UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS (BIOQUÍMICA)

RENAN CROCCI DE SOUZA

**Investigação de parceiros moleculares de Cdc42 em
linhagens de células humanas submetidas a estresse
genotóxico**

Versão Corrigida da Dissertação conforme Resolução CoPGr 5890

O original se encontra disponível na Secretaria de Pós-Graduação do IQ-USP

São Paulo

Data do depósito na SGP 22/02/2016

RENAN CROCCI DE SOUZA

**Investigação de parceiros moleculares de Cdc42 em
linhagens de células humanas submetidas a
estresse genotóxico**

*Dissertação apresentada ao Instituto de
Química da Universidade de São Paulo para
obtenção do Título de Mestre em
Ciências (Bioquímica)*

Orientador: Prof. Dr. Fábio Luis Forti

São Paulo

2016

À minha família.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Fábio Luís Forti, pela orientação e pela paciência.

Ao meu pai Amilton, à minha mãe Eliana, aos meus irmãos Allan e Nátali pelo amor e pelo suporte durante todo esse tempo.

À minha namorada Thaís pelo amor, companheirismo e suporte durante todos esses anos.

Ao Dr. Leo Kei Iwai e ao doutorando Eduardo Shigueo Kitano por todos ensinamentos e por todo auxílio dado com o espectrômetro de massas e as análises.

À Profa. Dra. Solange Maria de Toledo Serrano e ao técnico Ismael Feitosa Lima por nos cederem a utilização do espectrômetro e diversos reagentes.

À profa. Dra. Bianca Silvana Zingales, ao técnico Marcelo Nunes e à Pós Doutoranda Dra. Solange Lessa Nunes, por nos cederem a utilização do sonicador e diversos reagentes.

À todos os integrantes do laboratório LSSB e também aos que passaram por ele (Dra. Lilian, Dra. Juliana, Msc. Thompson, Alexsandro, Gisele, Yuli e Felipe) pelos auxílios nos experimentos, discussões, críticas e risadas.

À profa. Dra. Daniela Sanchez Basseres e seus alunos do laboratório LBMC, pela ajuda, empréstimos de materiais e equipamentos.

À Dra. Alessandra Eva (G.Gaslini Institute) pelo envio dos plasmídeos com as mutações de Cdc42.

Às técnicas Bere, Juliana e Vivi que contribuíram muito para o desenvolvimento da tese.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo suporte financeiro.

*“The joy of life comes from our encounters
with new experiences, and hence there is no
greater joy than to have an endlessly
changing horizon, for each day to have a new
and different sun.”*

Christopher McCandless

RESUMO

Souza, R. C.. **Investigação de parceiros moleculares de Cdc42 em linhagens de células humanas submetidas a estresse genotóxico**. 2016. 90p. Dissertação de mestrado - Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Bioquímica). Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

A proteína Cdc42 (Cell Division Cycle 42) é um membro da família das Rho GTPases, sinalizadores intracelulares conhecidos pelo seu papel na regulação do citoesqueleto. Essa proteína é capaz de ciclar entre um estado ativo (ligado à GTP) e um estado inativo (ligado à GDP) e essa ativação é modulada por diversas proteínas, conhecidas como GEFs (*guanine nucleotide-exchange factors*), GAPs (*GTPase-activating proteins*) e GDIs (*guanine nucleotide-dissociation inhibitors*). Trabalhos recentes têm demonstrado um papel de Cdc42 na apoptose e na senescência, respostas relacionadas e comumente desencadeadas por estresse genotóxico. Neste contexto este trabalho procurou identificar interações de Cdc42 com outras proteínas, que podem ou não estar envolvidas nos mecanismos de resposta ao dano do DNA. Para isso foram utilizadas as linhagens celulares HeLa e MRC-5 submetidas a tratamento com radiação ultravioleta tipo C, a fim de provocar danos no DNA. Foram realizados dois diferentes tratamentos em cada uma das linhagens com diferentes tempos de incubação pós radiação UV, visando a busca de proteínas envolvidas em uma resposta rápida ou tardia ao dano causado. Os lisados celulares desses tratamentos foram submetidos ao pull-down com proteínas recombinantes GST, GST-Cdc42WT (Selvagem) e GST-Cdc42V12 (Mutação constitutivamente ativa). As proteínas purificadas foram digeridas e submetidas à análise por espectrometria de massa e os dados obtidos foram utilizados para a construção de redes de interação proteica. Dentre as proteínas identificadas as que despertaram maior atenção foram: Proibitina-2 (PHB2) encontrada nas amostras incubadas por 48 horas pós irradiação e Cullina-4A (CUL4A) e P53, encontradas em amostra incubada por 5 minutos pós radiação. Essas proteínas possuem papéis em apoptose e reparo de DNA e foram observadas em posições muito próximas de Cdc42 nas redes de interação, fazendo delas interessantes alvos para futuras validações de interação proteica por análises experimentais distintas.

Palavras-chave: Cdc42, Resposta ao dano no DNA (DDR), Radiação ultravioleta tipo C, Proteômica, Interação proteína-proteína.

ABSTRACT

Souza, R. C.. **Investigation of Cdc42 molecular partners in human cell lines subjected to genotoxic stress.** 2016. 90p. Masters Thesis- Graduate Program in Biochemistry. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

The Cdc42 protein (Cell Division Cycle 42) is a member of the Rho family of GTPases, intracellular signalling molecules well known for their role in the cytoskeleton regulation. This protein cycles between an active state (GTP-bound) and an inactive state (GDP-bound) and this regulation is modulated by proteins known as GEFs, GAPs and GDIs. Recent studies demonstrated roles for Cdc42 in apoptosis and senescence, cellular responses commonly triggered by genotoxic stress. This work sought to identify Cdc42 interactions with other proteins that possibly involved in response to DNA damage mechanisms. To reach this aims we used HeLa and MRC-5 cell lines submitted to treatments with ultraviolet C radiation to induce DNA damage. Two experimental conditions were used in each cell line with different times and doses post UV irradiation in order to search for proteins involved in either rapid or delayed response to the installed DNA damage. Cell lysates obtained from these treatments were subjected to pull-down experiments using recombinant proteins GST, GST-Cdc42-WT (Wild type) and GST-Cdc42-V12 (constitutively active mutant). Purified proteins were digested by trypsin, analyzed by mass spectrometry and the obtained data were used for the construction of protein-protein interaction (PPI) networks. Among the identified proteins those that seem more relevant to the aims of this project were: Prohibitin-2 (PHB2), found in samples incubated 48 hours post irradiation; Cullin-4A (CUL4A) and P53, found in samples incubated 5 minutes after radiation. These proteins have roles in apoptosis and DNA repair and were observed in close proximity to Cdc42 in PPI networks, making them interesting targets for future validation by different experimental approaches.

Keywords: Cdc42, DNA damage response, ultraviolet C radiation, proteomics, protein-protein interactions.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	10
1.1 A família das Rho GTPases.....	10
1.2 Cell Division Cycle 42 (Cdc42).....	14
1.3 Danos causados por luz ultravioleta e respostas ao dano no DNA	20
2. OBJETIVOS	27
2.1 Objetivo geral	27
2.2 Objetivos específicos	27
3. MATERIAIS E MÉTODOS	28
3.1 Linhagens Celulares	28
3.2 Preparação de Bactérias Competentes e Transformação Bacteriana.....	28
3.3 Desenho de Primers	30
3.4 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) e Eletroforese em gel de agarose.....	30
3.5 Clonagem e Sequenciamento	31
3.6 Transfecção.....	33
3.7 Expressão de Proteínas de Fusão em Bactéria e Purificação	34
3.8 Eletroforese em Gel de Poliacrilamida (SDS-PAGE), Quantificação dos Beads e Western Blotting	35
3.9 Tratamento com UVC, Obtenção de Lisados e Quantificação.....	36
3.10 Pull-down de Proteínas.....	37
3.11 Digestão Tripsínica em Solução e Dessalinização em Sep-Pak Light	38
3.12 Identificação e Análise em Espectrometria de Massa	39
3.13 Construção e Análise de Redes de Interação Proteína-Proteína.....	41
4. RESULTADOS.....	43
4.1 PCR, Clonagem e Sequenciamento dos Plasmídeos	43
4.2 Geração de Clones	46
4.3 Investigação de Novos Parceiros de Cdc42 e Identificação por Espectrometria de Massa	50

4.4	Redes de Interação Proteína-Proteína	66
5.	DISCUSSÃO	79
6.	CONCLUSÃO	84
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	85
ANEXO 1		90
ANEXO 2		91
ANEXO 3		92
ANEXO 4		105

1. INTRODUÇÃO

1.1 A família das Rho GTPases

A família das Rho GTPases nos humanos é composta por 20 moléculas sinalizadoras intracelulares, que foram inicialmente documentadas pelo seu papel na regulação do citoesqueleto (Heasman and Ridley, 2008). Baseado na sequência primária de aminoácidos essas proteínas podem ser divididas em cinco diferentes subfamílias: *Rho-like*, *Rac-like*, *Cdc42-like*, *Rnd*, e *RhoBTB* (Burridge and Wennerberg, 2004). As mais conhecidas, estudadas e mais conservadas entre diversos organismos Rho GTPases são RhoA, pertencente à subfamília *Rho-like*, Rac1, pertencente à subfamília *Rac-like*, e Cdc42, pertencente à subfamília *Cdc42-like* (Figura 1) (Heasman and Ridley, 2008).

Figura 1 – Dendrograma representando a família das Rho GTPases. As cinco subfamílias estão destacadas por círculos. (Burridge and Wennerberg, 2004).

Essas três proteínas ciclam entre um estado ativo (ligado à GTP) e um estado inativo (ligado à GDP) e essa ciclagem é controlada por três diferentes classes de proteínas: *guanine nucleotide-exchange factors* (GEFs), *GTPase-activating proteins* (GAPs) e *guanine nucleotide-dissociation inhibitors* (GDIs) (Figura 2) (Heasman and Ridley, 2008).

A atividade de GEF, que consiste na troca de GDP por GTP resultando na ativação das Rho GTPases, é exercida principalmente por proteínas da família Dbl, que é constituída de, aproximadamente, 60 genes no genoma dos mamíferos (Schmidt and Hall, 2002). Quanto ao número GAPs, responsáveis por intensificar a atividade GTPásica intrínseca das Rho GTPases e causar a sua inativação, foram identificados por volta de 80 genes contendo um domínio de Rho GAP conhecido (Moon and Zheng, 2003). Apesar dessa grande quantidade de GAPs, GEFs e de Rho GTPases são conhecidos apenas três genes que codificam para RhoGDIs em mamíferos (DerMardirossian and Bokoch, 2005). RhoGDIs são responsáveis por modular a expressão, a localização na membrana e o estado de ativação das Rho GTPases (Garcia-Mata et al., 2011).

Figura 2 – Representação esquemática da regulação da atividade das Rho GTPases. A regulação da atividades dessas GTPases se dá por meio de três principais classes de proteínas: GEFs (responsáveis pela ativação das Rho GTPases através da troca de GDP por GTP), GAPs (responsáveis pela inativação das Rho GTPases pela hidrólise de GTP) e GDIs (responsáveis pela inibição da ativação das Rho GTPases, através do seu sequestro). Também são representadas as principais mutações utilizadas para o estudo dessas GTPases, a mutação dominante negativa (DN) que sequestras as GEFs, impedindo a ativação das outras moléculas, e a mutação constitutivamente ativa (CA) que é incapaz de hidrolisar GTP (Heasman and Ridley, 2008).

Uma importante região para as interações de Rho GTPases está localizada na porção C-terminal e também é chamada de região polibásica C-terminal (PBR) composta por diversos resíduos de lisinas ou argininas. Essa região é responsável pelo controle de diversas funções como a associação com membranas, a interação com proteínas específicas e a localização das Rho GTPases em compartimentos subcelulares (Williams, 2003).

As GTPases da família Rho vêm sendo bastante estudadas nos últimos anos e constatou-se o envolvimento dessas proteínas em diferentes processos celulares como a migração, o desenvolvimento neuronal, a morfogênese, a adesão e divisão celular, a dinâmica de microtúbulos, o transporte de vesículas, a expressão gênica e a endocitose (Etienne-Manneville and Hall, 2002; Heasman and Ridley, 2008; Jaffe and Hall, 2005).

Os componentes da subfamília Rho-like são muito similares em sequência e quando superexpressos no estado ativo eles contribuem para a capacidade de contração celular e a formação de fibras de estresse e adesões focais (Burridge and Wennerberg, 2004). Trabalhos recentes mostram um possível envolvimento de proteínas da subfamília Rho-like com a resposta ao dano no DNA. Foi demonstrado que a radiação ionizante leva à ativação da fração nuclear de Rho por meio de NET1 e que RhoA pode estar atuando em alguma resposta relacionada ao dano no DNA (Dubash et al., 2011). Existem ainda algumas evidências mostrando que a atividade de RhoB é necessária para a indução de morte celular causada por dano no DNA e que essa resposta envolveria a fosforilação de c-Jun N-terminal kinases (JNKs) e a indução da proteína pro-apoptótica Bim (Srougi and Burridge, 2011). Trabalhos recentes em nosso grupo de pesquisa descreveram o envolvimento das GTPases RhoA e Rac1 em respostas fenotípicas desencadeadas por danos no DNA, tanto gerados por radiação- γ quanto por ultravioleta (Espinha et al., 2016; Osaki et al., 2016; Espinha et al., 2015)

Quanto aos componentes de *Rac-like*, alguns trabalhos mostram o envolvimento de proteínas dessa subfamília na formação de lamelipódios e de *ruffles* de membrana, no crescimento e direcionamento de axônios, na adesão e diferenciação celular, na fagocitose e na morte de bactérias pela ativação da NADPH oxidase, que leva a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) (Burridge and Wennerberg, 2004; Heasman and Ridley, 2008)

Alguns trabalhos mostram uma sobreposição de função entre algumas GTPases da família Rho (Liang et al., 2006; Teramoto et al., 1996) e ativação de diferentes GTPases por uma mesma proteína GEF (Abe et al., 2000). Essa sobreposição de funções estaria relacionada com a similaridade de sequência entre as diferentes

GTPases, similaridade também presente na região PBR de algumas dessas proteínas (Williams, 2003).

Outra importante característica das GTPases da família Rho é a capacidade de comunicação cruzada entre proteínas de diferentes subfamílias através da diminuição da ativação de outra GTPase pelo estímulo de GAPs ou aumento da ativação pelo estímulo de GEFs (Burridge and Wennerberg, 2004). Outra forma de comunicação cruzada entre Rho GTPases descoberta recentemente envolve a participação de RhoGDIs. Foi demonstrado que GTPases não associadas com membranas ou com RhoGDIs ficam susceptíveis à degradação, dessa forma o aumento da expressão de uma Rho GTPase pode levar à degradação de outras proteínas da mesma família pela competição por RhoGDIs (Boulter et al., 2010).

Outra forma de comunicação cruzada envolve a competição por parceiros de interação. Foi demonstrado que Cdc42 atua como um inibidor competitivo de Rac1 e Rac2 no estímulo à formação de ROS pela enzima NADPH oxidase (Diebold et al., 2004).

1.2 Cell Division Cycle 42 (Cdc42)

O gene Cdc42 codifica para uma GTPase de 25kDa. Membro da família das Rho GTPases, Cdc42 foi inicialmente descoberto em *S. cerevisiae* como tendo envolvimento com a arquitetura do citoesqueleto de actina (Johnson and Pringle, 1990). O gene homólogo em humanos é altamente conservado, sugerindo que essa GTPase pode desempenhar importantes papéis na biologia de células de mamíferos (Melendez et al., 2011). A importância de Cdc42 fica evidente quando se estuda camundongos nocaute para esse gene. O nocaute desse gene é letal e causa a morte do embrião antes do dia 7,5 (Chen et al., 2000).

Alguns trabalhos de revisão já listaram diversas funções importantes moduladas por Cdc42 como a regulação da formação de filopódio, a extensão de neuritos, o crescimento de axônios, a mielinização de axônios, a migração e quimiotaxia e a regulação da polaridade e determinação da diferenciação celular (Figura 3) (Heasman and Ridley, 2008; Melendez et al., 2011).

Figura 3 – Exemplos de funções celulares com o envolvimento de Cdc42 e principais tipos de parceiros de interação (Cerione, 2004).

É descrito na literatura que Cdc42 pode ser ativada por diversos tipos de estímulos celulares e por diferentes proteínas, tais como citocinas, integrinas, Receptores acoplados à proteína G, Receptores tirosina quinase, dentre outros. São descritos mais de 20 efetores ativados por Cdc42 para exercer suas funções. Dentre

efetores estão incluídas diversas proteínas, sendo algumas já identificadas, como proteínas andaimes tais como Par6 e WASP, algumas proteínas quinases como PAKs e MRCKs, proteínas associadas à actina, fosfolipases (Figura 4) (Cerione, 2004; Cotteret and Chernoff, 2002). Com relação à participação de Cdc42 em importantes vias de sinalização foi descrito *crosstalk* com a via de JAK–STAT, e envolvimento na ativação da via de ERK, JNK, p38 MAP quinase e transcrição de NF- κ B (Lamarche et al., 1996; Coso et al. 1995; Minden et al. 1995; Perona et al. 1997)

Figura 4 – Parceiros de interação de Cdc42. GEFs, GDIs, GAPs e efetores estão representados em amarelo, cinza, verde e azul, respectivamente. Proteínas envolvidas em transformação celular estão marcadas em vermelho. (Arias-Romero and Chernoff, 2013).

Outros trabalhos vêm relatando um importante papel de Cdc42 no tráfico de vesículas (Cerione, 2004; Harris and Tepass, 2010). Uma interação bastante estudada de Cdc42 envolve a regulação da actina por meio do complexo WASp–

Arp2/3 que é capaz de afetar o transporte vesicular (Harris and Tepass, 2010). Foi mostrado também que Cdc42 regula positivamente a pinocitose de proteínas ancoradas por glicosil-fosfatidilinositol (Mayor and Pagano, 2007). Foi desvendado ainda que Cdc42 possui um importante papel na manutenção da polarização celular através da modulação do tráfico polarizada de vesículas a partir do complexo de Golgi (Rojas et al., 2001), orientação do citoesqueleto na divisão celular e manutenção das junções celulares (Qadir et al., 2015). A perda de polarização e adesão celular é comumente observada em tumores, sendo fundamental nas fases iniciais do câncer (Wodarz and Nathke, 2007).

Outra interessante função dessa proteína está relacionada ao splicing. Cdc42 estimula o splicing de RNAs pré-mensageiros e esse efeito parece estar relacionado com a atuação do complexo de ligação à cap (CBC) e da proteína kinase S6, essa última mediando o sinal para CBC (Wilson et al., 2000).

Foi demonstrado que a proliferação celular regulada por Cdc42 requer a fosforilação de IQGAP1 e a ligação desta proteína com Cdc42. Sendo IQGAP1 um parceiro de interação de mTOR, dessa forma Cdc42 pode vincular o crescimento e a divisão celular à via Cdc42-IQGAP1-mTOR (Wang et al., 2009).

Muitos trabalhos mostram também um possível papel de Cdc42 como um oncogene e como possuindo papel na metástase (Fidyk et al., 2006; Stengel and Zheng, 2011; Tu et al., 2002). A superexpressão de Cdc42 foi detectada em diferentes tipos de cânceres humanos como câncer pulmonar de células não-pequenas, colo-retal, adenocarcinoma, melanoma, câncer de mama e dos testículos (Chen et al., 2012; Stengel and Zheng, 2011; Qadir et al., 2015), no entanto nenhuma mutação capaz de tornar Cdc42 constitutivamente ativa foi detectada (Rihet et al., 2001). Foi mostrado que é necessário ocorrer a ciclagem entre os

estados ativo e inativo de Cdc42 para que ocorra a proliferação celular (Fidyk et al., 2006). Além disso, a localização de Cdc42 também é importante para a sua atividade de sinalização e indução da transformação celular (Johnson et al., 2012). Trabalhos recentes observaram que Cdc42 e Rac1 são reguladores vasculares envolvidos na angiogênese tumoral e que esse papel pode ser feito através da redução da estabilidade e ubiquitinação de P53, o que promoveria o aumento da expressão de VEGF (Ma et al., 2013).

Alguns trabalhos mostram ainda um possível envolvimento de Cdc42 com o ciclo celular e progressão das fases G1-S e mitose (Gjoerup et al., 1998; Yasuda et al., 2006)

Apesar da relação de Cdc42 com a transformação maligna de células, alguns autores apontam uma função contrária de Cdc42. Alguns trabalhos mostraram que Cdc42 ativada desencadeia diferentes vias apoptóticas em células relacionadas com o sistema imune, dentre elas vias dependente ou independente de FAS (Na et al., 1999) e mediadas por estimulação de c-Jun amino terminal quinase (JNK) (Chuang et al., 1997). Foi verificado também que Cdc42 pode participar da sinalização de apoptose influenciada por PTEN em células de epitélio coloretal (Deevi et al., 2011).

A participação de Cdc42 foi observada em diversas vias de sinalização que envolvem importantes proteínas conhecidas como supressores tumorais como P53 (Gadea et al., 2002; Thomas et al., 2000), PTEN (Deevi et al., 2011; Li et al., 2005) e APC (Sudhakaran et al., 2011) e outras com funções oncogênicas como EGFR (Wu et al., 2003) e PAK (Tang et al., 1999). Tendo em vista que Cdc42 interage com proteínas que possuem funções contrárias, uma regulação precisa para que Cdc42 exerça seu papel na manutenção da homeostase celular é necessária, dessa forma dependendo do tratamento e do contexto as alterações nas quantidades de Cdc42

podem produzir resultados bem distintos, como os observados nos trabalhos já destacados.

Alguns trabalhos mostram que Cdc42 pode estar relacionado com o envelhecimento do organismo (Kerber et al., 2009; Wang et al., 2007), de células-tronco (Florian et al., 2012) e que esta proteína se encontra ativada em células senescentes, contribuindo para as mudanças morfológicas encontradas (Cho et al., 2004). Em camundongos, foi demonstrado que níveis elevados Cdc42 ativada devido à deleção de Cdc42GAP promove a senescência prematura em diversos tecidos e esse efeito é dependente de P53 (Wang et al., 2007). Ito e colaboradores observaram que Cdc42 é capaz de ativar NF- κ B por uma via não canônica e aumentar a expressão de genes pró-inflamatórios em células endoteliais senescentes (Ito et al., 2014). Por fim foi observado que a supressão da atividade de Cdc42 em células-tronco hematopoiéticas senescentes reverteu diversos fenômenos severos associados ao envelhecimento, dentre eles a despolarização e modificações epigenéticas (Florian et al., 2012).

Uma poderosa teoria defende que danos no DNA é a causa crucial do envelhecimento (Freitas and de Magalhaes, 2011), dessa forma proteínas envolvidas com o reparo a danos no DNA podem estar diretamente envolvidas com envelhecimento. Seo e colaboradores observaram que Cdc42 é ativado em células COS-1 tratadas com radiação UVC e foi observado também que Cdc42 promove a ativação de p38 induzida por UV (Seo et al., 2004)

Analisando a porção C-terminal de Cdc42 foi identificado uma possível sequência sinal de localização nuclear (NLS) (Williams, 2003) e, recentemente, foi descoberta a translocação de Cdc42 para a membrana nuclear após o estresse de células fotorreceptoras por exposição excessiva à luz (Heynen et al., 2011).

Esses dados sugerem que Cdc42 pode ter um papel na resposta ao dano no DNA, seja através de uma possível interação com componentes da via de reparo, com proteínas envolvidas com a senescência ou com parceiros pró ou anti-apoptóticos.

1.3 Danos causados por luz ultravioleta e respostas ao dano no DNA

Frequentemente o DNA está sujeito ao ataque de agentes oxidantes, alquilantes, luz ultravioleta, outras formas de radiação eletromagnética e até mesmo da água, que pode causar danos hidrolíticos às bases do DNA. Essas bases danificadas interferem com o pareamento entre bases, podem bloquear a replicação e a transcrição e ainda dar origem a mutações que podem ameaçar a viabilidade da célula e do organismo (Jackson and Bartek, 2009; Fromme and Verdine, 2004; Lindahl, 1993)

Para combater ameaças impostas pelos danos causados ao DNA, as células desenvolveram mecanismos, denominados coletivamente de resposta ao dano no DNA (DDR), para detectar lesões de DNA, sinalizar a sua presença e promover seu reparo (Figura 5) (Harper and Elledge, 2007; Rouse and Jackson, 2002). Organismos eucariotos possuem diversas vias e mecanismos de reparo capazes de atuar no complexo contexto da cromatina e proteger as informações genéticas das células, garantindo a viabilidade das células-filhas e a sobrevivência do organismo (Palomera-Sanchez and Zurita, 2011). As principais vias de reparo conhecidas e estudadas podem ser observadas na Figura 6. Se a maquinaria de reparo não for capaz de remover o dano, a sinalização DDR pode provocar a morte celular por apoptose ou a senescência celular, ambas respostas impedindo uma possível transformação maligna da célula (Campisi and d'Adda di Fagagna, 2007; Halazonetis et al., 2008).

Figura 5 – Representação esquemática de resposta ao Dano no DNA. Lesões no DNA são detectadas por diversas proteínas sensores que iniciam vias de sinalização diversas e essas podem levar à diferentes respostas celulares. (Jackson and Bartek, 2009)

Figura 6 – Representação esquemática das diversas vias de reparo do DNA e principais proteínas envolvidas. Figura modificada de Lord and Ashworth, 2012.

Os principais componentes da sinalização da Resposta ao dano no DNA nas células de mamíferos são as proteínas quinases ATM e ATR, que são recrutadas e ativadas por quebras de dupla fita (DSBs) e pela proteína RPA ligada à DNA simples-fita (Cimprich and Cortez, 2008; Bartek and Lukas, 2007; Shiloh, 2003). Os principais alvos estudados de ATM e ATR são as proteínas quinases CHK1 e CHK2, que juntamente com ATM e ATR reduzem as atividades de CDKs, por algumas vias envolvendo a ativação de P53, o que provoca a desaceleração ou a parada do ciclo celular nos checkpoints G1–S, intra-S e G2–M, o que em tese aumenta o tempo disponível para o reparo completo do DNA antes da replicação e induz a expressão e recrutamento de proteínas envolvidas no reparo (Bartek and Lukas, 2007; Riley et al., 2008; Kastan and Bartek, 2004; Huen, 2008).

A grande maioria das lesões causadas por luz ultravioleta são os dímeros ciclobutano de pirimidina (CPDs, 80–90%) e fotoproducto (6-4)-pirimidina-pirimidona (6-4 PPs, 10–20%) (Yang, 2011). Esses dois tipos de lesões causam uma torção na dupla-hélice de DNA, o que permite a identificação dessas lesões e o recrutamento de proteínas de reparo (Kim et al., 1995; Palomera-Sanchez and Zurita, 2011; Suquet and Smerdon, 1993). Essas lesões interferem com o pareamento de bases o que pode levar a um bloqueio da transcrição e replicação (Hoeijmakers, 2001).

A via de reparo por excisão de nucleotídeo (NER) é considerada a mais versátil em termos de variedade de lesões reconhecidas, sendo ativada sempre que lesões distorcem a dupla-hélice de DNA, como as lesões por ultravioleta (Freitas and de Magalhaes, 2011). A via de NER pode ser separada em dois tipos: *global genome* NER (GG-NER), que ocorre em todo genoma, e *transcription-coupled* NER (TC-NER), com ocorrência na fita transcrita de genes ativos (Gorbunova et al., 2007; Moriwaki and Takahashi, 2008).

As lesões detectadas que ativam a via GG-NER, podem ser reconhecidas diretamente XPC, juntamente com hRAD23B e centrina 2 (CETN2), quando esta causa uma distorção na estrutura ou na hélice de DNA, ou DDB2 (XPE) em complexo com DDB1 que por fim recruta XPC, quando as lesões não provocam uma desestabilização abrupta na hélice de DNA, como as lesões CPD. Esses complexos proteicos acabam por recrutar TFIIH (Spivak, 2015). O complexo DDB1-DDB2 que pode ubiquitinar as histonas H2A, H3 e H4, facilitando a ação da maquinaria de NER (Guerrero-Santoro et al., 2008; Wang et al., 2006). Trabalhos recentes têm evidenciado um papel direto de P53 na modulação de modificações de histonas em resposta ao dano causado por UV (Palomera-Sanchez and Zurita, 2011). Já na via TC-NER uma RNA-Polimerase II pode ser bloqueada por danos como CPDs, e

fotoprodutos (6-4)-pirimidina-pirimidona, provocando o recrutamento de CSB (ERCC6) (Spivak, 2015).

Tanto a sub-via TC-NER quanto a GG-NerR convergem quando TFIIH é recrutado. TFIIH é um complexo de iniciação da transcrição que compreende 10 proteínas, dentre elas as helicases XPB e XPD. Após a formação deste complexo as proteínas XPA, RPA, XPG e ERCC1-XPF são recrutadas e processam a excisão da fita contendo o dano e proteção da fita oposta (Spivak, 2015). A maquinaria de replicação pol $\delta/\epsilon/\kappa$ -PCNA-RFC-RPA sintetiza uma nova fita e DNA-ligases promovem a ligação entre a ponta 5' e 3' na fita recém polimerizada (Scharer, 2013).

Figura 7 – Representação esquemática da via de reparo NER em humanos. Figura modificada de Spivak, 2015.

A radiação UV também é capaz de gerar ROS, que causam danos oxidativos no DNA (Yaar and Gilchrest, 2007). Esses danos não causam uma distorção na dupla-hélice e por isso são reconhecidos e reparados por outra via, a via de reparo por excisão de base (BER), que também é responsável pelo reparo de danos que causem desaminação ou depurinação (Maynard et al., 2009). Nessa via de reparo uma base danificada é geralmente reconhecida por uma enzima DNA glicosilase que media a remoção da base e o reparo com o auxílio de proteínas nucleasse, polimerase e ligase (David et al. 2007).

A exposição prolongada à luz UV também pode causar quebras de dupla fita (DSBs) (Palomera-Sanchez and Zurita, 2011). Esse tipo de lesão pode ser reparado pela via de reparo por recombinação homóloga (HR), que ocorre apenas nas fases S e G2 do ciclo celular e utiliza um cromossomo homólogo intacto como molde para o reparo do dano (Hoeijmakers, 2001). HR é ativada quando a fita lesionada está com a extremidade 3' em simples fita. Essa via é realizada por diversas proteínas incluindo o complexo MRE11–RAD50–NBS1 (MRN). Catalisado por RAD51 e as proteínas BRCA1 e BRCA2, o DNA simples fita e os complexos de proteínas invadem a fita homóloga do DNA e, utilizando a fita homóloga como molde, polimerizam a fita complementar faltante com a participação de polimerases, nucleases, helicases e outros componentes (Jackson and Bartek, 2009).

Diferente de HR a via de união não-homóloga de extremidades (NHEJ) ocorre principalmente na fase G1, podendo atuar também nas outras fases do ciclo celular também é capaz de reparar DSBs (Lombard et al., 2005). Em NHEJ, os danos DSBs são reconhecidos pela proteína Ku que se liga e ativa as proteínas quinases DNA-

PKcs, levando ao recrutamento e ativação de diversas enzimas no processo, como polimerases e ligases (Jackson and Bartek, 2009).

Por fim, mas não menos importante, há o reparo de mismatch (MMR), no qual a detecção de mismatches (pareamento errôneo) e loops causados por inserção ou deleção de bases desencadeia a incisão de uma simples-fita, que é então corrigida por uma série de proteínas nuclease, polimerase e ligase (Jiricny, 2006; Fishel, 2015). Dentre as principais proteínas dessa via de reparo podemos listar MSH2 e MLH1.

A área de estudo do reparo de DNA e de respostas celulares relacionadas ao dano nessa molécula ainda está em franca expansão, com descobertas frequentes de novas proteínas com envolvimento nessas vias. Nesse contexto procuramos investigar um possível papel da proteína GTPase Cdc42, conhecida por seu papel na mobilidade celular, nesses processos.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Uma forma de se verificar funções desconhecidas de proteínas é através da descoberta de parceiros de interação por meio de estudos de proteômica. Neste contexto este trabalho tem como objetivo investigar interações de Cdc42 com outras proteínas, que podem ou não estar envolvidas nos mecanismos de resposta ao dano do DNA em situações de danos celulares causados por exposição a agente genotóxico em linhagens celulares humanas em cultura.

2.2 Objetivos específicos

- Produzir construções plasmidiais de Cdc42 selvagem e mutada fusionadas na porção N-terminal à GST em vetores pGEX 4T1 (GElifesciences), a cauda de histidina em vetores pEF1/HisC (Invitrogen) e a GFP em vetores pEGFP-C1 (Clontech).
- Transfecção e obtenção de sublinhagens celulares humanas expressando Cdc42 recombinante para futura utilização em validações de resultados.
- Obter lisados celulares de linhagens celulares humanas em cultura tratados com radiação ultravioleta tipo-C para provocar danos no DNA.
- Purificar possíveis complexos proteicos que estejam interagindo com Cdc42 por meio de pull-down.
- Identificar possíveis novos alvos proteicos de Cdc42 por espectrometria de massas.
- Construir redes de interação proteína-proteína ou interactomas de Cdc42 nas condições de interesse, utilizando a lista de proteínas encontradas por MS.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 *Linhagens Celulares*

As células de adenocarcinoma humano - HeLa (Célula epitelial de câncer cervical- CCL-2), HEK (Células humanas embrionárias de rim 293 - CRL-1573) utilizadas neste projeto foram obtidas junto a American Type Culture Collection (ATCC), Manassas, VA, USA, e nos foram cedidas pelo laboratório do Prof. Hugo A. Armelin (CAT-Cepid-Instituto Butantan). As células MRC-5 (Células normais de pulmão – CCL-171) utilizadas nesse projeto foram obtidas junto a American Type Culture Collection (ATCC), Manassas, VA, USA, e nos foram cedidas pelo laboratório do Prof. Carlos Frederico Martins Menck (ICB-USP). Para o cultivo, as células foram sempre mantidas incubadas em meio Dulbecco Modified Eagle Medium (DMEM) (Invitrogen) contendo 10% de soro bovino fetal (Cultilab) a 37°C e 5% de CO₂, em incubadora Sanyo modelo MCO-19AIC(UV).

Para manutenção das células em cultura, as mesmas eram lavadas com PBSA (NaCl 140mM, KCl 2,7mM, Na₂HPO₄ 8mM, KH₂PO₄ 1,5mM, pH 7.4) e subcultivadas com uma solução de tripsina 0,1% (Gibco-Invitrogen) quando atingia a confluência de 80%. Os estoques celulares foram mantidos no meio de cultivo com 10% de DMSO (Sigma) e armazenados em freezer à -80°C (modelo MDF-U33V-PE - Sanyo).

3.2 *Preparação de Bactérias Competentes e Transformação Bacteriana*

Para que as transformações das cepas bacterianas com os plasmídeos e a expressão de proteínas de fusão sejam eficientes, é necessário que previamente se viabilize esses organismos. Para a preparação de cepas *E. coli* competentes para

transformação bacteriana por choque térmico uma colônia de bactéria (DH5 α ou BL21) foi inoculada em meio SOB (2% triptona, 0.5% extrato de levedura, 8.56mM NaCl, 2.5mM KCl, 10mM MgCl₂ e 10mM MgSO₄) e incubadas por 12-16 horas à 37°C em shaker com agitação de 250 RPM, em seguida 2mL dessa colônia em crescimento foram inoculados em 100mL de meio SOB e, quando atingiam a O.D.₆₀₀ = 0,6 aferida em espectrofotômetro PowerWave XS (BioTek) era adicionado 1 ml de solução MgCl₂ à concentração final de 2mM ao inóculo. As células foram repousadas por 15 min em gelo e foram centrifugadas a 3300RPMs por 13 min a temperatura de 4°C. Após descartado o sobrenadante o “pellet” de células foi lavado com 40 mL de Solução RF1 (KCl 100mM, MnCl₂ 50mM, CH₃COOK 30mM, CaCl₂ 10mM, Glicerol 15%), repousado no gelo por 15 min e, após isso, centrifugado a 3300 RPMs por 13min a temperatura de 4°C. O sobrenadante foi descartado e o “pellet” ressuspensionado em 4 mL de Solução RF2 (KCl 10mM, CaCl₂ 75mM, MOPS 10mM e Glicerol 15%), aliquotadas e armazenadas em freezer à -80°C (modelo MDF-U33V-PE - Sanyo).

Para transformação bacteriana foi utilizado o protocolo de “choque térmico”. Para isso eram acrescentados 0,5 μ g do plasmídeo de interesse à 50 μ L de bactéria competente e mantidos em à temperatura de 4°C por 30 min. O “choque térmico” era realizado incubando as bactérias à 42°C por 2 min e em seguida incubadas à temperatura de 4°C por 15 min. 400 μ L de meio LB (bacto-triptona 10 mg/ml, extrato de levedura 5 mg/ml, NaCl 10 mg/ml, pH 7,5) foram adicionados às células, que foram incubadas a 37 °C por 1h. Posteriormente, as bactérias foram semeadas em meio LB-água (bacto-triptona 10 mg/ml, extrato de levedura 5 mg/ml, NaCl 10 mg/ml, água bacteriológico 15mg/L, pH 7) contendo ampicilina (100 μ g/mL) ou Kanamicina (50 μ g/mL) e mantidas a 37 °C durante uma noite. X-Gal 40 μ g/ml (5-bromo-4-

chloro-3-indolyl-b-D-galactopyranoside) e IPTG 0.1 mM (Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside) foram utilizados para bactérias transformadas com o plasmídeo pGEM-T Easy Vector System (Promega).

3.3 *Desenho de Primers*

Os primers utilizados para a amplificação da sequência de Cdc42 foram desenhados utilizando a ferramenta OligoDesigner (Invitrogen) e estão descritos na tabela 1.

Tabela 1 – Primers utilizados para clonagem de Cdc42.

Nome do primer	Sítio de enzima de restrição adicionado	Sequência do primer
EcoR1-Cdc42_F	EcoR1	GAATTCATGCAGACAATTAAGTGTGTTGTTG
EcoR1-nn-Cdc42_F	EcoR1	GAATTCTGATGCAGACAATTAAGTGTGTTGTTG
Not1-Cdc42_R	Not1	GCGGCCGCTCATAGCAGCACACACCTGC
BamH1-Cdc42_F	BamH1	GGATCCATGCAGACAATTAAGTGTGTT
Xho1-nn-Cdc42_F	Xho1	CTCGAGCTATGCAGACAATTAAGTGTGTT
BamH1-Cdc42_R	BamH1	GGATCCTCATAGCAGCACACACCTGC

3.4 *Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) e Eletroforese em gel de agarose*

Para amplificar os transcritos de interesse, foi realizada reação em cadeia da polimerase (PCR) utilizando-se 0,2 μ M de primers iniciadores específicos para Cdc42 e para cada plasmídeo de interesse e 1U de Taq Polimerase (GoTaq Green Master Mix; Promega), segundo protocolo do fabricante. Como “template” das reações foram utilizados 500ng de cDNA de células A172(Glioma Humano) cedidos pelo laboratório da Prof. Dra. Daniela Sanchez Basseres (IQ-USP) ou 500ng de DNA dos plasmídeos pcefl-GST-Cdc42V12 ou pcefl-GST-Cdc42F28 cedidos pela Dra. Alessandra Eva (G.Gaslini Institute). H₂O MilliQ como controle negativo. O produto da reação foi submetido à eletroforese em gel de agarose 1% contendo brometo de etídeo 0,5 g/mL em tampão TAE (Tris-Acetato 40mM, EDTA 1mM). O produto da

reação foi visualizado e as imagens adquiridas em um fotodocumentador GelDoc-It2 Imager (UVP) sob luz UV. As bandas obtidas correspondentes aos produtos de PCR foram cortadas do gel e purificadas com o kit illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification (GE Healthcare), de acordo com o protocolo do fabricante.

3.5 Clonagem e Sequenciamento

Os produtos da PCR purificados foram subclonados em pGEM-T Easy Vector System (Promega), de acordo com o protocolo do fabricante, e usados para a transformação de células competentes de *Escherichia coli*, cepa DH5 α , por meio de choque térmico, conforme descrito na seção 3.2. As colônias selecionadas foram coletadas e inoculadas em 5 mL de meio LB líquido com ampicilina (100 μ g/mL) a 37 °C, durante uma noite, sob agitação constante de 250 RPM. A extração do DNA plasmidial contendo o inserto foi realizada com o illustra plasmidPrep Mini Spin Kit (GE Healthcare), de acordo com o protocolo do fabricante. O DNA obtido foi quantificado por sua densidade óptica a 260 nm e sua pureza foi atestada pela razão 260/280 nm.

O sequenciamento dos plasmídeos foi feito no Centro de Estudos Genoma Humano localizado na Universidade de São Paulo – USP, utilizando o equipamento 3730 DNA Analyser (ThermoFisher). Para as reações de sequenciamento realizadas foi utilizado o kit BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit (ThermoFisher). As sequências foram analisadas pelo software BioEdit (Ibis Biosciences).

Após confirmada a sequencia, o plasmídeo com a sequencia subclonada e os plasmídeos finais de clonagem – pEF1/His C (Thermofisher) que possui uma cauda de Histidina N-terminal, pGEX-4T-2 (GE Healthcare) que possui uma a sequencia de GST em N-terminal, pEGFP-C1(Clontech) que possui uma a sequencia de EGFP em

3.6 *Transfecção*

As sequencias de Cdc42 selvagem (Cdc42WT), Cdc42 constitutivamente ativo (Cdc42V12 - Val→Gly) e Cdc42 de rápida ciclagem (Cdc42F28 - Leu→Phe) foram excisadas do vetor pGEM pelas endonucleases EcoR1 e Not1 (New England Biolabs), separadas em gel de agarose, purificadas e clonadas em plasmídeo pEF1/HisC previamente digerido, conforme descrito anteriormente. A sequencia de Cdc42 selvagem (Cdc42WT) foram excisadas do vetor pGEM pelas endonucleases Xho1 e BamH1 (New England Biolabs), separadas em gel de agarose, purificadas e clonadas em plasmídeo pEGFP-C1 previamente digerido, conforme descrito. Ambos os vetores possuem o gene de resistência a Neomicina que é análoga ao antibiótico G418, que foi utilizada na etapa de seleção das células transfectadas com os vetores. Células HeLa e HEK293 foram semeadas em placas p100 e mantidas em cultura até atingirem a confluência de 80%, e em seguida foram misturadas com 6,5 µg do vetor pEF1/HisC-Cdc42WT, ou do vetor pEF1/HisC-Cdc42V12, ou do vetor pEF1/HisC-Cdc42F28, ou do vetor pEGFP-C1-Cdc42WT ou dos vetores pEF1/HisC e pEGFP-C1 vazios como controles, diluído no reagente FuGENE 6 Transfection Reagent (Roche), segundo instruções do fabricante.. Após 48 horas da transfecção, as células foram subcultivadas para duas placas p100 e tratadas com 400 µg/ml de G418 (Sigma-Aldritch), para selecionar as células transfectadas com os plasmídios. Como controle da seleção uma placa com células HeLa e HEK293 submetidas às mesmas condições de transfecção sem a presença do plasmídeo, foram submetida ao tratamento de seleção. A seleção foi mantida até as células utilizadas como controle da seleção da transfecção terem 100% de morte celular. Após o isolamento das colônias estas foram expandidas e mantidas em meio de

manutenção (DMEM + 10% SBF +100 µg/ml de G418), incubadas em atmosfera 5% CO₂ a 37°C.

As análises e aquisição de imagens originadas das células clonadas com vetor pEGFP-C1-Cdc42WT e controle, foram realizadas através do microscópio confocal de fluorescência - LSM 510 Meta (Zeiss) e seu software Start LSM Image Browser.

3.7 Expressão de Proteínas de Fusão em Bactéria e Purificação

As sequências de Cdc42 selvagem (Cdc42WT) e Cdc42 constitutivamente ativo (Cdc42V12 - Val→Gly) foram excisadas do vetor pGEM pelas endonucleases EcoR1 e Not1 (New England Biolabs), separadas em gel de agarose, purificadas e clonadas em plasmídeo pGEX-4T-2 previamente digerido, conforme descrito anteriormente. Para transformação de Células de E. coli BL-21(DE3) competentes foram utilizados os plasmídeos pGEX-4T-2, pGEX-4T-2-Cdc42WT e pGEX-4T-2-Cdc42V12. As bactérias foram transformadas por choque térmico e plaqueadas em meio LB-ágar para seleção dos clones com ampicilina, conforme metodologia descrita.

Uma colônia de bactéria já transformada com plasmídeo pGEX-4T-2 ou pGEX-4T-2-Cdc42WT ou pGEX-4T-2-Cdc42V12 foi inoculada em 200 mL de meio LB por 12 h a 37°C sob agitação constante (200 rpm). Essa cultura de 200 mL foi re-inoculada em 2 L de meio LB, a cultura de células foi mantida a 37 °C sob agitação constante de 250 rpm até atingir aproximadamente O.D.₆₀₀ = 0,6 nm, aferida em espectrofotômetro PowerWave XS (BioTek). Adicionou-se indutor de expressão IPTG (isopropil β-D tiogalactosídeo) à concentração final de 0,5 mM e incubada à 37 °C sob agitação à 250 rpm. Após 2h de indução, as células foram recuperadas por 10 minutos de centrifugação a 8000 rpm a 4 °C. O precipitado bacteriano foi ressuspensão em 20 mL de tampão de lise (Tris-HCl 50 mM pH7.5, NaCl 150 mM, Triton X-100 1%, MgCl₂ 5 mM, PMSF 1mM, 10 µg/mL Leupetina e Aprotinina). As

bactérias foram lisadas em gelo através de sonicação em 8 ciclos de 2 min, com intervalos de 1 min, com sonicador Vibra-Cell VC 505 (SONICS). Após a lise, o material foi centrifugado por 30 minutos a 14000 rpm a temperatura de 4°C e a fração solúvel contendo a proteína GST (nominada GST) ou GST-Cdc42WT (denominada WT) ou GST-Cdc42V12(denominada V12) foi coletada.

0,5 mL de resina Glutathione-Sepharose 4B (GE Healthcare) previamente lavados por três vezes com PBS (NaCl 140mM, KCl 2,7mM, Na₂HPO₄ 8mM, KH₂PO₄ 1,5mM, CaCl₂ 1mM, MgCl₂ 0,5mM, pH 7.4) foram incubados com 12 mL dessa fração solúvel foi incubada com por 1h a 4 °C sob agitação orbital constante. Em seguida, a proteína de fusão ligada a resina foi lavada 6 vezes com tampão de lavagem (20 mM HEPES pH7.5, , 150 mM NaCl, 5mM MgCl₂, 1% CHAPS, 0,1 mM PMSF, 1µg/mL Leupetina e Aprotinina,) as beads foram ressuspensas em 5mL do tampão de lavagem contendo 10% de glicerol, aliquotadas e armazenadas em freezer -80 °C (modelo MDF-U33V-PE - Sanyo).

3.8 Eletroforese em Gel de Poliacrilamida (SDS-PAGE), Quantificação dos Beads e Western Blotting

A análise eletroforética das proteínas foi realizada sob condições desnaturantes segundo LAEMMLI, 1970. Foram utilizados o gel de empilhamento de poliacrilamida (5% Poliacrilamida, 0.125M Tris pH6.8, 1% SDS, 0,01% persulfato de amônio, 0,001% TEMED) e o gel separador (12% Poliacrilamida, 0.375M Tris pH8.8, 1% SDS, 0,01% persulfato de amônio, 0,001% TEMED) de espessuras de 1,5mm e relação acrilamida:bis-acrilamida de 29:1. As corridas eletroforéticas foram realizadas em voltagem constante de 120 V e amperagem variável, em tampão de corrida (192 mM Glicina; 0,1% SDS; 25mM Tris) a temperatura ambiente.

Para a quantificação dos beads, 2,5 μ L e 5 μ L de cada uma das amostras dos beads preparados (GST, WT e V12) foram submetidos à eletroforese juntamente com 2,5, 5 e 10 μ g de BSA. As proteínas foram coradas com Coomassie Brilliant Blue R-250(BioRad) e escaneadas no equipamento Odyssey Imager (LICOR) com auxílio do software Odyssey V 3.0 (LICOR) para quantificação da beads.

Os géis de SDS-PAGE destinados para transferência das proteínas, foram incubados com tampão de transferência (192 mM Glicina, 20% metanol, 25mM Tris pH8.3) por 10 minutos e as proteínas foram transferidas para membrana de nitrocelulose-Millipore utilizando o sistema úmido por meio do equipamento Mini Trans-Blot (Bio-Rad) à 350mA, por 1h a temperatura ambiente.

As membranas foram então bloqueadas com 5% de leite em pó em TBS-T (20 mmol/L Tris-HCl pH 7.6; 137 mmol/L NaCl; 0,1% Tween 20) por 1h sob agitação em temperatura ambiente. Em seguida, foram incubadas com anticorpo primário monoclonal de camundongo, anti-GFP B-2 (Santa Cruz), na proporção 1:1000.

Por fim, as membranas foram incubadas com o anticorpo secundário fluorescente na diluição de 1:15000 IRDye 800CW anti-mouse IgG (LI-COR Biosciences), por 1h a temperatura ambiente. As membranas foram reveladas utilizando o equipamento Odyssey Imager (LICOR) com auxílio do software Odyssey V 3.0 (LICOR).

3.9 Tratamento com UVC, Obtenção de Lisados e Quantificação

Para o tratamento com UVC foram utilizadas células HeLa e MRC5 em 3 condições: Controle (denominada K); tratamento com UVC 100J/m² seguido de incubação por 5 min à 37°C com a finalidade de identificar proteínas envolvidas em uma resposta rápida (denominada 5min); e tratamento com UVC 10J/m² seguido de incubação por 48 h à 37°C com a finalidade de identificar proteínas envolvidas em

uma resposta tardia (denominada 48h). Para isso as células foram plaqueadas 24h antes do tratamento, em placas p100 para atingirem densidade celular de aproximadamente 80% de confluência, no caso das condições dos tratamentos K e 5min e 40% de confluência, no caso da condição 48h, no momento do tratamento com UVC. As células foram lavadas duas vezes com PBS (NaCl 140mM, KCl 2,7mM, Na_2HPO_4 8mM, KH_2PO_4 1,5mM, CaCl_2 1mM, MgCl_2 0,5mM, pH 7.4) irradiadas em PBS sob luz UVC de acordo com a dose descrita. No controle K as células eram submetidas ao mesmo processo, mas sem a dose de UVC. Após os tempos de incubação descritos as placas colocadas sob o gelo eram lavadas 3 vezes com tampão HBS (20 mM HEPES pH 7.5, 150 mM NaCl, a 4°C) e rompidas com tampão de lise celular (20 mM HEPES pH 7.5, 150 mM NaCl, 5 mM MgCl_2 , 1% CHAPS, 1 mM PMSF, 2 u g/ml aprotinin, 2 u g/ml leupeptin, 2ug/ml Pepstatin, 1mM NaF, 1mM Na_3VO_4 , a 4°C). As células foram mantidas em gelo por 10 minutos e removidas das placas com auxílio de espátula. O homogenato foi centrifugado em centrífuga, por 10 minutos a 16000g a 4°C, a fração sobrenadante foi recolhida e armazenada em freezer -80°C.

As proteínas foram quantificadas segundo método de Bradford, utilizando o reagente Protein Assay (Bio-Rad), conforme protocolo do fabricante.

3.10 Pull-down de Proteínas

Para o pull-down de proteínas e separação de prováveis parceiros de interação com Cdc42 cada 4mg de proteína de cada uma das células (HeLa e MRC5) e cada uma das 3 condições foi incubada, separadamente, com 400µg dos 3 diferentes beads previamente produzidos (GST, WT e V12), totalizando 9 condições para cada linhagem (Tabela2). Ajustando-se previamente todos os volumes, para que a

concentração de proteínas e beads não fossem diferentes entre cada uma das condições cada, as proteínas e beads foram incubadas por 45min sob rotação constante à 4°C. Em seguida centrifugou-se as amostras a 600g por 3 min à temperatura de 4°C e lavou-se os beads+proteínas com tampão de lise (20 mM HEPES pH 7.5, 150 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 1% CHAPS, 1 mM PMSF, 2 u g/ml aprotinin, 2 u g/ml leupeptin, 2ug/ml Pepstatin, 1mM NaF, 1mM Na₃VO₄, a 4°C) por três vezes nas mesmas condições de temperatura intercaladas com centrifugação supracitados (Protocolo adaptado de García-Mata et al., 2006). Após a ultima centrifugação os beads as proteínas que estavam interagindo com os beads foram desligadas com duas lavagens de 50µL de solução de NaCl 1M. Os 100 µL de amostra foram coletados e as proteínas quantificadas pelo método de Bradford previamente descrito.

Tabela 2 – Diferentes condições do pull-down de Cdc42.

Tratamento/Beads	GST	WT	V12
K	HeLa/MRC5 K GST	HeLa/MRC5 K WT	HeLa/MRC5 K V12
5min	HeLa/MRC5 5min GST	HeLa/MRC5 5min WT	HeLa/MRC5 5min V12
48h	HeLa/MRC5 48h GST	HeLa/MRC5 48h WT	HeLa/MRC5 48h V12

3.11 *Digestão Tripsínica em Solução e Dessalinização em Sep-Pak Light*

Para a digestão tripsínica das amostras em solução adicionou-se Hidroclorato de Guanidina - GuHCl(concentração final de 4M) e DTT (concentração final de 5 mM) e as amostras foram então incubadas a 65°C, por 1h Adicionou-se IAA (para uma concentração final de 15 mM) e amostras foram incubadas a 25°C, no escuro, por 1h. Adicionou-se DTT para uma concentração final de 10 mM e novamente as amostras foram incubadas a 25°C, por 15 min. Adicionou-se acetona (8 volumes) e metanol (1 volume) a temperatura de -20°C às amostras e as mesmas foram

incubadas por 3h a -80°C. As amostras foram centrifugadas por 10 min a 14000 x g na temperatura de 4°C, o sobrenadante foi removido e o pellet foi lavado por duas vezes com metanol (1volume) a -20°C e centrifugados pelo mesmo tempo, velocidade e temperatura. Após a remoção do sobrenadante o pellet foi seco a 25°C por 5 min. Os pellets foram ressuspensos em 10 µL de NaOH 100mM, em seguida foi adicionado 390 µL tampão HEPES (HEPES 50mM pH7,5) e ajustou-se o pH para 7,5. Protocolo adaptado de (Kleifeld et al., 2011)

Procedeu-se à digestão das proteínas com o kit sequencing grade modified trypsin (Promega®) na proporção protease:proteína de 1:100, conforme protocolo do fabricante.

Para a dessalinização das amostras utilizou-se as colunas Sep-Pak C18 Plus Light Cartridge (Waters). As colunas foram previamente condicionadas com lavagem de 10 ml de ácido fórmico 0.1%, em seguida 7 ml de acetonitrila 90% e ácido fórmico 0.1% e por fim 10 ml de ácido fórmico 0.1%. As amostras foram carregadas, lavadas com 10 ml de ácido fórmico 0.1% e eluídas com 4 ml de 50% acetonitrila e ácido fórmico 0.1%.

3.12 Identificação e Análise em Espectrometria de Massa

As amostras de peptídeos foram dissolvidas em 20 µL de ácido fórmico 0,1% e analisadas por LC-MS/MS (Liquid chromatography-tandem mass spectrometry) utilizando espectrômetro de massas LTQ-Orbitrap Velos (Thermo Scientific, Bremen, GA, USA) acoplado ao sistema de nano-cromatografia líquida Easy-nLCII (Thermo Scientific, Bremen, GA, USA). 15 µL de cada amostra foram automaticamente injetados em pré-coluna C-18 (100 µm I.D. x 50 mm; Jupiter 10 µm, Phenomenex Inc, Torrance, CA, USA) acoplada a uma coluna analítica C-18 (75 µm I.D. x 100 mm; ACQUA 5 µm, Phenomenex Inc, Torrance, CA, USA). Os peptídeos foram

eluídos em gradiente linear de 5% a 40% de solvente B (0,1% ácido fórmico em acetonitrila) por 90 minutos, sob fluxo de 200 nL/min. A fonte de ionização por electrospray (ESI source) foi operada em modo positivo, com a voltagem e temperatura ajustadas para 2,0 kV e 200°C, respectivamente. O intervalo de varredura de massas considerado para o full scan (MS1) foi de 200 - 2000 m/z (resolução de 60.000 em 400 m/z), operando no modo DDA (Data Dependent Acquisition), onde os dez íons mais intensos por scan foram selecionados para o evento de fragmentação por dissociação induzida por colisão (CID, collision induced dissociation). O sinal mínimo requerido para disparar eventos de fragmentação (MS2) de determinado íon foi ajustado para 5.000 cps, e o tempo de exclusão dinâmica utilizado foi 30 segundos.

Os espectros de massas resultantes das corridas de LC-MS/MS foram processados utilizando ferramentas do software MaxQuant v.1.5.3.12 (Cox and Mann, 2008) utilizando o banco de dados de proteínas humanas (*Homo sapiens*) de 16 de Outubro de 2015, curadas do Swiss-Prot contendo 26.139 proteínas. Os parâmetros de busca utilizados foram: enzima: tripsina; tolerância de duas clivagens perdidas pela enzima; tolerância de erro de massa para o peptídeo precursor de 6 ppm; tolerância de erro de massa para os fragmentos de MS/MS de 0,5 Da; a carbamidometilação de cisteínas foi considerada como modificação fixa e como modificações variáveis, a oxidação da metionina e fosforilação de resíduos de serina, treonina e tirosina. A taxa de falso positivo considerada em nível de peptídeos e proteínas foi estipulada em 1%.

As tabelas de dados foram construídas a partir da busca em banco de dados e foram analisadas pelo software Perseus v.1.5.0.15.

3.13 Construção e Análise de Redes de Interação Proteína-Proteína

Os dados de proteínas identificadas por espectrometria de massas foram utilizados para desenhar potenciais interactomas de Cdc42 com outras proteínas no contexto de interações físicas proteína-proteína (redes PPPI).

Neste sentido, utilizamos as proteínas encontradas exclusivamente nas condições tratadas (5min e 48h) como dados de entrada ou “seed list”, utilizando a proteína Cdc42 como isca, por meio do software Cytoscape, versão 2.6.3 (<http://www.cytoscape.org>), para gerar as redes de interações de Cdc42 naquelas condições específicas. Para isto foram utilizados os dados PPPI de *H. sapiens* disponíveis em muitos bancos de dados de proteínas usando o Plug-in APID2NET para a plataforma Cytoscape (<http://bioinfow.dep.usal.es/apid/apid2net.html>). Foram consideradas proteínas com no máximo 1 nível de conexão com as proteínas da “seed list” validadas por no mínimo 1 método experimental na literatura. Algumas poucas proteínas (indicadas na parte de resultados) tiveram que ser descartadas na construções das redes devido a falta de dados disponíveis de PPPIs nos bancos acessados. Para a identificação dos 10 nodes mais importadas das redes foi utilizado o Plug-in cytoHubba(<http://apps.cytoscape.org/apps/cytohubba>) para a plataforma Cytoscape, versão 2.8.2. Foi utilizado o método de ranking BottleNeck para grupo total de 10 proteínas.

Figura 9 – Fluxograma da metodologia utilizada no trabalho.

3. RESULTADOS

4.1 PCR, Clonagem e Sequenciamento dos Plasmídeos

Para clonagem das sequências de Cdc42 selvagem (WT) e mutadas (V12 e F28), foi realizada PCR com primers específicos para toda a sequência codificadora do gene e com a presença de sequências para endonucleases específicas nas porções 5' e 3'. Utilizou-se como template cDNA de células A172 (Glioma Humano) para a amplificação da sequência selvagem de Cdc42 e plasmídeos pcefl-GST-Cdc42V12 ou pcefl-GST-Cdc42F28 cedidos pela Dra. Alessandra Eva (G. Gaslini Institute), para a amplificação das sequências mutadas de Cdc42. A mutação V12 é equivalente à encontrada naturalmente na proteína oncogênica de Ras, onde Ras V12 apresenta ganho de função (Gly→Val na posição 12), essa mutação causa uma perda da capacidade intrínseca e mediada por GAPs de hidrólise de GTP, tornando-se constitutivamente ativo. O mesmo ganho de função ocorre com Cdc42. Essa mutação permite ainda que Cdc42 interaja com maior afinidade com efetores e GAPs (García-Mata et al., 2006), o que torna o uso dessa proteína mutada particularmente interessante para experimentos de proteômica. A mutação F28 causa um ganho de função em Cdc42, fazendo com que essa proteína tenha uma capacidade intrínseca de troca de GDP por GTP, aumentando a sua velocidade de ciclagem (Vanni et al., 2005). Essa mutação é interessante principalmente para ensaios fenotípicos, visto que as respostas mediadas por Cdc42 se tornam mais intensas. Foram observadas bandas na altura aproximada de 590 pb, após a separação dos produtos por eletroforese em gel de agarose. Essas bandas foram cortadas, purificadas e subclonadas no plasmídeo pGEM-T Easy Vector System (Promega). Após a transformação de cepas bacterianas com o plasmídeo e a

extração plasmidial, esses plasmídeos foram submetidos à outra PCR para confirmação de clonagem dos insertos (Figura 10).

Figura 10 – Análise em gel de agarose dos produtos da reação de PCR dos plasmídeos clonados com as sequencias de Cdc42. Como controle positivo da reação foi utilizado cDNA de células A172.

Confirmada a presença do inserto, procedeu-se à digestão desses plasmídeos pGEM-T contendo as sequencias de Cdc42 e dos plasmídeos utilizados para clonagem final com as endonucleases EcoR1, Not1, Xho1 e BamH1 de acordo com os primers utilizados e os sítios de restrição presentes no plasmídeo utilizado para clonagem final. Optou-se pelos plasmídeos com construções em N-terminal, visto que diversos trabalhos mostram a porção C-terminal de Cdc42 como a principal região de interação entre proteínas (Feltham et al., 1997; Williams, C.L., 2003), dessa forma a função de Cdc42 recombinante seria o mínimo possível prejudicada. Para os plasmídeos pEF1/His C (Thermofisher) que possui uma cauda de Histidina N-

terminal e pGEX-4T-2 (GE Healthcare) que possui uma a sequencia de GST em N-terminal foram utilizadas as endonucleases EcoR1 para porção 5' e Not1 para porção 3' e para o plasmídeo pEGFP-C1(Clontech) que possui uma a sequencia de EGFP em N-terminal foram utilizadas as endonucleases Xho1 para porção 5' e BamH1 para porção 3'. Essas amostras digeridas foram submetidas a separação por eletroforese em gel de agarose e os produtos foram excisados, purificados e ligados, as sequencias com os respectivos plasmídeos. Dessa forma foram produzidas 6 construções ao total – pGEX-4T-2-Cdc42WT; pGEX-4T-2-Cdc42V12; pEF1/HisC-Cdc42WT; pEF1/HisC-Cdc42V12; pEF1/HisC-Cdc42F28; pEGFP-C1-Cdc42WT. Esses plasmídeos foram utilizados para transformação bacteriana e, após à extração plasmidial, foram enviados para o seqüenciamento realizado no Centro de Estudos Genoma Humano localizado na Universidade de São Paulo – USP, utilizando o equipamento 3730 DNA Analyser (ThermoFisher). Para as reações de seqüenciamento realizadas foi utilizado o kit BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit (ThermoFisher). As sequências foram analisadas pelo software BioEdit (Ibis Biosciences), onde foi corrido o programa ClustalW para alinhamentos múltiplos. Foi possível observar que as sequencias estavam corretas e clonadas in frame com as sequencias codificadores presentes na porção 5' dos plasmídeos de todas as construções produzidas. As mutações foram confirmadas nas sequencias de Cdc42V12 e Cdc42F28 (Figura 11).

Figura 11 – Análise em das mutações nos plasmídeos clonados com as sequencias de Cdc42. As amostras RCS-1 e RCS-2 apresentam a mutação F28, com a substituição de uma Fenilalanina por uma Leucina. As amostras RCS-5 e RCS-6 apresentam a mutação V12, com a substituição de uma Glicina por uma Valina. As amostras RCS-7 e RCS-8 apresentam a sequencia selvagem de Cdc42

4.2 Geração de Clones

Comumente se utiliza sublinhagens clonais superexpressando ou com genes silenciados para observações fenotípicas e análises de funções proteicas. O mesmo ocorre para estudos das Rho GTPases. Neste trabalho foram geradas sublinhagens estáveis de HEK293 com os vetores pEF1/HisC vazio, pEF1/HisC-Cdc42WT, pEF1/HisC-Cdc42V12, pEF1/HisC-Cdc42F28, pEGFP-C1 e pEGFP-C1-Cdc42WT e sublinhagens de HeLa com os vetores pEF1/HisC vazio, pEF1/HisC-Cdc42WT, pEF1/HisC-Cdc42V12, pEF1/HisC-Cdc42F28. Optou-se pelos vetores pEF1/HisC por esses possuírem uma pequena cauda de 6 Histidinas na porção N-terminal, que devido ao seu diminuto tamanho pode não interferir ou interferir pouco na função da proteína. Além disso, a cauda de histidina permite que essa proteína seja purificada, visto que a mesma tem afinidade por Níquel. Isso permite a utilização dessas sublinhagens para ensaios fenotípicos e ensaios de proteômica a fim de validar futuros resultados encontrados. Quanto ao vetor pEGFP-C1, o mesmo possui uma sequência em N-terminal que codifica para proteína fluorescente EGFP. Essas sublinhagens foram geradas com a finalidade de futuros estudos de localização celular de Cdc42 após o tratamento com luz ultravioleta e análises de colocalização

de Cdc42 com outros alvos proteicos a fim de se validar resultados encontrados, visto que não são encontrados comercialmente anticorpos de Cdc42 capazes de serem utilizados para Imunofluorescência.

As sublinhagens estáveis de células HEK293 e HeLa mutantes e selvagem para Cdc42, as quais expressam exogenamente a sequência de mRNA que codifica para Cdc42 selvagem, Cdc42 constitutivamente ativa (Cdc42 V12) ou rápida ciclagem (Cdc42 F28), foram obtidas segundo materiais e métodos descritos no item 3.6.

No total em HEK293 foram gerados 97 clones de pEF1/HisC, 72 clones de pEF1/HisC-Cdc42WT, 81 clones mutantes Cdc42V12, 89 clones mutantes Cdc42F28, 75 clones pEGFP-C1 e 81 clones pEGFP-C1-Cdc42WT dentre esses foram isolados, expandidos e congelados 6 clones de cada transfecção.

Em HeLa foram gerados 73 clones de pEF1/HisC, 71 clones de pEF1/HisC-Cdc42WT, 55 clones mutantes Cdc42V12 e 67 clones mutantes Cdc42F28. Dentre esses foram isolados, expandidos e congelados 6 clones de cada transfecção.

Observamos que, tanto em HEK293 quanto em HeLa, as sublinhagens clonais transfectadas com as sequencias de Cdc42 selvagem e mutadas apresentavam alteração de suas morfologias celulares. Estas sublinhagens apresentavam morfologia mais espreiadas em relação às sublinhagens transfectadas com o vetor pEF1/HisC vazio (Figura 12). Essas alterações em sublinhagens de Cdc42 já foram observadas em outros trabalhos (Li et al., 2012; Moorman et al., 1999) .

Figura 12 – Representação da alteração da morfologia celular dos mutantes Rac1. As células foram analisadas e fotografadas em microscópio invertido (Olympus), em meios de manutenção com 10% de SBF e 100 µg/ml de G418.

Tentou-se validar a superexpressão de Cdc42 nestas sublinhagens de HEK293 e HeLa por meio de *Western Blotting*, utilizando-se o anticorpo monoclonal de camundongo, anti-Cdc42 610929 (BD Biosciences), porém não se observou diferenças significativas entre as quantidades de proteína Cdc42 entre as sublinhagens transfectadas com o vetor vazio e com Cdc42 selvagem e mutadas.

Quanto aos clones de HEK293 pEGFP-C1 e pEGFP-C1-Cdc42WT Observamos que, tanto em HEK293 foram observadas alterações morfológicas semelhantes às observadas nos clones transfectados com pEF1/HisC. As sublinhagens transfectadas com a construção pEGFP-C1-Cdc42WT também apresentavam morfologia mais espreiadas em relação às sublinhagens transfectadas com o vetor pEGFP-C1vazio. Foi observado sinal de expressão de GFP nesses clones quando analisados no Microscópio confocal LSM 510 Meta (Zeiss) (Figura 13).

Figura 13 - Microscopia confocal de fluorescência representando a expressão de GFP em ambas sublinhagens. As células foram analisadas e fotografadas no microscópio confocal LSM 510 Meta (Zeiss), em meios de manutenção com 10% de SBF e 100 μ g/ml de G418. As imagens são representativas de dois clones de cada sublinhagem.

Tentou-se validar a expressão de GFP e de GFP-Cdc42 nestas sublinhagens de HEK293 por meio de *Western Blotting*, utilizando-se o anticorpo monoclonal de camundongo, anti-GFP B-2 (Santa Cruz). Foram observadas bandas correspondentes ao tamanho aproximado de 26kDa nas sublinhagens HEK293 pEGFP-C1 e bandas correspondentes ao tamanho aproximado de 51 kDa (Figura 14). Essas bandas se encontram no tamanho esperado para GFP e para proteína fusionada GFP-Cdc42WT.

Figura 14 – Western Blotting de 4 clones de HEK293. As células foram mantidas em meio de manutenção e as proteínas foram extraídas conforme descrito na seção 3.8. Os níveis de GFP foram determinados por imunoblot utilizando anticorpo anti-GFP B-2 (Santa Cruz). As imagens são representativas de dois experimentos independentes.

4.3 Investigação de Novos Parceiros de Cdc42 e Identificação por Espectrometria de Massa

Com a finalidade de buscar novas interação de Cdc42 com proteínas que possam estar envolvidas na resposta ao dano no DNA (DDR), utilizou-se as construções pGEX-4T-2-Cdc42WT e pGEX-4T-2-Cdc42V12 fusionadas à GST descritas na seção 4.1, a fim de se produzir essas proteínas recombinantes em bactéria e realizar a técnica de pull-down. Como controle de interações inespecíficas de proteína foi utilizado o vetor vazio pGEX-4T2, contendo apenas a sequência codificadora para GST. As proteínas recombinantes produzidas apresentavam o tamanho esperado (vide anexo 1). A técnica de pull-down consiste na incubação de lisados celulares com a proteína isca ligadas a beads, que em nosso caso são Cdc42 selvagem e mutante. Os beads utilizados possuíam glutathione ligadas à eles,

pela qual GST possui alta afinidade. Após a incubação com os lisados, esses beads são purificados juntamente com as proteínas que interagem com a proteína isca.

Realizamos essa técnica em lisados de dois tipos celulares MRC-5 (Células normais de pulmão – CCL-171) e HeLa (Célula epitelial de câncer cervical- CCL-2). Esses tipos celulares foram escolhidos pela facilidade de manipulação, alta taxa de proliferação e a fim de minimizar possíveis diferenças intrínsecas de linhagens tumoral e a normal. Essas células foram tratadas com radiação ultravioleta tipo C, visando causar danos no DNA e induzir as respostas ao dano, com dose 100J/m^2 seguido de incubação por 5 min à 37°C (denominada 5min), com a finalidade de identificar proteínas envolvidas em uma resposta rápida e tratamento com dose 10J/m^2 seguido de incubação por 48 h à 37°C (denominada 48h), com a finalidade de identificar proteínas envolvidas em uma resposta tardia e com senescência celular, visto que após essa dose é possível observar células senescentes em ambas linhagens, de acordo com experimentos realizados no laboratório (dados não publicados). Como controle (denominada K) do tratamento foram utilizadas células não submetidas à radiação ultravioleta, conforme descrito na seção 3.9.

Cada um dos lisados em cada condição dessas células foi incubado com as proteínas recombinantes GST, GST-Cdc42WT e GST-Cdc42V12 e procedeu-se ao pulldown e purificação conforme descrito na seção 3.10. Dessa forma foram obtidas 18 amostras diferentes de acordo com a célula, tratamento e proteína incubada (Tabela 2).

As proteínas que possivelmente interagem com Cdc42 foram eluídas aumentando-se a força iônica da solução, através de duas lavagens com NaCl 1M, o que permitiu a remoção de uma grande quantidade de proteínas sem o desligamento de GST e GST-Cdc42 selvagem e mutada dos beads, conforme

observado após eletroforese em gel de poliacrilamida e coloração com nitrato de prata (vide anexo 2). Após esse processo, as proteínas foram submetidas à digestão tripsínica em solução, conforme descrito na seção 3.11. Optou-se por essa técnica a fim de não haver perdas de proteínas, o que poderia ocorrer caso as mesmas fossem submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida para análise e excisão de bandas diferenciais. Realizada a dessalinização em colunas, as amostras foram submetidas à espectrometria de massas e os resultados foram analisados, conforme seção 3.12. Os espectros foram processados no software MaxQuant v.1.5.3.12 utilizando-se o banco de dados de proteínas humanas (*Homo sapiens*) curadas do Swiss-Prot. As tabelas de proteínas identificadas foram trabalhadas no software Perseus v.1.5.0.15. Todas as proteínas encontradas em qualquer amostra incubada com a proteína GST (controle de interações inespecíficas) foram desconsideradas do restante das amostras e excluídas das análises. Nas tabelas 3 e 4 podemos observar as proteínas resultantes identificadas em todas as amostras de HeLa e MRC-5, respectivamente.

Tabela 3 – Proteínas identificadas por espectrometria de massa nas amostras de HeLa, excluídas as amostras encontradas em GST de todas as outras amostras.

	Gene names	Majority protein IDs	Score	Peptides	Unique peptides	Sequence coverage [%]	KEGG name
1	ACOT7	O00154	2,2824	1	1	4,5	Biosynthesis of unsaturated fatty acids
2	MYO1C	O00159	1,8089	2	2	3	
3	PSMD11	O00231	15,968	2	2	5,7	Proteasome
4	IPO5	O00410	1,7794	1	1	0,8	
5	COPE	O14579	2,0763	1	1	7,8	
6	AP3D1	O14617	8,4382	2	2	3,2	Lysosome
7	PDCD5	O14737	2,4071	3	3	30,4	
8	TNFRSF10B	O14763	1,1328	1	1	2,4	Apoptosis;Cytokine-cytokine receptor interaction
9	XPO1	O14980	1,8442	1	1	1,1	Ribosome biogenesis in eukaryotes;RNA transport
10	SLC16A3	O15427	4,8674	3	3	7,3	
11	PSMD3	O43242	2,0756	2	2	3,9	Proteasome
12	TXNL1	O43396	2,6744	1	1	7,6	
13	TPD52L2	O43399	3,7439	3	3	20,2	
14	DIAPH1	O60610	1,6916	1	1	1,2	Focal adhesion;Regulation of actin cytoskeleton
15	UGDH	O60701	24,835	8	8	25,1	Metabolism
16	HIST1H2BL, etc.	Q99880	1,1464	1	1	7,1	Systemic lupus erythematosus
17	EIF5B	O60841	1,9002	1	1	1,6	RNA transport
18	TBCA	O75347	2,3082	2	2	26,9	
19	ATP5H	O75947	3,1624	1	1	12,4	Alzheimer's disease;Oxidative phosphorylation
20	GLS	O94925	1,3769	1	1	12,4	Metabolism
21	PAK4	O96013	21,643	6	6	14,2	Focal adhesion;Regulation of actin cytoskeleton

22	GSR	P00390	3,3857	2	2	6,8	Glutathione metabolism
23	FTH1	P02794	1,1154	2	2	9,3	Metabolism
24	CAPNS1	P04632	3,1751	2	2	10,4	
25	ARG1	P05089	2,268	1	1	4,7	Metabolism
26	SSB	P05455	2,7318	2	2	5,6	Systemic lupus erythematosus
27	TPM1	P09493	4,7046	8	3	22,2	Cardiac muscle contraction
28	ACADM	P11310	1,8834	1	1	3,6	Fatty acid metabolism;PPAR signaling pathway
29	G6PD	P11413	16,171	5	5	9,3	Metabolism
30	SRM	P19623	2,3686	2	2	7,6	Metabolism
31	BTF3	P20290	4,2334	2	2	24,1	
32	PSMB1	P20618	8,7239	4	4	24,1	Proteasome
33	ACO1	P21399	2,0977	1	1	0,9	Metabolism
34	GART	P22102	2,8146	2	2	2	Metabolism
35	RRM1	P23921	1,5738	1	1	1,1	Metabolism
36	U2AF2	P26368	2,342	2	2	7,2	Spliceosome
37	VAR5	P26640	2,8788	2	2	2,1	Aminoacyl-tRNA biosynthesis
38	SERPINB3	P29508	27,856	8	2	21,5	Amoebiasis
39	PRDX3	P30048	5,0517	3	3	23,9	
40	ECHS1	P30084	3,6346	1	1	4,5	Metabolism
41	CMPK1	P30085	1,2471	1	1	6,6	Pyrimidine metabolism
42	PPP2R1A	P30153	3,2031	2	2	5,1	Cell cycle - yeast;mRNA surveillance pathway
43	SERPINB1	P30740	9,1146	3	3	9,2	Amoebiasis
44	SDHA	P31040	1,4275	1	1	2,9	Alzheimer's disease;Oxidative phosphorylation
45	CASP14	P31944	3,5729	2	2	7,9	
46	CTNNA1	P35221	2,2514	1	1	2	Adherens junction;Pathways in cancer
47	ATP5C1	P36542	6,3379	2	2	7,4	Alzheimer's disease;Oxidative phosphorylation

48	LONP1	P36776	3,3377	2	2	3	
49	ATP6V1A	P38606	2,8011	1	1	3,6	Oxidative phosphorylation
50	IARS	P41252	5,6217	3	3	2,5	Aminoacyl-tRNA biosynthesis
51	CDKN2A	P42771	3,1031	3	3	26,3	Cell cycle;P53 signaling pathway;Pathways in cancer
52	GSTM5	P46439	1,282	9	0	29,4	Metabolism
53	CAPZB	P47756	3,1336	3	3	11,4	
54	LGALS7	P47929	5,0055	1	1	8,1	
55	MARCKSL1	P49006	2,0618	1	1	6,7	Fc gamma R-mediated phagocytosis
56	NASP	P49321	1,6627	1	1	4,5	
57	AARS	P49588	1,8281	1	1	1,5	Aminoacyl-tRNA biosynthesis
58	VASP	P50552	4,816	3	3	6,3	Focal adhesion
59	ANXA11	P50995	2,7926	2	2	5,7	
60	PGD	P52209	3,9523	1	1	4,5	Metabolism
61	KPNA2	P52292	43,87	3	3	10	
62	RAP1GDS1	P52306	61,886	15	15	30,8	
63	CRIP2	P52943	23,98	1	1	15,4	
64	COPA	P53621	55,966	3	3	3,3	Neuroactive ligand-receptor interaction
65	RARS	P54136	4,1339	3	3	4,5	Aminoacyl-tRNA biosynthesis
66	PMS1	P54277	1,2294	2	2	3,1	
67	YARS	P54577	3,2612	1	1	2,3	Aminoacyl-tRNA biosynthesis
68	ALDH18A1	P54886	4,4906	1	1	2,9	Arginine and proline metabolism
69	CSE1L	P55060	15,28	3	3	4,3	
70	ATP5J2	P56134	5,533	1	1	26,5	Oxidative phosphorylation
71	UBE2N;UBE2NL	P61088;Q5JXB2	2,0854	2	2	13,8	Ubiquitin mediated proteolysis
72	ACTR3	P61158	1,9454	1	1	2,9	
73	PSME3	P61289	6,097	2	2	10,2	Proteasome
74	RhoA;RhoC	P61586;P08134	4,7106	2	2	14	Pathways in cancer;Regulation of actin cytoskeleton

75	SUMO2;SUMO4;SUMO3	P61956;Q6EEV6;P55854	10,58	2	2	31	RNA transport
76	PSMC5	P62195	3,5058	2	2	6,8	Proteasome
77	PSMC6	P62333	11,707	3	3	10,3	Proteasome
78	FKBP1A	P62942	2,3034	1	1	12	
79	UBE2L3	P68036	2,3932	1	1	18	Ubiquitin mediated proteolysis
80	FKBP3	Q00688	1,2998	1	1	6,7	
81	YWHAH	Q04917	1,7932	5	2	19,9	Cell cycle;Neurotrophin signaling pathway
82	KHDRBS1	Q07666	2,2566	2	2	6,9	
83		Q09FC8-4	1,2102	1	1	2	
84	GALNT2	Q10471	2,1818	1	1	1,9	Mucin type O-Glycan biosynthesis
85	CBX3	Q13185	29,859	1	1	7,7	
86	TRIM28	Q13263	2,652	2	2	2,6	
87	PABPC4	Q13310	1,4852	6	2	12	mRNA surveillance pathway;RNA transport
88	PICALM	Q13492	1,557	1	1	2,5	
89	TUBB3	Q13509	2,9081	13	1	29,3	Gap junction;Phagosome
90	IQGAP2	Q13576	1,2169	4	1	2	Regulation of actin cytoskeleton
91	BLMH	Q13867	1,5846	1	1	2,4	
92	GIT2	Q14161	2,5459	5	3	9,1	Endocytosis
93	FLNC	Q14315	2,2253	10	1	3,6	Focal adhesion;MAPK signaling pathway
94	RBM39	Q14498	2,3552	2	2	4,9	
95	MCM6	Q14566	1,6351	1	1	1,6	Cell cycle;DNA replication
96	SEPT2	Q15019	4,1108	3	3	15	
97	NCAPD2	Q15021	1,4215	2	2	1,5	Cell cycle - yeast
98	KARS	Q15046	2,2181	2	2	5,7	Aminoacyl-tRNA biosynthesis
99	SF3A2	Q15428	1,2152	1	1	3	Spliceosome
100	SF1	Q15637	5,2223	2	2	7,1	
101	MAPRE1	Q15691	1,9367	2	2	9,3	
102	ADRM1	Q16186	9,6612	1	1	3,9	

103	DPYSL2	Q16555	3,8835	3	2	7,5	Axon guidance
104	KYNU	Q16719	4,0174	2	2	6,7	Tryptophan metabolism
105	HADH	Q16836	1,7072	1	1	4,5	Metabolism
106	TRIM60	Q495X7	1,2625	1	1	2,5	
107	TOR1AIP1	Q5JTV8;Q5JTV8-3	21,764	2	2	4,3	
108	FNBP1L	Q5T0N5	7,4607	6	6	11,2	
109	MRM1	Q6IN84	23,016	5	5	20,1	
110	TRAF7	Q6Q0C0	5,7808	4	4	8,1	
111	DNMBP	Q6XZF7	1,2758	1	1	0,6	
112	MTDH	Q86UE4	1,3497	1	1	1,9	
113	PCNP	Q8WW12	2,9849	2	2	15,2	
114	PALLD	Q8WX93	5,5479	3	3	9,4	
115	H1FX	Q92522	2,6842	2	2	13,1	
116	STMN2	Q93045	1,5512	3	1	15,1	
117	FKBP10	Q96AY3	3,8378	3	3	5,5	
118	MASTL	Q96GX5	1,3603	1	1	1,6	
119	FAM129B	Q96TA1	1,3013	2	2	3,5	
120	PHB2	Q99623	5,5605	1	1	4	
121	HSD17B10	Q99714	3,9372	3	3	17,9	Alzheimer's disease
122	HNRNPAB	Q99729	54,899	3	3	12,3	
123	ACO2	Q99798	1,9971	1	1	2,1	Metabolism
124	ANAPC13	Q9BS18	1,305	1	1	13,5	Cell cycle;Ubiquitin mediated proteolysis
125	C9orf142	Q9BUH6	2,5515	2	2	10,3	
126	TMED9	Q9BVK6	13,183	1	1	4,7	
127	EHD1;EHD3;EHD4	Q9H4M9;Q9NZN3;Q9H223	1,638	1	1	1,7	Endocytosis
128	SH3BGRL3	Q9H299	2,9862	2	2	19,4	
129	TMX1	Q9H3N1	1,6692	1	1	4,3	
130	Cdc42EP4	Q9H3Q1	11,255	5	5	18,8	

131	TTC12	Q9H892	1,4484	2	2	3,8	
132	HN1L	Q9H910	3,2722	1	1	8	
133	PHPT1	Q9NRX4	3,7041	1	1	16,8	Fructose and mannose metabolism
134	OLA1	Q9NTK5	1,6586	2	2	6,1	
135	TMOD3	Q9NYL9	2,6364	2	2	7,1	
136	IGF2BP1	Q9NZI8	6,0843	3	2	7,1	
137	EHD2	Q9NZN4	2,2128	1	1	2,9	Endocytosis
138	CALML5	Q9NZT1	15,103	2	2	21,2	Phosphatidylinositol signaling system
139	BCCIP	Q9P287	1,9949	1	1	5,5	
140	LARS	Q9P2J5	5,8184	1	1	2,5	Aminoacyl-tRNA biosynthesis
141	ATPIF1	Q9UII2	3,3562	2	2	17	
142	Cdc42EP3	Q9UKI2	2,6446	2	2	9,8	
143	GIT1	Q9Y2X7	10,849	9	7	15,5	Regulation of actin cytoskeleton
144	TRRAP	Q9Y4A5	1,3413	1	1	0,3	
145	HYOU1	Q9Y4L1	2,1616	2	2	2,9	Protein processing in endoplasmic reticulum
146	RBM8A	Q9Y5S9	2,0266	1	1	11	RNA transport;Spliceosome
147	PSAT1	Q9Y617	2,9041	3	3	10,8	Metabolism
148	COPG1;COPG2	Q9Y678;Q9UBF2	3,69	2	2	2,5	
149	BZW2	Q9Y6E2	2,3486	1	1	2,1	

Tabela 4 – Proteínas identificadas por espectrometria de massa nas amostras de MRC-5, excluídas as amostras encontradas em GST de todas as outras amostras.

	Gene names	Majority protein IDs	Score	Peptides	Unique peptides	Sequence coverage [%]	KEGG name
1	CNOT1	A5YKK6	17,392	3	3	1,3	RNA degradation
2	PSMD12	O00232	21,266	3	3	7	Proteasome
3	EIF3F	O00303	13,309	2	2	7,3	RNA transport
4	CYR61	O00622	117,08	14	14	45,4	
5	EIF1AX;EIF1AY	P47813;O14602	6,3083	1	1	6,9	RNA transport
6	Cdc42EP2	O14613	14,778	2	2	17,1	
7	TNFRSF10B	O14763	5,966	1	1	2,4	Apoptosis;Cytokine-cytokine receptor interaction
8	EIF3D	O15371	19,768	3	3	8,8	RNA transport
9	PSMD3	O43242	63,963	9	9	21	Proteasome
10	EEF1E1	O43324	6,567	1	1	7,2	
11	NUDT21	O43809	16,938	3	3	14,1	mRNA surveillance pathway
12	EDF1	O60869	32,546	5	5	30,2	
13	PSIP1	O75475	22,808	3	3	8,7	
14	NUP155	O75694	33,209	5	5	5,5	RNA transport
15	TRIO	O75962	6,1285	1	1	0,4	
16	SRP72	O76094	86,529	11	11	23	Protein export
17	SMC2	O95347	66,042	9	9	10,3	Cell cycle - yeast
18	STAU1	O95793	124,12	15	14	37,9	
19	PAK4	O96013	109,01	13	13	34,7	Focal adhesion;Regulation of actin cytoskeleton
20	DHFR	P00374	6,2875	1	1	11,9	Folate biosynthesis;One carbon pool by folate
21	COL1A1	P02452	11,779	2	2	1,3	Focal adhesion;Protein digestion and absorption
22	TP53	P04637	22,893	4	4	23,4	Apoptosis; Cell cycle; Pathways in cancer
23	TYMS	P04818	11,087	2	2	7,2	One carbon pool by folate;Pyrimidine metabolism
24	HMG1	P05114	6,1492	1	1	10	
25	SERP1B2	P05120	11,164	2	2	4,3	Amoebiasis

26	MYL1;MYL3	P05976;P08590	17,389	2	2	10,7	Cardiac muscle contraction
27	EPRS	P07814	56,825	9	9	7,5	Aminoacyl-tRNA biosynthesis
28	SNRNP70	P08621	41,486	6	6	17,6	Spliceosome
29	TROVE2	P10155	13,466	2	2	4,6	Systemic lupus erythematosus
30	SNRPB;SNRPN	P63162;P14678	19,019	3	3	12,6	Spliceosome;Systemic lupus erythematosus
31	AKR1B1	P15121	7,2825	1	1	3,5	Metabolism
32	NQO1	P15559	18,489	3	3	13,6	
33	DSP	P15924	71,553	9	9	3,6	Arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy
34	HIST1H1B	P16401	19,433	5	3	17,7	
35	HLA-G	P17693	6,2558	2	1	6,8	Cell adhesion molecules (CAMs);Endocytosis
36	EIF2AK2	P19525	34,055	5	5	9,6	Protein processing in endoplasmic reticulum
37	MDK	P21741	9,5238	1	1	11,5	
38	COMT	P21964	6,2447	1	1	6,8	Metabolism
39	APEX1	P27695	20,045	3	3	14,2	Base excision repair
40	MCM7	P33993	38,202	6	6	11	Cell cycle;DNA replication
41	DEK	P35659	36,656	5	5	17,9	
42	MDH1	P40925	33,838	5	5	30,2	Metabolism
43	STAT1	P42224	40,012	6	6	10	Chemokine signaling pathway;Pathways in cancer
44	MATR3	P43243	102,8	13	13	22,2	
45	MSH2	P43246	6,1121	1	1	1,6	Mismatch repair;Pathways in cancer
46	TSFM	P43897	15,33	2	2	13,5	
47	NOP2	P46087	25,202	4	4	7,6	
48	NASP	P49321	6,549	1	1	2,7	
49	TMED10	P49755	12,878	2	2	10,5	
50	PDE6C	P51160	5,9713	1	1	1,5	Purine metabolism
51	BCAP31	P51572	19,054	3	3	11,8	Protein processing in endoplasmic reticulum
52	PGD	P52209	35,534	4	4	12,1	Metabolism
53	RAP1GDS1	P52306	101,89	13	13	28,7	

54	NAPA;NAPB	P54920;Q9H115	26,426	4	4	19,3	
55	EIF5	P55010	19,004	3	3	7,9	RNA transport
56	HADHB	P55084	16,998	3	3	10,8	Fatty acid metabolism
57	LYZ	P61626	6,1858	1	1	8,1	Salivary secretion
58	CNBP	P62633	17,818	3	3	18,8	
59	RPS15	P62841	28,872	4	4	31	Ribosome
60	GNB1	P62873	6,7373	5	1	16,3	Chemokine signaling pathway;Phototransduction
61	UBA52;UBB;UBC	P62987;P0CG47;P0CG48	9,4589	5	1	41,4	Parkinson's disease;Ribosome
62	GRB2	P62993	11,633	2	2	8	Chemokine signaling pathway;Pathways in cancer
63	DYNLL2;DYNLL1	Q96FJ2;P63167	12,235	2	2	24,7	Vasopressin-regulated water reabsorption
64	RPS21	P63220	37,462	5	5	45,8	Ribosome
65	HDLBP	Q00341	34,444	5	5	5	
66	DSG1	Q02413	12,071	2	2	3,3	Staphylococcus aureus infection
67	YWHAH	Q04917	6,8314	4	1	16,3	Cell cycle
68	SRSF1	Q07955	44,213	7	7	40,8	Spliceosome
69	PAK1	Q13153	65,101	16	9	36,9	Axon guidance;Regulation of actin cytoskeleton
70	MRPL49	Q13405	14,121	2	2	15,1	
71	TUBB3	Q13509	26,556	17	3	42,7	Gap junction
72	CUL4A;CUL4B	Q13619;Q13620	7,016	1	1	1,7	Nucleotide excision repair
73	ARHGEF7	Q14155	56,43	9	9	16,7	Regulation of actin cytoskeleton
74	GIT2	Q14161	11,6	2	1	4	Endocytosis
75	TRIP10	Q15642	90,107	13	13	29	Insulin signaling pathway
76	HNRNPUL2	Q1KMD3	6,6343	1	1	1,9	
77	LEPRE1	Q32P28	6,0036	1	1	2,8	
78		Q56UN5-6	6,0177	1	1	8,3	
79	FNBP1L	Q5TON5	12,878	2	2	3,8	
80	EDC4	Q6P2E9	10,802	2	2	1,6	RNA degradation
81	ERICH6	Q7L0X2	6,1165	1	1	2,1	

82	NPLOC4	Q8TAT6	7,8174	1	1	3	Protein processing in endoplasmic reticulum
83	H1FX	Q92522	27,746	4	4	21,1	
84	PXDN	Q92626	19,274	3	3	6,1	
85	STMN2	Q93045	6,6312	4	1	15,1	
86	TCEAL3	Q969E4	6,2578	1	1	12	
87	ZNF622	Q969S3	23,951	4	4	12,4	
88	CDC5L	Q99459	57,242	6	6	12	Spliceosome
89	PHB2	Q99623	33,587	5	5	20,4	
90	HNRNPAB	Q99729	40,398	6	6	23,2	
91	GRWD1	Q9BQ67	7,0024	1	1	3,6	
92	NAA15	Q9BXJ9;	39,44	6	6	7,2	
93	EHD4	Q9H223	31,711	5	4	10,7	Endocytosis
94	Cdc42EP4	Q9H3Q1	21,667	3	3	18,5	
95	PHAX	Q9H814	8,8094	1	1	2,8	RNA transport
96	TTC12	Q9H892	6,6673	1	1	2,3	
97	TRIM45	Q9H8W5	6,6086	1	1	1,6	
98	OLA1	Q9NTK5	12,057	2	2	6,1	
99	LARS	Q9P2J5	23,298	4	4	3,8	Aminoacyl-tRNA biosynthesis
100	CGN	Q9P2M7	11,494	2	2	1,8	Tight junction
101	ATPIF1	Q9UII2	14,079	2	2	10,4	
102	Cdc42EP3	Q9UKI2	29,678	2	2	13,4	
103	BAIAP2	Q9UQB8	74,643	11	11	27	Adherens junction;Regulation of actin cytoskeleton
104	CARHSP1	Q9Y2V2	6,4428	1	1	10,9	
105	TRRAP	Q9Y4A5	6,0689	1	1	0,3	
106	Cdc42BPB	Q9Y5S2	29,116	4	4	3	
107	COPG1	Q9Y678	54,729	7	7	11,6	

No total foram encontradas 149 proteínas nas amostras de HeLa e 107 proteínas nas amostras de MRC-5. Foram encontradas diversas proteínas já descritas na literatura como parceiros de interação de Cdc42 nos resultados de HeLa, tais como PAK4 (linha 21), IQGAP2 (linha 90), Cdc42EP4 (linha 130) e Cdc42EP3 (linha 142) e nos resultados de MRC-5, tais como Cdc42EP2 (linha 6), ARHGEF7 (linha 73), Cdc42EP4 (linha 94), Cdc42EP3 (linha 102) e Cdc42BPB (linha 106). Essas observações sugerem que as proteínas recombinantes produzidas nas bactérias estavam funcionais.

Dentre esses dados podemos extrair diversos alvos promissores com envolvimento direto em diversas e importantes funções celulares. Podemos observar em HeLa diversas proteínas envolvidas com ciclo celular, tais como CDKN2A (linha 51), YWHAH (linha 81), MCM6 (linha 95) e ANAPC13 (linha 124). Nos dados de HeLa não foi observada nenhuma proteína com envolvimento direto no reparo ou apoptose. Entre os dados de MRC-5 podemos observar proteínas envolvidas diretamente no reparo, tais como: APEX1 (linha 39), MSH2 (linha 45), e CUL4A;CUL4B (linha 72); apoptose, tais como TNFRSF10B (linha 7), TP53 (linha 22); e ciclo celular, tais como TP53 (linha 22), MCM7 (linha 40) e YWHAH (linha 67).

Foi realizada a análise da intersecção dos conjuntos (Tabela 5, 6, 7 e 8) a fim de se observar as proteínas encontradas exclusivamente em cada amostra e na intersecção dos conjuntos de resultados das amostras para posteriormente proceder às análises de rede.

Tabela 5 – Análise da intersecção dos conjuntos de dados de HeLa e total de proteínas exclusivamente encontradas em cada amostra ou conjunto de amostras.

Amostra						Nº de Proteínas
HeLa K WT	HeLa K V12	HeLa 5min WT	HeLa 5min V12	HeLa 48h WT	HeLa 48h V12	
+						37
	+					3
		+				1
			+			7
				+		4
					+	11
+		+				1
+			+			36
+				+		1
+					+	4
	+	+				1
	+		+			1
	+				+	2
		+			+	2
				+	+	2
+	+	+				1
+	+			+		1
+		+	+			2
+		+		+		1
+		+			+	1
+			+	+		4
+			+		+	5
+				+	+	1
	+	+			+	1
	+		+		+	1
		+		+	+	1
+	+	+			+	1
+	+		+	+		2
+	+		+		+	1
+		+	+	+		1
+		+	+		+	2
+		+		+	+	1
+			+	+	+	1
		+	+	+	+	1
+	+	+	+	+		1
+	+	+		+	+	2
+	+	+	+	+	+	4

Tabela 6 – Total de proteínas encontradas em cada conjunto de dados de HeLa.

Amostra	Nº de Proteínas
HeLa K WT	111
HeLa K V12	22
HeLa 5min WT	25
HeLa 5min V12	69
HeLa 48h WT	28
HeLa 48h V12	44

Tabela 7 – Análise da intersecção dos conjuntos de dados de MRC-5 e total de proteínas exclusivamente encontradas em cada amostra ou conjunto de amostras.

Amostra						Nº de Proteínas
MRC5 K WT	MRC5 K V12	MRC5 5min WT	MRC5 5min V12	MRC5 48h WT	MRC5 48h V12	
+						2
	+					13
		+				3
			+			24
				+		5
					+	12
+			+			1
+				+		2
	+	+				2
	+		+			3
	+				+	5
		+	+			1
		+			+	1
			+	+		1
			+		+	2
+	+	+				1
+		+		+		4
+			+		+	1
	+	+			+	2
	+		+		+	10
+	+	+			+	1
+	+		+		+	2
+		+	+	+		2
	+	+	+		+	1
	+		+	+	+	1
+	+	+	+	+		3
+	+	+	+	+	+	2

Tabela 8 – Total de proteínas encontradas em cada conjunto de dados de MRC-5.

Amostra	Nº de Proteínas
MRC5 K WT	21
MRC5 K V12	46
MRC5 5min WT	23
MRC5 5min V12	54
MRC5 48h WT	20
MRC5 48h V12	40

Podemos observar que, com exceção da amostra HeLa K WT, os tratamentos quando incubados com a proteína recombinante Cdc42V12 apresentaram um maior número de proteínas identificadas. Isso pode ser devido ao que fora anteriormente abordado, que a mutação V12 permite que Cdc42 interaja com maior afinidade com efetores e GAPs (García-Mata et al., 2006). Podemos observar que as amostras tratadas 48h apresentam uma quantidade menor do total de proteínas identificadas, quando comparadas aos outros tratamentos, tanto em HeLa quanto em MRC-5.

4.4 Redes de Interação Proteína-Proteína

As interações proteicas são primordiais para que ocorra uma resposta celular a um dado estímulo e para que a célula e o organismo possam se adaptar às variações do meio e sobreviver. As funções desempenhadas por uma proteína podem ser muito diferentes dependendo de quais outras proteínas estejam interagindo em um determinado momento. A fim de tentar relacionar as proteínas identificadas nesse trabalho com a nossa proteína de estudo, Cdc42, e o que se tem depositado em bancos de dados de interação proteína-proteína, foram construídas diversas redes de interação ou interactomas. Para isso utilizamos as proteínas identificadas exclusivamente nos tratamentos com radiação ultravioleta tipo C, no caso 5min e 48h. Portanto foram retiradas das análises qualquer proteína

encontrada nas condições controle (K). Consideramos as proteínas encontradas com a isca de Cdc42WT e Cdc42V12 como um único conjunto. Uma vez que a ativação de Cdc42WT necessita de GEFs para a troca de GDP por GTP e essas GEFs não são produzidas endogenamente em bactérias, podemos considerar que essas proteínas estejam no estado inativo num primeiro momento, quando incubadas com os lisados. Já com Cdc42V12 que possui uma mutação que o torna constitutivamente ativo, sempre ligado à GTP, podemos identificar proteínas que se ligam à Cdc42 quando este estiver ativo no complexo contexto celular. Como Cdc42 possui um tempo de inativação independente e intrínseco da proteína, ambos os estados de Cdc42 (ativo e inativo) podem ser encontrados em um mesmo momento em uma célula.

Para a construção das redes de cada condição utilizou-se a proteína isca, Cdc42, juntamente com as proteínas identificadas em cada um dos quatro grupos, HeLa 5min (-K), HeLa 48h (-K), MRC-5 5min (-K) e MRC-5 48h (-K). As proteínas desses grupos foram organizadas numa tabela (Tabela 9), cada uma contendo um número próprio de proteínas identificadas nesse grupo e encontradas nos bancos de dados de interação proteína-proteína e às quais também foram atribuídas cores específicas para identificação nas redes (Tabela 10). Cdc42 foi colorida com a cor vermelha e representada sob a forma de um losango para facilitar a visualização. Deixou-se de plotar 3 proteínas do grupo HeLa 5min (-K), 4 proteínas do grupo HeLa 48h (-K) e 2 proteínas do grupo MRC-5 48h pelas mesmas não terem sido encontradas em bancos de dados na busca pelo Plug-in APID2NET para a plataforma Cytoscape versão 2.6.3.

Tabela 9: Proteínas identificadas exclusivamente nas amostras tratadas com UVC e utilizadas para construção de redes de interação com Cdc42.

Hela 5min (-K)		Hela 48h (-K)		MRC5 5min (-K)		MRC5 48h (-K)	
Uniprot Name	Protein ID	Uniprot Name	Protein ID	Uniprot Name	Protein ID	Uniprot Name	Protein ID
ADRM1_HUMAN	Q16186	2AAA_HUMAN	P30153	1433F_HUMAN	Q04917	ATIF1_HUMAN	Q9UII2
ATPG_HUMAN	P36542	ARG1_HUMAN	P05089	ALDR_HUMAN	P15121	CING_HUMAN	Q9P2M7
BORG2_HUMAN	Q9UKI2	BORG2_HUMAN	Q9UKI2	APEX1_HUMAN	P27695	CPSF5_HUMAN	O43809
COPG_HUMAN	Q9Y678	CALL5_HUMAN	Q9NZT1	BAP31_HUMAN	P51572	DSG1_HUMAN	Q02413
COPG2_HUMAN	Q9UBF2	CASPE_HUMAN	P31944	CDC5L_HUMAN	Q99459	DYL1_HUMAN	P63167
DIAP1_HUMAN	O60610	COPG_HUMAN	Q9Y678	CING_HUMAN	Q9P2M7	DYL2_HUMAN	Q96FJ2
IQGA2_HUMAN	Q13576	COPG2_HUMAN	Q9UBF2	CNBP_HUMAN	P62633	GRB2_HUMAN	P62993
MARE1_HUMAN	Q15691	DNMBP_HUMAN	Q6XZF7	CUL4A_HUMAN	Q13619	H15_HUMAN	P16401
PCNP_HUMAN	Q8WW12	GIT2_HUMAN	Q14161	CUL4B_HUMAN	Q13620	IF1AX_HUMAN	P47813
SF3A2_HUMAN	Q15428	IF2B1_HUMAN	Q9NZI8	DYR_HUMAN	P00374	IF1AY_HUMAN	O14602
VASP_HUMAN	P50552	IQGA2_HUMAN	Q13576	ECHB_HUMAN	P55084	MATR3_HUMAN	P43243
		LEG7_HUMAN	P47929	EDC4_HUMAN	Q6P2E9	MCM7_HUMAN	P33993
		MRP_HUMAN	P49006	EHD4_HUMAN	Q9H223	PAI2_HUMAN	P05120
		MYO1C_HUMAN	O00159	EIF3F_HUMAN	O00303	PHB2_HUMAN	Q99623
		PABP4_HUMAN	Q13310	GRWD1_HUMAN	Q9BQ67	PSIP1_HUMAN	O75475
		PHB2_HUMAN	Q99623	HLAG_HUMAN	P17693	RO60_HUMAN	P10155
		SPB3_HUMAN	P29508	LYSC_HUMAN	P61626	SFRS1_HUMAN	Q07955
		SYAC_HUMAN	P49588	MATR3_HUMAN	P43243	STAU1_HUMAN	O95793
		SYRC_HUMAN	P54136	MCA3_HUMAN	O43324	SYLC_HUMAN	Q9P2J5
				MCM7_HUMAN	P33993	TMEDA_HUMAN	P49755
				NPL4_HUMAN	Q8TAT6	ZN622_HUMAN	Q969S3
				P3H1_HUMAN	Q32P28		
				P53_HUMAN	P04637		
				PSD12_HUMAN	O00232		
				PSMD3_HUMAN	O43242		
				PXDN_HUMAN	Q92626		
				SMC2_HUMAN	O95347		
				SNAA_HUMAN	P54920		
				SNAB_HUMAN	Q9H115		
				TBB3_HUMAN	Q13509		
				TMEDA_HUMAN	P49755		
				TRIO_HUMAN	O75962		
				TYSY_HUMAN	P04818		
				VIGLN_HUMAN	Q00341		

Tabela 10: Relação entre total de nodes, edges, proteínas utilizadas para busca, proteínas não encontradas no software Cytoscape e cores específicas dos nodes de acordo com a amostra em que essa proteína foi identificada (Azul, Ciano, Verde escuro e Verde claro).

	Hela 5min (-K)	Hela 48h (-K)	MRC5 5min (-K)	MRC5 48h (-K)
Nodes	530	588	1201	1260
Edges	8998	13792	21037	19658
Total busca	14	23	34	23
Não Encontradas	3	4	0	2
Cor dos nodes	Azul	Ciano	Verde escuro	Verde claro

Cada proteína identificada na rede passa a ser um “node” e cada linha representando as interações físicas entre elas comprovadas por, no mínimo, uma técnica bioquímica apropriada, encontradas em bancos de dados públicos, são referidas como “edge”. O total de nodes e edges de cada rede pode ser observado na Tabela 10. Em cada uma das redes construídas podemos observar além das proteínas utilizadas como entrada e pintadas com cores características para cada condição (Tabela 10), outras proteínas com cor branca e edges na cor azul mostrando as conexões entre todas essas proteínas. Para verificar os mais importantes nodes de cada rede com base em análises topológicas que levam em conta a posição de cada node e as interações entre eles foi utilizado o Plug-in cytoHubba (Chin et al., 2014) para a plataforma Cytoscape, versão 2.8.2. Foi utilizado o método de ranking BottleNeck para grupo total de 10 proteínas. As redes e os resultados das análises do cytoHubba podem ser observados a seguir (Figuras 12-19).

Figura 15 - Rede de interação entre Cdc42 e as proteínas identificadas por espectrometria de massas nos lisados HeLa 5min (em azul). As proteínas representadas pelas demais cores, foram encontradas em outros tratamentos e linhagens. Cdc42 está representado na cor vermelha. Visualização com o software Cytoscape 2.8.2.

Figura 16 - Rede de interação após análise pelo Plug-in cytoHubba entre Cdc42 e as proteínas identificadas por espectrometria de massas nos lisados HeLa 5min. A tabela ao lado representa o ranking final das proteínas. Visualização com o software Cytoscape 2.8.2.

Figura 17 - Rede de interação entre Cdc42 e as proteínas identificadas por espectrometria de massas nos lisados HeLa 48h (em ciano). As proteínas representadas pelas demais cores, foram encontradas em outros tratamentos e linhagens. Cdc42 está representado na cor vermelha. Visualização com o software Cytoscape 2.8.2.

Figura 18 - Rede de interação após análise pelo Plug-in cytoHubba entre Cdc42 e as proteínas identificadas por espectrometria de massas nos lisados HeLa 48h. A tabela ao lado representa o ranking final das proteínas. Visualização com o software Cytoscape 2.8.2.

Figura 19 - Rede de interação entre Cdc42 e as proteínas identificadas por espectrometria de massas nos lisados MRC-5 5min (em verde-escuro). As proteínas representadas pelas demais cores, foram encontradas em outros tratamentos e linhagens. Cdc42 está representado na cor vermelha. Visualização com o software Cytoscape 2.8.2.

Figura 20 - Rede de interação após análise pelo Plug-in cytoHubba entre Cdc42 e as proteínas identificadas por espectrometria de massas nos lisados MRC-5 5min. A tabela ao lado representa o ranking final das proteínas. Visualização com o software Cytoscape 2.8.2.

Figura 21 - Rede de interação entre Cdc42 e as proteínas identificadas por espectrometria de massas nos lisados MRC-5 48h (em verde-claro). As proteínas representadas pelas demais cores, foram encontradas em outros tratamentos e linhagens. Cdc42 está representado na cor vermelha. Visualização com o software Cytoscape 2.8.2.

Figura 22 - Rede de interação após análise pelo Plug-in cytoHubba entre Cdc42 e as proteínas identificadas por espectrometria de massas nos lisados MRC-5 48h. A tabela ao lado representa o ranking final das proteínas. Visualização com o software Cytoscape 2.8.2.

Com base nos resultados obtidos e apresentados nas figuras acima, redes mostradas nas figuras 15, 17, 19 e 21, é possível observar proteínas identificadas em outras amostras (coloridas), diferentes das utilizadas como as proteínas de entrada para confecção da rede. Isto mostra coerência e consistência da predição dos interactomas de acordo com os tratamentos com uma mesma fonte de dano. Essas proteínas observadas em mais de uma rede podem indicar uma interação com Cdc42, mesmo de forma estável.

Quanto a análise topológica das redes realizada pelo Plug-in cytoHubba (Figuras 16, 18, 20 e 22), podemos observar que Cdc42 aparece entre as 10 principais proteínas nas análises realizadas nas 4 amostras. Isso sugere que parte das proteínas identificadas nas análises de espectrometria de massas e utilizadas para a construção das redes de fato podem estar interagindo Cdc42, visto que a utilização dessas listas de proteínas como dados de entrada colaboraram para que Cdc42 fosse ranqueado entre os 10 principais nodes da rede. Dessas análises podemos observar também que diversas proteínas identificadas nas análises de massa também aparecem ranqueadas. Em HeLa 5min podemos observar as proteínas ATPG e SF3A2. Em HeLa 48h observamos as proteínas 2AAA, que interage diretamente com Cdc42, e PHB2. Em MRC 5min observamos P53 e 1433F, que interagem diretamente com Cdc42, e CUL4A. Por fim, em MRC 48h observamos as proteínas DYL1, GRB2 e, novamente, PHB2. Além disso, podemos observar proteínas que não foram identificadas nessas amostras por espectrometria de massa, mas aparecem como nodes importantes no contexto analisado em diferentes amostras, como no caso Rac1, 1433Z e 1433G.

Desses resultados podemos selecionar possíveis alvos para futuras análises e validações de interação. Chama a atenção a presença de PHB2 em duas amostras ranqueadas (HeLa 48h e MRC-5 48h) e CUL4A e P53 presentes na amostra MRC-5 5min. Todas essas proteínas estão a, no máximo, 1 node de distância de Cdc42 e possuem interessantes funções diretamente envolvidas com a resposta ao dano no DNA (DDR), tais como modulação da apoptose e reparo do DNA.

4. DISCUSSÃO

No presente estudo buscamos novos parceiros de interação de Cdc42 que possam estar envolvidos com a resposta à dano no DNA (DDR). Cdc42 é um membro da família das Rho GTPases, altamente conservado em diversas espécies (Melendez et al., 2011), conhecido principalmente por seu papel na organização do citoesqueleto, tráfico de vesículas, manutenção da polaridade celular (Cerione, 2004), orientação do citoesqueleto na divisão celular e manutenção das junções celulares (Qadir et al., 2015). Trabalhos recentes têm demonstrado também um possível papel na resposta ao dano no DNA. Foi observado que os níveis de Cdc42 ativada aumentam após o tratamento com UVC e Cdc42 é capaz de ativar p38 (Seo et al., 2004). Alguns trabalhos mostram que Cdc42 pode estar relacionado com o envelhecimento (Kerber et al., 2009; Wang et al., 2007; Florian et al., 2012) e que esta proteína pode promover a senescência de modo dependente de P53 (Wang et al., 2007).

Para atingirmos os objetivos propostos foram geradas construções com Cdc42 selvagem e mutada (mutação V12) fusionadas à proteína GST. A mutação V12 é equivalente à encontrada naturalmente na proteína oncogênica de Ras, onde Ras V12 apresenta ganho de função (Val→Gly na posição 12), essa mutação causa uma perda da capacidade intrínseca e mediada por GAPs de hidrólise de GTP, tornando-se constitutivamente ativo (Qiu et al., 1995). O mesmo ganho de função ocorre com Cdc42. Essa mutação permite ainda que Cdc42 interaja com maior afinidade com efetores e GAPs (García-Mata et al., 2006), o que torna o uso dessa proteína mutada particularmente interessante para experimentos de proteômica.

Utilizando GST, GST-Cdc42WT e GST-Cdc42V12 como isca, foram realizados pull-downs de proteínas em lisados de células HeLa e MRC-5 em três condições

diferentes: Controle (denominada K); tratamento com UVC 100J/m₂ seguido de incubação por 5 min à 37°C com a finalidade de identificar proteínas envolvidas em uma resposta rápida (denominada 5min); e tratamento com UVC 10J/m₂ seguido de incubação por 48 h à 37°C com a finalidade de identificar proteínas envolvidas em uma resposta tardia (denominada 48h). Totalizando portanto 18 amostras, sendo 9 para cada linhagem. Após a digestão dessas amostras e análises por espectrometria de massas verificamos que as proteínas recombinantes possivelmente se encontram funcionais, visto que foram identificados parceiros conhecidos de Cdc42, tais como PAK4, IQGAP2, Cdc42EP4, Cdc42EP3, Cdc42EP2, ARHGEF7 e Cdc42BPB (Arias-Romero and Chernoff, 2013 e bancos de dados do UniProt).

Procedida a construção de redes de interação de proteínas observamos que as redes compartilhavam diversas proteínas em comum observadas nos experimentos de espectrometria de massas, o que confere coerência e robustez da predição dos interactomas, visto que os tratamentos, apesar de possuírem tempos distintos, foram realizados com uma mesma fonte de dano. Na identificação dos nodes mais importantes das redes construídas, Cdc42 aparece entre as 10 principais proteínas nas análises realizadas nas 4 amostras. Isso sugere que Cdc42 possa de fato estar interagindo com algumas das proteínas identificadas, uma vez que a plotagem destas proteínas contribuíram para que Cdc42 fosse ranqueado entre os 10 principais nodes da rede. Desta análise da rede podemos identificar possíveis alvos também encontrados nos experimentos de espectrometria de massas para futuras análises e validações de interação. Chamou a atenção devido às suas posições nas redes e às suas funções as proteínas PHB2 (encontrada nas amostras HeLa 48h e MRC-5 48h), P53 e CUL4A (encontradas na amostra MRC-5 5min). Todas essas proteínas estão a, no máximo, 1 node de distância de Cdc42 na rede.

Proibitina – 2 (PHB2) é uma subunidade do complexo Proibitina, formado pelas subunidades Proibitina 1 e 2. Esta é uma proteína de membrana com diferentes localizações celulares, que, dependendo da região em que se encontra (núcleo, mitocôndria ou citoplasma), desempenha um papel diferente no contexto celular. Esse complexo proteico está envolvido em diversas funções celulares, tais como proliferação, apoptose e senescência (Peng et al. 2015). A Proibitina de membrana regula o transporte celular e pode causar a parada do ciclo celular entre as fases G0 e G1 e a inativação da via de sinalização Raf-MEK-ERK (Luan et al., 2014). Também já foi descrita a participação de Cdc42 na via das MAP quinases ERK, JNK, p38 (Lamarche et al., 1996; Coso et al. 1995; Minden et al. 1995). Essa sobreposição pode sugerir uma interação entre as duas proteínas.

A proteína P53 é um conhecido e bem estudado supressor tumoral. Essa proteína possui envolvimento direto com vias apoptóticas e de reparo do DNA (Nicolai et al., 2015) A participação de Cdc42 já foi descrita em vias de sinalização que envolvem P53 (Gadea et al., 2002; Thomas et al., 2000), porém não foi descrita nenhuma participação de Cdc42 na resposta ao dano no DNA mediada por P53, o que abre um novo campo a ser explorado, caso essa interação seja validada nesse contexto.

Cullina-4A (CUL4A) é uma proteína localizada principalmente no núcleo e conhecida por seu papel em diversas funções celulares, geralmente relacionadas com regulação do ciclo celular e estabilidade genômica. CUL4A exerce um papel vital na manutenção da estabilidade genômica e atua impedindo a replicação do DNA genômico durante o estresse genotóxico (Sharma and Nag, 2014). Também é conhecido o seu envolvimento na via de NER e interação direta com complexos dessa via, tais como DDB1 e DDB2 (Huang and D'Andrea, 2006). A via de NER é a

principal via ativada por lesões que distorcem a dupla-hélice de DNA, como as lesões por ultravioleta (Freitas and de Magalhaes, 2011). Vale relatar que CUL4A já foi identificada em experimentos prévios realizados com células MRC-5 nas mesmas condições descritas (Anexo 4).

Apesar de Cdc42 só ter sido descrito como uma proteína citoplasmática alguns trabalhos relatam uma possível sequência sinal de localização nuclear (NLS) em Cdc42 (Williams, 2003) e a translocação dessa proteína para a membrana nuclear após o estresse de células fotorreceptoras por exposição excessiva à luz (Heynen et al., 2011). Uma vez que não são encontrados anticorpos comerciais anti-Cdc42 que possam ser eficazmente utilizados para imunofluorescência é possível verificar, utilizando-se as sublinhagens expressando GFP-Cdc42WT já geradas, se há translocação de Cdc42 após a irradiação por UVC, o que tornaria possível também a interação desta proteína com CUL4A e com outras proteínas nucleares. Cumprir registrar que em experimentos prévios de pull-down de Cdc42WT e Cdc42V12 em células MRC-5 nas mesmas condições já foram identificadas por espectrometria de massas as proteínas NUP188 e NUTF2, envolvidas com transporte nuclear (Anexo 4).

Para confirmar essas interações serão necessários experimentos extras que possam corroborar os dados aqui obtidos, uma vez que o presente trabalho apresenta dados de um único experimento realizado e uma das técnicas utilizadas para investigar possíveis interações proteína-proteína. Tendo em vista as novas possibilidades que esse trabalho abre para validar essas interações é possível utilizar as sublinhagens expressando GFP-Cdc42WT já geradas para verificar se as proteínas encontradas aqui colocalizam com Cdc42 nas mesmas condições analisadas, por exemplo. Após a validação da superexpressão de Cdc42 nas

sublinhages transfectadas com as construções de Cdc42 no vetor pEF1/HisC, é possível realizar o experimento de pull-down das proteínas Cdc42 fusionadas à cauda de Histidina nas mesmas condições e verificar por meio de Western Blotting utilizando anticorpos específicos para as proteínas que se quer validar, se essas são purificadas junto com Cdc42. Por fim é possível utilizar essas mesmas sublinhagens geradas em HeLa e HEK293, descritas na seção 4.2, e verificar se o tratamento com UVC gera alguma diferença em possíveis modificações pós-traducionais, nas proteínas que se pretende validar, entre as diversas sublinhagens com Cdc42 selvagem e mutada.

5. CONCLUSÃO

Esse trabalho identificou diversos possíveis alvos de Cdc42 com envolvimento ou não na resposta ao dano no DNA (DDR) em análises por espectrometria de massas, sendo que muitas dessas proteínas nunca foram descritas como parceiros de interação com a nossa proteína de estudo. Algumas dessas proteínas se correlacionam às funções e vias das quais Cdc42 participa.

Dentre as proteínas identificadas, com base em análise de redes e funções celulares desempenhadas, foram selecionadas como principais alvos para futuros experimentos as proteínas Proibitina-2 (PHB2) encontrada nas amostras incubadas por 48 horas pós irradiação e Cullina-4A (CUL4A) e P53 , encontradas em amostra incubada por 5 minutos pós radiação.

As possíveis interações das proteínas identificadas com Cdc42 necessitam de validação por outros experimentos e as sublinhagens celulares e construções plasmidiais de Cdc42 selvagem e mutada que foram geradas nesse trabalho podem auxiliar nesse futuros passos.

Por fim, analisando os dados da literatura e resultados encontrados no presente trabalho é possível conceber que Cdc42 desempenha diversas funções além das comumente descritas, podendo inclusive ter papel na resposta ao dano no DNA (DDR) seja através da apoptose, vias de sinalização de reparo do DNA ou senescência celular.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abe, K., Rossman, K.L., Liu, B., Ritola, K.D., Chiang, D., Campbell, S.L., Burrridge, K., and Der, C.J. (2000). Vav2 is an activator of Cdc42, Rac1, and RhoA. *J Biol Chem* 275, 10141-10149.
- Arias-Romero, L. E., and Chernoff, J. (2013) Targeting Cdc42 in cancer. *Expert Opinion on Therapeutic Targets*, 17:11, 1263-1273
- Bartek, J. and Lukas, J. (2007) DNA damage checkpoints: from initiation to recovery or adaptation. *Curr. Opin. Cell Biol.* 19, 238–245.
- Boulter, E., Garcia-Mata, R., Guilluy, C., Dubash, A., Rossi, G., Brennwald, P.J., and Burrridge, K. (2010). Regulation of Rho GTPase crosstalk, degradation and activity by RhoGDI1. *Nat Cell Biol* 12, 477-483.
- Burrridge, K., and Wennerberg, K. (2004). Rho and Rac take center stage. *Cell* 116, 167-179.
- Campisi, J. and d’Adda di Fagagna, F. (2007) Cellular senescence: when bad things happen to good cells. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 8, 729–740.
- Cerione, R.A. (2004). Cdc42: new roads to travel. *Trends Cell Biol* 14, 127-132.
- Chen, F., Ma, L., Parrini, M.C., Mao, X., Lopez, M., Wu, C., Marks, P.W., Davidson, L., Kwiatkowski, D.J., Kirchhausen, T., et al. (2000). Cdc42 is required for PIP(2)-induced actin polymerization and early development but not for cell viability. *Curr Biol* 10, 758-765.
- Chen, Q.Y., Jiao, D.M., Yao, Q.H., Yan, J., Song, J., Chen, F.Y., Lu, G.H., and Zhou, J.Y. (2012). Expression analysis of Cdc42 in lung cancer and modulation of its expression by curcumin in lung cancer cell lines. *Int J Oncol* 40, 1561-1568.
- Chin, C. H., Chen, S. H., Wu, H. H., Ho, C. W., Ko, M. T. and Lin, C. Y. (2014) cytoHubba: identifying hub objects and sub-networks from complex interactome. *BMC Syst Biol.* 8, Suppl 4:S11.
- Cho, K. A., Ryu, S. J., Oh, Y. S., Park, J. H., Lee, J. W., et al. (2004) Morphological adjustment of senescent cells by modulating caveolin-1 status. *J Biol Chem*, 279, 42270–42278.
- Chuang, T.H., Hahn, K.M., Lee, J.D., Danley, D.E., and Bokoch, G.M. (1997). The small GTPase Cdc42 initiates an apoptotic signaling pathway in Jurkat T lymphocytes. *Mol Biol Cell* 8, 1687-1698.
- Cimprich, K. A. and Cortez, D. (2008) ATR: an essential regulator of genome integrity. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 9, 616–627.
- Coso, O. A., Chiariello, M., Yu, J. C., et al. (1995) The small GTP-binding proteins Rac1 and Cdc42 regulate the activity of the JNK/SAPK signaling pathway. *Cell*, 81, 1137–1146.
- Cotteret, S., Chernoff, J. (2002). The evolutionary history of effectors downstream of Cdc42 and Rac. *Genome Biol*, 3(2), 1-8.
- David, S. S., O’Shea, V. L. & Kundu, S. (2007). Base-excision repair of oxidative DNA damage. *Nature*, 447, 941–950.
- Deevi, R., Fatehullah, A., Jagan, I., Nagaraju, M., Bingham, V., and Campbell, F.C. (2011). PTEN regulates colorectal epithelial apoptosis through Cdc42 signalling. *Br J Cancer* 105, 1313-1321.
- DerMardirossian, C., and Bokoch, G.M. (2005). GDIs: central regulatory molecules in Rho GTPase activation. *Trends Cell Biol* 15, 356-363.
- Diebold, B.A., Fowler, B., Lu, J., Dinauer, M.C., and Bokoch, G.M. (2004). Antagonistic cross-talk between Rac and Cdc42 GTPases regulates generation of reactive oxygen species. *J Biol Chem* 279, 28136-28142.
- Dubash, A.D., Guilluy, C., Srougi, M.C., Boulter, E., Burrridge, K., and Garcia-Mata, R. (2011). The small GTPase RhoA localizes to the nucleus and is activated by Net1 and DNA damage signals. *PLoS One* 6, e17380.
- Espinha, G., Osaki, J. H., Costa, E. T. and Forti, F. L. (2016). Inhibition of the RhoA GTPase Activity Increases Sensitivity of Melanoma Cells to UV Radiation Effects. *Oxid Med Cell Longev.* 2016, 2696952.

- Espinha, G., Osaki, J. H., Magalhaes, Y. T. and Forti, F. L. (2015) Rac1 GTPase-deficient HeLa cells present reduced DNA repair, proliferation, and survival under UV or gamma irradiation. *Mol Cell Biochem.* 404(1-2),281-97.
- Etienne-Manneville, S., and Hall, A. (2002). Rho GTPases in cell biology. *Nature* 420, 629-635.
- Feltham, J. L., Dötsch, V., Raza, S., Manor, D., Cerione, R. A., Sutcliffe, M.J., Wagner, G. and Oswald, R.E. (1997) Definition of the switch surface in the solution structure of Cdc42Hs. *Biochemistry*, 36(29), 8755-66.
- Fidyk, N., Wang, J.B., and Cerione, R.A. (2006). Influencing cellular transformation by modulating the rates of GTP hydrolysis by Cdc42. *Biochemistry* 45, 7750-7762.
- Fishel, R. (2015). Mismatch Repair. *The Journal Of Biological Chemistry*, 290 (44), 26395–26403.
- Florian, M. C., Dorr, K., Niebel, A., Daria, D., Schrezenmeier, H., et al. (2012) Cdc42 activity regulates hematopoietic stem cell aging and rejuvenation. *Cell Stem Cell*, 10, 520–530.
- Freitas, A.A., and de Magalhaes, J.P. (2011). A review and appraisal of the DNA damage theory of ageing. *Mutat Res* 728, 12-22.
- Fromme, J.C., and Verdine, G.L. (2004). Base excision repair. *Adv Protein Chem* 69, 1-41.
- Gadea, G., Lapasset, L., Gauthier-Rouviere, C., and Roux, P. (2002). Regulation of Cdc42-mediated morphological effects: a novel function for P53. *EMBO J* 21, 2373-2382.
- Garcia-Mata, R., Boulter, E., and Burrridge, K. (2011). The 'invisible hand': regulation of Rho GTPases by RhoGDIs. *Nat Rev Mol Cell Biol* 12, 493-504.
- García-Mata, R., Wennerberg, K., Arthur, W. T., Noren, N. K., Ellerbroek, S. M., Burrridge, K. (2006) Analysis of activated GAPs and GEFs in cell lysates. *Methods Enzymol.* 406, 425-37.
- Gjoerup, O., Lukas, J., Bartek, J., and Willumsen, B.M. (1998). Rac and Cdc42 are potent stimulators of E2F-dependent transcription capable of promoting retinoblastoma susceptibility gene product hyperphosphorylation. *J Biol Chem* 273, 18812-18818.
- Gorbunova, V., Seluanov, A., Mao, Z., and Hine, C. (2007). Changes in DNA repair during aging. *Nucleic Acids Res* 35, 7466-7474.
- Groisman, R., Polanowska, J., Kuraoka, I., Sawada, J., Saijo, M., Drapkin, R., Kisselev, A. F., Tanaka, K. and Nakatani, Y. (2003). The ubiquitin ligase activity in the DDB2 and CSA complexes is differentially regulated by the COP9 signalosome in response to DNA damage. *Cell*, 113, 357–367.
- Guerrero-Santoro, J., Kapetanaki, M.G., Hsieh, C.L., Gorbachinsky, I., Levine, A.S., and Rasic-Otrin, V. (2008). The cullin 4B-based UV-damaged DNA-binding protein ligase binds to UV-damaged chromatin and ubiquitinates histone H2A. *Cancer Res* 68, 5014-5022.
- Halazonetis, T. D., Gorgoulis, V. G. and Bartek, J. (2008) An oncogene-induced DNA damage model for cancer development. *Science*, 319, 1352–1355.
- Harper, J. W. and Elledge, S. J. (2007) The DNA damage response: ten years after. *Mol. Cell*, 28, 739–745.
- Harris, K.P., and Tepass, U. (2010). Cdc42 and vesicle trafficking in polarized cells. *Traffic* 11, 1272-1279.
- Heasman, S.J., and Ridley, A.J. (2008). Mammalian Rho GTPases: new insights into their functions from in vivo studies. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9, 690-701.
- Heynen, S.R., Tanimoto, N., Joly, S., Seeliger, M.W., Samardzija, M., and Grimm, C. (2011). Retinal degeneration modulates intracellular localization of Cdc42 in photoreceptors. *Mol Vis* 17, 2934-2946.
- Hoeijmakers, J.H. (2001). Genome maintenance mechanisms for preventing cancer. *Nature* 411, 366-374.
- Huang, T. T. and D'Andrea, A. D. (2006). Regulation of DNA repair by ubiquitylation. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 7, 323-334.
- Huen, M. S. and Chen, J. (2008). The DNA damage response pathways: at the crossroad of protein modifications. *Cell Res.* 18, 8–16.

- Ito, T. K., Yokoyama, M., Yoshida, Y., Nojima, A., Kassai, H., et al. (2014) A Crucial Role for Cdc42 in Senescence-Associated Inflammation and Atherosclerosis. *PLoS One* 9(7),e102186.
- Jackson, S. P., Bartek, J. (2009) The DNA-damage response in human biology and disease. *NATURE*, 461, 1071-1078.
- Jaffe, A.B., and Hall, A. (2005). Rho GTPases: biochemistry and biology. *Annu Rev Cell Dev Biol* 21, 247-269.
- Jiricny, J. (2006) The multifaceted mismatch-repair system. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 7, 335–346.
- Johnson, D.I., and Pringle, J.R. (1990). Molecular characterization of Cdc42, a *Saccharomyces cerevisiae* gene involved in the development of cell polarity. *J Cell Biol* 111, 143-152.
- Johnson, J.L., Erickson, J.W., and Cerione, R.A. (2012). C-terminal di-arginine motif of Cdc42 protein is essential for binding to phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate-containing membranes and inducing cellular transformation. *J Biol Chem* 287, 5764-5774.
- Kastan, M. B. and Bartek, J. (2004) Cell-cycle checkpoints and cancer. *Nature*, 432, 316–323.
- Kerber, R.A., O'Brien, E., and Cawthon, R.M. (2009). Gene expression profiles associated with aging and mortality in humans. *Aging Cell* 8, 239-250.
- Kim, J.K., Patel, D., and Choi, B.S. (1995). Contrasting structural impacts induced by cis-syn cyclobutane dimer and (6-4) adduct in DNA duplex decamers: implication in mutagenesis and repair activity. *Photochem Photobiol* 62, 44-50.
- Kleifeld, O., et al. (2011) Identifying and quantifying proteolytic events and the natural N terminome by terminal amine isotopic labeling of substrates. *Nat. Protocols*, 6, 1578-611.
- Lamarche, N., Tapon, N., Stowers, L., et al. (1996) Rac and Cdc42 induce actin polymerization and G1 cell cycle progression independently of p65PAK and the JNK/SAPK MAP kinase cascade. *Cell*, 87,519–529.
- Li, B., Antonyak, M. A., Zhang, J. and Cerione, R. A. (2012) RhoA triggers a specific signaling pathway that generates transforming microvesicles in cancer cells. *Oncogene* 31, 4740-4749.
- Li, Z., Dong, X., Wang, Z., Liu, W., Deng, N., Ding, Y., Tang, L., Hla, T., Zeng, R., Li, L., et al. (2005). Regulation of PTEN by Rho small GTPases. *Nat Cell Biol* 7, 399-404.
- Liang, S.L., Liu, H., and Zhou, A. (2006). Lovastatin-induced apoptosis in macrophages through the Rac1/Cdc42/JNK pathway. *J Immunol* 177, 651-656.
- Lindahl, T. (1993). Instability and decay of the primary structure of DNA. *Nature* 362, 709-715.
- Lombard, D.B., Chua, K.F., Mostoslavsky, R., Franco, S., Gostissa, M., and Alt, F.W. (2005). DNA repair, genome stability, and aging. *Cell* 120, 497-512.
- Lord, C. J., Ashworth, A. (2012). The DNA damage response and cancer therapy. *Nature*, 481,287–294.
- Luan, Z., He, Y., Alattar, M., Chen, Z. and He, F. (2014) Targeting the prohibitin scaffold-CRAF kinase interaction in RAS-ERK-driven pancreatic ductal adenocarcinoma. *Mol Cancer*. 13,38.
- Ma, J., Xue, Y., Liu, W., Yue, C., Bi, F., et al. (2013). Role of Activated Rac1/Cdc42 in Mediating Endothelial Cell Proliferation and Tumor Angiogenesis in Breast Cancer. *PLoS ONE*, 8(6), 1-10.
- Maynard, S., Schurman, S.H., Harboe, C., de Souza-Pinto, N.C., and Bohr, V.A. (2009). Base excision repair of oxidative DNA damage and association with cancer and aging. *Carcinogenesis* 30, 2-10.
- Mayor, S., and Pagano, R.E. (2007). Pathways of clathrin-independent endocytosis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8, 603-612.
- Melendez, J., Grogg, M., and Zheng, Y. (2011). Signaling role of Cdc42 in regulating mammalian physiology. *J Biol Chem* 286, 2375-2381.
- Minden, A., Lin, A., Claret, F.X., et al. (1995) Selective activation of the JNK signaling cascade and c-Jun transcriptional activity by the small GTPases Rac and Cdc42Hs. *Cell*, 81,1147–1157.
- Moon, S.Y., and Zheng, Y. (2003). Rho GTPase-activating proteins in cell regulation. *Trends Cell Biol* 13, 13-22.

- Moorman, J.P., Luu, D., Wickham, J., Bobak, D.A. and Hahn CS. (1999) A balance of signaling by Rho family small GTPases RhoA, Rac1 and Cdc42 coordinates cytoskeletal morphology but not cell survival. *Oncogene* 18(1),47-57.
- Moriwaki, S., and Takahashi, Y. (2008). Photoaging and DNA repair. *J Dermatol Sci* 50, 169-176.
- Mortz, E., Krogh, T.N., Vorum, H., and Gorg, A. (2001). Improved silver staining protocols for high sensitivity protein identification using matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight analysis. *Proteomics* 1, 1359-1363.
- Na, S., Li, B., Grewal, I.S., Enslen, H., Davis, R.J., Hanke, J.H., and Flavell, R.A. (1999). Expression of activated Cdc42 induces T cell apoptosis in thymus and peripheral lymph organs via different pathways. *Oncogene* 18, 7966-7974.
- Nicolai, S., Rossi, A., Di-Daniele, N., Melino, G., Annicchiarico-Petruzzelli, M., Raschellà, G. (2015) . DNA repair and aging: the impact of the P53 family. *Aging*, 7(12),1050-65.
- Osaki JH, Espinha G, Magalhaes YT, Forti FL. Modulation of RhoA GTPase Activity Sensitizes Human Cervix Carcinoma Cells to γ -Radiation by Attenuating DNA Repair Pathways. *Oxid Med Cell Longev*. 2016, 6012642.
- Palomera-Sanchez, Z., and Zurita, M. (2011). Open, repair and close again: chromatin dynamics and the response to UV-induced DNA damage. *DNA Repair (Amst)* 10, 119-125.
- Peng, Y., Chen, P., Ouyang, R., and Song, L. (2015) Multifaceted role of prohibitin in cell survival and apoptosis. *Apoptosis*, 20(9), 1135–1149.
- Perona, R., Montaner, S., Saniger, L., et al. (1997) Activation of the nuclear factor-kappaB by Rho, Cdc42, and Rac-1 proteins. *Genes Dev*, 11, 463–475.
- Qadir, M. I., Parveen, A., Ali, M. (2015). Cdc42: Role in Cancer Management. *Chem Biol Drug Des* 86, 432–439
- Qiu, R.G., Chen, J., McCormick, F., and Symons, M. (1995). A role for Rho in Ras transformation. *Proc Natl Acad Sci*, 92, 11781-11785.
- Rihet, S., Vielh, P., Camonis, J., Goud, B., Chevillard, S., and de Gunzburg, J. (2001). Mutation status of genes encoding RhoA, Rac1, and Cdc42 GTPases in a panel of invasive human colorectal and breast tumors. *J Cancer Res Clin Oncol* 127, 733-738.
- Riley, T., Sontag, E., Chen, P. and Levine, A. (2008). Transcriptional control of human P53-regulated genes. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 9, 402–412.
- Rojas, R., Ruiz, W.G., Leung, S.M., Jou, T.S., and Apodaca, G. (2001). Cdc42-dependent modulation of tight junctions and membrane protein traffic in polarized Madin-Darby canine kidney cells. *Mol Biol Cell* 12, 2257-2274.
- Rouse, J. and Jackson, S. P. (2002) Interfaces between the detection, signalling, and repair of DNA damage. *Science*, 297, 547–551.
- Scharer, O.D. (2013). Nucleotide excision repair in eukaryotes, *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 5 (10), 1-19.
- Schmidt, A., and Hall, A. (2002). Guanine nucleotide exchange factors for Rho GTPases: turning on the switch. *Genes Dev* 16, 1587-1609.
- Seo M., Cho C.H., Lee Y.I., Shin E.Y., Park D., Bae C.D., Lee J.W., Lee E.S., Juhn Y.S. (2004). Cdc42-dependent mediation of UV-induced p38 activation by G protein $\beta\gamma$ -subunits. *J. Biol. Chem.* 279, 17366–17375
- Sharma, P. and Nag, A. (2014). CUL4A ubiquitin ligase: a promising drug target for cancer and other human diseases. *Open Biol.* 4(2), 130217.
- Shiloh, Y. (2003). ATM and related protein kinases: safeguarding genome integrity. *Nature Rev. Cancer* 3, 155–168.
- Spivak, G. (2015). Nucleotide excision repair in humans. *DNA Repair*, 36, 13-18.
- Srougi, M.C., and Burrige, K. (2011). The nuclear guanine nucleotide exchange factors Ect2 and Net1 regulate RhoB-mediated cell death after DNA damage. *PLoS One* 6, e17108.
- Stengel, K., and Zheng, Y. (2011). Cdc42 in oncogenic transformation, invasion, and tumorigenesis. *Cell Signal* 23, 1415-1423.

- Sudhaharan, T., Goh, W.I., Sem, K.P., Lim, K.B., Bu, W., and Ahmed, S. (2011). Rho GTPase Cdc42 is a direct interacting partner of Adenomatous Polyposis Coli protein and can alter its cellular localization. *PLoS One* 6, e16603.
- Suquet, C., and Smerdon, M.J. (1993). UV damage to DNA strongly influences its rotational setting on the histone surface of reconstituted nucleosomes. *J Biol Chem* 268, 23755-23757.
- Tang, Y., Yu, J., and Field, J. (1999). Signals from the Ras, Rac, and Rho GTPases converge on the Pak protein kinase in Rat-1 fibroblasts. *Mol Cell Biol* 19, 1881-1891.
- Teramoto, H., Coso, O.A., Miyata, H., Igishi, T., Miki, T., and Gutkind, J.S. (1996). Signaling from the small GTP-binding proteins Rac1 and Cdc42 to the c-Jun N-terminal kinase/stress-activated protein kinase pathway. A role for mixed lineage kinase 3/protein-tyrosine kinase 1, a novel member of the mixed lineage kinase family. *J Biol Chem* 271, 27225-27228.
- Thomas, A., Giesler, T., and White, E. (2000). P53 mediates bcl-2 phosphorylation and apoptosis via activation of the Cdc42/JNK1 pathway. *Oncogene* 19, 5259-5269.
- Tu, S.S., Wu, W.J., Yang, W., Nalbant, P., Hahn, K., and Cerione, R.A. (2002). Antiapoptotic Cdc42 mutants are potent activators of cellular transformation. *Biochemistry* 41, 12350-12358.
- Vanni, C., Ottaviano, C. Guo, F. Puppo, M. Varesio, L. Zheng, Y. and Eva, A. (2005) Constitutively Active Cdc42 Mutant Confers Growth Disadvantage in Cell Transformation. *Cell Cycle*, 4(11):1675-82
- Wang, H., Zhai, L., Xu, J., Joo, H.Y., Jackson, S., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Xiong, Y., and Zhang, Y. (2006). Histone H3 and H4 ubiquitylation by the CUL4-DDB-ROC1 ubiquitin ligase facilitates cellular response to DNA damage. *Mol Cell* 22, 383-394.
- Wang, J. B., Sonn, R., Tekletsadik, Y. K., Samorodnitsky, D., Osman, M. A. (2009) IQGAP1 regulates cell proliferation through a novel Cdc42-mTOR pathway. *J.CellSci.*122, 2024–2033.
- Wang, L., Yang, L., Debidda, M., Witte, D., and Zheng, Y. (2007). Cdc42 GTPase-activating protein deficiency promotes genomic instability and premature aging-like phenotypes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 1248-1253.
- Williams, C.L. (2003). The polybasic region of Ras and Rho family small GTPases: a regulator of protein interactions and membrane association and a site of nuclear localization signal sequences. *Cell Signal* 15, 1071-1080.
- Wilson, K.F., Wu, W.J., and Cerione, R.A. (2000). Cdc42 stimulates RNA splicing via the S6 kinase and a novel S6 kinase target, the nuclear cap-binding complex. *J Biol Chem* 275, 37307-37310.
- Wodarz A., Nathke I. (2007). Cell polarity in development and cancer. *Nat Cell Biol* 9, 1016–1024.
- Wu, W.J., Tu, S., and Cerione, R.A. (2003). Activated Cdc42 sequesters c-Cbl and prevents EGF receptor degradation. *Cell* 114, 715-725.
- Yaar, M., and Gilchrist, B.A. (2007). Photoageing: mechanism, prevention and therapy. *Br J Dermatol* 157, 874-887.
- Yang, W. (2011). Surviving the sun: repair and bypass of DNA UV lesions. *Protein Sci* 20, 1781-1789.
- Yasuda, S., Taniguchi, H., Ocegüera-Yanez, F., Ando, Y., Watanabe, S., Monypenny, J., and Narumiya, S. (2006). An essential role of Cdc42-like GTPases in mitosis of HeLa cells. *FEBS Lett* 580, 3375-3380.

ANEXO 1

Figura 23 – Imagem de um gel de poliacrilamida utilizado para a quantificação de beads. Podemos observar que as bandas correspondentes a GST apresentam um peso molecular de aproximadamente 25kDa enquanto os beads de GST-Cdc42WT e GST-Cdc42V12 apresentam um peso molecular próximo de 50kDa. Gel de poliacrilamida corado com Coomassie Brilliant Blue R-250(BioRad) e escaneadas no equipamento Odyssey Imager (LICOR).

ANEXO 2

Figura 24 – Desligamento das proteínas dos beads. Após a incubação dos beads com os lisados e as lavagens, os beads foram lavados duas vezes com 50µL de NaCl 1M a fim de se remover o máximo de proteínas sem o desligamento de GST dos beads de glutathione. O gel de 10% de poliacrilamida foi corado com nitrato de prata. Para isso o mesmo foi fixado por 2 horas em solução de etanol (30%) e ácido acético (10%). Por mais 1h30' em solução contendo etanol (30%), glutaraldeído (25%), acetato de sódio (68mg/L) e tiosulfato de sódio (20mg/L). Posteriormente incubamos o gel em nitrato de prata (10mg/L) e formaldeído (0,0002%) por 20 minutos e o revelamos em solução reveladora contendo carbonato de sódio (240mg/L) e formaldeído (0,0001%) , por fim paramos a reação com g/L). Escaneadas no equipamento Odyssey Imager (LICOR).

ANEXO 3

Tabela 11: Proteínas identificadas por espectrometria de massa nos experimentos prévios nas amostras de HeLa K WT, HeLa K V12, HeLa V12 e HeLa 48h V12, excluídas as amostras encontradas em HeLa K GST de todas as outras amostras.

	Gene names	Majority protein IDs	Score	Peptides	Unique peptides	Sequence coverage [%]	KEGG name
1	DDX39A;DDX39B	O00148;Q13838	2,9365	2	2	4,7	RNA transport;Spliceosome
2	ACOT7	O00154	2,2824	1	1	4,5	Biosynthesis of unsaturated fatty acids
3	MYO1C	O00159	1,8089	2	2	3	
4	PSMD11	O00231	15,968	2	2	5,7	Proteasome
5	CLIC1	O00299	15,859	5	5	24,5	
6	EIF1AX;EIF1AY	P47813;O14602	2,3879	1	1	6,9	RNA transport
7	AP3D1	O14617	8,4382	2	2	3,2	Lysosome
8	PDCD5	O14737	2,4071	3	3	30,4	
9	SLC9A3R1	O14745	5,4186	2	2	6,7	
10	TNFRSF10B	O14763	1,1328	1	1	2,4	Apoptosis
11	PSMA7;PSMA8	O14818;Q8TAA3	19,369	7	7	34,7	Proteasome
12	ARPC3	O15145	2,394	2	2	12,4	Regulation of actin cytoskeleton
13	SLC16A3	O15427	4,8674	3	3	7,3	
14	ARPC5	O15511	1,7195	1	1	7,9	Regulation of actin cytoskeleton
15	PHGDH	O43175	30,461	7	7	15,4	Metabolism
16	TPD52L2	O43399	3,7439	3	3	20,2	
17	PPIH	O43447	3,8963	1	1	10,4	Spliceosome
18	LANCL1	O43813	6,6234	3	3	12,5	
19	CALU	O43852	26,906	11	11	38,7	
20	ACSL4;ACSL3	O60488;O95573	5,8874	1	1	2,7	Fatty acid metabolism
21	DIAPH1	O60610	1,6916	1	1	1,2	Focal adhesion;Regulation of actin cytoskeleton
22	PLIN3	O60664	2,3914	2	2	6,4	

23	UGDH	O60701	24,835	8	8	25,1	Metabolism
24	EIF1;EIF1B	P41567;O60739	1,2676	1	1	21,2	RNA transport
25	PDCD6	O75340	5,6523	3	3	18	
26	TBCA	O75347	2,3082	2	2	26,9	
27	CS	O75390	1,0979	1	1	1,9	Metabolism
28	BANF1	O75531	13,378	4	4	50,6	
29	CSDE1	O75534	2,2596	1	1	1,6	
30	EIF3G	O75821	10,182	2	2	6,9	RNA transport
31	IDH1	O75874	48,459	6	6	17,1	Metabolism
32	ATP5H	O75947	3,1624	1	1	12,4	Oxidative phosphorylation
33	ATP5L	O75964	2,5398	2	2	23,3	Oxidative phosphorylation
34	GLRX3	O76003	20,677	9	9	30,4	
35	AHSA1	O95433	2,9477	2	2	11,8	
36	AP2A1	O95782	3,1241	1	1	1,2	Endocytosis
37	PAK4	O96013	21,643	6	6	14,2	Focal adhesion;Regulation of actin cytoskeleton
38	GSR	P00390	3,3857	2	2	6,8	Glutathione metabolism
39	SOD1	P00441	36,165	3	3	53,9	Amyotrophic lateral sclerosis (ALS)
40	PNP	P00491	1,4916	2	2	6,9	Metabolism
41	HPRT1	P00492	8,1675	5	5	27,5	Metabolism
42	GOT2	P00505	39,35	7	7	20,9	Metabolism
43	AK1	P00568	3,0839	3	3	17	Purine metabolism
44	LMNA	P02545	86,233	16	16	34,3	Hypertrophic cardiomyopathy (HCM)
45	FTH1	P02794	1,1154	2	2	9,3	Mineral absorption
46	SEMG1;SEMG2	P04279;Q02383	8,402	1	1	2,7	
47	CAPNS1	P04632	3,1751	2	2	10,4	
48	S100A8	P05109	9,1643	3	3	31,2	
49	SLC25A5;SLC25A6	P05141;P12236	6,2197	5	5	16,8	Calcium signaling pathway
50	ISG15	P05161	5,4713	3	3	25,5	RIG-I-like receptor signaling pathway

51	HMGH2	P05204	3,0976	2	2	30	
52	SSB	P05455	2,7318	2	2	5,6	Systemic lupus erythematosus
53	ITGB1	P05556-	1,9873	3	3	4,6	Pathways in cancer;Regulation of actin cytoskeleton
54	ATP5B	P06576	71,128	15	15	42,7	Oxidative phosphorylation
55	S100A6	P06703	3,0296	2	2	16,7	
56	GPI	P06744	161,05	15	15	33,2	Metabolism
57	TPM3	P06753	98,197	14	9	46,4	Cardiac muscle contraction;Pathways in cancer
58	DBI	P07108	2,4688	3	3	52,9	PPAR signaling pathway
59	P4HB	P07237	103,86	18	18	38,4	Protein processing in endoplasmic reticulum
60	CTSD	P07339	2,9483	2	2	4,6	Lysosome
61	APRT	P07741	5,2529	3	3	21,7	Purine metabolism
62	FH	P07954	1,7778	2	2	5,4	Citrate cycle (TCA cycle);Pathways in cancer
63	CD55	P08174	15,228	2	2	7,4	Complement and coagulation cascades
64	ASNS	P08243	1,0909	1	1	2,7	Metabolism
65	GSTP1	P09211	84,983	10	10	66,2	Metabolism
66	GSTM1	P09488	136,78	16	3	58,3	Metabolism
67	DLD	P09622	1,8383	1	1	2,7	Metabolism
68	SNRPA1	P09661	1,2668	1	1	4,3	Spliceosome
69	PARP1	P09874	72,064	23	23	29,2	Base excision repair
70	TXN	P10599	20,99	6	6	51,4	
71	MTHFD1	P11586	7,8315	5	5	6,7	One carbon pool by folate
72	PCNA	P12004	60,344	5	5	25,3	Base excision repair;Cell cycle;Mismatch repair;Nucleotide excision repair
73	CKB	P12277	26,784	8	8	33,6	Arginine and proline metabolism
74	ANXA3	P12429	17,615	8	8	30	
75	ACTN1	P12814	34,445	21	7	28,4	Adherens junction;Regulation of actin cytoskeleton
76	PDIA4	P13667	13,591	5	5	8,8	Protein processing in endoplasmic reticulum
77	TPT1	P13693	18,031	5	5	30,8	
78	PLS3	P13797	23,593	11	11	22,9	

79	ETFA	P13804	6,82	4	4	19,4	
80	CD59	P13987	3,7695	2	2	15,6	Complement and coagulation cascades
81	MIF	P14174	15,497	2	2	17,4	Metabolism
82	PRKCSH	P14314	16,6	6	6	14,9	Protein processing in endoplasmic reticulum
83	AKR1A1	P14550	1,8698	1	1	3,1	Metabolism
84	SNRPB;SNRPN	P63162;P14678	1,4616	1	1	3,5	Spliceosome
85	AKR1B1	P15121	12,11	8	8	32,3	Metabolism
86	EZR	P15311	48,979	14	5	18,9	Regulation of actin cytoskeleton
87	NME1	P15531	2,67	9	1	65,8	Metabolism
88	NQO1	P15559	6,7569	5	5	24,6	
89	RPA2	P15927	3,2016	2	2	7,4	DNA replication;DNA repair
90	STMN1	P16949	7,476	5	3	33,6	MAPK signaling pathway
91	CTPS1	P17812	4,7217	3	3	6,1	Pyrimidine metabolism
92	PSMC3	P17980	4,3687	3	3	9,3	Proteasome
93	HLA-A;HLA-B;HLA-C	P30457;P30456;P30453, etc.	1,7169	2	2	5,5	Cell adhesion molecules (CAMs);Endocytosis
94	PGAM1	P18669	75,416	12	12	53,5	Metabolism
95	BTF3	P20290	4,2334	2	2	24,1	
96	RAB6A;RAB6B;RAB39A	Q9NRW1;P20340;Q14964	1,9242	1	1	6,3	
97	CAST	P20810	17,663	15	15	28,4	
98	PTMS	P20962	6,57	2	2	22,5	
99	CSRP1	P21291	23,532	7	7	55,4	
100	PAICS	P22234	8,2781	6	6	17,4	Purine metabolism
101	UBA1	P22314	106,91	13	13	16,7	Ubiquitin mediated proteolysis
102	WARS	P23381	1,6765	2	2	5,3	Metabolism
103	AHCY	P23526	15,487	8	8	21,8	Metabolism
104	EIF4B	P23588	7,5073	7	7	12,4	RNA transport
105	EEF1B2	P24534	85,317	4	3	24,4	

106	ACP1	P24666	3,8116	2	2	16,1	Riboflavin metabolism
107	PSMA1	P25786	13,65	4	4	19	Proteasome
108	PSMA3	P25788	5,3703	4	4	18,5	Proteasome
109	PSMA4	P25789	3,2344	2	2	6,9	Proteasome
110	S100P	P25815	29,992	1	1	13,7	
111	MSN	P26038	120,56	31	20	45,9	Regulation of actin cytoskeleton
112	U2AF2	P26368	2,342	2	2	7,2	Spliceosome
113	S100A4	P26447	8,9782	5	5	36,6	
114	VAR5	P26640	2,8788	2	2	2,1	Aminoacyl-tRNA biosynthesis
115	CALML3	P27482	3,3336	2	2	18,8	Calcium signaling pathway;Phosphatidylinositol signaling system
116	APEX1	P27695	4,1714	3	3	13,2	Base excision repair
117	CALR	P27797	50,412	14	14	45,8	Protein processing in endoplasmic reticulum
118	CANX	P27824	18,872	6	6	11,7	Protein processing in endoplasmic reticulum
119	PSMB6	P28072	5,9615	3	3	13	Proteasome
120	PSMB5	P28074	5,2456	5	5	22,4	Proteasome
121	SERPINB3	P29508	27,856	8	2	21,5	Amoebiasis
122	EEF1D	P29692	113,81	8	7	38,1	
123	MARCKS	P29966	3,5178	3	3	13,6	Fc gamma R-mediated phagocytosis
124	ERP29	P30040	12,312	3	3	14,2	Protein processing in endoplasmic reticulum
125	BLVRB	P30043	1,4621	1	1	4,9	Metabolism
126	PRDX5	P30044	5,5919	5	5	42,6	Peroxisome
127	DDT;DDTL	P30046;A6NHG4	7,3982	2	2	20,3	
128	PRDX3	P30048	5,0517	3	3	23,9	
129	PEBP1	P30086	66,764	6	6	47,1	
130	PDIA3	P30101	93,346	21	21	52,5	Protein processing in endoplasmic reticulum
131	LRPAP1	P30533	1,1759	2	2	7,6	
132	SERPINB1	P30740	9,1146	3	3	9,2	Amoebiasis
133	S100A7;S100A7A	P31151;Q86SG5	13,188	3	3	35,6	

134	MAT2A	P31153	17,06	3	3	9,9	Metabolism
135	DNAJA1	P31689	15,346	5	5	28,1	Protein processing in endoplasmic reticulum
136	ATIC	P31939	12,848	9	9	19,9	Metabolism
137	STIP1	P31948	11,751	9	9	19,9	Prion diseases
138	S100A11	P31949	18,956	4	4	34,3	
139	DUT	P33316	17,312	5	5	37,2	Pyrimidine metabolism
140	SHMT2	P34897	13,193	4	4	10,1	Metabolism
141	HSPA4	P34932	71,552	12	11	20,6	Antigen processing and presentation
142	PHB	P35232	2,5868	2	2	10,3	
143	RDX	P35241	5,085	13	2	18,2	Regulation of actin cytoskeleton
144	BSG	P35613	13,559	1	1	8	
145	ATP5C1	P36542	6,3379	2	2	7,4	Oxidative phosphorylation
146	LONP1	P36776	3,3377	2	2	3	
147	SERPINB5	P36952	8,2758	5	5	18,7	p53 signaling pathway
148	TALDO1	P37837	12,097	7	7	22,8	Pentose phosphate pathway
149	ANP32A	P39687	71,079	5	4	21,3	
150	FEN1	P39748	35,292	5	5	19,5	Base excision repair;DNA replication;Non-homologous end-joining
151	CAPG	P40121	7,0914	3	3	10,5	
152	MDH1	P40925	45,378	5	5	27,8	Metabolism
153	GARS	P41250	5,2472	3	3	5	Aminoacyl-tRNA biosynthesis
154	ECI1	P42126	10,001	1	1	4,6	Fatty acid metabolism
155	AKR1C3	P42330	9,1015	4	2	21,4	Metabolism
156	TSFM	P43897	5,774	3	3	17,5	
157	GSTM5	P46439	1,282	9	0	29,4	Metabolism
158	CAPZA2;CAPZA1	P47755;P52907	10,276	2	2	16,3	
159	CAPZB	P47756	3,1336	3	3	11,4	
160	LGALS7	P47929	5,0055	1	1	8,1	
161	SERPINB4	P48594	1,735	7	1	19,2	Amoebiasis

162	CCT5	P48643	19,711	16	16	34,4	
163	MARCKSL1	P49006	2,0618	1	1	6,7	Fc gamma R-mediated phagocytosis
164	TUFM	P49411	17,151	9	9	27,4	Plant-pathogen interaction
165	AARS	P49588	1,8281	1	1	1,5	Aminoacyl-tRNA biosynthesis
166	SARS	P49591	1,3885	1	1	1,8	Aminoacyl-tRNA biosynthesis
167	PSMB3	P49720	3,3456	2	2	11,2	Proteasome
168	ACADVL	P49748	3,6977	2	2	4,9	Fatty acid metabolism
169	TMED10	P49755	1,2573	1	1	5	
170	CRIP1	P50238	2,6806	2	2	22,1	
171	GDI2	P50395	17,169	7	7	26,1	
172	EMD	P50402	2,5385	1	1	4,7	Hypertrophic cardiomyopathy (HCM)
173	SERPINH1	P50454	62,877	14	14	44,7	
174	ST13;ST13P4;ST13P5	P50502;Q8IZP2;Q8NFI4	12,399	6	6	20,3	
175	VASP	P50552	4,816	3	3	6,3	Focal adhesion
176	CCT4	P50991	25,348	7	7	18,1	
177	RAB7A	P51149	95,258	3	3	18,4	Endocytosis
178	SSR4	P51571	8,6637	1	1	6,4	Protein processing in endoplasmic reticulum
179	HDGF	P51858	16,775	10	10	54,2	
180	RAP1GDS1	P52306	61,886	15	15	30,8	
181	ARHGDI A	P52565	93,897	6	6	26	Neurotrophin signaling pathway
182	AKR1C2	P52895	4,0999	4	2	16,4	Steroid hormone biosynthesis
183	ACLY	P53396	77,985	9	9	11	Citrate cycle (TCA cycle)
184	RARS	P54136	4,1339	3	3	4,5	Aminoacyl-tRNA biosynthesis
185	PMS1	P54277	1,2294	2	2	3,1	
186	AK2	P54819	1,4097	1	1	7,7	Purine metabolism
187	PSMD4	P55036	2,2695	1	1	2,7	Proteasome
188	VCP	P55072	70,573	22	22	38,2	Protein processing in endoplasmic reticulum
189	NAP1L1	P55209	53,133	5	4	18,5	

190	TPD52	P55327	6,387	2	2	25,5	
191	NPEPPS	P55786	6,4497	2	2	3	
192	OXCT1;OXCT2	P55809;Q9BYC2	2,416	2	2	4,4	Metabolism
193	ATP5J2	P56134	5,533	1	1	26,5	Oxidative phosphorylation
194	EIF6	P56537	12,017	3	3	22,9	Ribosome biogenesis in eukaryotes
195	TMEM33	P57088	15,107	1	1	4,9	
196	MTPN	P58546	20,607	1	1	14,4	
197	EIF3E	P60228	19,81	1	1	2,5	Hepatitis C;RNA transport
198	SEC61B	P60468	1,7814	1	1	15,6	Protein export;Protein processing in endoplasmic reticulum
199	PSMA6	P60900	14,151	3	3	13,8	Proteasome
200	DSTN	P60981	40,569	4	3	29,1	
201	UBE2M	P61081	1,2649	1	1	5,5	Ubiquitin mediated proteolysis
202	UBE2N;UBE2NL	P61088;Q5JXB2	2,0854	2	2	13,8	Ubiquitin mediated proteolysis
203	ARF3;ARF1	P84077;P61204	42,379	3	3	22,9	Vibrio cholerae infection
204	RHOA;RHOC	P61586;P08134	4,7106	2	2	14	Pathways in cancer;Regulation of actin cytoskeleton
205	HSPE1	P61604	30,663	9	9	76,5	
206	B2M	P61769	4,7161	2	2	26,9	Antigen processing and presentation
207	SUMO2;SUMO4;SUMO3	P61956;Q6EEV6;P55854	10,58	2	2	31	RNA transport
208	PPP1CB;PPP1CA;PPP1CC	P62140;P36873;P62136	4,3312	4	4	15	Regulation of actin cytoskeleton
209	PSMC1	P62191	4,4204	3	3	9,8	Proteasome
210	PSMC5	P62195	3,5058	2	2	6,8	Proteasome
211	SNRPD1	P62314	1,1259	1	1	10,9	Spliceosome
212	SNRPD3	P62318	3,0673	2	2	15,8	Spliceosome
213	TMSB4X	P62328	10,624	3	3	45,5	Regulation of actin cytoskeleton
214	PSMC6	P62333	11,707	3	3	10,3	Proteasome
215	CNBP	P62633	4,2635	3	3	21,8	

216	RAB1A;RAB1B;RAB1C	Q9H0U4;Q92928;P62820	13,104	1	1	11,3	
217	RPS24	P62847	42,696	4	4	30	Ribosome
218	GNB1;GNB4;GNB2;GNB3	Q9HAV0;P62879;P62873;P16520	2,5606	2	2	6	Chemokine signaling pathway
219	FKBP1A	P62942	2,3034	1	1	12	
220	UBA52	P62987	1,2006	4	1	34,4	Ribosome
221	RAC1;RAC3;RAC2	P63000;P60763;P15153	3,4269	3	2	18,2	Pathways in cancer;Regulation of actin cytoskeleton
222	EIF5A;EIF5A2;EIF5A1	P63241;Q9GZV4;Q6IS14	30,555	6	6	48,1	
223	UBE2I	P63279	1,7408	2	2	14,6	RNA transport
224	CSNK2A3;CSNK2A1	Q8NEV1;P68400	1,3407	2	2	7,4	Adherens junction
225	HBA1	P69905	5,6081	3	1	28,2	African trypanosomiasis;Malaria
226	CCT2	P78371	21,811	11	11	32,2	
227	GSTO1	P78417	1,8447	2	2	9,1	Metabolism
228	PRKDC	P78527	23,595	10	10	2,9	Cell cycle;Non-homologous end-joining
229	SPTBN1	Q01082	2,6244	3	3	1,4	
230	SET;SETSIP	Q01105;P0DME0	23,347	5	5	23,8	
231	FABP5	Q01469	50,994	4	4	40,7	PPAR signaling pathway
232	CAP1	Q01518	65,509	7	7	19,6	
233	SLC7A5	Q01650	41,326	2	2	6,3	
234	GSTM4	Q03013	8,1524	13	2	59,5	Metabolism
235	GLO1	Q04760	2,1609	1	1	5,9	Metabolism
236	YWHAH	Q04917	1,7932	5	2	19,9	Cell cycle
237	EEF1A2	Q05639	12,874	11	4	35,6	RNA transport
238	SSRP1	Q08945	3,5054	3	3	4,8	
239	AHNAK	Q09666	18,256	8	8	6,7	
240	AIMP1	Q12904	10,35	4	4	20,5	

241	PAK1	Q13153	2,6738	9	2	19,4	Regulation of actin cytoskeleton
242	CBX3	Q13185	29,859	1	1	7,7	
243	TCOF1	Q13428	7,0649	5	5	4,1	Ribosome biogenesis in eukaryotes
244	PDAP1	Q13442	1,6912	1	1	8,8	
245	TUBB3	Q13509	2,9081	13	1	29,3	Gap junction;Phagosome
246	IQGAP2	Q13576	1,2169	4	1	2	Regulation of actin cytoskeleton
247	SPTAN1	Q13813	4,7526	3	3	1,6	
248	ARHGEF7	Q14155	66,655	15	15	27,2	Regulation of actin cytoskeleton
249	RBM39	Q14498	2,3552	2	2	4,9	
250	GANAB	Q14697	7,8496	4	4	7,2	Protein processing in endoplasmic reticulum
251	LASP1	Q14847	14,175	4	4	17,6	
252	SEPT2	Q15019	4,1108	3	3	15	
253	NCAPD2	Q15021	1,4215	2	2	1,5	Cell cycle - yeast
254	EIF4H	Q15056	4,0713	3	3	21,9	
255	PPA1	Q15181	6,2549	3	3	15,9	Oxidative phosphorylation
256	PTGES3	Q15185	7,9011	2	2	23,1	
257	RCN1	Q15293	2,4684	2	2	11,4	
258	PCBP1	Q15365	15,993	4	3	15,2	Spliceosome
259	SF3A2	Q15428	1,2152	1	1	3	Spliceosome
260	SF1	Q15637	5,2223	2	2	7,1	
261	TRIP10	Q15642	34,381	14	14	38,7	Insulin signaling pathway
262	MAPRE1	Q15691	1,9367	2	2	9,3	
263	SLC1A5	Q15758	5,801	1	1	6,4	Protein digestion and absorption
264	ZYX	Q15942	34,49	3	3	10,3	Focal adhesion
265	SEPT7;SEPT14	Q16181;Q6ZU15	1,6623	2	2	4,4	
266	CDC37	Q16543	3,2978	1	1	5,6	
267	RBBP7;RBBP4	Q16576;Q09028	12,88	6	6	14,4	
268	TXNRD1	Q16881	15,156	8	8	24,8	Metabolism

269	TUBB8	Q3ZCM7	9,1351	10	2	22,7	Gap junction
270	HSP90AB2P	Q58FF8	13,156	10	1	22,6	
271	TMEM41B	Q5BJD5	2,3375	1	1	15	
272	COA6	Q5JTJ3	1,1037	1	1	16,5	
273	FNBP1L	Q5TON5	7,4607	6	6	11,2	
274	GPATCH4	Q5T3I0	1,5337	1	1	3,6	
275		Q5U7I5	2,2712	1	1	8,8	
276	MRM1	Q6IN84	23,016	5	5	20,1	
277	PRPF8	Q6P2Q9	1,6896	2	2	1	Spliceosome
278	TRAF7	Q6Q0C0	5,7808	4	4	8,1	
279	PGAP1	Q75T13	1,8773	1	1	1,3	Glycosylphosphatidylinositol(GPI)-anchor biosynthesis
280	SND1	Q7KZF4	6,9937	4	4	6,2	
281	BZW1	Q7L1Q6	4,4803	3	3	7,1	
282	MYH14	Q7Z406	21,693	7	1	3,7	Tight junction;Viral myocarditis
283	KTN1	Q86UP2	2,8636	1	1	0,9	
284	CAND1	Q86VP6	6,5313	4	4	4,5	
285	TXNDC5	Q8NBS9	15,203	5	5	17	Protein processing in endoplasmic reticulum
286	LSM14A	Q8ND56	1,339	1	1	2,4	
287	PCNP	Q8WW12	2,9849	2	2	15,2	
288	ATXN2L	Q8WWM7	1,4992	1	1	1,8	
289	PALLD	Q8WX93	5,5479	3	3	9,4	
290	DNAJC9	Q8WXX5	5,4623	3	3	12,3	
291	DDX1	Q92499	2,0679	2	2	3,9	
292	HSPH1	Q92598	7,221	7	6	12,4	Protein processing in endoplasmic reticulum
293	TBC1D5	Q92609	1,278	1	1	2,3	
294	GCN1L1	Q92616	7,0635	4	4	2,2	
295	ANP32B	Q92688	3,0838	3	2	20,5	
296	KHSRP	Q92945	4,543	4	4	7,6	

297	STMN2	Q93045	1,5512	3	1	15,1	
298	FUBP1	Q96AE4	12,775	4	4	8,4	
299	CCDC124	Q96CT7	5,3934	3	3	20,2	
300	MASTL	Q96GX5	1,3603	1	1	1,6	
301	PDLIM5	Q96HC4	3,0329	3	3	6,5	
302	C16orf13	Q96S19	6,298	5	5	31,9	
303	PARK7	Q99497	30,69	8	8	56,6	Parkinson's disease
304	S100A13	Q99584	1,8666	2	2	23,5	
305	CCT7	Q99832	96,261	8	8	18	
306	TUBA1C	Q9BQE3	17,381	22	1	55,9	Gap junction
307	TXNDC17	Q9BRA2	1,6588	1	1	8,1	
308	TUBB6	Q9BUF5	95,333	11	3	27,6	Gap junction
309	C9orf142	Q9BUH6	2,5515	2	2	10,3	
310	TMEM109	Q9BVC6	1,3554	1	1	4,9	
311	TMED9	Q9BVK6	13,183	1	1	4,7	
312	SLIRP	Q9GZT3	1,3673	1	1	9,3	
313	SH3BGRL3	Q9H299	2,9862	2	2	19,4	
314	DHX36	Q9H2U1	1,4185	1	1	1,5	RNA degradation
315	BOLA2	Q9H3K6	1,7542	1	1	27,6	
316	TMX1	Q9H3N1	1,6692	1	1	4,3	
317	CDC42EP4	Q9H3Q1	11,255	5	5	18,8	
318	MRPL44	Q9H9J2	2,7655	1	1	3,3	
319	XPO5	Q9HAV4	1,949	1	1	0,8	RNA transport
320	GRPEL1	Q9HAV7	8,358	4	4	22,1	
321	CACYBP	Q9HB71	5,2787	3	3	22,7	Wnt signaling pathway
322	FARSB	Q9NSD9	1,2929	1	1	1,5	Aminoacyl-tRNA biosynthesis
323	TUBA8	Q9NY65	1,1903	14	1	43,3	Metabolism
324	LARS	Q9P2J5	5,8184	1	1	2,5	Metabolism

325	EIF3K	Q9UBQ5	1,2388	1	1	5,2	
326	SRP68	Q9UHB9	1,144	1	1	4,5	Protein export
327	CHORDC1	Q9UHD1	2,6651	2	2	11,2	
328	SEPT9	Q9UHD8	4,8086	3	3	8,1	
329	EIF2B4	Q9UI10	1,3801	1	1	2,7	RNA transport
330	ATPIF1	Q9UII2	3,3562	2	2	17	
331	HN1	Q9UK76	18,827	4	4	37,7	
332	PRPF19	Q9UMS4	1,1802	2	2	7,7	Spliceosome;Ubiquitin mediated proteolysis
333	MAGED2	Q9UNF1	2,32	1	1	3,7	
334	BAIAP2	Q9UQB8	7,4796	4	4	10,7	Regulation of actin cytoskeleton
335	RUVBL1	Q9Y265	8,4923	5	5	17,9	Wnt signaling pathway
336	NUDC	Q9Y266	6,3386	6	6	22,1	
337	DRG1	Q9Y295	1,7138	1	1	3,8	
338	TMA7	Q9Y2S6	1,1473	1	1	14,1	
339	GIT1	Q9Y2X7	10,849	9	7	15,5	Regulation of actin cytoskeleton
340	RTCB	Q9Y3I0	1,2932	2	2	5,9	
341	TLN1	Q9Y490	21,575	13	13	7,3	Focal adhesion
342	TRRAP	Q9Y4A5	1,3413	1	1	0,3	
343	HYOU1	Q9Y4L1	2,1616	2	2	2,9	Protein processing in endoplasmic reticulum
344	SUPT16H	Q9Y5B9	6,3378	2	2	2	
345	TIMM13	Q9Y5L4	1,5963	1	1	11,6	
346	PSAT1	Q9Y617	2,9041	3	3	10,8	Metabolism
347	COPG1;COPG2	Q9Y678;Q9UBF2	3,69	2	2	2,5	
348	BZW2	Q9Y6E2	2,3486	1	1	2,1	

ANEXO 4

Tabela 12: Proteínas identificadas por espectrometria de massa nos experimentos prévios nas amostras de MRC-5 K WT, MRC-5 K V12, MRC-5 5min WT, MRC-5 5min V12 e MRC-5 48h WT, excluídas as amostras encontradas em GST de todas as outras amostras.

	Gene names	Majority protein IDs	Score	Peptides	Unique peptides	Sequence coverage [%]	KEGG name
1	ESYT2	A0FGR8	12,231	2	2	2,9	
2	PDLIM1	O00151	17,024	3	3	10,9	
3	ACOT7	O00154	7,293	1	1	4,5	Biosynthesis of unsaturated fatty acids
4	SAP18	O00422	6,7444	1	1	8,5	mRNA surveillance pathway;RNA transport
5	RTCA	O00442	11,994	2	2	7,7	
6	PDCD5	O14737	32,663	4	4	38,4	
7	TNFRSF10B	O14763	5,966	1	1	2,4	Apoptosis
8	ARPC3	O15145	7,0466	1	1	7,3	Regulation of actin cytoskeleton
9	HMGB3	O15347	6,9028	1	1	6	
10	PPM1G	O15355	6,0116	1	1	2,9	
11	EIF3H	O15372	7,7471	1	1	5,4	Measles;RNA transport
12	EEF1E1	O43324	6,567	1	1	7,2	
13	EPB41L2	O43491	13,058	2	2	4,6	Tight junction
14	NARS	O43776	16,699	2	2	3,5	Aminoacyl-tRNA biosynthesis
15	PRPSAP2	O60256	6,3334	1	1	4,6	
16	KIF5C;KIF5B;KIF5A	O60282;P33176;Q12840	7,2328	1	1	1,8	
17	LYPLA1	O75608	11,557	2	2	11,7	Glycerophospholipid metabolism
18	ARL6IP5	O75915	9,9093	1	1	10,1	
19	TRIO	O75962	6,1285	1	1	0,4	
20	GLRX3	O76003	24,871	4	4	14,9	

21	PAK4	O96013	109,01	13	13	34,7	Axon guidance;Focal adhesion;Regulation of actin cytoskeleton
22	DHFR	P00374	6,2875	1	1	11,9	Folate biosynthesis;One carbon pool by folate
23	PNP	P00491	22,416	3	3	16,3	Purine metabolism;Pyrimidine metabolism
24		Q98776;P03523	7,0414	1	1	0,7	
25	CSTB	P04080	13,326	2	2	24,5	
26	TK1	P04183	6,3088	1	1	6,4	Drug metabolism - other enzymes;Pyrimidine metabolism
27	DBI	P07108	18,082	3	3	50,6	PPAR signaling pathway
28	CAPN1	P07384	12,555	2	2	3,5	Apoptosis;Protein processing in endoplasmic reticulum
29	PDHA1;PDHA2	P08559;P29803	12,771	2	2	5,8	Metabolism
30	DLD	P09622	12,414	2	2	8	Metabolism
31	UCHL1	P09936	18,379	3	3	19,3	Parkinson's disease
32	ESD	P10768	22,916	3	3	13,8	Methane metabolism
33	PDHB	P11177	8,0914	1	1	4,7	Metabolism
34	ANXA3	P12429	8,9865	1	1	5	
35	PEPD	P12955	7,1698	1	1	2,3	
36	PDIA4	P13667	69,006	10	10	22,5	Protein processing in endoplasmic reticulum
37	ETFA	P13804	6,205	1	1	5,6	
38	PRKCSH	P14314	41,949	6	6	13,3	Protein processing in endoplasmic reticulum
39	CCNB1	P14635	11,03	2	2	6,7	Cell cycle;p53 signaling pathway
40	AKR1B1	P15121	7,2825	1	1	3,5	Metabolism
41	RAC1;RAC3;RAC2	P63000;P60763;P15153	6,967	2	1	10,9	MAPK signaling pathway;Regulation of actin cytoskeleton;Wnt signaling pathway
42	NME1	P15531	8,0017	8	1	65,1	Metabolism
43	RPA2	P15927	20,984	3	3	17,8	DNA replication;Homologous recombination;Mismatch repair;Nucleotide excision repair
44	HLA-G	P17693	6,2558	2	1	6,8	Cell adhesion molecules (CAMs);
45	ARF4	P18085	7,4823	3	1	25,6	
46	ATP5J	P18859	7,7856	1	1	13,9	Oxidative phosphorylation

47	SRM	P19623	11,05	2	2	6	Metabolism
48	CSNK2A2	P19784	6,0575	1	1	3,4	Adherens junction;Tight junction;Wnt signaling pathway
49	ANXA7	P20073	12,733	2	2	4,3	
50	RAB6A;RAB6B;RAB39A	Q9NRW1;P20340;Q14964	15,978	2	2	13,1	
51	CAST	P20810	11,228	2	2	3,7	
52		P20889;P20873;P20892;P20875	6,0025	1	1	2,2	
53	COMT	P21964	6,2447	1	1	6,8	Steroid hormone biosynthesis;Tyrosine metabolism
54	GART	P22102	17,856	3	3	4,8	One carbon pool by folate;Purine metabolism
55	TCEA1	P23193	27,931	4	4	15,9	
56	ACAT1	P24752	12,074	2	2	6,8	Metabolism
57	PSMA2	P25787	16,709	3	3	23,1	Proteasome
58	DNMT1	P26358	7,1628	1	1	1,1	Cysteine and methionine metabolism
59	TARS	P26639	24,324	4	4	7,3	Aminoacyl-tRNA biosynthesis
60	PSMB5	P28074	17,584	3	3	12,2	Proteasome
61	GSTM2	P28161	20,037	3	2	18,8	Metabolism
62	LAP3	P28838	29,035	4	4	11,1	Metabolism
63	BLVRB	P30043	13,427	2	2	18,9	Metabolism
64	CMPK1	P30085	13,131	2	2	16,8	Pyrimidine metabolism
65	PEBP1	P30086	46,608	3	3	26,2	
66	NMT1;NMT2	P30419;O60551	14,18	2	2	6,2	
67	SDHA	P31040	6,5379	1	1	2,7	Oxidative phosphorylation
68	MAT2A	P31153	22,368	2	2	10	Cysteine and methionine metabolism
69	DUT	P33316	29,042	4	4	31,1	Pyrimidine metabolism
70	CTNNA1	P35221	6,8284	1	1	2	Adherens junction;Pathways in cancer;Tight junction
71	RDX	P35241	7,5249	9	1	12	Regulation of actin cytoskeleton
72	RPA3	P35244	32,627	5	5	61,2	DNA replication;Homologous recombination;Mismatch repair;Nucleotide excision repair

73	ARL3	P36405	6,4894	1	1	6	
74	GARS	P41250	6,5589	1	1	1,8	Aminoacyl-tRNA biosynthesis
75	MCAM	P43121	5,9852	1	1	2,3	
76	MSH2	P43246	6,1121	1	1	1,6	Colorectal cancer;Mismatch repair;Pathways in cancer
77	TSFM	P43897	15,33	2	2	13,5	
78	CAPZA2	P47755	7,2488	2	1	16,3	
79	ARCN1	P48444	5,9565	1	1	7,8	
80	NASP	P49321	6,549	1	1	2,7	
81	AARS	P49588	6,2931	1	1	2	Aminoacyl-tRNA biosynthesis
82	PSMB3	P49720	6,8266	1	1	7,8	Proteasome
83	METAP2	P50579	8,1226	1	1	5,5	
84	RAB7A	P51149	6,1302	1	1	6,3	Amoebiasis;Endocytosis;Phagosome
85	ARHGDIB	P52566	73,76	6	6	43,3	Neurotrophin signaling pathway;Vasopressin-regulated water reabsorption
86	SMS	P52788	13,393	2	2	9,3	Metabolism
87	BLVRA	P53004	5,9748	1	1	5,7	Porphyrin and chlorophyll metabolism
88	TTC3	P53804	7,0219	1	1	0,6	
89	RAD23B	P54727	15,783	2	2	14,2	Nucleotide excision repair;Protein processing in endoplasmic reticulum
90	AK2	P54819	6,0463	1	1	5,4	Purine metabolism
91	NAPA;NAPB	P54920;Q9H115	26,426	4	4	19,3	
92	EIF5	P55010	19,004	3	3	7,9	RNA transport
93	MANF	P55145	7,2713	1	1	8,2	
94	HNRNPH2	P55795	6,7817	5	1	16,3	
95	TMEM33	P57088	9,1613	1	1	4,9	
96	MTPN	P58546	9,866	1	1	14,4	
97	RAB2A	P61019	7,5961	1	1	7,4	
98	NUTF2	P61970	11,716	2	2	33,9	
99	RAB11A;RAB11B	P62491;Q15907	6,6458	1	1	8,4	Endocytosis;Pancreatic secretion;Vasopressin-regulated

							water reabsorption
100	FKBP1A	P62942	13,8	2	2	25	
101	GRB2	P62993	11,633	2	2	8	Focal adhesion;Gap junction;Pathways in cancer
102	UBE2L3	P68036	14,16	2	2	30,3	Parkinson's disease;Ubiquitin mediated proteolysis
103	GSTO1	P78417	23,633	4	4	17,4	Metabolism
104	MRPS35	P82673	6,6895	1	1	3,1	
105	CBX3;CBX1	Q13185;P83916	14,903	1	1	8,7	
106	FABP5	Q01469	58,227	5	5	47,4	PPAR signaling pathway
107	UBXN1	Q04323	7,8693	1	1	6,4	
108	GLO1	Q04760	14,746	2	2	10,1	Pyruvate metabolism
109	YWHAH	Q04917	6,8314	4	1	16,3	Cell cycle
110	PSME1	Q06323	14,374	2	2	9,2	Proteasome
111	BAX	Q07812	7,7731	1	1	7,9	Apoptosis;p53 signaling pathway;Pathways in cancer
112	KLC1	Q07866	6,2636	1	1	2,4	
113	PPID	Q08752	6,0264	1	1	2,4	Calcium signaling pathway
114	GPS1	Q13098	6,5204	1	1	2,3	
115	MTAP	Q13126	8,4061	1	1	7,5	Cysteine and methionine metabolism
116	PAK1	Q13153	65,101	16	9	36,9	Focal adhesion;Regulation of actin cytoskeleton
117	PAK2	Q13177	225,56	23	15	54,4	Axon guidance;Regulation of actin cytoskeleton
118	TRIM28	Q13263	12,768	2	2	3,7	
119	UBE2V1;UBE2V2	Q13404;Q15819	18,036	3	3	24,5	
120	PDAP1	Q13442	7,9177	1	1	8,8	
121	CAMK2B;CAMK2A;CAMK2D	Q13554;Q9UQM7;Q13557	6,756	1	1	2,4	Calcium signaling pathway;Wnt signaling pathway
122	SEPT6;SEPT11	Q14141;Q9NVA2	6,2475	1	1	4,1	
123	ARHGEF7	Q14155	56,43	9	9	16,7	Regulation of actin cytoskeleton
124	UBAP2L	Q14157	6,7182	1	1	1,1	
125	COG2	Q14746	6,8665	1	1	1,8	
126	EIF4H	Q15056	13,312	2	2	15,8	

127	PAFAH1B3	Q15102	6,0431	1	1	3,9	Ether lipid metabolism
128	SF3A1	Q15459	6,2385	1	1	1,6	Spliceosome
129	TRIP10	Q15642	90,107	13	13	29	Insulin signaling pathway
130	ZYX	Q15942	7,2563	1	1	2,7	Focal adhesion
131	CDC37	Q16543	14,054	2	2	10,1	
132	DPYSL2	Q16555	18,538	3	3	6,5	Axon guidance
133	NUP188	Q5SRE5	12,542	2	2	1,6	RNA transport
134	FNBP1L	Q5TON5	12,878	2	2	3,8	
135		Q5U7I5	8,3882	1	1	8,8	
136	ATL3	Q6DD88	11,818	2	2	5,5	
137	TWF2	Q6IBS0	6,7521	1	1	4,9	
138	CLASP1;CLASP2	Q7Z460;O75122	12,552	2	2	1,7	
139	CCAR2	Q8N163	6,9749	1	1	1,5	
140	NPLOC4	Q8TAT6	7,8174	1	1	3	Protein processing in endoplasmic reticulum
141	IPO4	Q8TEX9	6,1471	1	1	1	
142	OSTF1	Q92882	6,7339	1	1	5,6	
143	USP9X	Q93008	6,2636	1	1	0,5	
144	TCEAL3	Q969E4	6,2578	1	1	12	
145	S100A16	Q96FQ6	6,1983	1	1	10,7	
146	HSD17B10	Q99714	14,144	2	2	17,1	Valine, leucine and isoleucine degradation
147	GRWD1	Q9BQ67	7,0024	1	1	3,6	
148	TXNDC17	Q9BRA2	13,021	2	2	19,5	
149	ERP44	Q9BS26	16,28	2	2	8,6	
150	ANP32E	Q9BTT0	5,948	1	1	8,6	
151	ADI1	Q9BV57	11,462	2	2	11,7	Cysteine and methionine metabolism
152		Q9DSQ0	6,2962	1	1	1	
153	SH3BGRL3	Q9H299	12,363	2	2	31,2	
154	CDC42EP4	Q9H3Q1	21,667	3	3	18,5	

155	HN1L	Q9H910	6,1801	1	1	8	
156	XPO5	Q9HAV4	14,344	2	2	2,1	RNA transport
157	GRPEL1	Q9HAV7	13,769	2	2	10,1	
158	C12orf10	Q9HB07	6,3624	1	1	2,7	
159	CACYBP	Q9HB71	60,706	9	9	60	Wnt signaling pathway
160	OLA1	Q9NTK5	12,057	2	2	6,1	
161	GIMAP4	Q9NUV9	6,1139	1	1	2,1	
162	PARVA	Q9NVD7	12,535	2	2	15,4	Focal adhesion
163	UGGT1	Q9NYU2	6,3109	1	1	0,9	Protein processing in endoplasmic reticulum
164	LMCD1	Q9NZU5	6,5228	1	1	3,8	
165	ABRACL	Q9P1F3	6,0542	1	1	16	
166	SAE1	Q9UBE0	6,2402	1	1	8,3	Ubiquitin mediated proteolysis
167	DNAJB4	Q9UDY4	6,8251	2	1	8,9	
168	LIMA1	Q9UHB6	11,798	2	2	7	
169	TAGLN3	Q9UI15	19,196	2	1	14,1	
170	TRMT112	Q9UI30	13,907	2	2	22,4	
171	STOML2	Q9UJZ1	6,0267	1	1	4,8	
172	NUDT5	Q9UKK9	11,68	2	2	10	Purine metabolism
173	CDV3	Q9UKY7	11,038	1	1	20,9	
174	NSFL1C	Q9UNZ2	12,394	2	2	12	Protein processing in endoplasmic reticulum
175	C14orf166	Q9Y224	13,501	2	2	11,9	
176	CFL2	Q9Y281	17,237	6	2	46,3	Regulation of actin cytoskeleton
177	CARHSP1	Q9Y2V2	6,4428	1	1	10,9	
178	PRRC2C	Q9Y520	6,0228	1	1	0,6	