UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto
Programa de Pós-graduação em Bioquímica

Ana Carla Medeiros

Caracterização subcelular e bioquímica da proteína SAMHD1

Ribeirão Preto/SP

2019

ANA CARLA MEDEIROS

Caracterização subcelular e bioquímica da proteína SAMHD1

Tese de doutorado apresentada ao
Programa de Pós-graduação em
Bioquímica como parte dos requisitos
para obtenção do título de Doutor em
Ciências, área de concentração
Bioquímica

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Damário Gomes

Co-orientador: Prof. Dr. Felipe Roberti Teixeira

Ribeirão Preto

2019

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

FICHA CATALOGRÁFICA

Medeiros, Ana Carla

Caracterização subcelular e bioquímica da proteína SAMHD1

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica da FMRP/USP. Departamento de Bioquímica e Imunologia.

Ribeirão Preto – Agosto 2019. 93p.

Orientador: Dr. Marcelo Damário Gomes

Co-Orientador: Dr. Felipe Roberti Teixeira

1- SAMHD1, 2- Início alternativo de tradução, 3- DSBs

FICHA DE APROVAÇÃO

Ana Carla Medeiros

Caracterização subcelular e bioquímica da proteína SAMHD1

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Bioquímica

Aprovado em: -----/-----/-----

Banca examinadora

Prof. Dr. Marcelo Damário Gomes

Ass: _____

Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - FMRP/USP

Prof. Dr. Emer S. Ferro

Ass: _____

Instituto de Ciências Biológicas – ICB/USP

Prof. Dr. Adriano Silva Sebollela

Ass: _____

Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - FMRP/USP

Prof. Dr. Malson N. Lucena

Ass. _____

Universidade Federal de Goiás – UFG

AGRADECIMENTOS

A Deus, por estar sempre me iluminando e abençoando;

A minha família, em especial aos meus pais pelo amor incondicional, apoio e incentivo de sempre buscar alcançar meus sonhos e objetivos;

Ao Bruno, pela paciência, incentivo, amor e por todos os momentos juntos;

Ao Marcelo, pela confiança em me receber em seu laboratório, pelos seus ensinamentos e por contribuir para minha formação profissional;

Ao Felipe, pela paciência, amizade, pelos puxões de orelha que tanto contribuíram para este trabalho, e por todos os seus ensinamentos acadêmicos e pra vida;

Aos meus amigos por todos os momentos de alegria e descontração fora do laboratório;

A Pri, minha companheira de bancada em todos esses anos! Obrigada pela paciência, amizade, conselhos pra vida, e por estar sempre presente;

Ao Prof. Cláudio, por nos permitir fazer uso do seu laboratório, assim como seus alunos por estarem sempre disponíveis a ajudar;

A todos os técnicos e funcionários do Departamento de Bioquímica pela gentileza de sempre, em especial a Cacilda pelo carinho de mãe e exemplo de bom coração;

A Capes pelo auxílio;

A FAPESP, CNPq pelo auxílio ao projeto;

E a todos que de alguma forma contribuíram para conclusão desta etapa, o meu muito obrigada!

SUMÁRIO

RESUMO	8
ABSTRACT	9
LISTA DE ABREVIACÕES	10
1. INTRODUÇÃO	11
1.1.FBXO25 e SAMHD1	12
1.2.SAMHD1 e Resposta Imune Antiviral	17
1.3.Atividade de reparo de DNA de SAMHD1	18
2. OBJETIVOS	22
2.1.Objetivo Geral	23
2.2.Objetivos específicos	23
3. METODOLOGIA	24
3.1.Plasmídeos e anticorpos	25
3.2.Subclonagem e mutagênese	25
3.3. <i>Knockout</i> e <i>Knockdown</i> de SAMHD1	27
3.4.Células: Cultivo e transfecção transiente	28
3.5.Microscopia confocal de fluorescência	29
3.6.Western blotting	29
3.7.Ligação do anticorpo SAMHD1 a resina conjugada a uma mistura de proteína A/G usando Dimethylpimelimidate (DMP), para imunopurificação	30
3.8.Identificação de reatividade cruzada do anti-SAMHD1 Origene utilizando o <i>Protoarray</i>	32
4. RESULTADOS	34
4.1.Especificidade do anticorpo anti-SAMHD1 (Origene <i>Technologies</i>) em diferentes linhagens celulares não mielóides	35
4.2.A hiperexpressão de SAMHD1-HA gera uma proteína SAMHD1 truncada por tradução alternativa do sítio de iniciação	37

4.3.SAMHD1 tem localização nuclear e é recrutada para locais onde há dano no DNA, causada por Camptotecina (CPT)	49
4.4.Avaliação da produção de SAMHD1(ATG2) endógena	54
4.5.Imunopurificação das proteínas reativas ao anticorpo anti-SAMHD1 monoclonal	56
4.6.Determinação da especificidade do anticorpo anti-SAMHD1 monoclonal utilizando microarranjos de Proteína (<i>Protoarrays</i> ®).....	60
5. DISCUSSÃO	65
6. CONCLUSÕES	72
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	74
8. ANEXOS	81
8.1.Sequenciamento da célula HAP1 <i>knockout</i> para SAMHD1	82
8.2.Proteínas com reatividade cruzada com o anticorpo monoclonal anti-SAMHD1 Origene Technologies, identificadas com o Protoarray®.....	83

RESUMO

Caracterização subcelular e bioquímica da proteína SAMHD1

Medeiros, A. C., 2019.

Tese de doutorado 93p. Programa de Pós-graduação em Bioquímica da FMRP/USP.

SAMHD1 é uma proteína de 626 aminoácidos com um motivo N-terminal SAM e um domínio contendo histidina e ácido aspártico (HD). O domínio SAM é envolvido em interações do tipo proteína-proteína e proteína-DNA/RNA. Proteínas com o domínio HD fazem parte de uma superfamília de fosfotransferases comumente envolvidas no metabolismo de ácidos nucleicos. SAMHD1 tem a função de diminuir o *pool* de dNTPs intracelular, e mutações no gene de *SAMHD1* está associada a Síndrome de Aicardi-Goutières (AGS). Nesse trabalho, avaliamos a especificidade de anticorpos comerciais anti-SAMHD1 em diferentes linhagens celulares, determinamos sua localização subcelular em resposta ao dano no DNA induzido por camptotecina (CPT) que induz duplas quebras na fita de DNA (DSBs – *Double-Strand Breaks*). Por último, investigamos a possibilidade de existência de uma forma alternativa truncada endógena de SAMHD1. Vimos que o anticorpo anti-SAMHD1 monoclonal possui reatividade cruzada com uma proteína de aproximadamente 50 kDa, de função ainda desconhecida, enquanto que o anticorpo policlonal reconhece especificamente uma banda de massa molecular correspondente a SAMHD1. Além disso, identificamos que a hiperexpressão de SAMHD1 produz uma forma truncada SAMHD1(ATG2) sem os 114 primeiros aminoácidos, incluindo o domínio SAM. Esta forma foi produzida graças a um códon de início alternativo localizado a 345 nucleotídeos *upstream* do ATG1, do gene *SAMHD1*. Por fim, concluímos que SAMHD1 ativa a resposta ao dano, porém não é recrutada para o *foci* nuclear, diferente do que foi recentemente publicado na literatura.

Palavras chave: SAMHD1, Início alternativo de tradução, DSBs

ABSTRACT

Biochemical and subcellular characterization of SAMHD1 protein

Medeiros, A. C., 2019.

Tese de doutorado 93p. Programa de Pós-graduação em Bioquímica da FMRP/USP.

SAMHD1 is a 626 amino acid protein in an N-terminal SAM motif and a domain containing histidine and aspartic acid (HD). The SAM domain is involved in protein-protein and protein-DNA / RNA interactions. Proteins with the HD domain are part of a superfamily of phosphohydrolases commonly involved in the metabolism of nucleic acids. SAMHD1 has the function of decreasing the pool of intracellular dNTPs, and mutations in the SAMHD1 gene are associated with Aicardi-Goutières Syndrome (AGS). In this work, we evaluated the specificity of commercial anti-SAMHD1 antibodies in different cell lines, determined their subcellular location in response to DNA damage induced by camptothecin (CPT) that induces double strand breaks (DSBs). Finally, we investigated the possibility of an endogenous truncated alternative form of SAMHD1. We have seen that the anti-SAMHD1 monoclonal antibody has cross-reactivity with a protein of approximately 50 kDa, of yet unknown function, whereas the polyclonal antibody specifically recognizes a band of molecular mass corresponding to SAMHD1. In addition, we have identified that the overexpression of SAMHD1 produces a truncated form SAMHD1 (ATG2) without the first 114 amino acids, including the SAM domain. This form was produced thanks to an alternative start codon located at 345 nucleotides upstream of the ATG1, SAMHD1 gene. Finally, we conclude that SAMHD1 activates the response to the damage, but it is not recruited to the nuclear foci, different from what has recently been published in the literature.

Key words: SAMHD1, alternative translation start, DSBs

LISTA DE ABREVIações

ActD - Actinomicina D

AGS - Síndrome Aicardi-Goutières

CPT - Camptotecina

dNTPs - desoxinucleotideo trifosfatase

DMP - Dimethylpimelimidate

DSB - *Double-Strand Breaks*

FANDS - FBXO25- *associated nuclear domains*

FBP – F-box protein

HA - *Haemagglutinin peptide*

HEK - *Human embryonic kidney cells*

HR - Recombinação Homóloga

PML - *Promyelocytic leukemia protein*

SCF1 - SKP1, CUL1, F-box *protein*

SUP - Sistema ubiquitina-proteassoma

TIS -*Translation Initiation Site*

Introdução

1. Introdução

1.1. FBXO25 e SAMHD1

A proteína FBXO25 é uma das 70 proteínas do tipo F-box (FBP) que possuem o domínio F-box de interação com SKP-1 e que atuam como fatores de especificidade para a família mais estudada de E3 ubiquitina-ligases humanas, as do tipo RING (*Really Interesting New Gene-Box 1*)¹. Esta classe de E3-ligases são complexos oligoméricos denominados SCF1, compostos por SKP-1, CULLIN-1, ROC-1 e uma FBP, que estão envolvidos na ubiquitinação de proteínas para degradação via Sistema Ubiquitina Proteassoma (SUP) ou regulação funcional do substrato. Desta forma, a proteína FBXO25 é um componente de uma E3-ligase do tipo SCF1 capaz de formar um complexo SCF1^{FBXO25} estável e ativo em experimentos de ubiquitinação *in vitro*^{2,3}. Ela foi descrita pela primeira vez *in silico* em 1999^{4,5}, e é alvo de estudos em nosso grupo.

Em trabalhos anteriores, nosso grupo identificou que FBXO25 encontra-se no núcleo sob a forma de “dots”, e parecem estar associados à estrutura da cromatina estando presentes apenas na fase G1/telófase do ciclo celular. Após estudos de co-localização com proteínas marcadoras de estruturas subnucleares conhecidas (por exemplo, Speckles, PML, Cajal etc..) verificamos se tratarem de novas estruturas subnucleares que foram denominadas “FANDs” (*FBXO25 Associated Nuclear Domains*)⁶. Trata-se do primeiro e único corpo nuclear composto de proteínas do tipo F-box caracterizado até o momento e o laboratório tem procurado estudar outras proteínas associadas aos FANDs.

Em busca de informações funcionais de proteínas associadas a FBXO25, foram utilizados *arrays* de proteínas humanas ou *Protoarrays*®. É uma importante ferramenta por permitir o estudo de forma simultânea de milhares de proteínas ao mesmo tempo.

Dr Heng Zhu em 2001 apresentou tal metodologia, em que cerca de 90% do proteoma de levedura foi imobilizado em duplicata de forma direcional (via proteína de fusão GST) 5800 ORFs purificadas em uma lâmina de vidro ⁷.

Diversos trabalhos vêm utilizando os *arrays* de proteínas para identificação de substratos de E3-ligases de mamíferos ^{8,9,10}. Os *Protoarrays* contêm 21.120 proteínas humanas imobilizadas, sendo 8.295 proteínas únicas e 2.122 controles, sendo todas em duplicata.

Nosso laboratório fez a primeira descrição do uso dessa estratégia para uma enzima E3 ligase oligomérica tipo SCF. Demonstramos que FBXO25 interage, ubiquitina e medeia a degradação proteassomal do fator de transcrição ELK-1 envolvido na indução gênica inicial imediata. Observou-se também que os efeitos celulares dessa atividade de FBXO25 promoveram a redução da ativação dos genes alvos de ELK-1 c-FOS e EGR1 em células HEK 293T estimuladas pelo mitógeno PMA ¹¹.

Outras proteínas também foram identificadas nesse *screening*, dentre elas, a proteína SAMHD1 (*Sterile Alpha Motif and Histidine-Aspartic acid Domain containing protein 1*), que é descrita como alvo do SUP.

SAMHD1 foi originalmente descoberta em células dendríticas humanas como proteína homóloga a uma proteína de camundongo denominada proteína induzida por IFN- γ derivada de células dendríticas (DCIP), sugerindo uma função na resposta imune inata ¹². SAMHD1 tem atividade antiviral dependente do GTP reduzindo a concentração de dNTPs abaixo de um limiar utilizável para a replicação eficiente do vírus da imunodeficiência humana tipo 1 (HIV-1) ¹³. Análises bioquímicas subsequentes, revelaram atividade catalítica hidrolásica de enzima, dependência de íon metálico

divalente e ativação por nucleotídeos de guanosina¹⁴. Recentemente, uma atividade ribonuclease é discutida, controversamente, como uma segunda atividade antiviral enzimática¹⁵.

SAMHD1 é uma proteína de 626 aminoácidos que possui um motivo N-terminal SAM e um domínio contendo histidina e ácido aspártico (HD) na porção central de sua estrutura. O domínio SAM é comumente envolvido em interações do tipo proteína-proteína e proteína-DNA/RNA¹⁶. O sinal de localização nuclear que precede o domínio SAM, confere a localização nuclear observada em vários estudos^{17,18}. O domínio HD define-se pelo seu quarteto característico de metal que coordena resíduos de histidina e ácido aspártico dentro do sítio ativo da enzima. Proteínas que contem o domínio HD representam uma superfamília de fosfohidrolases comumente envolvidas no metabolismo de ácidos nucleicos¹⁹. É no domínio HD também onde se encontram os sítios ativos responsáveis pela atividade dNTPase, sítios regulatórios e também é requisito para interface da oligomerização de SAMHD1²⁰. A região C-terminal de SAMHD1 consiste de uma região distinta importante para a estabilização do estado oligomérico da enzima e interação com ácidos nucleicos²¹.

SAMHD1 foi alvo de estudo do nosso grupo durante o projeto de pós-doutorado da Dra Cláudia Sossai, em que ela realizou estudos para validar a interação entre FBXO25 e SAMHD1. Para isso, foi feita a imunoprecipitação de SAMHD1 de células HEK 293T e por *western blotting* foi confirmada a interação dessa proteína com a FBXO25. Demonstrou-se que SAMHD1 interagiu tanto com FBXO25WT quanto com a FBXO25ΔF (mutante F-box que se liga ao seu substrato, mas não a proteína SKP-1, portanto incapaz de formar o complexo SCF ativo) (Figura 1B).

A proteína FBXO25 é caracterizada por se acumular no núcleo celular nos FANDs, que são altamente responsivos ao estado transcrional ⁶. Já SAMHD1, devido ao seu domínio SAM, se liga a ácidos nucléicos e está comumente presente em proteínas envolvidas na transcrição ²². Logo, para investigar a interação e redistribuição de FBXO25 e SAMHD1, foi realizado o tratamento com o inibidor transcrional Actinomicina D (ActD). Dessa forma, foi demonstrado por microscopia confocal em células HEK 293T, que os *dots* de SAMHD1 e FBXO25 se colocizam na porção nucleoplasmática (Figura 1A). Porém quando as células foram tratadas com 5 µg/mL de ActD por 2 horas, tanto SAMHD1 quanto FBXO25 foram redistribuídas no nucleoplasma, perdendo suas estruturas em forma de *dots* e diminuindo a colocização dessas duas proteínas. Esses resultados nos levaram a estudar e caracterizar a interação de FBXO25 com a proteína SAMHD1.

A)

B)

Figura 1: Estrutura subnuclear rica em SAMHD1 co-localiza com FBXO25 e ambas são alteradas pelo tratamento com ActD. A) Análise confocal de dupla marcação utilizando anticorpos anti-SAMHD1 monoclonal e anti-FBXO25 em células HEK 293T transfectadas com GST-FBXO25-FLAG tratadas com ActD. DAPI - para marcação de núcleo e nucléolo. Barra - 5 µm. B) Células HEK 293T foram transfectadas com pcDNA3 (vetor vazio - controle), GST-FBXO25WT-FLAG ou GST-FBXO25ΔF-FLAG. Após 48 horas, os lisados foram submetidos a imunoprecipitação com o anticorpo anti-SAMHD1. Em seguida, foi realizado um *western blotting* marcando com o anti-FBXO25. As análises mostraram que SAMHD1 endógena interage tanto com FBXO25WT quanto com FBXO25ΔF. IgG-HC: cadeia pesada do anticorpo.

1.2. SAMHD1 e Resposta Imune Antiviral

Uma das principais funções de SAMHD1 na resposta imune inata consiste na diminuição do *pool* de dNTPs intracelular, como no caso do vírus HIV-1 em que SAMHD1 bloqueia a infecção em células não-cíclicas como macrófagos, células dendríticas e células T CD4+ quiescentes²³, reduzindo a transcrição reversa e a síntese de cDNA do HIV-1²⁴.

Como uma proteína multifuncional, SAMHD1 tem funções importantes na progressão do ciclo celular^{25,26}, desenvolvimento de câncer²⁷ e imunidade adaptativa²⁸. Algumas retrovíroses como o HIV-2 e o vírus da imunodeficiência símia (SIV) contém uma proteína viral chamada proteína X (Vpx) que antagoniza a função antiviral de SAMHD1, por recrutar SAMHD1 ao complexo E3 ubiquitina ligase CRL4^{DCAF1}²⁹. Esse recrutamento resulta em uma degradação dependente do proteassoma, através do qual o Vpx alivia a mediação de SAMHD1 na restrição da replicação lentiviral em células mielóides^{30,31}.

Mutações em SAMHD1 causam a Síndrome Aicardi-Goutières (AGS), um grave distúrbio genético neurodegenerativo que mimetiza a infecção viral congênita³² caracterizada por ativação imunológica inadequada e grande secreção de interferon alfa³³⁻³⁵. Da mesma forma, mutações no gene da exonuclease TREX1 e nos três genes que codificam a endonuclease RNase H2 podem causar AGS, ligando o metabolismo de ácidos nucleicos com este distúrbio autoimune³⁶⁻³⁸. TREX1 é a principal 3'-exonuclease que degrada DNA celular de fita simples e dupla³⁹⁻⁴⁵. Em células infectadas pelo HIV-1, o TREX1 degrada transcritos não-produtivos evitando cDNA viral em excesso, impedindo a ativação da resposta imune inata^{46,47}. A RNase H2 reconhece e cliva ribonucleotídeos presentes em duplex de RNA / DNA^{48,49} e o silenciamento da RNase H2 dificulta a

replicação do HIV ⁵⁰. Isso sugere que SAMHD1 e outras proteínas associadas à AGS, estão envolvidas com a regulação da resposta imune inata ⁵¹.

1.3. Atividade de reparo de DNA de SAMHD1

SAMHD1 promove a integridade do genoma, por manter baixo os pools de dNTPs na célula, por meio de sua atividade dNTPase ⁵²⁻⁵⁵. No entanto, o aumento espontâneo de dano no DNA e dos *pools* de dNTPs foi observado em pacientes com AGS ⁵⁴. Além disso, mutações heterozigóticas associadas ao câncer colorretal, impedem a atividade dNTPase de SAMHD1. Assim, elevados índices de dNTPs combinados com uma falha no reparo do DNA, aumentam o índice de mutações, sugerindo cânceres associados a SAMHD1 ²⁶.

Estudos mostraram que SAMHD1 é recrutada para locais de dano em resposta a agentes como camptotecina (CPT) conhecidos por causarem duplas quebras na fita de DNA (DSBs – *Double-Strand Breaks*), e que estava envolvida na resposta a DSBs por interagir com proteínas específicas de reparo ⁵⁵.

Em um trabalho mais recente, foi demonstrado que SAMHD1 promove o reparo de DSBs predominantemente na fase S do ciclo celular, fase em que o reparo por recombinação homóloga (HR) acontece ⁵⁶. Além disso, SAMHD1 colocalizou-se com γ H2AX, marcador de DSBs, e com RAD51, marcador para HR. A HR tem início com a ressecção do DNA e tem a participação de duas endonucleases, a CtBP (proteína de ligação C-terminal) que interage com o complexo MRN (MRE11-RAD50-NBS1) ⁶²⁻⁶⁷, se transformando na proteína de interação (CtIP) que realiza o processamento das

extremidades 5' das DSBs ⁵⁷⁻⁶¹ e geram um curto *overhang* na extremidade 3' do DNA de fita simples (ssDNA), que será estendido pelas nucleases EXO1 ou DNA2 junto com BLM ou WRN helicase ⁶⁸⁻⁷³. Esse 3'ssDNA *overhang* é ligado por RPA, que é então deslocado por RAD51, para formar RAD51-ssDNA, um microfilamento de nucleoproteínas, que com ajuda de proteínas mediadoras, incluindo BRCA2, medeiam a HR ⁷⁴ (Figura 2). RPA-ssDNA também recruta ATRIP para ativar ATR kinase *checkpoint* ⁷⁵. Sendo assim, a ressecção do DNA é um determinante crítico para o reparo do DNA e ativação de *checkpoints*.

Nesse mesmo estudo, foi mostrado que SAMHD1 promove a HR e ativação de ATR, por promover a ressecção do DNA, de maneira independente de sua atividade de dNTPase bem estabelecida. SAMHD1 facilita o recrutamento de CtIP, que por sua vez coopera com a MRN para promover a ressecção final do DNA demonstrando que SAMHD1 tem um papel direto na manutenção do genoma independente do seu papel na regulação do *pool* de dNTPs ⁵⁶.

Figura 2: SAMHD1 atua no reparo de DNA via recombinação homóloga (HR). SAMHD1 promove o reparo de DSBs por HR independente de sua atividade de dNTPase bem estabelecida. SAMHD1 facilita o recrutamento de CtIP, que por sua vez coopera com a MRN para promover a ressecção final do DNA. Quando há deficiência de SAMHD1, o reparo por HR é impedido e a estabilidade genômica comprometida (Modificado: Daddacha *et al.*, 2017).

Iniciamos nossos estudos a partir da interação da proteína FBXO25 e SAMHD1 utilizando o anticorpo monoclonal Origene *Technologies* e vimos que SAMHD1 apresentava marcação nuclear *dot-like*, que colocalizavam com FBXO25. No entanto, por *western blotting*, esse mesmo anticorpo marcava, além da banda de massa molecular correspondente a SAMHD1, outra banda de massa molecular de aproximadamente 50 kDa (p50). Para confirmar esses dados e estudar a possibilidade de um início alternativo de tradução, adquirimos o anticorpo policlonal Proteintech *Group*, que não apresentou marcação *dot-like*, nem tampouco reconhecia a p50, o que nos levou a questionar a especificidade do anticorpo monoclonal. No entanto, Daddacha *et al*, 2017, utilizou esse mesmo anticorpo monoclonal para descrever a redistribuição de SAMHD1 para os *foci* nucleares, em resposta a DSBs. No presente estudo estabelecemos estratégias para caracterizar a localização intracelular de SAMHD1, assim como determinar sua distribuição em resposta ao dano no DNA e investigar a presença de formas endógenas truncadas da proteína SAMHD1.

Objetivos

2. Objetivo Geral

Caracterizar a localização intracelular de SAMHD1 em diferentes linhagens celulares em resposta ao dano no DNA e investigar a presença de formas endógenas truncadas desta proteína.

2.1. Objetivos específicos

- Analisar a especificidade dos anticorpos comerciais anti-SAMHD1, monoclonal Origene *Technologies* e o policlonal Proteintech *Group*, em diferentes linhagens celulares não mielóides;
- Avaliar a existência de um sítio de início alternativo de tradução da proteína SAMHD1;
- Avaliar a localização celular de SAMHD1 e sua resposta ao dano no DNA induzido por CPT;
- Identificar as proteínas que possuem reatividade cruzada do anticorpo anti-SAMHD1 monoclonal.

Metodologia

3. METODOLOGIA

3.1. Plasmídeos e anticorpos

O plasmídeo que codifica o gene *SAMHD1* humana (NM_015474) foi obtido da Origene Technologies (Rockville, MD). Os anticorpos monoclonais de camundongo anti-GAPDH (clone 71.1, #G8795), anti- β -Actina (clone AC74, #A2228), anti- β -Tubulina (clone TUB 2.1, #T4026), e anti-HA (clone HA-7, #H3663) foram adquiridos da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). O anticorpo monoclonal de camundongo Anti-SAMHD1 (IgG2b; clone3F5, #TA502024) contra proteína recombinante inteira, humana, foi adquirido da Origene Technologies (Rockville, MD). O anticorpo policlonal de coelho Anti-SAMHD1 (#12586-1-AP) produzido contra os 314 aminoácidos da região N-terminal de *hSAMHD1* foi adquirido do Grupo Proteintech (Chicago, IL). Os plasmídeos que expressam a construção HA-RRAGD, GSK3 β -HA e RAD51-HA foram gentilmente cedidos pelo Dr. Jung Min Han (Universidade Yonsei, Seoul, Coreia do Sul), Dr. Felipe Roberti Teixeira (Universidade Federal de São Carlos, São Carlos) e Dr. Francis Lanch (Universidade Rockefeller, Nova York, EUA), respectivamente.

3.2. Subclonagem e mutagênese

O gene *SAMHD1* foi subclonado no plasmídeo pcDNA3.1 usando a construção da Origene como molde.

A reação de PCR foi realizada utilizando *primers* com sítios de restrição para *EcoRI* ou *XhoI* em suas respectivas extremidades 3' e 5' (Tabela 1). Os produtos de PCR foram purificados e subclonados no vetor pcDNA3.1. O produto de PCR foi analisado em gel de agarose 1% através de eletroforese. Esse produto foi então purificado utilizando o QIAquick® Gel Extraction kit (QIAGEN) de acordo com as recomendações do fabricante e, em seguida,

digerido com as enzimas de restrição. O produto de PCR e o vetor foram purificados utilizando o mesmo kit de purificação e em seguida, ligados utilizando T4 DNA ligase (Fermentas).

As transformações de bactérias contendo essas construções foram realizadas por *heat shock*, e as preparações plasmidiais em pequena escala (mini-preps) foram realizadas com o kit da QIAGEN Plasmid Purification(QIAGEN). As construções foram selecionadas a partir da análise de enzimas de restrição e os fragmentos analisados em gel de agarose 1%.

O mutante no ATG2 [SAMHD1(AAG2)-HA] foi produzido por mutação sítio dirigida. Isso gerou uma mutação pontual, trocando o códon da Met 345 por uma Ile. A reação de PCR foi realizada da seguinte forma: 98 °C por 10s, 18 ciclos de 95 °C por 20s, 68 °C por 30s e 72 °C por 110 s, seguido por uma última extensão de 5 min a 72 °C. O DNA parental foi digerido com a enzima DpnI. Essa enzima é responsável pela degradação do DNA metilado (o da bactéria), deixando apenas o *amplicon*. Em seguida, as reações foram colocadas em estufa a 37 °C, overnight, por um período máximo de 18 horas.

As amostras de PCR foram analisadas em gel de agarose 1% para análise dos fragmentos gerados. Em seguida, bactérias competentes foram transformadas e as colônias submetidas ao procedimento de extração do DNA plasmidial em pequena escala (Mini-Preps QIAGEN). O DNA plasmidial purificado foi digerido com a enzima de restrição *PvuII* (Thermo Scientific) para análise do perfil dos mutantes gerados. Aquele com perfil de digestão diferente, comparado com o plasmídeo SAMHD1 WT, foi sequenciado pelo método de Sanger, para confirmação da mutação.

Tabela 1- Sequência dos *primers* utilizados:

<i>Primers</i>	<i>Sequências (5'→3')</i>
SAMHD1-HA <i>sense</i>	CTACGGGAATTCATGCAGCGAGCCGATTCCGAGCAGC
SAMHD1-HA <i>antisense</i>	ACCGAGCTCGAGTCAAGCGTAATCTGGTACGTCGTATGGGTACATTGGGTC AT CTTTAAAAAGCTGGACTCTGCTTTTG
SAMHD1(ATG2)-HA <i>sense</i>	AGCTAGGAATTCATGAAGGTAATTAATGATCCTATCC
SAMHD1(ATG2)-HA <i>antisense</i>	ACCGAGCTCGAGTCAAGCGTAATCTGGTACGT
SAMHD1(AAG2)-HA <i>sense</i>	ATCCACGTTGATACAATCAAGGTAATTAATGATCC
SAMHD1(AAG2)-HA <i>antisense</i>	GGATCATTAATTACCTTG ATTGTATCAACGTGGAT

3.3. *Knockout e knockdown de SAMHD1*

As células SAMHD1 *knockout* foram adquiridas da Horizon Discovery (Austria, #HZGHC000813c007) baseado na linhagem celular humana quase haplóide HAP1 e no sistema de edição de genoma CRISPR/Cas9 como descrito por Zheng *et al.* ⁷⁶. Os clones de células únicas de HAP1 foram diluídos e isolados e os genótipos foram analisados por PCR e sequenciados usando os *primers forward* (5'-CTACCTCGGATGTTCTTCAGCAG-3') e reverso (5'-AATAGGCTGCCAATACTCCTTGG-3') para confirmação.

Para o *knockdown* de SAMHD1, utilizou-se uma mistura de quatro siRNA ON-TARGETplus para SAMHD1 humana, de acordo com as especificações do fabricante (DharmaconTM, Lafayette, CO). Os siRNAs alvo para SAMHD1 foram direcionados para as sequências descritas na tabela 2, adquiridas da DharmaconTM (Lafayette, CO). As transfecções foram carregadas utilizando o reagente de transfecção DharmaFECT[®]

(DharmaconTM, Lafayette, CO) de acordo com as especificações do fabricante (Thermo Scientific) por 48 horas.

Tabela 2- Sequência dos siRNAs utilizados

siRNA	Sequências
J-013950-09	GACAAUGAGUUGCGUAUUU
J-013950-10	CAUGUUUGAUGGACGAUUU
J-01395 0-11	AAGUAUUGCUAGACGUGAA
J-013950-12	UUAGUUUAUAUCCAGCGAUU

3.4- Células: cultivo e transfecção transiente

Células HEK 293T (ATCC, CRL-11268), e Neuro2A (ATCC, CCL-131) foram crescidas em meio DMEN (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA). Enquanto células Namalwa (ATCC, CRL-1432) e Jurkat foram crescidas em meio RPMI 1640 (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA). A linhagem celular quase haplóide HAP1 (Haplogen Genomics, Austria) foi mantida em meio IMDM (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA). Todos os meios foram suplementados com 10% SFB (soro fetal bovino, Invitrogen, Carlsbad, CA) e 5 % CO₂. As transfecções foram carregadas utilizando Polietilenamina (PEI, linear) 1µg/µL em Tris-HCL pH 7.2, por 48 h. As células HeLa foram tratadas com 2µM de Camptotecina (CPT, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) por 4hr e processadas para imunofluorescência.

3.5. Microscopia confocal de Fluorescência

Para imunofluorescência direta, células HAP1/HeLa foram crescidas sobre lamínulas de vidro com meio IMDM ou DMEM, respectivamente, suplementado com 10µg/mL de estreptomicina e 10 U/mL de penicilina. As células foram fixadas e permeabilizadas por 10

minutos TA com PBS contendo 2% de paraformaldeído (Eletron Microscopy Science, #15710) e 0.3% de Triton X-100. Em seguida, as lamínulas foram bloqueadas com PBS/2% BSA. As incubações com os anticorpos (anti-SAMHD1 monoclonal Origene *Technologies* 1:1000, e o anti-SAMHD1 policlonal Proteintech *Group* 1:200) foram feitas por 1 h a T. A. em PBS/2% BSA seguido pela incubação com os anticorpos secundários Alexa 488 ou Alexa 594 (1:600), por 30 minutos. As lamínulas foram montadas com o meio de montagem Prolong[®] antifade contendo DAPI (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA). As amostras foram analisadas em microscópio confocal Leica TCS SP5 *laser scanning* (Leica Microsystems, Germany).

3.6. **Western blotting**

Para a preparação dos lisados, 5×10^6 células foram lavadas com PBS gelado, e então foi adicionado 400 μ L tampão de lise (25 mM Tris-HCl, pH 7.4, 225 mM KCl, and 1% Nonidet P-40), mais uma mistura de inibidores de proteases (Sigma-Aldrich) e fosfatases (NaF 10 mM, Na_3VO_4 1mM; Sigma-Aldrich). As amostras foram então vortexadas e subsequentemente incubadas no gelo por 30 minutos. Os lisados foram clarificados por centrifugação 20000 $\times$ g por 20 min, a 4°C. A concentração de proteínas no lisado celular foi determinada usando o Reagente de Bradford (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). Assim, sessenta microgramas de proteína do lisado foram submetidos a eletroforese em gel poliacrilamida contendo SDS (SDS-PAGE), transferido para uma membrana de nitrocelulose e incubado *overnight* com os anticorpos primários. As membranas foram lavadas com TBST (Tampão Tris Salina com 0,1% de detergente Tween20), incubadas com anticorpos secundários conjugados a peroxidase e lavados de novo com TBST. As bandas de proteína foram

visualizadas pelo método de quimioluminescência com ECL (Santa Cruz Biotechnology) utilizando o programa ImageQuant (GE).

3.7. Ligação do anticorpo SAMHD1 a resina conjugada a uma mistura de proteínas A e G usando Dimethylpimelimidate (DMP), para imunopurificação

Para purificação de SAMHD1 de células HEK 293T sem a presença de anticorpos utilizados na imunoprecipitação, conjugamos covalentemente o anticorpo anti-SAMHD1 à resina de agarose.

- Imobilização do anticorpo anti-SAMHD1 à resina de agarose-proteína A/G: Em um tubo, foi adicionado 20 µg do anticorpo anti-SAMHD1 monoclonal (Origene) a 30 µL de resina de agarose-proteína A/G, e em outro tubo, foi adicionado 20 µg de IgG de camundongo como controle de acoplamento. A mistura foi deixada sob agitação *overnight* a 4°C. Em seguida, as resina foram lavadas três vezes com 1 mL tampão de ligação (borato de sódio 0,2M, pH 9).
- *Crosslinking*: O reagente de *crosslinking* foi preparado momentos antes do uso, devido sua instabilidade. Foi preparada uma solução de 20 mM de DMP (dimethylpimelimidate, ThermoFisher), dissolvido em tampão de ligação. 1 mL dessa solução foi imediatamente adicionada a cada tubo. A mistura foi deixada sob agitação T. A. por 40 minutos. Após esse período, a resina foi lavada e ressuspensa em reagente de “extinção” (0,2M de etanolamina em 50 mM de bicarbonato de

amônia). As resinas ficaram incubadas por 2 horas T.A. com o reagente de extinção, para promover a remoção/extinção de todo resíduo de DMP que não foi ligado.

Para remoção das IgGs que não foram acopladas, foi feita a lavagem das resinas com tampão ácido (0,58% v/v de ácido acético e 150 mM de NaCl), por 3x1 mL. Em seguida, as resinas foram lavadas 3x com 1 mL de PBS 1x, gelado. Foi adicionado 2 gotas de tampão Tris-HCl pH 12, para neutralização do pH.

Para checar a eficiência de imobilização do anticorpo à resina, uma alíquota (5 µL) das amostras antes e depois do *crosslinking*, e depois da lavagem com tampão ácido, foram eluídas pela adição de tampão de amostra 2x (1M Tris-HCl pH 6,8; 5% β-mercaptanol; 2% SDS; 0,004% Azul de bromofenol e Glicerol 10%). As amostras foram fervidas por 5 minutos a 100 °C e aplicadas em gel de poliacrilamida. Em seguida, as proteínas do gel foram transferidas para membrana de nitrocelulose. A membrana foi então incubada com anticorpo secundário de camundongo e de coelho por 1h T.A., e revelada pelo método de quimioluminescência.

- **Imunopurificação:** Os lisados foram preparados como descrito no item 3.6. Antes da aplicação do lisado às resinas acopladas, foi realizado o *pre-clearing*, que consiste na adição do lisado à resina A/G não acoplada por 30 minutos. Após essa incubação, a mistura foi centrifugada e o sobrenadante reservado para IP. 1 mL de lisado foi adicionado a aproximadamente 25 µL de resina acoplada. A mistura foi deixada sob agitação *overnight*, 4°C. Após esse período, a resina foi centrifugada e o sobrenadante descartado. A resina foi lavada 7x com o tampão de lise (150mM NaCl, 50mM Tris, 10mM EGTA, 0.2% NP40). Após a última lavagem, foi adicionado 40 µL de Glicina 100 mM pH 2, por 3 horas, para completa eluição do complexo. O eluído foi analisado por *western blotting*.

3.8. Identificação de reatividade cruzada do anti-SAMHD1 monoclonal utilizando o *Protoarray*[®]

Para determinar a especificidade de ligação do anticorpo anti SAMHD1 Origene frente a outras proteínas, nós utilizamos o *Protoarray*[®] v5.0 (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA). Os procedimentos com os *Protoarrays*[®] seguiram as instruções do fabricante. Nesse ensaio, utilizamos 2 lâminas de *Protoarray*[®]: uma foi incubada com o anti-SAMHD1 Origene, e a outra foi incubada apenas com o anticorpo secundário, como controle negativo do experimento.

As lâminas do Protoarray foram incubadas com tampão de bloqueio (50 mM de HEPES, 200 mM de NaCl, 0,08% de Triton X-100, 25% glicerol, 20 mM de glutatona reduzida, 1 mM de ditioneitol (DTT), e 1% de albumina de soro bovino (BSA) (Invitrogen) durante 1h a 4 °C em agitação 50 rpm. Após esse período, a solução de bloqueio foi removida e em seguida foi adicionada uma solução do anti SAMHD1 0,5 µg/mL, em solução de PBS 1x. A mistura foi deixada sob agitação por 2h, 4 °C. O anticorpo primário foi decantado, e as lâminas foram lavadas 3x10min com o tampão de lavagem (PBS 10X, Tween 20 10% e *synthetic block*) Por fim, as lâminas foram então incubadas com 1,0 µg /µL de anti-mouse AlexaFluor 647 durante 90 min a 4 °C, com agitação de 50 rpm. Em seguida, elas foram lavadas cinco vezes com tampão de lavagem e uma vez com água destilada. As lâminas foram secas por centrifugação a 200 x g por 2 minutos, protegidas da luz. As lâminas foram escaneadas em GeneScan5000B (Lab. Prof. Dr. Gustavo H. Goldman/Ciências Farmacêuticas/FCFRP-USP) utilizando o software *GenePix*.

Os Protoarrays foram digitalizados, e a aquisição dos dados e subtração do *background* local foram adquiridos com software *GenePix* 4.1 (Molecular Devices) e os dados analisados em *ProspectorAnalyser* 5.1 (Invitrogen). As proteínas foram consideradas somente se todas as replicatas internas fossem consistentemente detectadas pelo Coeficiente de Variância (CV) de 50%. Os spots foram considerados *hits* se possuísem o *Z-factor* > 0,45. Isso significa que o sinal apresentado leva em consideração a variação associada às características do controle e da amostra para medir a qualidade do ensaio.

Resultados

4- RESULTADOS

4.1. Especificidade do anticorpo anti-SAMHD1 (Origene *Technologies*) em diferentes linhagens celulares não mielóides

Para avaliarmos a expressão de SAMHD1 em diferentes linhagens celulares não relacionadas a estudos de infecção viral, utilizamos células HEK 293T (transfectadas ou não com o plasmídeo SAMHD1 sem *tag*), Namalwa (linfoma de Burkitt - células linfoblastóide B) e Neuro 2A (tumor espontâneo de cérebro de camundongo albino). Essas células foram lisadas em tampão de lise e os sobrenadantes foram submetidos à análise por *western blotting*. Inicialmente, utilizamos apenas o anticorpo anti-SAMHD1 monoclonal produzido contra a proteína SAMHD1 inteira (Origene *Technologies*), e observamos que anticorpo monoclonal reconhece três diferentes bandas em HEK 293T não transfectada, uma com massa molecular maior que 66 kDa (1), outra com massa molecular próximo a 66 kDa (2) e uma com massa molecular menor que 66kDa (3. Após a transfecção, verificamos mais uma banda um pouco acima da banda 3. Nas demais células testadas, o anti-SAMHD1 também reconheceu as três bandas observadas (Figura 3).

Esses dados nos levaram a investigar se as bandas seriam provenientes de um sítio alternativo de tradução de SAMHD1.

Figura 3: Expressão de SAMHD1 em diferentes tipos celulares. Lisados de células HEK 293T, Namalwa e Neuro 2A foram submetidos a análise por *western blotting* utilizando o anti-SAMHD1 monoclonal Origene Technologies. Observa-se a marcação de 3 bandas: uma com massa molecular maior que 66 kDa (1), outra com massa molecular próximo a 66 kDa (2) e uma com massa molecular menor que 66kDa (3) nos tipos celulares utilizados. A membrana também foi incubada com anticorpo anti-GAPDH como controle de “carregamento”.

4.2. A hiperexpressão de SAMHD1-HA gera uma proteína SAMHD1 truncada por tradução alternativa do sítio de iniciação

Subclonamos SAMHD1 humana (*hSAMHD1*) em fusão com HA *tag* na região C-terminal para hiperexpressar em células HEK 293T (Figura 4). O lisado celular total foi submetido a *western blotting* e incubado com o anticorpo monoclonal anti-HA (Figura 5). Foram observadas duas bandas proteicas migrando com massas moleculares próximas de 66- e 55-kDa (Figura 5, faixa 1). Uma vez que *hSAMHD1* é composta de 626 resíduos de aminoácidos, com peso molecular teórico de 72.2 kDa, a pequena banda observada poderia ser uma versão truncada desta proteína.

Figura 4: Versões truncadas de SAMHD1. Representação esquemática indicando a posição dos AUGs em transcritos humanos. Os retângulos em preto indicam os domínios de *hSAMHD1* descritos. O x indica o local onde foi feita a mutação para deleção do ATG2, e geração dos transcritos SAMHD1(AAG2).

Para investigar a possibilidade de um sítio alternativo de tradução localizado a 345 nucleotídeos *upstream* do ATG1, mutamos o ATG2 (nucleotídeos 345 a 347) para AAG, que codifica para SAMHD1(AAG2)-HA (Figura 4). Construimos também a versão truncada da proteína *hSAMHD1*-HA sem os primeiros 114 aminoácidos, que codifica para SAMHD1(ATG2)-HA (Figura 4). Os lisados totais de células HEK 293T transfectadas com cada construção foram analisados por *western blotting* com anticorpo anti-HA. Surpreendentemente, a SAMHD1(AAG2)-HA falhou em gerar uma proteína de 55 kDa ao passo que a proteína SAMHD1(ATG2)-HA migrou como uma única banda de mesmo peso molecular que a pequena SAMHD1-HA (Figura 5).

No geral, a hiperexpressão de *hSAMHD1*-HA *full-length* e seus mutantes revelaram a presença de uma versão truncada de *hSAMHD1* gerada por um sítio de início de tradução alternativo localizado no nucleotídeo 345 a 347. Esses resultados nos permitem inferir que a banda de 50 kDa, reconhecida pelo anticorpo monoclonal da Origene, poderia ser a versão truncada SAMHD1(ATG2).

Figura 5: Expressão das versões truncadas de SAMHD1. Lisados de HEK 293T transientemente transfectadas com as construções de SAMHD1 e analisados por *western blotting* com o anticorpo anti-HA.

Para confirmar a existência de um sítio alternativo de tradução, células HEK 293T foram transfectadas com siRNA específico para *SAMHD1*, e processadas para *western blotting*. Nossos resultados com o anticorpo monoclonal demonstraram que, usando siRNA, nós podemos fazer o *knockdown* da banda de 66 kDa (banda 2), porém o mesmo não ocorre com a banda 3, de 50 kDa. Esses dados são inconsistentes com a idéia de início de tradução alternativa de *SAMHD1* endógena, e que a banda 3 pode ser decorrente de reação cruzada do anticorpo monoclonal (Figura 6).

Figura 6: Avaliação do *Knockdown* de SAMHD1 utilizando siRNA. Células HEK 293T foram transfectadas com siRNA específicos ou não para SAMHD1 e os resultados avaliados por *western blotting* com o anti-SAMHD1 Origene. A membrana também foi incubada com anticorpo anti-GAPDH como controle de “carregamento”.

Utilizamos, portanto, uma segunda abordagem, células humanas HAP1 nocaute para *hSAMHD1* gerada pelo sistema CRISPR/Cas9. A análise de PCR e sequenciamento de Sanger da região genômica alvo confirmaram a presença de uma adição no gene SAMHD1, levando a uma mutação de deslocamento de 2 pares de bases no quadro de leitura e um códon de parada prematuro *downstream* no éxon 1 de células HAP1 (Anexo 1). Igualmente, o nocaute de SAMHD1 mediada por CRISPR levou à depleção apenas da banda de 66 kDa sem nenhum efeito na banda 2 da proteína de 55 kDa (Figura 7).

Figura 7: Especificidade do anticorpo anti-SAMHD1 monoclonal Origene. Lisados de células HAP1 parentais e nocautes para SAMHD1 foram analisados por *western blotting*, utilizando o anti-SAMHD1 monoclonal Origene *Technologies*. Como controle de “carregamento” foi utilizado o anticorpo anti- β -actina.

Os resultados acima mencionados demonstraram que a banda de proteína de 50 kDa observada usando o anticorpo monoclonal foi resultado de reação cruzada do anticorpo monoclonal. Então sentimos a necessidade de utilizarmos um segundo anticorpo anti-SAMHD1 para confirmação dos nossos resultados.

Utilizamos o anticorpo anti-SAMHD1 policlonal produzido contra o fragmento N-terminal de 314 aminoácidos de *hSAMHD1* (Proteintech *Group*). Testamos a especificidade do mesmo em lisados de células HEK 293T, e vimos que ao contrário do que ocorre quando utilizamos o anticorpo monoclonal, o anticorpo policlonal reconhece uma única proteína que migra com uma massa molecular próximo a 66 kDa em células HEK 293T (Figura 8).

Figura 8: Expressão de SAMHD1 em células HEK 293T, utilizando o anticorpo policlonal. Lisados de células HEK 293T foram submetidos a análise por *western blotting* utilizando o anti-SAMHD1 policlonal Proteintech Group.

Para reforçar nossos dados, utilizamos da mesma estratégia com siRNA e células HAP1 nocaute para SAMHD1. O anticorpo policlonal marcou somente a banda de 66 kDa, como mostra a Figura 9A. Com as células nocaute HAP1, é claro o desaparecimento da banda específica de SAMHD1 de 66 kDa (Figura 9B).

Figura 9: Especificidade do anticorpo anti-SAMHD1 policlonal. (A) Lisados de células HEK 293T transfectados com siRNA específicos para SAMHD1, analisados por *western blotting* com o anticorpo policlonal anti-SAMHD1 Proteintech Group, mostrando o *knockdown* da banda de 66 kDa. Como controle de “carregamento”, foi utilizado o anti- β -tubulina. (B) Lisados de células HAP1, parental e nocaute para SAMHD1, foram incubados com o anti-SAMHD1 policlonal Proteintech Group, mostrando o *knockout* específico da banda de 66 kDa. Como controle de “carregamento”, foi utilizado o anti- β -actina.

Para reforçar esse resultado, utilizamos lisados de células Jurkat, que possuem níveis muito baixos de *hSAMHD1* (nocaute natural)⁸⁴, em comparação com HEK 293T para ambos os anticorpos (Figura 10). Os resultados mostram uma banda específica de *hSAMHD1* em 66 kDa e provaram a reação cruzada do anticorpo monoclonal anti-SAMHD1 com as bandas 1 e 3 da Figura 4.

Figura 10: Expressão de *hSAMHD1* em células humanas. Extratos celulares foram preparados e analisados por western blotting com anticorpos anti-SAMHD1 monoclonal e policlonal. Como controle de comparação de corrida, utilizamos bandas não específicas do gel coradas com ponceau.

4.3. SAMHD1 tem localização nuclear e é recrutada para locais onde há dano no DNA, causada por Camptotecina (CPT).

Para determinar a localização subcelular de SAMHD1 endógena, nós avaliamos por microscopia confocal a localização desta proteína utilizando anti-SAMHD1 monoclonal (Origene *Technologies*) e o anti-SAMHD1 policlonal (Proteintech *Group*), em células HAP1. Ambos apresentaram marcação nuclear, e o anticorpo monoclonal também exibiu estrutura perinuclear *dot like* que permanece mesmo na linhagem celular HAP-1 nocaute para SAMHD1 (Figura 11, painel superior) indicando que esta marcação é inespecífica do anticorpo. Por outro lado, o anticorpo policlonal não apresentou essas estruturas *dot like*, e a marcação não foi verificada em células nocautes (Figura 11, painel inferior).

SAMHD1 tem sido descrita como uma proteína essencial no reparo de extremidades do DNA quando há quebra na dupla fita (DSB) por recombinação homóloga (HR)^{55,56}. Demonstramos que SAMHD1 é recrutada para os locais de ruptura sob estímulo da droga camptotecina (CPT), que causa danos no DNA, usando o anti-SAMHD1 monoclonal. Embora também observemos um aumento das estruturas *dot-like* quando utilizamos tratamento com 2 μ M de CPT por 4h em células HeLa, este efeito não foi observado quando o anticorpo policlonal foi utilizado (Figura 12).

As DSBs provocam uma reação extensa na cromatina vizinha, caracterizada pela fosforilação da histona H2AX na serina 139 de sua cauda C-terminal (para formar “ γ H2AX”). Para avaliar o recrutamento de SAMHD1 para esses locais de dano, analisamos por microscopia confocal a dupla marcação com os anticorpos anti-SAMHD1 e o anti- γ H2AX, tratados com CPT. Nós observamos que o anti- γ H2AX não colocaliza com o anticorpo

policlonal de SAMHD1 (Figura 13), e que os dados mostrados por Daddacha et al., 2017, são decorrentes de marcações inespecíficas do anticorpo monoclonal de SAMHD1.

Figura 11: SAMHD1 acumula-se somente no nucleoplasma. Células HAP1 parental e células SAMHD1^{KO} foram marcadas com o anti-SAMHD1 (verde) Origene *Technologies* e com o anti-SAMHD1 Proteintech *Group*. O núcleo celular foi marcado com DAPI (azul). Note que a estrutura *dot-like* permanece mesmo na linhagem celular HAP-1 nocaute para SAMHD1 indicando que este sinal é inespecífico para este anticorpo. Barra - 5 μ m.

Figura 12: A sinalização de resposta ao dano do DNA não desencadeia a redistribuição de SAMHD1 para *foci nucleares*. A) As células HeLa foram tratadas com CPT 2 μ M por 4 horas e processadas para imunofluorescência e análise no confocal com os anticorpos anti-SAMHD1 Origene *Technologies* e Proteintech *Group*. Note que o padrão especulado sob estímulos de dano do DNA não foi observado com o anticorpo policlonal específico do Proteintech *Group*. Barra - 5 μ m.

Figura 13: O dano ao DNA induzido por CPT ativa a resposta γ H2AX, mas não SAMHD1. Células HeLa foram tratadas com 2 μ M de CPT durante 4 h e processadas para análise de microscopia confocal de imunofluorescência, utilizando dupla marcação com o anticorpo policlonal anti-SAMHD1 Proteintech Group (verde) e γ H2AX (vermelho).

4.4. Avaliação da produção de SAMHD1(ATG2) endógena

A SAMHD1(ATG2)-HA foi identificada sob condições de hiperexpressão de SAMHD1-HA em células HEK 293T, mas não tínhamos avaliado seus níveis de expressão endógenos. Para isso, células HEK 293T foram transfectadas ou não com SAMHD1-HA, SAMHD1(AAG2)-HA ou SAMHD1(ATG2)-HA e processadas para *western blotting* marcando com os anticorpos anti-SAMHD1 monoclonal e policlonal (Figura 14). Nota-se a expressão de SAMHD1(ATG2) somente sob condições de hiperexpressão de SAMHD1-HA ou SAMHD1(ATG2)-HA com ambos os anticorpos (faixas 2, 4, 6 e 8). Como esperado, o mutante SAMHD1(AAG2)-HA não apresentou expressão da SAMHD1(ATG2)-HA (faixas 3 e 7). Esses dados confirmam a falta de um códon de início alternativo endógeno no mRNA de *hSAMHD1*.

No entanto, uma vez observada a expressão deste códon de início alternativo de SAMHD1 (ATG2) sob a hiperexpressão de SAMHD1-HA do tipo selvagem, a determinação da função desta forma truncada é importante para distingui-la da versão do tipo selvagem em estudos envolvendo a hiperexpressão de SAMHD1.

Figura 14: Análise de SAMHD1(ATG2)-HA por *western blotting* em extratos de células HEK 293T. Células HEK 293T foram transfectadas com vetor vazio, SAMHD1-HA, SAMHD1(AAG2)-HA ou SAMHD1(ATG2)-HA e foram processadas para análises por *western blotting*, com anticorpos anti-SAMHD1 Origene *Technologies* e Proteintech *Group*.

4.5. Imunopurificação das proteínas reativas ao anticorpo anti-SAMHD1 monoclonal

Em nossos estudos, vimos que o anticorpo anti-SAMHD1 Origene *Technologies*, reage, além de SAMHD1 (72,2 kDa), com uma outra proteína de aproximadamente 50 kDa (p50), por *western blotting* e que pode ser a proteína formadora do *dots* observado por microscopia confocal. Para investigar a possibilidade de reação cruzada do anti-SAMHD1, imobilizamos via reagente DMP de *crosslinking* como um método de imunopurificação. DMP *crosslinker* pode ser utilizado para imobilizar anticorpos em suportes de agarose conjugadas a proteína A ou proteína G para imunopurificação do antígeno.

O primeiro passo do processo de imunopurificação da proteína alvo consiste na verificação se o anticorpo anti-SAMHD1 Origene *Technologies* se ligou corretamente a resina de agarose. Para isso, separamos alíquotas antes da adição do *crosslinking* (1), após a adição do DMP *crosslinking* (2) e após a lavagem com o tampão ácido (3) (Figura 15), as quais foram analisadas por *western blotting*. Assim, conseguimos identificar a ligação bem-sucedida do anti-SAMHD1 a resina de agarose, pois o resultado indicou uma depleção de IgG entre as amostras 1 e 2 (pré e pós-ligação), uma vez que a amostra 1 indica a quantidade de IgG livre, e a amostra 2 a quantidade de IgG que não se ligou à resina (Figura 15). Além disso, a diminuição de IgG na amostra 3 indica a eficiência de ligação à resina, considerando que um *crosslinking* bem sucedido é indicado pela falta de eluição de IgG após a fervura da resina⁷⁸.

Figura 15: Eficiência de imobilização do anti-SAMHD1 à resina de agarose conjugado à proteína A/G. (1) e (4) representam IgGs livres antes da adição do DMP *crosslinking*; (2) e (5) representam os IgGs livres após a adição do reagente de *crosslinking*; (3) e (6) representam os IgGs livres após a lavagem com o tampão ácido. O anticorpo anti-SAMHD1 foi ligado à resina de agarose conjugado à proteína A/G usando DMP *crosslinking*. Para revelação da membrana, foi utilizado anticorpo secundário conjugado a peroxidase, anti-*mouse* e anti-*rabbit*.

Em seguida, procedemos com a imunopurificação da proteína alvo a partir de lisados celulares. Para isso, partimos de um total de 8 placas de 10 cm de HEK 293T, sendo 4 placas para imunopurificação utilizando a resina de agarose conjugada a proteína A/G que foi imobilizada ao IgG controle, e 4 placas utilizando a resina de agarose conjugada a proteína A/G que foi imobilizada ao anti-SAMHD1 Origene *Technologies*. Após a análise dos resultados da imunopurificação, vimos que a proteína alvo (p50) não foi enriquecida com o processo (Figura 16), dessa forma não foi possível purificar a banda para análise por espectrometria de massas, não sendo possível a identificação dessa proteína por essa metodologia.

Figura 16: Imunopurificação usando o anticorpo anti-SAMHD1 Origene. Anti-SAMHD1 monoclonal foi covalentemente ligada à resina de agarose conjugada a proteína A/G, utilizando DMP crosslinking. (I) *Input*; (NL) o lisado que não foi ligado á resina; (E) Eluído Glicina 100 mM pH 2-3.

4.6. Determinação da especificidade do anticorpo anti-SAMHD1 monoclonal utilizando microarranjos de Proteína (*Protoarrays*®)

Para identificar proteínas que tem reatividade cruzada com esse anticorpo, utilizamos *Protoarrays* humanos e 0,5 µg/mL do anticorpo anti-SAMHD1 Origene *Technologies* e como controle, utilizamos uma lâmina apenas incubada com o anticorpo secundário. Utilizando os critérios estatísticos descritos na “Metodologia”, identificamos 174 proteínas que reagiram com o anti-SAMHD1 Origene *Technologies*, subtraindo-se as proteínas marcadas no controle negativo (Anexo 2). Essas proteínas identificadas foram agrupadas, utilizando o PANTHER, de acordo com as suas funções biológicas, sendo grande parte delas (37,1%) proteínas que possuem atividade catalítica como SAMHD1, seguidas por proteínas de ligação (30,5%), desse total, 38,2% possuem atividade hidrolase como SAMHD1 (Figura 17).

Figura 17: Classificação das proteínas identificadas de acordo com suas funções nas células. As 174 proteínas foram agrupadas 8 diferentes classes de acordo com sua função molecular que vão desde proteínas com atividade catalítica, proteínas de ligação entre outras.

Como vimos, a proteína reconhecida pelo anti-SAMHD1 Origene *Technologies* possui, assim como SAMHD1, localização nuclear, então realizamos também a classificação quanto a compartimentalização dessas proteínas na célula usando outra ferramenta, o STRAP1.5. Assim, identificamos um total de 46 proteínas nucleares (22%) (Figura 18).

Figura 18: Classificação das proteínas identificadas quanto a sua localização celular. Todas as proteínas identificadas foram agrupadas de acordo com os compartimentos celulares. A grande maioria das proteínas são nucleares ou citoplasmáticas.

Em seguida, fizemos uma nova seleção de proteínas que se encaixam em todos os parâmetros que havíamos observado: proteína de localização nuclear, com marcação do tipo *dots* no núcleo e de aproximadamente 50 kDa, e conseguimos refinar os dados com a seleção 3 proteínas: RAD51 (*DNA repair protein RAD51 homolog 1*), GSK3 β (*Glycogen synthase kinase-3 beta*) e RRAGD (*Ras-related GTP-binding protein D*) para validação por *western blotting* utilizando o anti-SAMHD1. Para isso, transfectamos transientemente células HEK 293T com os respectivos plasmídeos que expressam as proteínas selecionadas e realizamos *western blotting* marcando-os com o anticorpo anti-SAMHD1 Origene Technologies, e também com o anticorpo anti-HA, uma vez que as construções dos plasmídeos expressam HA *tag* e anti-actina, como controle de *loading*.

Infelizmente, o anti-SAMHD1 não reconheceu (por reação cruzada) nenhuma banda correspondente as proteínas superexpressas (Figura 19), utilizando o anticorpo anti-HA, para nenhuma das proteínas testadas, o que demonstra que nenhuma destas proteínas é a p50 observada.

Figura 19: Análise das proteínas identificadas no *Protoarray*[®], por *western blotting*. Células HEK 293T foram transfectadas com plasmídeo vazio e: A) HA-RAD51, B) HA-GSK3β ou C) HA-RRAGD. Os lisados celulares foram analisados por *western blotting*, e incubados com o anticorpo monoclonal anti-SAMHD1, anti-HA e anti-actina, para todas as membranas testadas.

Discussão

5. DISCUSSÃO DE RESULTADOS

SAMHD1 é conhecida por sua atividade antiviral dependente do GTP que pode reduzir a concentração de dNTPs abaixo de um limiar utilizável para a replicação eficiente do vírus da imunodeficiência humana tipo 1 (HIV-1)¹³. Além disso, uma função independente da sua atividade dNTPásica foi descrita, que é a capacidade de promover a ressecção final do DNA, facilitando o reparo de DSBs por HR⁵⁶. Daddacha *et al.*, 2017, mostraram que SAMHD1 pode ser recrutada para locais onde houve DSBs em resposta a danos no DNA induzidos por CPT em células HeLa e U2OS^{55,56} sendo redistribuída em estruturas *dot-like* (ou *foci*) de DSBs.

Durante nossos estudos da função de SAMHD1 no núcleo celular, testamos dois anticorpos: o anti-SAMHD1 monoclonal produzido contra a proteína SAMHD1 inteira, produzida pela Origene *Technologies*, e o anti-SAMHD1 policlonal criado contra os 314 aminoácidos do fragmento N-terminal de SAMHD1 produzido pelo Grupo Proteintech. Observamos que o anticorpo monoclonal anti-SAMHD1 exibiu os mesmos resultados obtidos por Daddacha *et al.*, 2017⁵⁶. No entanto, o anticorpo policlonal não confirmou este resultado, mostrando-se sem alterações na distribuição de SAMHD1 após a indução de DSBs. É importante ressaltar que esse mesmo anticorpo monoclonal foi utilizado nos experimentos de colocalização com a proteína FBXO25, no início de nossos estudos, sugerindo maior cautela nas análises de colocalização entre FBXO25 e SAMHD1.

Anticorpos comerciais pouco validados podem gerar resultados inconclusivos. Uma maneira definitiva de demonstrar a especificidade do anticorpo é incorporar o gene nocaute nos procedimentos de validação de anticorpos⁷⁹. Para isso, duas linhas de evidências argumentam contra o recrutamento de SAMHD1 para DSBs em resposta a danos no DNA. (1)

O anticorpo monoclonal, mas não o anticorpo policlonal, detectou as estruturas *dot-like*, mesmo nas células HAP1^{KO}, confirmando a não especificidade deste anticorpo. (2) Por análise de *western blotting* de lisados celulares de HEK 293T transfectados com siRNA para SAMHD1 ou HAP1^{KO}, demonstramos que uma banda de aproximadamente 50kDa (p50) foi detectada apenas pelo anticorpo monoclonal. Além disso, finalmente, confirmamos a banda inespecífica da proteína p50 pelo anticorpo monoclonal em lisados de células Jurkat, que não expressam SAMHD1.

A aplicação de anticorpos em pesquisas e desenvolvimento de terapias *in vitro* e *in vivo* requer que o anticorpo exiba alta especificidade. Apesar de se ligarem com alta afinidade a suas proteínas alvo, os anticorpos podem ter especificidades variáveis ⁸⁰. Nesse sentido é importante ressaltar a reatividade cruzada, que é quando um anticorpo reage com sítios antigênicos estruturalmente similares em proteínas diferentes ^{81,82}. Vimos que o anticorpo monoclonal reconhece três diferentes bandas: uma com massa molecular maior que 66 kDa, a segunda com massa molecular próximo a 66 kDa e a terceira, com massa molecular menor que 66 kDa em HEK 293T, enquanto que o anticorpo policlonal, reconhece, com alta especificidade uma única banda de 66 kDa. Esses dados, juntos com os resultados de células nocaute e siRNA para SAMHD1, mostraram que o anticorpo monoclonal possui reatividade cruzada com a proteína p50.

Para identificar novos parceiros de interação o DSP *crosslinker* tem sido utilizado como uma estratégia de purificação por afinidade aliada a espectrometria de massas ^{83,84}, sugerindo que o uso de *crosslinkers* em células pode ser usado caracterizar complexos transitórios por espectrometria de massas. DSP e DMP *crosslinker*, são utilizados para imobilizar anticorpos a suportes conjugados a proteína A/G para purificação de antígenos ⁸⁵.

Utilizamos DMP *crosslinker* como estratégia de purificação por afinidade para subsequente análise e identificação por espectrometria de massas. Infelizmente, a p50 não foi enriquecida no nosso eluído, assim, não conseguimos dar prosseguimento com a identificação da p50 utilizando essa estratégia. Assim, podemos inferir que a interação anti-SAMHD1 monoclonal com a p50 pode ser fraca e transiente, podendo ter sido rompida durante o procedimento.

Muitos métodos são utilizados para avaliar a especificidade do anticorpo, dentre eles, incluem os *arrays* de proteínas, *western blotting*, ELISA e imuno-histoquímica⁸⁶. Em comparação com outros métodos, os *arrays* de proteínas oferecem várias vantagens, como a triagem rápida de milhares de proteínas em um único dia, e o método de detecção mais sensível do que a detecção baseada em quimioluminescência usada para *western blotting*, por exemplo. Uma vez que a identidade de cada proteína impressa no *array* é conhecida, qualquer reatividade cruzada de anticorpos com proteínas identificadas na matriz pode ser consultada para identificar motivos que podem explicar a reatividade cruzada⁸⁷. Várias publicações demonstraram a utilidade de *arrays* de proteínas para perfis especificidade de anticorpos^{88, 89,90}. Assim, utilizamos o Protoarray como ferramenta de identificação de proteínas com reatividade cruzada com o anticorpo anti-SAMHD1 monoclonal, e que se encaixasse nos parâmetros que já havíamos observado: massa molecular (~50kDa), localização nuclear e estruturas de marcação do tipo *dot-like* no núcleo. Dessa forma, selecionamos três proteínas: RRAGD, GSK3 β e RAD51 que foram analisadas por *western blotting*, para verificação se o anticorpo monoclonal seria capaz de identificar alguma dessas proteínas superexpressas.

A proteína RRAGD tem atividade GTPásica está envolvida no controle de mTORC1 e na promoção do crescimento de células cancerígenas ⁹¹. RRAGD não está envolvida no reparo de dano no DNA e não foi reconhecida pelo anticorpo monoclonal por *western blotting*. Porém, utilizando o programa EMBOSS Water ⁹², que realiza a busca por similaridades entre sequências de proteínas, vimos RRAGD possui 33,3% de similaridade de sequência com SAMHD1, o que poderia explicar a reatividade cruzada com o anticorpo monoclonal de SAMHD1.

GSK3 β é uma serina/treonina quinase multifuncional, regulador chave de várias vias de sinalização, como controle do ciclo celular, proliferação, diferenciação e apoptose ^{93,94}. Em um estudo recente, GSK3 β foi translocada do citoplasma para o núcleo, onde induziu o reparo de DNA por DSBs em células de glioblastoma via fosfo-53BP1 ⁹⁵, uma importante proteína de checagem de dano no DNA ⁹⁶. Além disso, também utilizamos o programa EMBOSS Water ⁹², e vimos que GSK3 β possui 38,6% de similaridade de sequência com SAMHD1. Esses dados condiziam com nossos achados até o momento, porém o anticorpo anti-SAMHD1 monoclonal falhou na identificação de HA-GSK3 β superexpressa em células HEK 293T.

RAD51 é uma proteína multifuncional que participa de vias centrais de replicação do DNA, reparo por recombinação homóloga, e esta envolvida com o desenvolvimento de câncer ^{97,98}. Foi proposto um modelo de interação entre RAD51 e a sinalização imunológica em resposta ao dano no DNA e estresse de replicação. RAD51 é recrutado para os locais de DSBs e forquilha de replicação perturbada, resultando no bloqueio do excesso de atividade de exonuclease de MRE11 no genoma recém-replicado e reparo de DSB. Assim, o RAD51 desempenha um papel direto na replicação do DNA e no reparo de DSBs, e está

indiretamente envolvida na sinalização imunológica ⁹⁹. Assim, RAD51 poderia ser a p50 parceira de interação de SAMHD1, porém o anticorpo monoclonal não reconheceu por *western blotting* a proteína superexpressa, mesmo com 32,1 % de similaridade de sequência com SAMHD1.

Além da reatividade cruzada com o anticorpo monoclonal de SAMHD1, que permite que o anticorpo reconheça a p50, devemos considerar também o início alternativo de tradução (TIS), responsável por gerar proteínas truncadas no N-terminal com diferentes funções ¹⁰⁰. Esse processo é responsável pela complexidade e variabilidade do proteoma. O início da tradução da maioria dos mRNAs eucarióticos ocorre por varredura linear, embora alguns outros mecanismos também sejam possíveis ¹⁰¹⁻¹⁰³. De acordo com o modelo de varredura, subunidades ribossômicas 40S são recrutadas para a estrutura terminal cap-5', e a varredura do mRNA ocorre na direção 5' → 3'. O reconhecimento do tripleto AUG como TIS depende do seu contexto nucleotídico: se o contexto é ótimo, a maioria das subunidades ribossômicas 40S reconhecerá o AUG e iniciará a tradução. No entanto, se o contexto estiver abaixo do ideal, algumas subunidades reconhecem-no como um TIS, mas outras podem ignorá-lo e continuar a varredura na direção 3' e iniciar a tradução no primeiro AUG que encontrar (mecanismo de varredura com vazamento). Sendo assim, a varredura do mRNA depende do contexto AUG.¹⁰⁴ O mRNA transcrito do gene MDM2 humano produz uma proteína p90 (comprimento total) e uma proteína p75 que é uma mistura truncada de isoformas da proteína produzidas pelo início da síntese proteica em códons AUG internos na posição 62 ou 102, respectivamente ¹⁰⁵. Essas proteínas são funcionalmente diferentes, e outros exemplos foram encontrados para os mRNAs de p53 ¹⁰⁶, Sgk1 de camundongo (quinase 1 induzida por soro e glicocorticóide) ¹⁰⁷ e um regulador de sinalização de proteína G (RGS2) e glicocorticóide humano receptor (hGRalpha) ^{108,109}. Aqui, descobrimos que o

RNAi de SAMHD1 produziu duas isoformas de SAMHD1 sob hiperexpressão, uma SAMHD1 de tipo selvagem e uma SAMHD1(ATG2) truncado no N-terminal sem os 114 primeiros aminoácidos, incluindo o domínio SAM. Essas isoformas podem ter atividades não identificadas. Esses resultados sugerem a indução do mecanismo de vazamento durante a varredura do TIS de um gene hiperexpresso, recomendando uma cautela durante a hiperexpressão de um gene devido a eventos fora do alvo.

Em resumo, nesse trabalho vimos que a proteína SAMHD1 produziu duas isoformas sob condições de hiperexpressão, uma SAMHD1 do tipo selvagem e uma SAMHD1(ATG2) truncada no N-terminal sem os 114 primeiros aminoácidos, em decorrência de um start códon alternativo sugerindo cautela em experimentos de hiperexpressão. Além disso, vimos que SAMHD1 é recrutada para os locais onde houve DSBs, mas que ao contrário do que foi apresentado em um trabalho anterior ⁵⁶, a sinalização em resposta ao dano no DNA não levou a redistribuição de SAMHD1 para o *foci* nuclear. Por fim, observamos que o anticorpo monoclonal anti-SAMHD1 Origene *Technologies* possui reatividade com uma proteína de aproximadamente 50 kDa (p50), que não conseguimos identificar pelas metodologias utilizadas, portanto continua sem sua função estabelecida. Assim, novas metodologias precisam ser utilizadas na tentativa de identificar a p50 e sua função relacionada às proteínas SAMHD1 e FBXO25, e a sua resposta a danos no DNA.

Conclusões

6. Conclusões

- A proteína SAMHD1 produziu duas isoformas sob condições de hiperexpressão, uma SAMHD1 do tipo selvagem e uma SAMHD1(ATG2) truncada no N-terminal sem os 114 primeiros aminoácidos, incluindo o domínio SAM;
- SAMHD1 é recrutada para os locais onde houve DSBs, ativando a sinalização em resposta ao dano no DNA, porém, sem causar a redistribuição de SAMHD1 para o *foci* nuclear;
- O anticorpo monoclonal anti-SAMHD1 Origene *Technologies* possui reatividade com uma proteína de aproximadamente 50 kDa (p50), que continua sem identificação, podendo ser a proteína que é recrutada para o *foci* nuclear em situações de DSBs e colocaliza com FBXO25.

Referências Bibliográficas

7. Referências Bibliográficas

- 1- L. JIA; Y. SAN. *SCF E3 Ubiquitin ligases as anticancer targets*. Curr Cancer Drug Targets. 2011; v.11, n.3; p. 347–356.
- 2- MARAGNO, A.L., BAQUI, M. M. & GOMES, M. D. *FBXO25, na F-box homologue of atrogin-1, is not induced in atrophying muscle*. Biochim Biophys Acta. 2006; v.1760, p. 966-972.
- 3- HAGENS, O., MININA, E., SCHWEIGER, S., ROPERS, H. H. & KALSCHUEER, V. *Characterization of FBX25, encoding a novel brain-expressed F-box protein*. Biochim Biophys Acta. 2006; v.1760, p. 110-118.
- 4- CENCIARELLI, C., et al. *Identification of a family of a human F-box proteins*. Curr Biol. 1999; V.9, p. 1177-1179.
- 5- WINSTON, J. T., KOEPP, D. M., ZHU, C., ELLEDGE, S. J. & HARPER, J. W. *A family of mammalian F-box proteins*. Curr Biol. 1999 v.9, p. 1180-1182.
- 6- MANFIOLLI, A.O., et al. *FBXO25-associated nuclear domains: a novel subnuclear structure*. Mol Biol Cell. 2008; v.19, p. 1848-1861.
- 7- ZHU, H., et al. *Global analysis of protein activities using proteome chips*. Science. 2001; v. 293, p. 2101-2105.
- 8- PERSAUD, A., et al. *Comparison of substrate specificity of the ubiquitin ligases Nedd4 and Nedd4-2 using proteome arrays*. Mol Syst Biol. 2009; v. 5, p. 333.
- 9- MERBL, Y. & KIRSCHNER, M.W. *Large-scale detection of ubiquitination substrates using cell extracts and protein microarrays*. Proc Natl Acad Sci USA. 2009; v. 106, p. 2543-2548.
- 10- ANDREWS, P.S., et al. *Identification of substrates of SMURF1 ubiquitin ligase activity utilizing protein microarrays*. Assay Drug Dev Technol. 2010; v. 8, p. 471-487.
- 11- TEIXEIRA, FELIPE R.; MANFIOLLI, ADRIANA O.; SOARES, CLÁUDIA S.; BAQUI, MUNIRA M. A.; KOIDE, TIE; GOMES, MARCELO D. *The F-box Protein FBXO25 Promotes the Proteasome dependent Degradation of ELK-1 Protein*. Journal of Biological Chemistry. 2013; V. 288, p.28152–28162.
- 12- LAGUETTE N, SOBHIAN B, CASARTELLI N, et al. *SAMHD1 is the dendritic- and myeloid-cell-specific HIV-1 restriction factor counteracted by Vpx*. Nature. 2011;474:654-657.
- 13- LI, MIAOMIAO, et al. *Roles of SAMHD1 in antiviral defense, autoimmunity and cancer*. Rev Med Virol. 2017;e1931.
- 14- POWELL RD, HOLLAND PJ, HOLLIS T, AND PERRINO FW. *Aicardi-Goutieres Syndrome Gene and HIV-1 Restriction Factor SAMHD1 Is a dGTP-regulated Deoxynucleotide Triphosphohydrolase*. J. Biol. Chem 2011; e286: 43596–43600.
- 15- CHOI J, RYOO J, OH C, HWANG S, AHN K. *SAMHD1 specifically restricts retroviruses through its RNase activity*. Retrovirology. 2015; e12.
- 16- HANSEN EC, SEAMON KJ, CRAVENS SL, AND STIVERS JT. *GTP activator and dNTP substrates of HIV-1 restriction factor SAMHD1 generate a long-lived activated state*. Proc. Natl. Acad. Sci. 2014; e111: E1843–E1851.
- 17- AMIE SM, BAMBARA RA, AND KIM B. *GTP Is the Primary Activator of the Anti-HIV Restriction Factor SAMHD1*. J. Biol. Chem. 2013; e288: 25001–25006.

- 18-BRANDARIZ-NUÑEZ A, VALLE-CASUSO J, WHITE TE, LAGUETTE N, BENKIRANE M, BROJATSCH J, AND DIAZ-GRIFFERO F. 2012 Role of SAMHD1 nuclear localization in restriction of HIV-1 and SIVmac. *Retrovirology* 9: 49.
- 19-ZIMMERMAN MD, PROUDFOOT M, YAKUNIN A, AND MINOR W. *Structural Insight into the Mechanism of Substrate Specificity and Catalytic Activity of an HD-Domain Phosphohydrolase: The 5'-Deoxyribonucleotidase YfbR from Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* 2008; e378: 215–226.
- 20-ARAVIND L, AND KOONIN EV. 1998 *The HD domain defines a new superfamily of metal-dependent phosphohydrolases*. *Trends Biochem. Sci* 23: 469–472.
- 21-AMIE SM, BAMBARA RA, AND KIM B. *GTP Is the Primary Activator of the Anti-HIV Restriction Factor SAMHD1*. *J. Biol. Chem.* 2013; e288: 25001–25006.
- 22-LAHOUASSA, H. et al. *SAMHD1 restricts the replication of human immunodeficiency virus type 1 by depleting the intracellular pool of deoxynucleoside triphosphates*. *Nat. Immunol.* 2012; 13, 223–228.
- 23-GOLDSTONE DC, et al. *HIV-1 restriction factor SAMHD1 is a deoxynucleoside triphosphate triphosphohydrolase*. *Nature*. 2011; 480: 379–382.
- 24-PAULS, E. et al. *Nucleotide embargo by SAMHD1: a strategy to block retroviral infection*. *Antiviral Res.* 2013; 97, 180–182
- 25-MALUMBRES, M. AND BARBACID, M. *Cell cycle, CDKs and cancer: a changing paradigm*. *Nat. Rev.* 2009; Cancer 9, 153–166
- 26-RENTOFT, M et al. *Heterozygous colon cancer-associated mutations of SAMHD1 have functional significance*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2016; 113, 4723–4728.
- 27-PAULS, E. et al. *p21 regulates the HIV-1 restriction factor SAMHD1*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2014; 111, E1322–E1324
- 28-BALLANA, E. and ESTÉ, J. *SAMHD1: At the Crossroads of Cell Proliferation, Immune Responses, and Virus Restriction*. *Trends in Microbiology*. 2015; Vol. 23, No. 11.
- 29-AHN J, HAO C, YAN J, et al. *HIV/simian immunodeficiency virus (SIV) accessory virulence factor Vpx loads the host cell restriction factor SAMHD1 onto the E3 ubiquitin ligase complex CRL4DCAF1*. *J Biol Chem.* 2012; 287:12550-12558.
- 30-BERGER G, TURPIN J, CORDEIL S, et al. *Functional analysis of the relationship between Vpx and the restriction factor SAMHD1*. *J Biol Chem.* 2012; 287:41210-41217.
- 31-WEI W, GUO H, HAN X, et al. *A novel DCAF1-binding motif required for Vpx-mediated degradation of nuclear SAMHD1 and Vpr-induced G2 arrest*. *Cell Microbiol.* 2012; 14:1745-1756
- 32-RICE, G. I., et al. *Mutations involved in Aicardi-Goutières syndrome implicate SAMHD1 as regulator of the innate immune response*. *Nat. Genet.* 2009; 41, 829–832
- 33-AICARDI, J., AND GOUTIÈRES, F. *A progressive familial encephalopathy in infancy with calcifications of the basal ganglia and chronic cerebrospinal fluid lymphocytosis*. *Ann. Neurol.* 1984; 15, 49–54
- 34-GOUTIÈRES, F. *Aicardi-Goutières syndrome* *Brain Dev.* 2005; 27, 201–206
- 35-GOUTIÈRES, F., AICARDI, J., BARTH, P. G., AND LEBON, P. *Aicardi-Goutières syndrome: an update and results of interferon-alpha studies*. *Ann. Neurol.* 1998; 44, 900–907
- 36-CROW, Y. J. *Mutations in the gene encoding the 3'-5' DNA exonuclease TREX1 cause Aicardi-Goutières syndrome at the AGS1 locus*. *Nat. Genet.* 2006; 38, 917–920
- 37-CROW, Y. J., *Mutations in genes encoding ribonuclease H2 subunits cause Aicardi-Goutières syndrome and mimic congenital viral brain infection*. *Nat. Genet.* 2006; 38, 910–916

- 38- CROW, Y. J., and REHWINKEL, J. *Aicardi-Goutieres syndrome and related phenotypes: linking nucleic acid metabolism with autoimmunity*. Hum. Mol. Genet. 2009; 18, R130–136
- 39- FYE, J. M., OREBAUGH, C. D., COFFIN, S. R., HOLLIS, T., and PERRINO, F. W. *Dominant mutation of the TREX1 exonuclease gene in lupus and Aicardi-Goutieres syndrome*. J. Biol. Chem. 2011; 286, 32373–32382
- 40- HÖSS, M., ROBINS, P., NAVEN, T. J., PAPPIN, D. J., SGOUROS, J., AND LINDAHL, T. *A human DNA editing enzyme homologous to the Escherichia coli DnaQ/MutD protein*. EMBO J. 1999; 18, 3868–3875
- 41- LEHTINEN, D. A., HARVEY, S., MULCAHY, M. J., HOLLIS, T., and PERRINO, F. W. J. *The TREX1 Double-Stranded DNA Degradation Activity Is Defective in Dominant Mutations Associated With Autoimmune Disease* Biol. Chem. 2008; 283, 31649–31656
- 42- MAZUR, D. J., and PERRINO, F. W. *Identification and expression of the TREX1 and TREX2 cDNA sequences encoding mammalian 3'→5' exonucleases*. J. Biol. Chem. 1999; 274, 19655–19660
- 43- OREBAUGH, C. D., FYE, J. M., HARVEY, S., HOLLIS, T., and PERRINO, F. W. J. *The TREX1 exonuclease R114H mutation in Aicardi-Goutières syndrome and lupus reveals dimeric structure requirements for DNA degradation activity*. Biol. Chem. 2011; 286, 40246–40254
- 44- STETSON, D. B., KO, J. S., HEIDMANN, T., and MEDZHITOV, R. *Trex1 prevents cell-intrinsic initiation of autoimmunity*. Cell. 2008; 134, 587–598.
- 45- YANG, Y. G., LINDAHL, T., and BARNES, D. E. *Trex1 exonuclease degrades ssDNA to prevent chronic checkpoint activation and autoimmune disease*. Cell. 2007; 131, 873–886.
- 46- YAN, N., and LIEBERMAN, J. *Gaining a foothold: how HIV avoids innate immune recognition*. Curr. Opin. Immunol. 2011; 23, 21–28
- 47- YAN, N., Regalado-Magdos, A. D., Stiggelbout, B., Lee-Kirsch, M. A., and Lieberman, J. *The cytosolic exonuclease TREX1 inhibits the innate immune response to human immunodeficiency virus type 1*. Nat. Immunol. 2010; 11, 1005–1013
- 48- COFFIN, S. R., HOLLIS, T., and PERRINO, F. W. *Functional consequences of the RNase H2A subunit mutations that cause Aicardi-Goutieres syndrome*. J. Biol. Chem. 2011; 286, 16984–16991
- 49- PERRINO, F. W., HARVEY, S., SHABAN, N. M., and HOLLIS, T. J. *RNase H2 mutants that cause Aicardi-Goutieres syndrome are active nucleases*. Mol. Med. 2009; 87, 25–30
- 50- GENOVESIO, A. et al., *Automated genome-wide visual profiling of cellular proteins involved in HIV infection*. Biomol. Screen. 2011; 16, 945–958
- 51- LEE-KIRSCH, MA. *Nucleic acid metabolism and systemic autoimmunity revisited*. Arthritis Rheum 2010; 62:1208–1212.
- 52- FRANZOLIN, E. et al. *The deoxynucleotide triphosphohydrolase SAMHD1 is a major regulator of DNA precursor pools in mammalian cells*. Proc. Natl. Acad. Sci. 2014; 110, 14272–14277.
- 53- KOHNKEN, R., KODIGEPALLI, K.M., and WU, L. *Regulation of deoxynucleotide metabolism in cancer: novel mechanisms and therapeutic implications*. Mol. Cancer 2016; 14, 176.
- 54- KRETSCHMER, S. et al. *SAMHD1 prevents autoimmunity by maintaining genome stability*. Ann. Rheum. 2015; Dis. 74, e17.

- 55- CLIFFORD, R., LOUIS, T. et al. *SAMHD1 is mutated recurrently in chronic lymphocytic leukemia and is involved in response to DNA damage*. Blood. 2014; 123, 1021–1031.
- 56- DADDACHA, W. et al. *SAMHD1 Promotes DNA End Resection to Facilitate DNA Repair by Homologous Recombination*. Cell Reports. 2017; 20, 1921–1935.
- 57- LIMBO, O., CHAHWAN, C., YAMADA, Y., DE BRUIN, R.A., WITTENBERG, C., AND RUSSELL, P. *Ctp1 is a cell-cycle-regulated protein that functions with Mre11 complex to control double-strand break repair by homologous recombination*. Mol. Cell. 2007; 28, 134–146.
- 58- MAKHARASHVILI, N., et al. *Catalytic and noncatalytic roles of the CtIP endonuclease in double-strand break end resection*. Mol. Cell. 2014; 54, 1022–1033.
- 59- SARTORI, A.A., et al. *Human CtIP promotes DNA end resection*. Nature. 2007; 450, 509–514.
- 60- WANG, H., SHAO, Z., SHI, L.Z., HWANG, P.Y., TRUONG, L.N., BERNIS, M.W., CHEN, D.J., and WU, X. *CtIP protein dimerization is critical for its recruitment to chromosomal DNA double-stranded breaks*. J. Biol. Chem. 2012; 287, 21471–21480.
- 61- You, Z., Shi, et al. *CtIP links DNA double-strand break sensing to resection*. Mol. Cell. 2009; 36, 954–969.
- 62- ANAND, R., RANJHA, L., CANNAVO, E., AND CEJKA, P. *Phosphorylated CtIP functions as a Co-factor of the MRE11-RAD50-NBS1 endonuclease in DNA end resection*. Mol. Cell. 2016; 64, 940–950.
- 63- CANNAVO, E., AND CEJKA, P. *Sae2 promotes dsDNA endonuclease activity within Mre11-Rad50-Xrs2 to resect DNA breaks*. Nature. 2014; 514, 122–125.
- 64- GARCIA, V., PHELPS, S.E., GRAY, S., and NEALE, M.J. *Bidirectional resection of DNA double-strand breaks by Mre11 and Exo1*. Nature. 2011; 479, 241–244.
- 65- NICOLETTE, M.L., LEE, K., GUO, Z., RANI, M., CHOW, J.M., LEE, S.E., and PAULL, T.T. *Mre11-Rad50-Xrs2 and Sae2 promote 50 strand resection of DNA double-strand breaks*. Nat. Struct. Mol. Biol. 2010; 17, 1478–1485.
- 66- PAULL, T.T., and GELLERT, M. *The 30 to 50 exonuclease activity of Mre 11 facilitates repair of DNA double-strand breaks*. Mol. Cell. 1998; 1, 969–979.
- 67- STRACKER, T.H., and PETRINI, J.H. *The MRE11 complex: starting from the ends*. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 2011; 12, 90–103.
- 68- CEJKA, P., PLANK, J.L., BACHRATI, C.Z., HICKSON, I.D., and KOWALCZYKOWSKI, S.C. *Rmi1 stimulates decatenation of double Holliday junctions during dissolution by Sgs1-Top3*. Nat. Struct. Mol. Biol. 2010; 17, 1377–1382.
- 69- GRAVEL, S., CHAPMAN, J.R., MAGILL, C., and JACKSON, S.P. *DNA helicases Sgs1 and BLM promote DNA double-strand break resection*. Genes Dev. 2008; 22, 2767–2772.
- 70- MIMITOU, E.P., and SYMINGTON, L.S. *Sae2, Exo1 and Sgs1 collaborate in DNA double-strand break processing*. Nature. 2008; 455, 770–774.
- 71- NIMONKAR, A.V. et al. S.C. *BLM-DNA2-RPAMRN and EXO1-BLM-RPA-MRN constitute two DNA end resection machineries for human DNA break repair*. Genes Dev. 2011; 25, 350–362.
- 72- NIU, H., et al. *Mechanism of the ATP-dependent DNA end-resection machinery from Saccharomyces cerevisiae*. Nature. 2010; 467 108–111.
- 73- ZHU, C., et al. *Structural insight into dGTP-dependent activation of tetrameric SAMHD1 deoxynucleoside triphosphate triphosphohydrolase*. Nat. Commun. 2013; 4, 2722.

- 74- PRAKASH, R., ZHANG, Y., FENG, W., and JASIN, M. *Homologous recombination and human health: the roles of BRCA1, BRCA2, and associated proteins*. Cold Spring Harb. Perspect. Biol. 2015; 7, a016600.
- 75- ZHANG, H., et al. *ATRIP deacetylation by SIRT2 drives ATR checkpoint activation by promoting binding to RPA-ssDNA*. Cell Rep. 2016; 14, 1435–1447.
- 76- ZHENG, Q. et al., *Precise gene deletion and replacement using the CRISPR/Cas9 system in human cells*. Biotechniques. 2014 Sep 1;57(3):115-24
- 77- DE SILVA S, HOY H, HAKE TS, WONG HK, PORCU P, WU L.. *Promoter methylation regulates SAMHD1 gene expression in human CD4 T cells*. J. Biol. Chem. 2013; 288:9284 –9292
- 78- SMITH, A. L., FRIEDMAN, D.B., YU, H., CARNAHAN, R.H., REYNOLDS, A. B. *ReCLIP (Reversible Cross-Link Immuno-Precipitation): An Efficient Method for Interrogation of Labile Protein Complexes*. PLoS ONE. 2011; 6(1): e16206.
- 79- RHODES, K.J. , TRIMMER, J.S. *Antibody-based validation of CNS ion channel drug targets* J. Gen. Physiol. 2008; 131 pp. 407-413.
- 80- GATTO, B. *Monoclonal antibodies in cancer therapy*. Curr Med Chem Anti-Canc Agents 2004; 4, 411–4.
- 81- <https://www.ptglab.com/news/blog/how-do-i-know-if-the-antibody-will-cross-react/>
Acessado em: 22/05/2019
- 82- AALBERSE, R. C., AKKERDAAS, J. H., VAN REE, R. *Cross-reactivity of IgE antibodies to allergens*. Allergy. 2001; 56: 478–490
- 83- SALAZAR G, ZLATIC S, CRAIGE B, PEDEN AA, POHL J, et al. *Hermansky-Pudlak syndrome protein complexes associate with phosphatidylinositol 4-kinase type II alpha in neuronal and non-neuronal cells*. J Biol Chem. 2009; 284: 1790–1802.
- 84- HUMPHRIES JD, BYRON A, BASS MD, CRAIG SE, PINNEY JW, et al. *Proteomic Analysis of Integrin-Associated Complexes Identifies RCC2 as a Dual Regulator of Rac1 and Arf6*. Science Signaling. 2009; 2: ra51–ra51.
- 85- Thermo Scientific Crosslinking Technical Handbook. Disponível em: <http://tools.thermofisher.com/content/sfs/brochures/1602163-Crosslinking-Reagents-Handbook.pdf> Acessado em: 05/05/2019
- 86- MICHAUD, G. A. et al. *Analyzing antibody specificity with whole proteome microarrays*. Nat Biotechnol. 2003; 21, 1509–12.
- 87- Antibody Profiling on Invitrogen ProtoArray™ High-Density Protein Microarrays. Disponível em: www.invitrogen.com/protoarray
- 88- CREANEY, J., DICK, I. A., MUSK, W. OLSEN, N. & ROBINSON, B. W. S. *Immune response profiling of malignant pleural mesothelioma for diagnostic and prognostic biomarkers*. Biomarkers, 2016; 21:6, 551-561
- 89- TUREWICZ, MICHAEL et al. *Improving the default data analysis workflow for large autoimmune biomarker discovery studies with ProtoArrays*. Proteomics 2013; vol. 13,14, 2083-7.
- 90- MAY, CAROLINE et al. *Highly immunoreactive IgG antibodies directed against a set of twenty human proteins in the sera of patients with amyotrophic lateral sclerosis identified by protein array*. PloS one. 2014; vol. 9,2 e89596.
- 91- DI MALTA C, SICILIANO D, CALCAGNI A, et al. *Transcriptional activation of RagD GTPase controls mTORC1 and promotes cancer growth*. Science. 2017; 356(6343):1188–1192. doi:10.1126/science.aag2553
- 92- SMITH, T. F., Waterman MS. J. Mol. Biol. 1981; 147(1);195-7

- 93- YANG, Y., LEI, T., DU, S., et al. *Nuclear GSK3 β induces DNA double-strand break repair by phosphorylating 53BP1 in glioblastoma*. Int J Oncol. 2018;52(3):709–720.
- 94- DOBLE, B. W., WOODGETT, J. R. *GSK-3: Tricks of the trade for a multi-tasking kinase*. J Cell Sci. 2003;116:1175–1186.
- 95- HOEFLICH, K.P., LUO, J., RUBIE, E. A., TSAO, M. S., JIN, O., WOODGETT, J. R. Requirement for glycogen synthase kinase-3 β in cell survival and NF-kappaB activation. Nature. 2000;406:86–90.
- 96- ABRAHAM RT. *Checkpoint signalling: Focusing on 53BP1*. Nat Cell Biol. 2002;4:E277–E279
- 97- PETERMANN, E., ORTA, M.L., ISSAEVA, N., SCHULTZ N., HELLEDAY, T. *Hydroxyurea-stalled replication forks become progressively inactivated and require two different RAD51-mediated pathways for restart and repair*. Mol. Cell. 2010; 37:492–502.
- 98- HASHIMOTO, Y., RAY CHAUDHURI, A., LOPES, M., COSTANZO, V. *Rad51 protects nascent DNA from Mre11-dependent degradation and promotes continuous DNA synthesis*. Nat. Struct. Mol. Biol. 2010; 17:1305–1311
- 99- BHATTACHARYA, S., SRINIVASAN, K., ABDISALAAM, S., et al. *RAD51 interconnects between DNA replication, DNA repair and immunity*. Nucleic Acids Res. 2017;45(8):4590–4605.
- 100- BAZYKIN, G.A., KOCHETOV, A.V. *Alternative translation start sites are conserved in eukaryotic genomes*. Nucleic Acids Res. 2011, 39, pp. 567-577
- 101- KOZAK, M. *Regulation of translation via mRNA structure in prokaryotes and eukaryotes*. Gene. 2005; 361:13–37.
- 102- JACKSON, RJ. *Alternative mechanisms of initiating translation of mammalian mRNAs*. Biochem Soc Trans. 2005; 33:1231–1241.
- 103- BAIRD SD, TURCOTTE M, KORNELUK RG, HOLCIK M. *Searching for IRES*. RNA 2006; 12:1755–1785.
- 104- KOCHETOV, A.V. *Alternative translation start sites and hidden coding potential of eukaryotic mRNAs*. Bioessays: News Rev. Mol. Cell Dev. Biol., 2008; 30, pp. 683-691
- 105- CHENG, T.H., COHEN, S.N. *Human MDM2 isoforms translated differentially on constitutive versus p53-regulated transcripts have distinct functions in the p53/MDM2 and TSG101/MDM2 feedback control loops*. Mol. Cell Biol. 2007; 27, pp. 111-119
- 106- COURTOIS, S., et al. *DeltaN-p53, a natural isoform of p53 lacking the first transactivation domain, counteracts growth suppression by wild-type p53*. Oncogene. 2002; 22, pp. 6722-6728
- 107- ARTEAGA, M.F., ALVAREZ DE LA ROSA, D, ALVAREZ, J.A., CANESSA, C.M. *Multiple translational isoforms give functional specificity to serum- and glucocorticoid-induced kinase 1*. Mol. Biol. Cell. 2007; 18, pp. 2072-2080
- 108- GU, S., ANTON, A., SALIM, S., BLUMER, K.J., DESSAUER, C.W. HEXIMER, S.P. *Alternative translation initiation of human regulators of G-protein signaling-2 yields a set of functionally distinct proteins*. Mol. Pharmacol., 2008; 73, pp. 1-11
- 109- YUDT, M.R., CIDLOWSKI, J.A. *Molecular identification and characterization of a and b forms of the glucocorticoid receptor*. Mol. Endocrinol., 2001; 15, pp. 1093-1103

Anexos

Sequenciamento da célula HAP1 *knockout* para SAMHD1

(A) Representação esquemática do *locus* de SAMHD1 humana, mostrando o sítio alvo usado para geração da linhagem knockout, gerada a partir da edição do genoma mediado por CRISPR/Cas9. (B) Análise do DNA genómico das células HAP1, por PCR.

ANEXO 2:

Proteínas com reatividade cruzada com o anticorpo monoclonal anti-SAMHD1 Origene Technologies, identificadas com o Protoarray®.

Gene	Localização celular	Tamanho (kDa)	Nome completo do gene
ABCF3	Membrana	79	Cassete de ligação a ATP, sub-família F (GCN20), membro 3 (ABCF3)
ABL1	Mitocondria/Citoplasma/ Nuclear	122	v-abl Abelson murine leukemia viral oncogene homolog 1 (ABL1), transcript variant a;
AK2	Mitocondria	26,4	adenylate kinase 2 (AK2), transcript variant AK2A
ALG13	Retículo endoplasmático	126	asparagine-linked glycosylation 13 homolog (S. cerevisiae) (ALG13)
ARHGEF5	Nuclear /Citoplasma	126	Rho guanine nucleotide exchange factor (GEF) 5 (ARHGEF5)
ARL6	Membrana	21	ADP-ribosylation factor-like 6 (ARL6), transcript variant 1
ARMCX3	Nuclear /Mitocondria	42,5	armadillo repeat containing, X-linked 3 (ARMCX3), transcript variant 1
ATM	Nuclear	350	Serine-protein kinase ATM
BCL2L13	Nuclear	52	BCL2-like 13 (apoptosis facilitator) (BCL2L13)
BIRC5	Nuclear	16,3	baculoviral IAP repeat-containing 5 (survivin) (BIRC5), transcript variant 1
BLOC1S6	Membrana/Citoplasma	19,7	Biogenesis of lysosome-related organelles complex 1 subunit 6
BRSK2	Retículo/Citoesqueleto	89	BR serine/threonine kinase 2 (BRSK2)

C11orf54	Nuclear	35,11	Ester hydrolase C11orf54
C7orf53	Membrana	14,4	Coiled-coil domain-containing transmembrane protein C7orf53/ Leucine-rich single-pass membrane protein 1
CA2	Membrana	29,2	carbonic anhydrase II (CA2)
CAB39L	Citosol	39	Calcium-binding protein 39-like
CAMK2N1	Membrana	8,5	calcium/calmodulin-dependent protein kinase II inhibitor 1 (CAMK2N1)
CANT1	Golgi/Membrana/Retículo	44,8	calcium activated nucleotidase 1 (CANT1)
CCDC59	Nuclear	28,6	coiled-coil domain containing 59 (CCDC59)
CCL17	Secretado	10,5	C-C motif chemokine 17
CCL4	Secretado	10,2	C-C motif chemokine 4
CD151	Membrana	28,2	CD151 Antigen
CD99L2	Membrana plasmática		CD99 molecule-like 2 (CD99L2)
CDK7	Nuclear	39	cyclin-dependent kinase 7
CDKL3	Citoplasma	67	Cyclin-dependent kinase-like 3
CERCAM	Retículo endoplasmático	67,5	
CLK3	Nuclear	73	CDC-like kinase 3 (CLK3), transcript variant phclk3/152
CNNM3	Membrana	76	Metal transporter CNNM3

COG4	Golgi	89,6	Conserved oligomeric Golgi complex subunit 4
CXCL5	Secretado	11,9	
CYB5R1	Membrana	34	cytochrome b5 reductase 1 (CYB5R1)
CYBC1	Retículo endoplasmático	20,7	chromosome 17 open reading frame 62 (C17orf62)/ Cytochrome b-245 chaperone 1
DNAJB14	Nuclear	42,5	DnaJ homolog subfamily B member 14
DNAJC30	Citosol	25,9	DnaJ homolog subfamily C member 30
DNAJC7	Nuclear /Citoplasma	56	DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily C, member 7 (DNAJC7)
DUSP3	Nuclear	20,4	dual specificity phosphatase 3 (vaccinia virus phosphatase VH1-related) (DUSP3)
DYRK2	Nuclear	66	dual-specificity tyrosine-(Y)-phosphorylation regulated kinase 2 (DYRK2), transcript variant 1
EFTUD2	Nuclear	116	elongation factor Tu GTP binding domain containing 2 (EFTUD2)
EXO5	Nuclear /Citoplasma	41,8	Uncharacterized protein C1orf176 - Exonuclease V
FAF2	Retículo endoplasmático	52,6	FAS-associated factor 2
FAM122A		30,5	family with sequence similarity 122A (FAM122A)
FANK1	Nuclear /Citosol	38,4	fibronectin type III and ankyrin repeat domains 1 (FANK1)
FCER1A	Membrana		Fc fragment of IgE, high affinity I, receptor for; alpha polypeptide (FCER1A)
FGD6	Citoesqueleto	160	FYVE, RhoGEF and PH domain containing 6 (FGD6)

FKBP9	Retículo endoplasmático	63	FK506 binding protein 9, 63 kDa (FKBP9)
FKHL18	Nuclear	35	forkhead-like 18 (Drosophila) (FKHL18)
FOXRED1	Mitocondria	53,8	FAD-dependent oxidoreductase domain containing 1 (FOXRED1)
FOXS1	Nuclear	35,4	
GDE1	Membrana plasmática	37,7	Glycerophosphodiester phosphodiesterase 1
GH2	Região extracelular		growth hormone 2 (GH2), transcript variant 1
GJB4	Membrana	30,4	gap junction protein, beta 4 (GJB4)
GNB1L	Membrana	35,6	guanine nucleotide binding protein (G protein), beta polypeptide 1-like (GNB1L)
GNMT	Citoplasma	32,7	glycine N-methyltransferase (GNMT)
GNPAT	Peroxisomo	77	Dihydroxyacetone phosphate acyltransferase
GON7	Nuclear	10,8	chromosome 14 open reading frame 142 (C14orf142)
GPRC5C	Membrana	48,1	G-protein coupled receptor family C group 5 member C
GSK3B	Nuclear	46,7	Glycogen synthase kinase-3 beta
GSTM3	Citoplasmática	26,5	glutathione S-transferase M3 (brain) (GSTM3)
GSTP1	Nuclear /Mitocondria	23,8	glutathione S-transferase pi (GSTP1)
GTF2B	Nuclear	34,8	Transcription initiation factor IIB
GTPBP8	Mitocondria	32,1	GTP-binding protein 8

H1F0	Nuclear	20,8	H1 histone family, member 0 (H1F0)
HACD1	Retículo endoplasmático	32,8	Very-long-chain (3R)-3-hydroxyacyl-CoA dehydratase 1
HAUS8	Citoesqueleto/Citosol	44,8	HAUS augmin-like complex subunit 8
HDHC2		23	HD domain containing 2 (HDHC2)
HEYL	Nuclear	35,8	hairy/enhancer-of-split related with YRPW motif-like (HEYL)
HMG14	Nuclear	10,6	
HMGN2	Nuclear	9,3	Non-histone chromosomal protein HMG-17
HOMER3	Citoplasmática	39	homer homolog 3 (Drosophila) (HOMER3)
HSH2D	Nuclear	39	hematopoietic SH2 domain containing (HSH2D)
HSPA1L	Citosol/Nuclear	70	heat shock 70kDa protein 1-like (HSPA1L)
ICK	Nuclear/Citosol/Citoesqueleto	70	Serine/threonine-protein kinase ICK
KIAA1568	Membrana	151	Roundabout homolog 2
KLK7	Secretado	27,5	kallikrein-related peptidase 7 (KLK7), transcript variant 1
LCMT1	Citosol/Nuclear	38,3	Leucine carboxyl methyltransferase 1
LYSMD2		23,4	LysM, putative peptidoglycan-binding, domain containing 2 (LYSMD2)
MAPK10	Nuclear/Mitochondrial	52	mitogen-activated protein kinase 10 (MAPK10), transcript variant 1
MARK1	Citoplasmática	89	Serine/threonine-protein kinase MARK1

MMAB	Mitocondria	27,8	methylmalonic aciduria (cobalamin deficiency) cblB type (MMAB), nuclear gene encoding mitochondrial protein
MOXD1	Retículo endoplasmático	69,7	DBH-like monooxygenase protein 1
MRPL49	Mitocondria	19,1	39S ribosomal protein L49, mitochondrial
MTAP	Nuclear	31,2	methylthioadenosine phosphorylase (MTAP)
NAA16	Extracelular/Nuclear/Citosol	101	N-alpha-acetyltransferase 16, NatA auxiliary subunit
NARG1L	Nuclear/Citoplasma	101	NMDA receptor regulated 1-like (NARG1L), transcript variant 1
NIPA2	Endossomo/Membrana		non imprinted in Prader-Willi/Angelman syndrome 2 (NIPA2), transcript variant 1
NIT2	Citoplasma	30,6	nitrilase family, member 2 (NIT2)
NOLA1	Nucleo	22	nucleolar protein family A, member 1 (H/ACA small nucleolar RNPs) (NOLA1), transcript variant 1
NUMB	Membrana	70	numb homolog (Drosophila) (NUMB)
PAK 1	Membrana		Serine/threonine-protein kinase PAK 1
PAK2	Citoplasma/Membrana/Nucleo	58	p21 (CDKN1A)-activated kinase 2 (PAK2)
PARVG	Membrana/Citoesqueleto		parvin, gamma (PARVG)
PCGF3	Nuclear	28,1	polycomb group ring finger 3 (PCGF3)
PDGFRA	Membrana	122	platelet-derived growth factor receptor, alpha polypeptide (PDGFRA)
PDRG1	Citoplasma	15	p53 and DNA damage regulated 1 (PDRG1)

PDYN	Secretado	28,3	prodynorphin (PDYN)
PHTF2	Nuclear	88	putative homeodomain transcription factor 2 (PHTF2)
PIP4K2A	membrana/nucleo/citoplasma	46	phosphatidylinositol-5-phosphate 4-kinase, type II, alpha (PIP4K2A)
PITPNC1	Citoplasma	38,3	phosphatidylinositol transfer protein, cytoplasmic 1 (PITPNC1), transcript variant 2
PLCD1	Citosol	85	1-phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate phosphodiesterase delta-1
PLDN	Membrana/ Citoplasma	19,4	pallidin homolog (mouse) (PLDN)
PLK1	Nuclear	68,2	Serine/threonine-protein kinase PLK1
PLLP	Membrana	19,8	Plasmolipin
PLSCR1	Nuclear/Membrana	35	phospholipid scramblase 1 (PLSCR1)
PNKD	Nuclear/Mitochondrial	42,8	paroxysmal nonkinesigenic dyskinesia (PNKD), transcript variant 1
PNOC	Extracelular		prepronociceptin (PNOC)
PPAP2C	Membrana	32,7	phosphatidic acid phosphatase type 2C (PPAP2C), transcript variant 1
PPARG	Nuclear	57,6	Peroxisome proliferator-activated receptor gamma
PPIG	Nuclear	88	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase G
PPP1R14A	Citoplasma	16	protein phosphatase 1, regulatory (inhibitor) subunit 14A (PPP1R14A)
PRKD1	Golgi/Membrana/Citoplasma	101	Serine/threonine-protein kinase D1
RAB22A	Endossomo	21,8	RAB22A, member RAS oncogene family (RAB22A)

RAB24	Citosol	23,4	RAB24, member RAS oncogene family (RAB24)
RAB3B	Membrana plasmática	27	RAB3B, member RAS oncogene family (RAB3B)
RAD51	Nuclear	42,1	DNA repair protein RAD51 homolog 1
RASD2	Membrana	32,3	RASD family, member 2 (RASD2)
RBJ	Nuclear	30,8	rab and DnaJ domain containing (RBJ)
RCOR2	Nuclear	58	REST corepressor 2 (RCOR2)
RFX3	Nuclear	83	regulatory factor X, 3 (influences HLA class II expression) (RFX3), transcript variant 2
RHOA	Membrana /Citoplasma	21,4	ras homolog gene family, member A (RHOA)
RLN1	Extracelular/ Secretado	18,4	relaxin 1 (RLN1)
RNF111	Nuclear	108	E3 ubiquitin-protein ligase Arkadia
ROS1	Membrana	261	v-ros UR2 sarcoma virus oncogene homolog 1 (avian) (ROS1)
RPL26L1	Citosol	17	ribosomal protein L26-like 1 (RPL26L1)
RRAGD	Citplasma /Nuclear	45,6	Ras-related GTP binding D (RRAGD)
SAR1B	Retículo/Golgi	22,4	SAR1 gene homolog B (<i>S. cerevisiae</i>) (SAR1B), transcript variant 2
SCAMP1	Endossomo/Golgi	34,9	secretory carrier membrane protein 1 (SCAMP1)
SECISBP2	Nuclear/Mitocondria	95	Selenocysteine insertion sequence-binding protein 2
SEMA4G	Membrana	94,1	sema domain, immunoglobulin domain (Ig), transmembrane domain (TM) and short

			cytoplasmic domain, (semaphorin) 4G (SEMA4G)
SERPIND1	Retículo	57	serpin peptidase inhibitor, clade D (heparin cofactor), member 1 (SERPIND1)
SERPINE2	Extracelular/Secretado	42,8	serpin peptidase inhibitor, clade E (nexin, plasminogen activator inhibitor type 1), member 2 (SERPINE2)
SFXN2	Mitocondria	36,2	sideroflexin 2 (SFXN2)
SLC22A23	Membrana	44,7	Solute carrier family 22 member 23
SLC39A8	Membrana	46,7	Putative sodium-coupled neutral amino acid transporter 8
SNN			stannin (SNN)
SNX4	Endossomo	51,9	sorting nexin 4 (SNX4)
SP2	Nuclear	64,9	Sp2 transcription factor (SP2)
SPANXB1	Nuclear	11,8	SPANX family, member B1 (SPANXB1)
SPN	Nuclear	40,3	sialophorin (leukosialin, CD43) (SPN), transcript variant 2
SPON2	Extracelular/Secretado	40,8	SPONDIN-2
SSPN	Membrana	26,6	sarcospan (Kras oncogene-associated gene) (SSPN)
SUGT1L1			SGT1, suppressor of G2 allele of SKP1 like 1 (<i>S. cerevisiae</i>) (SUGT1L1)
SUSD3	Membrana	27	sushi domain containing 3 (SUSD3)

SYDE1	Citoplasmatica	79,7	Rho GTPase-activating protein SYDE1
Synembryn-A	Membrana	59,7	Synembryn-A
TBX22	Nuclear	57,9	T-box 22 (TBX22)
TCTEX1D2	Citoesqueleto	16,2	Tctex1 domain-containing protein 2
TEDC2		46,4	Tubulin epsilon and delta complex protein 2
TIMD4	Membrana	41,5	T-cell immunoglobulin and mucin domain-containing protein 4
TK1	Citosol/Mitocondria	25,4	Thymidine kinase, cytosolic
TMEM192	Lisossomo/Endossomo	30,9	Transmembrane protein 192
TMEM40	MEMBRANA		Transmembrane protein 40
TRIB2	Citoesqueleto/Citoplasma	38,8	tribbles homolog 2 (Drosophila) (TRIB2)
TRIM47	Nuclear	69,5	tripartite motif-containing 47 (TRIM47)
TRIM65	Nuclear/Citosólica	57	tripartite motif-containing 65 (TRIM65)
TSR2	Nuclear	20,8	TSR2, 20S rRNA accumulation, homolog (S. cerevisiae) (TSR2)
UBD	Nuclear/Citoplasmática	18,4	ubiquitin D (UBD)
UBE1C	Citosol/Nuclear	51,8	ubiquitin-activating enzyme E1C (UBA3 homolog, yeast) (UBE1C), transcript variant 3
UNKL	Nuclear	73,8	unkempt homolog (Drosophila)-like (UNKL)

UTS2B	Extracelular	13,7	Urotensin-2B
VDAC1	Membrana	30,1	voltage-dependent anion channel 1 (VDAC1)
VEGFD	Secretado	40,4	Vascular endothelial growth factor D
WIF1	Região extracelular	41,5	WNT inhibitory factor 1 (WIF1)
Wnt-3	extracelular ou secretado		Proto-oncogene protein Wnt-3
ZBED1	Nuclear	78,1	Zinc finger BED domain-containing protein 1