | 23,6075 |
| 40S ribosomal protein S20 | RPS20 | 2 | 0,90772559 | 0,878825188 | 22,71753 | 23,10351 | 24,0712 | 23,50749 |
| Heat shock cognate 71 kDa protein | HSPA8 | 1 | 0,659654564 | 0,817744255 | 23,15296 | 23,12395 | 24,41828 | 23,49412 |
| EXCLUSIVAS DMUT | | | | | | | | |
| U1 small nuclear ribonucleoprotein A | SNRPA | 13 | 1,977407958 | 0,47969532 | 25,36963 | 25,27991 | 25,78324 | 25,82568 |
| Procollagen galactosyltransferase 1 | COLGALT1 | 13 | 1,238798463 | 1,52355957 | 23,27407 | 22,63773 | 24,69221 | 24,26671 |
| otic translation initiation factor 2 subunit 3-like protein | EIF2S3L | 8 | 1,405694159 | 0,583797455 | 22,97196 | 23,05058 | 23,48247 | 23,70767 |
| 60S ribosomal protein L9 | RPL9 | 6 | 0,616263401 | 0,655093193 | 23,2148 | 23,08485 | 23,41171 | 24,19813 |
| Cyclin-dependent kinase 1 | CDK1 | 3 | 2,352162111 | 1,895723343 | 22,79618 | 22,95457 | 24,67206 | 24,87014 |
| Fatty aldehyde dehydrogenase | DKFZp686E23276 | 3 | 1,054795932 | 1,680128098 | 24,03621 | 22,97649 | 25,11358 | 25,25936 |
| Collagen alpha-1(III) chain | COL3A1 | 1 | 1,516214425 | 1,244774818 | 23,52863 | 23,08588 | 24,57311 | 24,53095 |

9. ANEXOS

9.1. Anexo A

Parecer CIBio – solicitação de trabalho com OGM classe I

Rio de Janeiro, 01/09/2012

Prezado Dr. Martin Hernan Bonamino

Em resposta à sua solicitação para a manipulação de OGM classe I no protocolo nº 007/2012, "Modificação de linfócitos com receptores quiméricos de antígenos (CARs)", informamos que o mesmo foi analisado pela CIBio tendo sido APROVADO sem pendências.

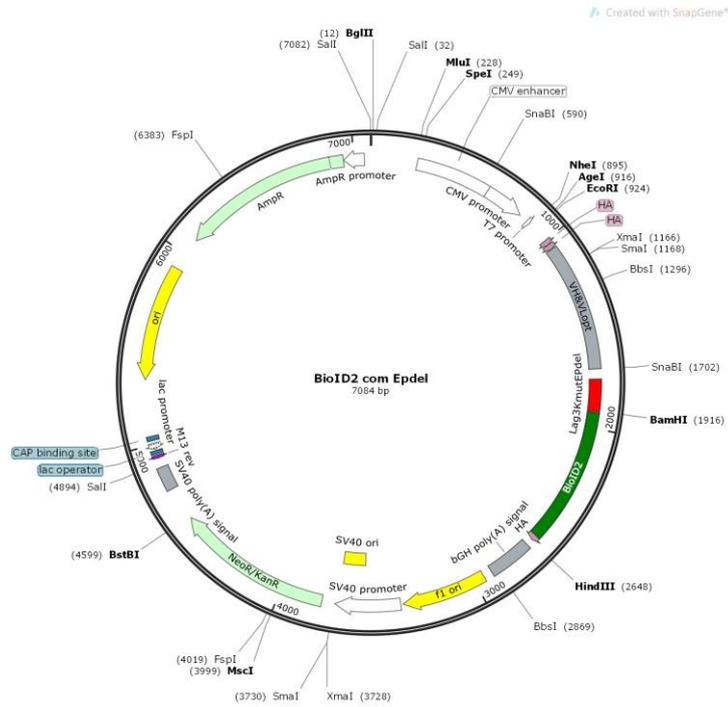
Atenciosamente,



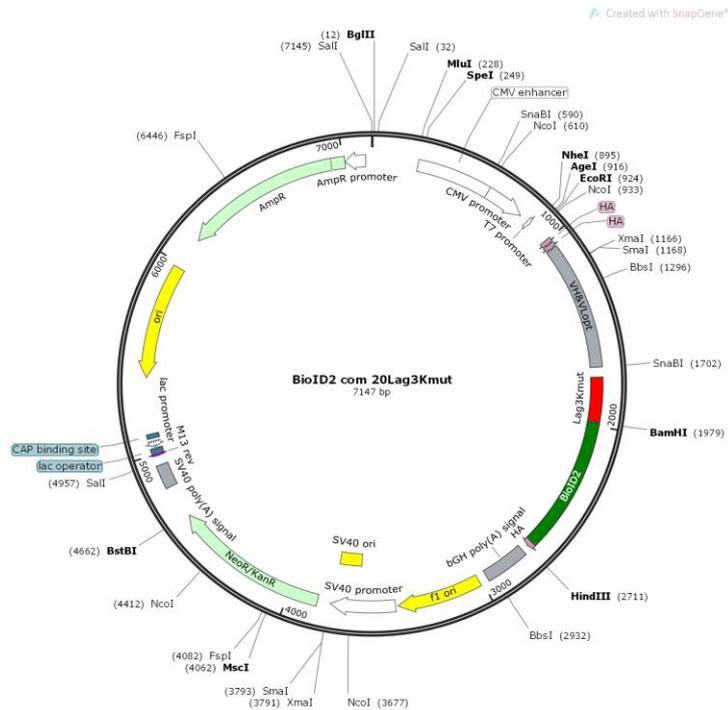
Martin H. Bonamino
Presidente CIBio - INCA

9.2. Anexo B

Mapas finais após clonagens de Epdel, Kmut e DMUT ao plasmídeo pcDNA 3.1 que contém sequência da BirA*2.



Esquema do mapa final do plasmídeo que contém o CAR EPdel BirA*2.



Esquema do mapa final do plasmídeo que contém o CAR Kmut BirA*2.

Esquema do mapa final do plasmídeo que contém o CAR DMUT BirA*2.

