Universidade Federal do Rio de Janeiro
Instituto de Química
Programa de Pós-Graduação em Bioquímica (PPGBq)

JIMMY ESNEIDER RODRIGUEZ MURILLO

ANÁLISE PROTEÔMICA QUANTITATIVA APLICADA A MODELOS CELULARES *IN VITRO* DE DIFERENCIAÇÃO NEURONAL

Rio de Janeiro – RJ
Fevereiro de 2017

JIMMY ESNEIDER RODRIGUEZ MURILLO

ANÁLISE PROTEÔMICA QUANTITATIVA APLICADA A MODELOS CELULARES *IN VITRO* DE DIFERENCIAÇÃO NEURONAL

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica do Instituto de Química da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor em Ciências (Bioquímica).

Orientadores: Dr. Magno Rodrigues Junqueira
Dr. Gilberto Barbosa Domont

Rio de Janeiro – RJ
Fevereiro de 2017

CIP - Catalogação na Publicação

M977a

Murillo, Jimmy Esneider Rodriguez
Análise proteômica quantitativa aplicada a modelos celulares in vitro de diferenciação neuronal / Jimmy Esneider Rodriguez Murillo. -- Rio de Janeiro, 2017.
155 f.

Orientador: Magno Rodrigues Junqueira.
Coorientador: Gilberto Barbosa Domont.
Tese (doutorado) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Química, Programa de Pós Graduação em Bioquímica, 2017.

1. Diferenciação neuronal. 2. iTRAQ. 3. Fosfoproteoma. 4. Células SH-SY5Y. 5. Neuroesferas. I. Junqueira, Magno Rodrigues, orient. II. Domont, Gilberto Barbosa, coorient. III. Título.

Elaborado pelo Sistema de Geração Automática da UFRJ com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

ANÁLISE PROTEÔMICA QUANTITATIVA APLICADA A MODELOS CELULARES *IN VITRO* DE DIFERENCIAÇÃO NEURONAL

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Bioquímica do Instituto de Química da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de doutor em Ciências (Bioquímica).

Aprovado em 9 de fevereiro de 2017

COMISSÃO EXAMINADORA

Magno R Junqueira

Magno Junqueira, IQ-DBQ/UFRJ, Presidente

Dário Eluan Kalume, FIOCRUZ/RJ

Leila M. Lopes Bezerra, UERJ

Luciana Pizzatti Barboza, IQ-DBQ/UFRJ

Elis Cristina Araújo Eleutherio, IQ-DBQ/UFRJ

Ao Brasil, ao Rio, maravilhosas joias de sonhos,
amor e gentileza.

AGRADECIMENTOS

À Aquela Força que conspira para viver, respirar, amar, sentir e chorar; Deus, Altíssimo ou como seja que Ele se chame. OBRIGADO.

À minha família e seu incondicional apoio, aos meus pais, irmãos, Manuela e meus cunhados, obrigado por terem presente meu nome em suas orações e pela força em todos esses anos.

Ao amor da minha vida, meu esposo que trouxe alegria, paz e muito AMOR, você Edson que me apoiou sempre, obrigado pelo enorme carinho e pela possibilidade de escrever esta história de amor com você.

Aos meus orientadores, professores Magno Junqueira e Gilberto B Domont, mais que agradecer pela oportunidade de trabalhar com vocês, agradeço por crerem em mim incondicionalmente sem importar as diferenças e as dificuldades.

Às minhas irmãs *caribeñas* Sheila López e Erika Velásquez, obrigado pela sua amizade, por tanto amor e pela força nos momentos mais difíceis nesses anos, vocês são amizades para a vida inteira.

Aos professores Fábio Nogueira (IQ-DBQ/UFRJ) e Paulo Carvalho (FIOCRUZ-PR) pelos ensinamentos, contribuições, ideias e confiança.

Ao meu grande amigo cubano Aniel Sánchez, não tenho como agradecer tantas contribuições, ensinamentos, paciência e por sobre tudo, a grande amizade.

À Dra. Lívia Goto pelo apoio e assessoria constante no trabalho do laboratório.

Aos integrantes e amigos da Unidade Proteômica – IQ/UFRJ, Gabriel Duarte, Nina Daddario, Priscila Aquino, Lívia Zamagna, Isabel Queiroz e Rafael Melani, obrigado por tantas experiências, colaborações, risos e ensinamentos.

Ao Diogo Borges, pela sua amizade e apoio constante durante esses anos.

À Indira Plá pela amizade, apoio e colaboração neste projeto.

Ao meu amigo Fabiano Teixeira pela amizade, os risos e as constantes palavras de apoio e força.

Ao Andrés Rodriguez e à Mónica Losada pela grande ajuda no começo da minha estadia no Rio de Janeiro e por me acompanhar neste processo.

Às minhas amigas da Colômbia Jessica Orrego e Paola Pulido por me acompanhar e me aconselhar constantemente, mesmo na distância.

Aos amigos Marcelo Quental e Roberta Barcellos pela grande ajuda durante meu processo de operação.

Ao Laboratório de Toxinologia do Instituto Oswaldo Cruz por permitir o acesso aos seus espectrómetros de massas.

Ao Laboratório de Apoio ao Desenvolvimento Tecnológico (LADETEC) IQ/UFRJ por permitir o acesso aos seus espectrómetros de massas.

Aos integrantes do Laboratório de Microbiologia Molecular e Proteínas – LaMMP, do Laboratório de Investigações de Fatores de Estresse – LIFE e do Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular de Vetores (LBBMV) pela constante ajuda com materiais, equipamentos e infraestrutura.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de estudos concedida durante os dois primeiros anos do doutorado.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ) pela bolsa de estudos concedida nos últimos dois anos do doutorado no programa Estudante Nota 10.

Aos integrantes da banca da defesa pela disposição, ideias e contribuições.

Ao corpo de professores e trabalhadores administrativos do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica (PPGBq) da UFRJ e, especialmente à professora Denise Guimarães pela colaboração prestada durante esses anos.

Por fim, a todos aqueles que contribuíram direta ou indiretamente na realização deste trabalho.

“Nossas crenças se transformam em pensamentos, os pensamentos em palavras, as palavras se tornam ações e estas ações repetidas se tornam hábitos. E estes hábitos formam nossos valores e nossos valores determinam nosso destino”

Mahatma Gandhi

RESUMO

MURILLO, Jimmy Esneider Rodriguez. Análise proteômica quantitativa aplicada a modelos celulares *in vitro* de diferenciação neuronal. Tese (Doutorado em Bioquímica) – Instituto de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2017.

A diferenciação neuronal é um processo celular altamente complexo e regulado. Diversos modelos de cultura celular *in vitro* permitem simplificar essa complexidade com o objetivo de estudar a função de proteínas ou das vias de sinalização específicas envolvidas nesse processo. Com o avanço significativo das técnicas de quantificação em larga escala e dos espectrômetros de massas, hoje é possível comparar os perfis proteômicos destas células em múltiplas fases de diferenciação e avaliar o impacto das modificações pos-traducionais nestes fenômenos. Neste trabalho, é proposta uma metodologia integrativa de quantificação por iTRAQ (marcadores isóbaros para quantificação relativa e absoluta), enriquecimento de fosfopeptideos e fracionamento por cromatografia de interação hidrofílica que é aplicada à análise da diferenciação neuronal em dois modelos celulares *in vitro*: células de neuroblastoma humano SH-SY5Y e células tronco neuronais cultivadas em neuroesferas. A diferenciação das células SH-SY5Y com ácido retinóico e com o fator neurotrófico derivado de cérebro permitiu identificar mais de 5500 proteínas combinando o proteoma total junto com o fosfoproteoma. Destas proteínas, 366 mostraram regulação envolvida com a interação com a matriz extracelular, apoptose e organização do citoesqueleto, processos vitais na migração neuronal, orientação dos axônios e sinapses mostrando o potencial das células como modelo neuronal. Destacaram-se proteínas como a catenina δ, a elastina de interfase microfibrilar, a agrina, o fator indutor de apoptose mitocondrial, a proteína de sobrevivência de motoneurônios e a estatmina 1 que podem ser aprofundadas em futuras pesquisas. Por outro lado, na diferenciação das neuroesferas com os suplementos B27 e N2 foram identificadas quase 7000 proteínas das quais 1048 sofreram regulação, uma parte significativa esteve relacionada com proteínas de adesão celular e interações célula-célula refletindo a natureza deste tipo de cultura, proteínas como o proteoglicano NCAN, a molécula de adesão celular L1, a neurexina e a neuroligina podem ser consideradas como alvos importantes no desenvolvimento de neurônios, como complemento, proteínas como a sinaptotagmina, sinapsina e ROBO1/2 também foram reguladas mostrando a diversidade de eventos que podem ser analisados na diferenciação das neuroesferas. Algumas das proteínas discutidas aqui têm relação direta com desordens neurológicas que mostra o potencial das neuroesferas na caracterização de proteínas que afetam o desenvolvimento de neurônios e que contribuem ao fenótipo dessas doenças. Os resultados proteômicos obtidos a partir de ambos tipos celulares foram complementares e constituem uma fonte de informação valiosa para os futuros estudos de neurobiologia e neuroproteômica.

Palavras-chave: diferenciação neuronal, iTRAQ, fosfoproteoma, células SH-SY5Y, neuroesferas.

ABSTRACT

MURILLO, Jimmy Esneider Rodriguez. Quantitative proteomic analysis applied to *in vitro* cell models of neuronal differentiation. Análise proteômica quantitativa aplicada a modelos celulares *in vitro* de diferenciação neuronal. Tese (Doutorado em Bioquímica) – Instituto de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2017.

Neuronal differentiation is a highly complex and regulated cellular process. The diversity of *in vitro* cellular models allows to considerably simplify this complexity aiming to study functions of specific proteins or pathways involved in this process. With the advance in large-scale quantification protocols and mass spectrometry, it is possible to compare proteomic profiles of those cells in multiple differentiation phases and evaluate the impact of post-translational modification in this kind of processes. In this work we propose an integrative pipeline of isobaric tags for relative and absolute quantification (iTRAQ), phosphopeptide enrichment and off line hydrophilic chromatography fractionation to analyze neuronal differentiation in two cellular *in vitro* models: human neuroblastoma SH-SY5Y cells and neural stem cells cultured as neurospheres. Retinoic acid and brain-derived neurotrophic factor-based SH-SY5Y cell differentiation led us to identify more than 5500 proteins by combining total proteome and phosphoproteome, 366 showing regulation involved in extracellular matrix interaction, apoptosis and cytoskeleton organization, relevant processes in neuronal migration, axon guidance and synapses confirming the potential of neuroblastoma cells as neuron-like model. We highlight proteins like d-catenin, elastin microfibril interfacer 1, agrin, mitochondrial apoptosis induction factor, survival of motor neuron protein 1 and stathmin 1 that might be considered in future research. On the other hand, neurosphere differentiation with B27 and N2 supplements rendered almost 7000 proteins, 1048 regulated. A significant part of upregulated proteins was related to cellular adhesion and cell-cell interactions reflecting the nature of neuroespheres, proteins like proteoglycan NCAN, cellular adhesion molecule L1, neurexin and neuroligin could be considered important targets in neuronal development, as complement, synaptotagmin, synapsin and Roundabout homolog 1/2 proteins were also regulated showing the diversity of events that could be explored in neurosphere differentiation. Some proteins discussed here are strongly related with some neurological disorders, demonstrating the potential of neurospheres in characterization of proteins involved in malfunctions of neuronal development and their contribution in this kind of diseases. Proteomic data from two types of cells were complementary and constitute a source of useful information for future research in neurobiology and neuroproteomics.

Keywords: neuronal differentiation, iTRAQ, phosphoproteome, SH-SY5Y cells, neurospheres.

SUMÁRIO

ABREVIAÇÕES, SÍMBOLOS E UNIDADES

2D	Bidimensional
3D	Tridimensional
AC	Corrente alternada, do inglês, *Alternating Current*
ACN	Acetonitrila
AGRN	Agrina
AIFM1	Do inglês, *Apoptosis Inducing Factor, Mitochondria Associated 1*
APP	Proteína precursora β-amilóide
AR	Ácido retinóico
ASD	Desordens do espectro autista, do inglês, *Autism Spectrum Disorder*
BDNF	Fator neurotrófico derivado de cérebro, do inglês *Brain-derived neurotrophic fator*
bFGF	Fator de crescimento de fibroblastos básico
BMP	Proteína morfogenética óssea, do inglês *Bone morphogenetic protein*
CAD	Dissociação induzida por colisão, do inglês, *Collisionally Activated Dissociation*
CaMK2	Cinase dependente de calmodulina 2, do inglês, *Calmodulin-dependent protein kinase II*
cAMP	AMP cíclico
CAMs	Moléculas de adesão celular, do inglês *Cell Adhesion Molecules*
Cbl-b	Casitas B-lineage lymphoma
CDH2	Caderina 2
CDK2	Ciclina cinase 2, do inglês, *ciclin-dependent kinase 2*
Cdks	Cinases dependentes de ciclinas, do inglês, *Ciclin-dependent kinase*s
CK2	Caseína cinase 2, do inglês, *casein kinase 2*
CNTN2	Contactina 2
COL3A1	Colágeno
CRABP2	Proteína de união a AR 2, do inglês, *Cellular retinoic acid binding protein 2*
CTNND1	Catenina δ
CV	Coeficiente de variação
Da	Dalton

DC	Corrente contínua, do inglês, *Direct Current*
DDA	aquisição dependente dos dados, do inglês, *data dependent acquisition*
DG	Circunvolução dentada
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's médium
DRG	Gânglio da raiz dorsal
ECD	Dissociação por Captura de Elétrons, do inglês, *Electron Capture Dissociation*
ECL	Quimioluminiscencia, do inglês,*enhanced chemiluminescence*
ECM	Matriz extracelular, do inglês, *Extracellular matrix*
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético, do inglés, Ethylenediamine tetraacetic acid
EEFK2	Cinase do fator de elongação 2, do inglês, *Elongation Factor Kinase 2*
EGF	Fator de crescimento epidermal, do inglês *Epidermal Growth Factor*
EMILIN-1	Do inglês, *Elastin Microfibrils Interface Located proteINs*
ERK	Receptor cinase extracelular, do inglés, *Extracellular Receptor Kinase*
ESI	Ionização por eletrospray, do inglês, *Electospray Ionization*
ETD	Dissociação por Transferência de Elétrons, do inglês, *Electron Transfer Dissociation*
FA	Ácido Fórmico, do inglês, *Formic Acid*
FAK	Cinase de adesão focal, do inglês *Focal Adhesion Kinase*
FDR	False Discovery Rate
FGF2	Fator de crescimento de fibroblastos 2, do inglês *Fibroblast Growth Factor 2*
FT-ICR	Ressonância ciclotrônica de íons, transformada de Fourier, do inglês, *Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance*
GDNF	Fator neurotrófico dependente de glia, do inglês, *Glial-derived neurotrophic fator*
GFAP	Proteína glial fibrilar acidica, do inglês*, Glial Fibrillary Acidic Protein*
GO	Gene Ontology
GRK	Receptor cinase acoplado à proteína G, do inglês, *G protein-coupled receptor kinases*
HCD	Dissociação de colisão por alta energia, do inglês, *High Energy Collision Dissociation*
HEPES	Do inglês, 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid

HILIC	Cromatografia de interação hidrofílica, do inglês, *Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography*
HRP	Peroxidase de rábano, do inglês, *horseradish peroxidase*
HT	Tirosina hidroxilase, do inglês, Hydroxylase tyrosine
IDOR	Instituto D'Or de Ensino e Pesquisa
IMAC	cromatografia de afinidade por metal imobilizado, do inglês, *Immobilized Metal Affinity Chromatography*
IP3	Inositol tri fosfato
iPSCs	Células tronco pluripotentes induzíveis, do inglês, *induced Pluripotent Stem Cells*
ITGA1	Integrina $\alpha 1$
ITGB1	Integrina $\beta 1$
ITGB2	Integrina $\beta 2$
iTRAQ	Marcadores isobáricos de quantificação absoluta e relativa, do inglés, *Isobaric Tags for Relative and Absolute Quantification*
K	Lisina
KCl	Cloreto de potássio
KH_2PO_4	Dihidrogenofosfato de potássio
L1CAM	Molécula de adesão celular L1, do inglês, *L1 Cellular Adhesion Molecule*
LAMA	Laminina
LC	Cromatografia líquida, do inglês, *Liquid Chromatography*
LC-MS/MS	Cromatografia líquida associada à espectrometria de massas
LIT	Armadilha de íons linear, do inglês, *Linear Ion Trap*
LTQ	Armadilha de quadrupolo linear, do inglês, *Linear Trap Quadrupole*
m/z	Relação massa – carga
MALDI	Ionização e dessorção a laser assistido por matriz, do inglês, *Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization*
MAP2	Molécula de associação aos microtúbulos 2, do inglês, *Microtubule-associated protein 2*
MAPK	Proteinas cinases ativadas por mitógenos, do inglés, *Mitogen Activated Protein Kinases*
MAPT	Proteína Tau
MARCKS	Do inglês, *Myristoylated Alanine-Rich C-Kinase Substrate*

MS	Espectrometría de massas, do inglês, *Mass Spectrometry*
MS/MS	Espectrometria de massas sequencial ou em tandem
MSA	Multi Stage Activation
MudPIT	Tecnologia multidimensional de identificação de proteínas, do inglês, *Multidimensional Protein Identification Technology*
Na_2HPO_4	Fosfato dissódico
NaCl	Cloreto de sódio
NCAM	Molécula neural de adesão celular, do inglês, *Neural cell adhesion molecule*
NCAN	Neurocan
NCE	Energia de colisão normalizada, do inglês, *Normalized Collision Energy*
NDMA	N-metil D-Aspartato
NEFL	Proteína de neurofilamento leve
NEFM	Proteína de neurofilamento médio
NES	Nestina
NeuN	Neural Nuclei
NGF	Factor de crescimento de nervos, do inglês, *Nerve Growth Factor*
NH_4OH	Hidróxido de amônia
NHS	N-hidroxi succinimida
nLC	Nanocromatografia líquida, do inglês, *nano-Liquid Chromatography*
NLGN	Neuroligina
NRXN1	Neurexina
NSCs	Células tronco neuronais, do inglés *Neural Stem Cells*
NSE	Enolase específica de neurônios, do inglês, *Neural specific enolase*
PBS	Tampão de fosfato salino, do inglés, *Phosphate saline buffer*
PI3K	Fostatidilinositol 3 cinase, do inglés, *Phosphatidylinositol 3 kinase*
PKA	Proteína cinase A
PKC	Proteína cinase C
PKCa	Proteina cinase C alpha
PLC	Fosfolipase C, do inglês, *Phospholipase C*
PMSF	Do inglês, Phenylmethane Sulfonyl Fluoride
PRKACB	Proteína cinase A
PRKCG	Proteína cinase Cγ, do inglês, *Protein Kinase C Gamma*
PSM	Peptide Spectrum Match

PTMs	Modificações pós-traducionais, do inglês, *Post-translational modifications*
R	Arginina
RAR	Receptor de ácido retinóico
RARE	Elementos de união dos receptores de ácido retinóico, do inglês, R*etinoic Acid Receptor Elements*
RF	Radiofrequência
ROBO	Roundabout homologo
RPC	Cromatografia em fase reversa, do inglês, *Reverse Phase Chromatography*
SCX	Cromatografia de troca catiônica, do inglês, *Strong Cation Exchange*
SDC	Syndecan -1
SDS	Sodium dodecyl sulfate
SFB	Soro fetal bovino
SILAC	Incorporação metabólica da marcação isotópica, do inglês, *Stable isotope labeling with amino acids in cell culture*
SIMAC	Eluição sequencial do IMAC, do inglês, *Sequential Elution from IMAC*
SMN1	Do inglês, *Survival motor neuron 1*
SNARE	Do inglês, *soluble NSF attachment receptor*
SNC	Sistema nervoso central
SNCA	α-sinucleína
SRM	Do inglês, *Single Reaction Monitoring*
STAT	Sinalizador transdutor e ativador da transcrição
STMN1	Estatmina 1, do inglês, *Stathmin 1*
SVZ	Zona subventricular, do inglês, *Subventricular Zone*
SYN1	Sinapsina
SYT1	Sinaptotagmina
TFA	Ácido trifluoro acético, do inglês, *Trifluoroacetic acid*
TFGs	Fatores tróficos transformantes, do inglês, *Trophic transforming factors*
TiSH	TiO_2-SIMAC-HILIC
TMT	Do inglês, *Tandem Mass Tag*
TNC	Tenascina C
TOF	Tempo de voo, do inglês, *Time of Flight*
Trk	Receptor de tropomiosina cinase, do inglês, *Tyrosine receptor kinase*

TrkB	Receptor de tropomiosina cinase B, do inglês, *Tropomyosin receptor kinase B*
VCAN	Versican
XIC	Cromatograma extraído de íons, do inglés, *Extracted Ion Chromatogram*

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO I

INTRODUÇÃO: DIFERENCIAÇÃO CELULAR EM NEURÔNIOS E MODELOS DE ESTUDO

1.1 Diferenciação celular em neurônios

A diferenciação celular é um processo no qual as células sofrem modificações na expressão gênica de forma ordenada para adquirir uma morfologia, função e propriedades bioquímicas específicas distinguíveis de outro tipo de células do organismo (LENT, 2002; O'CONNOR; ADAMS, 2010). Os neurônios são um claro exemplo deste tipo de especialização, visto que durante o desenvolvimento neuronal destacam-se como etapas de grande relevância, a determinação da identidade neural do ectoderma, a proliferação celular controlada, a migração de células jovens para formar diferentes regiões do sistema nervoso central (SNC), a diferenciação/maturação (aquisição das propriedades de células especializadas), a formação de circuitos neuronais e a eliminação programada de células. Particularmente, na etapa de diferenciação, é requerida a síntese de moléculas difusíveis e ativação dos seus receptores, ativação de sinais de transdução que influenciam a expressão gênica (geralmente com fatores de transcrição), expressão de segmentos gênicos para síntese de proteínas específicas de cada tipo celular e a comunicação célula – célula. Esses processos se refletem no desenvolvimento do sistema nervoso central onde cada neurônio deve conseguir um volume, prolongamento dendrítico e emissão do axônio para encontrar os parceiros sinápticos apropriados, assim como sintetizar moléculas que garantem a função neuronal madura (enzimas de metabolismo de neurotransmisores, neuromoduladores, canais iônicos, entre outros) e estabelecer sinais elétricos para receber e transmitir informações (LENT, 2002; SANTIAGO; BASHAW, 2014).

1.1.1 Proteínas e mecanismos envolvidos na diferenciação neuronal

Os estudos da embriogênese e o uso de células-tronco neurais multipotentes (neural stem cells - NSCs) consideram-se a base para entender o desenvolvimento de neurônios e suas interações. As NSCs são responsáveis por gerar células do sistema nervoso, como os neurônios e as células gliais (astrócitos e oligodendrócitos) (GAGE, 2000; GÖTZ; HUTTNER, 2005). Elas são susceptíveis à diferenciação pela ação de fatores mitogênicos que substituem o fator de crescimento de fibroblastos 2 e o fator de crescimento epidermal (FGF2/EGF) (WICHTERLE et al., 2002), assim, os estágios de diferenciação são controlados pelas cascatas de sinalização intracelulares, que geralmente iniciam nos receptores integrais de membrana desses fatores (MELO-BRAGA et al., 2015).

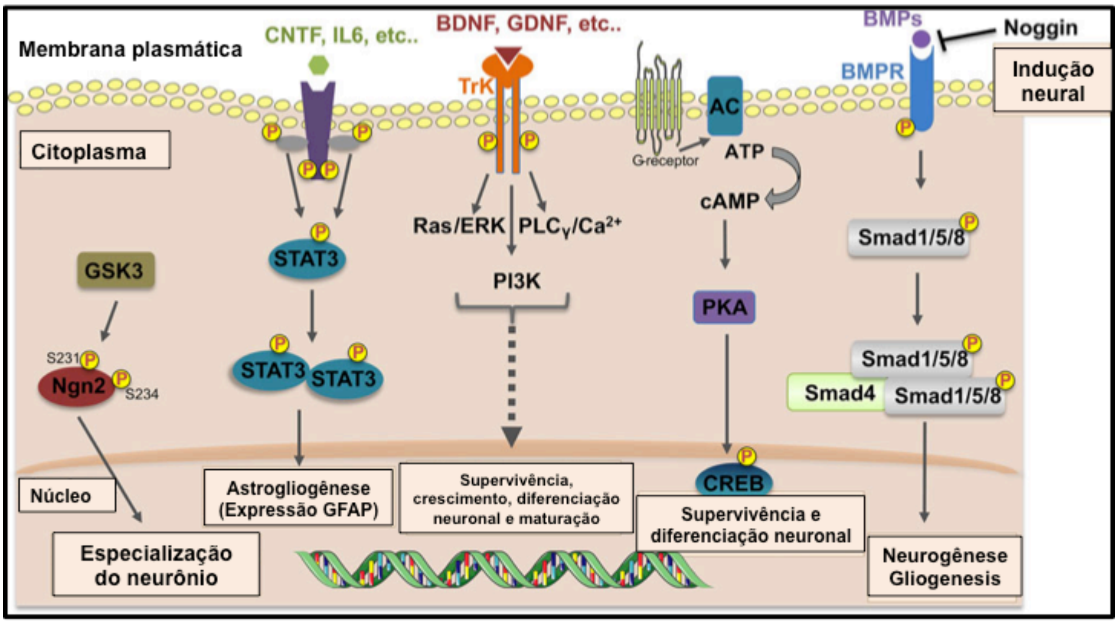


Figura 1. Breve descrição de alguns eventos de sinalização responsáveis da diferenciação celular em neurônios. Ngn2: neurogenina 2, CNTF: fator neurotófico ciliar, IL6: interleucina 6, STAT: transdutores e ativadores da transcrição, BDNF: fator neurotrófico derivado de cérebro, GDNF: fator neurotrífico derivado de glia, TrK: receptor de tropomiosina, AC: adenilato ciclase, ATP: adenosina trifosfato, cAMP: AMP cíclico, PKA: proteína cinase A, CREB: fator de transcrição de resposta aos elementos de cAMP, BMP: proteína morfogenética óssea, BMPR: receptor da proteína morfogenética óssea; os eventos de fosforilação estão marcados em amarelo (Figura adaptada de MELO-BRAGA et al., 2015).

A complexidade da diferenciação e desenvolvimento de células neuronais associa-se com as proteínas morfogenéticas ósseas (bone morphogenetic protein - BMP) da família de fatores tróficos transformantes (TFGs), via de sinalização Wnt, SHH (diferenciação de motoneurônios e interneurônios), FGF e ácido retinóico (AR) durante as etapas de formação da placa neural e tubo neural, estruturas que dão origem ao cérebro e medula espinhal (LENT, 2002) (Figura 1). A sinalização das BMPs ocorre pela ação dos receptores serina/treonina cinase que fosforilam SMAD1, SMAD5 e SMAD8 e ativam complexos citoplasmáticos com SMAD4, que são translocados ao núcleo para estimular a expressão de diversos genes (MELO-BRAGA et al., 2015). Outros tipos de receptores associados à diferenciação são os receptores de interleucinas e fatores de crescimento que fosforilam as proteínas STAT3 e ativam a expressão de marcadores de desenvolvimento de astrócitos (WEI et al., 2014) e os receptores tirosina cinase (Trk) que reconhecem os fatores neurotróficos BDNF (brain-derived neurotrophic factor) e GDNF (glial-derived neurotrophic fator), que, por sua vez, induzem cinases reguladas por sinais extracelulares (Ras/ERK), fostatidilinositol 3 cinase (PI3K) e fosfolipase C dependente de cálcio ($PLC\gamma/Ca^{2+}$) promovendo sobrevivência, atividade sináptica e desenvolvimento neuronal (AIRAKSINEN; SAARMA, 2002). Por outro lado, encontra-se também o sinalizador intracelular cAMP (AMP cíclico) que, uma vez sintetizado pela ativação dos receptores G, é capaz de se unir a proteínas específicas para regular expressão de genes como tirosina hidroxilase (SKÅLHEGG; TASKÉN, 1997).

Junto com as proteínas reguladoras da diferenciação, destacam-se proteínas com funções específicas que contribuem para desenvolver a estrutura morfológica requerida para a fisiologia dos neurônios. Quando as células neuronais conseguem formar o axônio, um cone de crescimento se especializa para facilitar a migração do neurônio jovem para fazer conexões sinápticas por meio de filopódios e lamelipódios. Estas migrações envolvem a ativação de receptores de membrana no cone que permitem a polarização do citoesqueleto para alongar o axônio (modificações da actina, microtubulos ligados à membrana, tubulina βIII, moléculas de associação aos microtúbulos – MAP2, proteínas de neurofilamento, tau, entre outras). Durante este processo, os neurônios interagem com proteínas adesivas da matriz extracelular como laminina, fibronectina, proteoglicanos e integrinas; também se favorece a interação entre células por meio de caderinas, proteínas similares a imunoglobulinas e a molécula neural de adesão celular (NCAM). O estabelecimento de interações neuronais é mediado por moléculas quimiotróficas (netrinas) e quimiorepulsoras (semaforinas e efrinas) por outro lado, os fatores neurotróficos, anteriormente comentados, permitem ajustar a população de células que irão interagir. As células que realizam conexões celulares estáveis secretam grande quantidade de fatores neurotróficos e seus receptores, aquelas que não conseguem, iniciam o processo de apoptose. A ação conjunta desses fatores permite que os axônios encontrem seus alvos para iniciar a sinaptogênese, assim, reconhecem-se alguns marcadores de especialização neuronal como sinaptofisina e proteínas de processamento da dopamina (EDSJÖ; HOLMQUIST; PAHLMAN, 2007; LENT, 2002; MELO-BRAGA et al., 2015; TANAKA et al., 2012).

1.1.2 Ácido retinóico

Diversos estudos descrevem a importância do ácido retinóico (AR) na diferenciação de neurônios durante o desenvolvimento do embrião, mais especificamente, na fase da formação do romboencéfalo do tubo neural. Esta molécula, derivada da vitamina A (retinol), atua nos receptores de AR (RARα, RARβ e RARγ); a união com o ligante induz os RAR a formar heterodímeros com receptores de retinóides (RXR) que são capazes de se unir a sequências específicas do DNA (elementos RARE) para estimular a expressão de genes relacionados com o desenvolvimento de neurônios. O desenvolvimento do tronco encefálico (a partir do tubo neural) depende da expressão de diversos genes homeóticos que respondem a concentrações variáveis do AR e dão certa heterogeneidade ao SNC. Tais genes incluem efrinas, fatores de transcrição Kreisler, Krox, Hox, e cinases Eph que estão associados à presença do receptor adrenérgico β1, o receptor de dopamina D2, integrina β3, laminina B1, moléculas de adesão intercelular, STAT1, neurogenina 2, nestina, fator de transcrição de oligodendrócitos, receptor de fatores de crescimento de nervos, Pax-6, Foxa1, ocitocina, proteínas relacionadas com a síntese/degradação de RA, entre outras (LENT, 2002; RHINN; DOLLE, 2012).

1.1.3 Diferenciação neuronal e ciclo celular

Do ponto de vista do ciclo celular, os neurônios diferenciados permanecem em uma fase de quiescência (G_0) onde a proliferação é inibida. As ciclinas, as cinases dependentes de ciclinas (Cdks) e as proteínas inibidoras de ciclinas atuam como pontos de controle das fases do ciclo celular, mas também, induzem sincronização do ciclo celular em resposta a sinais antiproliferativos, contato com outras células, diferenciação e senescência. Durante as etapas previas da diferenciação, as NSCs acumulam no citoplasma diversos complexos tipo Cdk4/6-ciclina D relevantes na diferenciação, especificamente, em neuritogênese. Da mesma forma, as ciclinas D1 e D2 regulam a proliferação das NSCs e simultaneamente induzem diferenciação em astrócitos e neurônios, respectivamente. Essa regulação se dá pela ação dos complexos Cdk-ciclina que fosforilam as proteínas p27, p16, p21 e pRb que regulam fatores de transcrição tipo E2f envolvido em processos de neurogênese e crescimento neurítico na circunvolução dentada (DG) e na zona subventricular (SVZ) do hipocampo (CHEFFER; TÁRNOK; ULRICH, 2013). Por outro lado, alguns trabalhos relatam a expressão significativa de Cdk5 implicada na maturação, migração de neurônios no córtex cerebral e sobrevivência de neurônios pós-mitóticos durante o desenvolvimento do embrião pela fosforilação dos fatores p39 e p35 (ZHENG; LEUNG; LIEM, 1998).

Como complemento da diferenciação, os neurônios pós-mitóticos devem ativar diversos mecanismos para manter sua identidade neural, dentre eles, destaca-se a ativação de fatores de transcrição específicos em etapas terminais da diferenciação e em eventos de autorregulação. A presença desses fatores de transcrição é importante dada à extensa variedade de células neuronais no CNS, assim, muitos dos marcadores de diferenciação e de maturação, anteriormente comentados, estão sob a influência deles. Dependendo do tipo de neurônio, estão descritos alguns fatores de transcrição, tais como Hand2, Gata3 (neurônios simpáticos); Pet1-FEV, Lmx1b, Engrailed 1/2 (neurônios 5-HT, tirosina hidroxilase); Foxa1/Foxa2, Pax-6 (neurônios dopaminérgicos); entre outros (DENERIS; HOBERT, 2014).

1.2 Modelos celulares *in vitro* no estudo da diferenciação neuronal

Os primeiros modelos *in vitro* utilizados para estudar a fisiologia neuronal se basearam na cultura primária de células extraídas de rato ou camundongo, tais modelos têm sido uteis para estudar diversos aspectos chave do desenvolvimento neuronal e/ou doenças neurodegenerativas em mamíferos (GIBBONS; DRAGUNOW, 2010). Porém, limitações éticas e metodológicas evidenciaram a necessidade de usar linhagens derivadas de celulas humanas para elucidar mecanismos envolvidos nas doenças neuronais, teste de medicamentos e ensaios de *screening* que seriam inviáveis de executar diretamente em animais (KORECKA; LEVY; ISACSON, 2015). O uso de células tronco pluripotentes induzidas (*induced Pluripotent Stem Cells* - iPSCs) representam um claro exemplo dos avanços da diferenciação celular *in vitro* que permitem estudar de forma mais específica mecanismos e proteínas envolvidas em tais processos (KELAVA; LANCASTER, 2016); um dos maiores desafios na cultura dessas células é a susceptibilidade a diferenciar em múltiplos tipos celulares funcionais; a manutenção da pluripotência deve ser estritamente controlada com meios definidos que contêm fatores de crescimento como FGF2/EGF e com o monitoramento da população para evitar formação de monocamadas que induzam algum tipo de diferenciação. Por outro lado, existe uma série de limitações que devem ser levadas em conta na utilização de iPSCs. Primeiro, a persistência de memória epigenética das células somáticas precursoras das iPSCs podem influir negativamente ou confundir a caracterização fenotípica ou resposta a medicamentos que estejam sendo testados; segundo, os modelos de doenças refletem variações genéticas hereditárias inesperadas que tendem a focar em fenótipos não relacionados; terceiro, como os protocolos de diferenciação geralmente são muito rápidos, isto não permite analisar doenças relacionadas como o envelhecimento, já que os protocolos de diferenciação em longo prazo se aplicam mais para o desenvolvimento ou amaduramento das células (HORVATH et al., 2016).

A depleção de fatores de crescimento e uso de fatores mitogênicos específicos em iPSCs induz a formação de NCSs (ver item 1.1.1), células que tem sido de grande utilidade em estudos de neurobiologia. De modo semelhante as iPSCs, as NCSs são altamente sensíveis a mudanças de temperatura e a composição do meio de cultura. Além disso, sua diferenciação é altamente dependente do protocolo e concentração de indutores que são utilizados (MELO-BRAGA et al., 2015). Partindo da ideia de que nenhum modelo *in vitro* é completo, na literatura se descrevem vários modelos celulares que se aproximam ao comportamento ou fisiologia neuronal e que, pelo menos parcialmente, superam os obstáculos que apresentam as iPCSs/NCSs. Neste trabalho se discutirão o uso de células de neuroblastoma humano SH-SY5Y e células em cultura tridimensional ou neuroesferas como modelos alternativos de estudo de diferenciação neuronal.

1.2.1 Células de neuroblastoma SH-SY5Y

Alguns estudos de diferenciação neuronal estão baseados no uso de cultura primária de neurônios. No entanto, problemas éticos no uso de células humanas ou de animais e a quantidade de células limitam esse tipo de trabalhos. Por outro lado, as NSCs replicam-se a grande velocidade e não é possível apreciar alguns fenômenos de diferenciação a longo prazo (CONSTANTINESCU et al., 2007). Atualmente, a utilização de células de neuroblastoma humano SH-SY5Y permite superar algumas dessas limitações; são células apropriadas para o estudo de neurônios em desenvolvimento, doenças neurodegenerativas como Alzheimer e Parkinson (KRISHNA et al., 2014) e migração neuronal (DWANE; DURACK; KIELY, 2013). As células SH-SY5Y, um sub-clone da linhagem SK-N-SH isolada da medula óssea de uma paciente com neuroblastoma, possuem características de neurônios imaturos, alta capacidade de expansão, sincronização com o ciclo celular e são suscetíveis à diferenciação celular (EDSJÖ; HOLMQUIST; PAHLMAN, 2007; KOVALEVICH; LANGFORD, 2013; ROSS; SPENGLER, 2007).

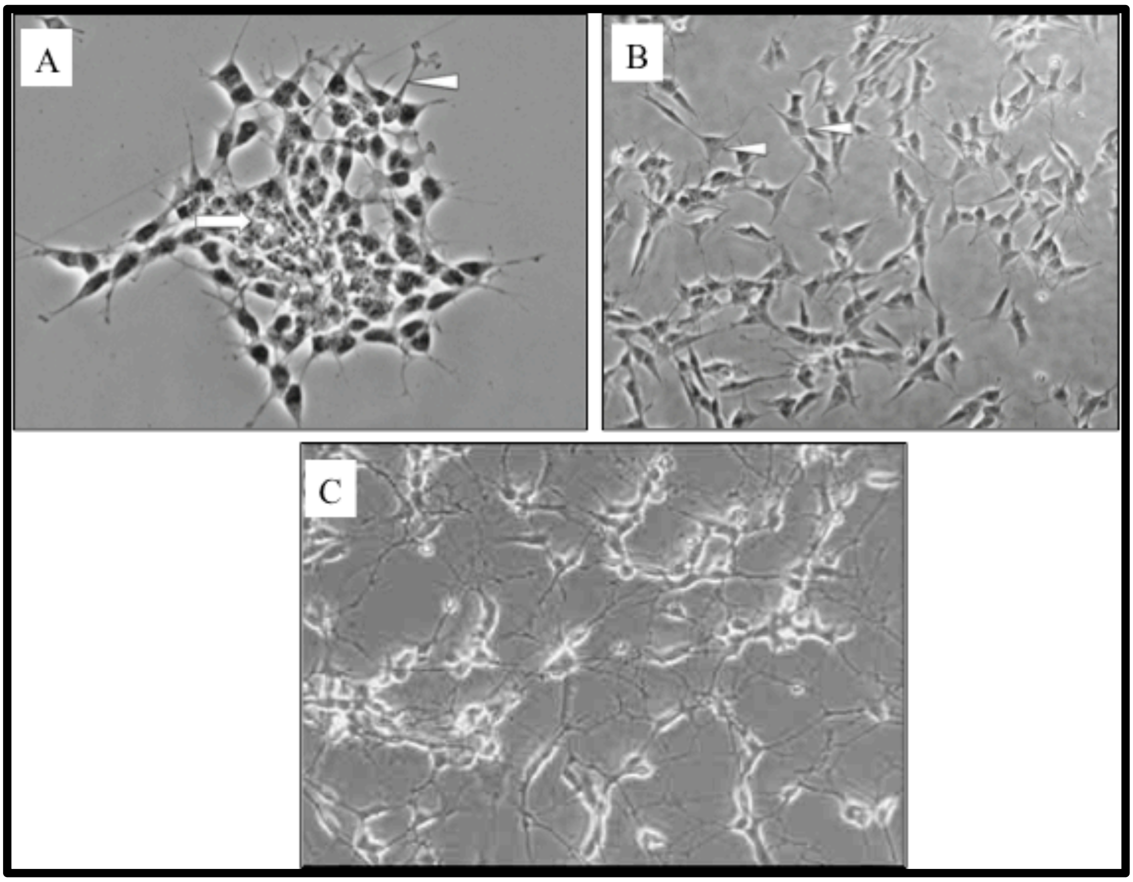


Figura 2. Morfologia de células SH-SY5Y. A: Células indiferenciadas, as setas indicam a presença de neuritos curtas e formação de massas celulares densas, B: incubação com AR, os neuritos estendem-se e as células são mais distinguíveis (figuras adaptadas de KOVALEVICH; LANGFORD 2013), C: incubação com AR+BDNF por tempo prolongado, evidencia-se múltiplas conexões e morfologia piramidal similar a neurônios primários (Figura adaptada de ENCINAS et al., 2000).

1.2.1.1 Diferenciação de células SH-SY5Y

Na forma indiferenciada, as células SH-SY5Y se caracterizam pela morfologia tipo neuroblasto com baixa polaridade. Durante sua expansão formam-se massas celulares densas, apresentando células aderentes e flutuantes, além de apresentar os fenótipos celulares N (neural) e S (epitelial) (Figura 2). Estas células proliferam continuamente expressando marcadores de neurônios imaturos como a nestina, proteína dos filamentos intermédios de células neuroepiteliais; uma vez tratadas com agentes indutores da diferenciação, as células adquirem uma morfologia piramidal similar a neurônios primários, diminuem sua taxa de proliferação, os neuritos estendem-se e apresentam variedades de fenótipos neuronais como, colinérgico, dopaminérgico e adrenérgico (KOVALEVICH; LANGFORD, 2013).

Os protocolos de diferenciação de células SH-SY5Y geralmente utilizam o AR como agente indutor, substância que promove a sobrevivência celular pela ativação da via de sinalização PI3K/Akt, RAS/ERK para diferenciação, expressão da proteína anti-apoptótica Bcl-2 e expressão de receptores de neurotrofinas (Trk, TrkB e RET). Tais eventos, são promovidos pela sinalização do AR que ativa os fatores de transcrição bHLH (domínios hélice-loop-hélice) NEUROD1 e NEUROD6. A combinação desses processos moleculares induz às células diferenciadas a aumentar a atividade acetil colina transferase, o transporte vesicular de monoaminas, a atividade tirosina hidroxilase e o processamento da dopamina (KOVALEVICH; LANGFORD, 2013; LÓPEZ-CARBALLO et al., 2002).

O tratamento com fatores neurotróficos (por exemplo, BDNF) permite manter o fenótipo neural maduro e a sobrevivência das células SH-SY5Y, já que ativa as vias de sinalização dos receptores Trk expressos durante a incubação com AR (ENCINAS et al., 2000; LÓPEZ-CARBALLO et al., 2002). A ação combinada do AR com BDNF induz alguns dos eventos esperados na diferenciação de neurônios: formação e extensão de processos neuríticos, aumento da excitabilidade da membrana plasmática, formação de sinapses mediadas pela sinaptofisina e indução de enzimas neurônio-específicas (enolase), neurotransmissores e seus receptores; eventos que estão acompanhados da expressão de marcadores de diferenciação como NeuN, tubulina βIII, MAP2, sinaptofisina, entre outras (KOVALEVICH; LANGFORD, 2013) (Figura 2). Nesse mesmo sentido, o fator de crescimento de nervos (NGF) é descrito como outra neurotrofina envolvida especificamente no crescimento de neuritos na diferenciação, ativa diversas cinases mitogênicas e proteínas efetoras que mantem a estrutura das extensões neuríticas e possivelmente ativa sistemas de regulação da concentração de receptores Trk durante os primeiros instantes da diferenciação, processo que ocorre pelo recrutamento de proteínas da família Cbl-b (casitas B-lineage lymphoma) que possuem atividade E3 ligase, importantes na ubiquitinação (EMDAL et al., 2015).

1.2.2 Cultura tridimensional de células

A cultura de células tridimensional (ou 3D) é um sistema artificial onde as células crescem e interagem nas três dimensões, principalmente focada na importância da interação da matriz extracelular (ECM) com as células na formação de estruturas multicelulares fisiologicamente relevantes. Nesta metodologia, as células podem ser cultivadas em biorreatores ou em placas especiais comercialmente disponíveis que contêm substratos como colágeno, fibrina, ácido hialurônico, chitosana, fibras de sílica, alginato, e polímeros derivados de polietileno glicol, polivinil álcool e policaprolactone, onde as células formam colônias 3D ou esferoides. Seu desenvolvimento está ligado principalmente na avaliação de compostos farmacêuticos na busca ou caracterização de medicamentos e ensaios de toxicidade (HORVATH et al., 2016).

Dentre as vantagens de cultura 3D destacam-se a semelhança aos tecidos *in vivo* em termos de comunicação celular e desenvolvimento de ECM, migração celular em esferas similar a uma célula nos tecidos vivos, melhor caracterização de processos como diferenciação celular, sobrevivência e crescimento, maior capacidade de expansão e disponibilidade de nutrientes, representação mais exata da polarização celular, e, padrões de expressão genica e ativação de vias de sinalização ausentes na cultura 2D (HORVATH et al., 2016; PAMPALONI; REYNAUD; STELZER, 2007).

Por outro lado, diversas limitações práticas na cultura 3D incluem o alto custo dos materiais, maior viscosidade dos meios, problemas na gelificação das matrizes pela alta sensibilidade a mudanças de temperatura, baixa reprodutibilidade, baixa perfusão de fármacos em linhagens celulares específicas e variabilidade na relação ECM:células que deve ser utilizada nos experimentos. Estas desvantagens possivelmente explicam a dificuldade de usar a cultura 3D em larga escala ou seu uso menos abrangente com os diferentes tipos de linhagens disponíveis em cultura 2D, assim, considera-se a cultura 3D uma técnica em desenvolvimento com aplicações biotecnológicas, terapêuticas e farmacêuticas (DERDA et al., 2009).

1.2.2.1 Neuroesferas

As neuroesferas que podem ser definidas como o conjunto ou agregação tridimensional de células flutuantes, compõem-se de uma mistura heterogênea de NSCs multipotentes, progenitores neurais proliferativos, células neuronais pós-mitóticas e glia. Foram descritas pela primeira vez nos anos 90 utilizando células do SNC embrionárias e adultas (REYNOLDS; WEISS, 1992). As neuroesferas se aproximam bastante ao nicho neurogênico de células do sistema nervoso em desenvolvimento (GIACHINO; BASAK; TAYLOR, 2009; KELAVA; LANCASTER, 2016), sua manutenção é definida sob o crescimento em meios sem soro onde a disponibilidade de nutrientes ou moléculas sinalizadoras é extremadamente dependente das células adjacentes (JENSEN; PARMAR, 2006). Uma das principais vantagens desta cultura é que as neuroesferas possuem um potencial de passagem enorme comparado com culturas em monocamada, assim, a expansão destas células pode ser realizada em larga escala, principalmente para estudos de *screening* de medicamentos e terapia de substituição celular (SUN et al., 2006; TORRADO et al., 2014). Devido à heterogeneidade das neuroesferas, existe pouca organização espacial das células que limita seu eventual desenvolvimento, gerando perda das características neuronais e/ou perda na capacidade proliferativa em um número significativo de células na esfera (TORRADO et al., 2014).

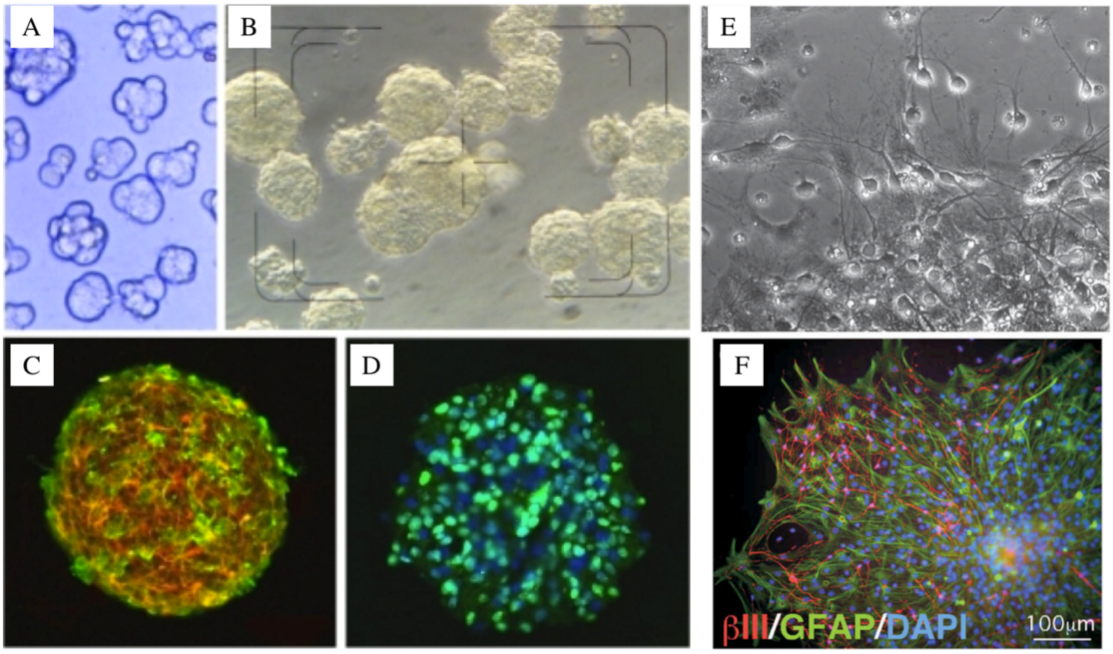


Figura 3. Estrutura de neuroesferas. A: Microscopia de contraste de fase da formação da neuroesfera. B: Microscopia de contraste de fase de neuroesferas em alta densidade. C: Microscopia de fluorescência da nestina (vermelho) e do receptor de EGF (verde) em uma neuroesfera intacta. D: Detecção de mitose celular em neuroesfera, 5-bromo-2'-deoxiuridina (BrdU) – FITC (verde) e DAPI na detecção de núcleo (azul). E: Células migrando durante a diferenciação. F: Microscopia de fluorescência em células diferenciadas, tubulina βIII para neurônios (vermelho) e GFAP para astrocitos (verde). (Figura adaptada de JENSEN; PARMAR, 2006 e (PACEY et al., 2006).

A formação de neuroesferas geralmente se inicia com o isolamento de iPSCs (p. ex. a partir de cérebro de camundongo) e sua posterior cultura com meios suplementados com EGF/bFGF e livres de soro. Uma pequena porcentagem de células dependentes de EGF (<0.1%) é capaz de sobreviver formando clusters de precursores neuronais não diferenciados (neuroesferas); depois de 7 dias de cultura as neuroesferas possuem um diâmetro de 100-200 μm e um total de 3000 – 5000 células (Figura 3). Neste ponto as passagens podem ser repetidas semanalmente resultando em um incremento aritmético do número total de células geradas, similar as NSCs em cultura 2D, as neuroesferas podem ser diferenciadas nos três fenótipos principais do SNC, (neurônios, astrocitos e oligodendrocitos) quando são cultivadas em ausência de EGF/bFGF e em presença de um substrato aderente. O uso das neuroesferas tem demonstrado que a população celular do SNC de mamíferos em embriões ou adultos pode ser isolada neste tipo de cultura sem perder os atributos de célula tronco como a proliferação, auto renovação, e a capacidade de gerar distintos tipos celulares após diferenciação (DELEYROLLE; REYNOLDS, 2009). Usualmente, os protocolos de diferenciação são de dois tipos: esferas cultivadas em baixa densidade para demostrar presença de células multipotentes e cultura em alta densidade com dissociação das esferas para calcular a porcentagem relativa dos diferentes tipos celulares gerados (FORONI et al., 2007).

Após a remoção de EGF/bFGF, o meio de cultura é suplementado com N2 e/ou B27, nesse processo, a diferenciação pode ser acompanhada ao longo do tempo pela crescente imunoreatividade a NSE, MAP2, neurofilamento ou tubulina βIII (neurônios) e GFAP (proteína glial fibrilar acidica em astrocitos) além pelas mudanças morfológicas da esfera onde os neurônios amadurecem se afastando da região central (Figura 3) (JENSEN; PARMAR, 2006).

Os recentes avanços metodológicos têm permitido dar um grande passo no estudo de fenótipos de doenças neurodegenerativas ou neuronais dificilmente realizável com iPSCs obtidas a partir de camundongo. Atualmente, é possível obter neuroesferas a partir de amostras de urina ou de biopsias de pele de pacientes que apresentem alguma patologia no desenvolvimento neuronal, de forma geral, as células são isoladas da amostra, expandidas de forma padrão (37 ºC, 5% de CO_2) e posteriormente reprogramadas com kits comerciais que contem fatores como Oct3/4, Sox2, KIf4, c-Myc, entre outros. As iPSCs obtidas são expandidas e finalmente diferenciadas utilizando meios livres de fatores de crescimento. Desta forma, têm sido isoladas iPSCs de pacientes com esquizofrenia (SOCHACKI et al., 2016a), desordem de hiperatividade e déficit de atenção (SOCHACKI et al., 2016b), e transtorno obsessivo compulsivo (SOCHACKI et al., 2016c).

CAPÍTULO II

INTRODUÇÃO: FERRAMENTAS DE ANÁLISE PROTEÔMICA

2.1 Análise Proteômica

A proteômica pode ser considerada como um conjunto de técnicas que estudam o proteoma de um organismo, fornecendo informação sobre a estrutura, interações protéicas e função celular nesse organismo em diversas condições ambientais e temporais (EIDHAMMER et al., 2007; HUBER, 2003). O termo foi introduzido por Wilkins e Williams na década dos 90 referindo-se ao estudo do complemento proteico do genoma de um tecido, célula ou organismo (WILKINS et al., 1996). Com o avanço das técnicas de separação cromatográfica, eletroforese 2D, ionização, detecção e desempenho dos espectrômetros de massas, bases de dados de transcriptômica e genômica e da biologia computacional para o processamento de dados, a proteômica tornou-se uma disciplina mais robusta que, além de identificar proteínas em escala genômica, estuda de forma global e integral os sistemas biológicos através da caracterização das proteínas por meio da quantificação, localização celular, presença de modificações pós-traducionais (PTMs) e interações proteína-proteína presentes nesses sistemas. Tais características refletem a plasticidade do proteoma, fazendo mais desafiadora a pesquisa relacionada com a caracterização dos proteomas. Atualmente estima-se a presença de aproximadamente um milhão de proteoformas codificadas por pouco mais de 20,000 genes (OMENN et al., 2015). Devido a essa complexidade, a integração da proteômica com outras disciplinas, tais como a bioquímica, bioinformática e a biologia molecular, é de grande relevância (AHRENS et al., 2010; STEEN; MANN, 2004; YATES; RUSE; NAKORCHEVSKY, 2009).

2.2 Espectrometria de massas

Atualmente, a espectrometria de massas (MS) é uma tecnologia analítica chave na análise proteômica, seu princípio básico é a identificação precisa da relação massa–carga (m/z) de íons moleculares que provém de uma amostra em fase líquida, com os analitos já carregados e que passam à fase gasosa de forma branda (AEBERSOLD; MANN, 2003). Independentemente da configuração, os espectrômetros de massas possuem três componentes essenciais: uma fonte de íons encarregada de evaporar a amostra e introduzir carga nas moléculas, um analisador que separa as moléculas dependendo da relação m/z; e um detector que registra o número de íons para os diferentes valores de m/z (GROSS, 2011; YATES; RUSE; NAKORCHEVSKY, 2009). A disponibilidade de diferentes tipos de fontes de ionização e de analisadores tem permitido a construção de equipamentos híbridos de alto desempenho (AEBERSOLD; MANN, 2003).

As formas de ionizar peptídeos e proteínas mais comuns são ionização por eletro-nebulização (Electro Spray Ionization - ESI) (FENN et al., 1989) e ionização e dessorção a laser assistido por matriz (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization - MALDI) (KARAS; HILLENKAMP, 1988; TANAKA et al., 1988). Essas técnicas de ionização consideradas suaves (não promovem a fragmentação do íon) revolucionaram a aplicação da MS na análise de proteínas e peptídeos. Na estratégia ESI, o solvente que contém o analito é bombeado através de uma agulha em alta voltagem onde há transferência de carga e formação de gotas micrométricas que evaporam rapidamente e “liberam” o analito carregado; o processo de desolvatação do analito pode ser auxiliado com um fluxo de nitrogênio. À medida que o solvente evapora, o número de cargas aumenta dramaticamente produzindo uma explosão coulombiana gerando íons de múltipla carga (BANERJEE; MAZUMDAR, 2012). Por outro lado, na estratégia MALDI o analito é cristalizado junto com uma matriz em excesso molar usualmente composta por ácidos orgânicos fracos e de baixo peso molecular. Uma vez seca, a mistura é bombardeada com um lazer UV que permite a volatilização da amostra junto com a matriz; nesse processo a matriz é responsável por doar prótons ao analito permitindo sua ionização (LEWIS; WEI; SIUZDAK, 2006).

O analisador de massa é o responsável por separar os íons que são transmitidos no espectrômetro de acordo com suas razões m/z para ser dirigidos finalmente ao detector. Entre os analisadores mais comuns em análises proteômicos encontram-se o quadrupolo, tempo de voo (Time-of-flight – TOF), armadilha de íons linear (lineal ion-trap – LIT ou Linear Trap Quadrupole – LTQ), analisador por ressonância ciclotrônica de íons (Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance – FT-ICR) e Orbitrap (HOFFMANN; STROOBANT, 2007; MAKAROV, 2000).

Os sistemas de detecção dos espectrômetros de massas são responsáveis pelo registro do número de íons das razões m/z separadas no analisador. Os detectores de tipo eletro-multiplicadoras e detectores de correntes de íons convertem os sinais de m/z em sinais elétricos que posteriormente são processados no sistema de aquisição de dados representado geralmente por um computador (GROSS, 2011).

Dependendo do tipo de análise e de amostra, opta-se por usar distintas combinações da fonte/analisador ou combinação sequencial de analisadores. Os instrumentos com tais incorporações permitem isolar, fragmentar e analisar os íons fragmentados a partir dos valores de m/z resultantes, técnica conhecida como espectrometria de massas sequencial (MS/MS). Dentro das ferramentas de fragmentação de peptídeos mais comuns encontra-se a dissociação induzida por colisão (Collisionally Activated Dissociation – CAD ou Collision Induced Dissociation – CID) e dissociação de colisão por alta energia (High Energy Collision Dissociation – HCD). Na primeira estratégia o íon é excitado por meio da energia translacional do choque dos íons com gás inerte com energia interna; posteriormente, o íon excitado se decompõe em íons de menor massa. Nesta ferramenta, considerada de baixa energia, os íons fragmentos não sofrem refragmentação (GROSS, 2011). Já no sistema HCD acelera os íons são acelerados para colidir com o gas contido na câmera de fragmentação, na maioria dos casos utilizam-se energias de ativação maiores do que em CID, assim, precisam-se menores tempos de ativação e existe a possibilidade de refragmentação dos íons gerados (OLSEN et al., 2007). Os grandes avanços da instrumentação na espectrometria de masas tornaram possíveis analises de proteínas e/ou peptídeos cada vez mais rápidas, acuradas e sensíveis. Isso se reflete no extenso uso dos sistemas híbridos que incorporam analisadores como o quadrupolo LTQ e o Orbitrap. Particularmente, neste trabalho utilizaram-se os sistemas híbridos ESI LTQ Orbitrap e Q-Exactive que são detalhados abaixo.

O sistema ESI LTQ Orbitrap está composto por dois analisadores, o LTQ (linear trap quadrupole) e o Orbitrap. O LTQ é um tipo de quadrupolo composto de hastes hiperbólicas, cada uma delas dividida em três sessões axiais sucessivas que, quando submetidas a uma diferença de potencial DC (axial) aprisionam e armazenam íons ao longo do eixo Z na secção central. Após o aprisionamento, ocorre a aplicação de corrente DC entre os pólos do quadruplo e os íons aprisionados são ejetados pelas aberturas presentes na sessão central das hastes no plano XZ para ser detectados posteriormente. As voltagens RF que se aplicam aos pares de hastes X e Y servem para aprisionar os íons, as voltagens AC nas hastes X possibilitam o isolamento, excitação e ejeção dos íons (MAKAROV, 2000; SCHWARTZ; SENKO; SYKA, 2002). Já o analisador Orbitrap consiste de dois eletrodos, um interno central e um externo dividido por um anel de cerâmica ao meio. Os íons são injetados tangencialmente no campo elétrico entre os eletrodos onde se aprisionam e passam a orbitar o eletrodo central, pois a atração entre esses íons e o eletrodo interno é contrabalançada pela força centrífuga originada pela velocidade tangencial inicial com a qual o íon foi injetado. Também há oscilação dos íons ao longo do eixo Z, a frequência dessa oscilação harmônica independe da velocidade do íon e é inversamente proporcional à raiz quadrada da relação m/z. Assim, essas oscilações são detectadas como imagens da corrente; essas frequências individuais são processadas com a transformada de Fourier para obter finalmente o espectro de massas (HU et al., 2005; MAKAROV, 2000) (Figura 4).

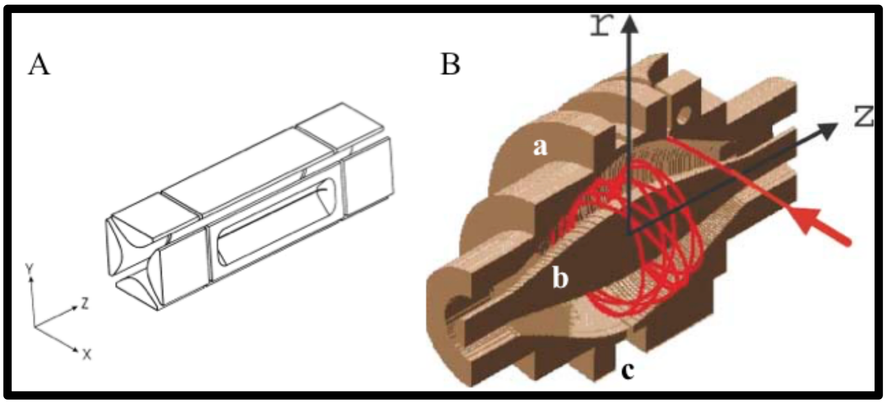


Figura 4. A: Desenho básico de um analisador de armadilha de íons (LTQ) (figura adaptada de SCHWARTZ et al., 2002). B: Visão de perfil do Orbitrap. Os íons são injetados tangencialmente no ponto indicado pela seta vermelha com uma velocidade perpendicular ao eixo z. (a) eletrodo central interno, (b) eletrodo externo e (c) anel de cerâmica que isola os dois hemisférios que são os eletrodos externos (Figura adaptada de HU et al., 2005).

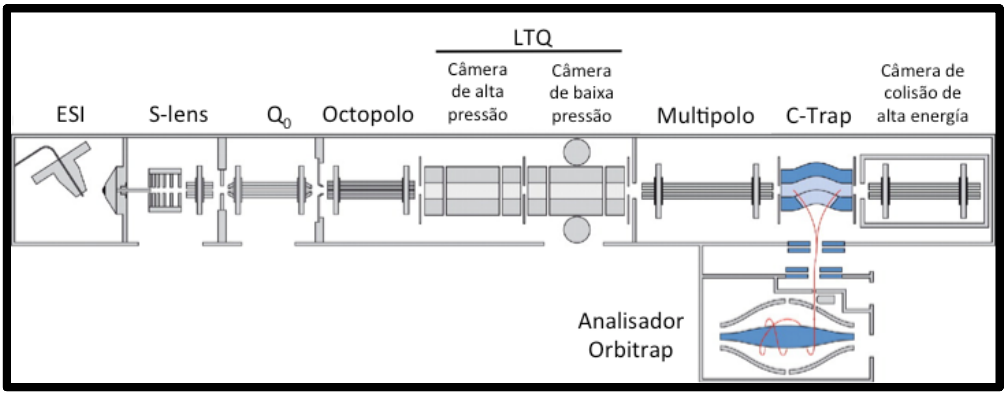


Figura 5. Esquema do sistema hibrido ESI LTQ Orbitrap Velos. ESI: ionização por eletro nebulização, Q_0: quadrupolo quadrado (Figura adaptada de OLSEN et al., 2009).

O instrumento híbrido LTQ-Orbitrap permite fazer análises de alta resolução e acurácia no Orbitrap e uma grande sensibilidade e velocidade no LTQ. Sua configuração se baseia no aprisionamento de íons no LTQ; em uma C-trap (armadilha de íons em curva) que armazena e ejeta os íons para o Orbitap; e o Orbitrap que detecta os íons em alta resolução (MAKAROV et al., 2006; YATES; RUSE; NAKORCHEVSKY, 2009). O equipamento LTQ-Orbitrap Velos, além de mostrar as caraterísticas anteriores, incorpora na sua configuração um sistema mais eficiente de transmissão de íons (S-lens), um LTQ com duas câmaras: uma de alta pressão com maior eficiência no isolamento e na ativação dos íons (fragmentação por CID) e uma de baixa pressão para o escaneamento/detecção dos íons mais rápida; e uma integração eficiente entre o C-trap e a câmera de colisão HCD para o analise no Orbitrap (OLSEN et al., 2009; SECOND et al., 2009) (Figura 5).

Os analisadores de tipo quadrupolo que se caracterizam por apresentar maior precisão na seleção de íons, estão compostos por dois pares de hastes ou barras redondas ou hiporbólicas dispostas em paralelo. Um par de barras é mantido com um potencial elétrico positivo e o outro par em potencial negativo. A combinação de DC e RF aplicada às barras permite que o par positivo filtre as massas mais elevadas enquanto o par negativo age como filtro das massas pequenas; com uma amplitude determinada de RF e DC, somente os íons com valores de m/z específicos que estejam em ressonância com o campo aplicado poderão passar pelas barras ao detector (GROSS, 2011). A incorporação do quadrupolo nas características do ESI e do analisador Orbitrap anteriormente mencionadas, configura o sistema do Q-Exactive (Figura 6), um sistema híbrido de alto desempenho que consegue filtrar e analisar íons em alta velocidade, seletividade e resolução (MICHALSKI et al., 2011).

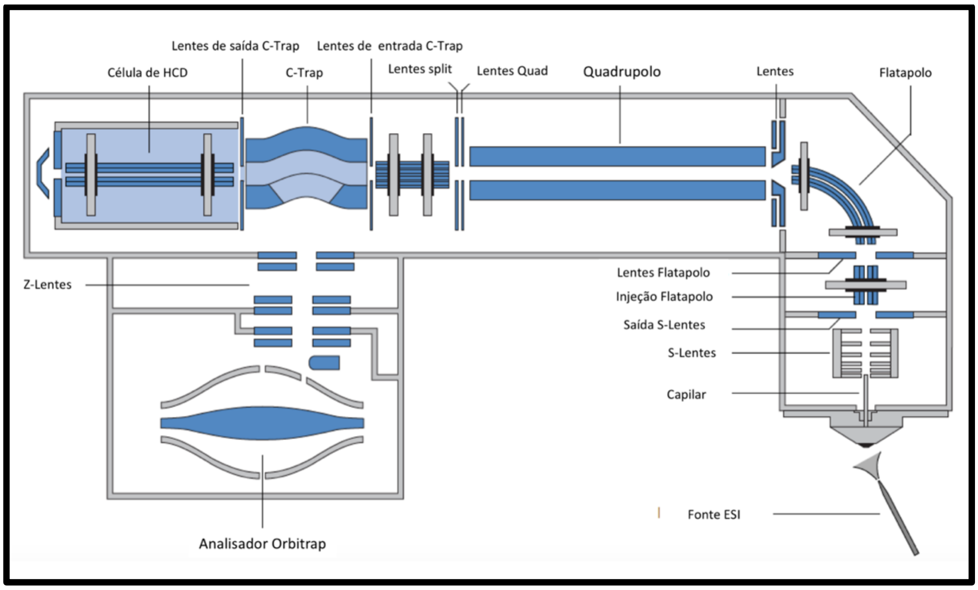


Figura 6. Esquema do sistema Q-Exactive. ESI: ionização por eletro nebulização, (Figura adaptada de MICHALSKI et al., 2011).

2.3 Estratégias de separação e fracionamento de peptídeos e proteínas

Como comentado anteriormente, existe um grande número de proteínas expressas no proteoma de um sistema biológico determinado, esse panorama é ainda mais complexo se for considerada a concentração em que cada espécie está representada dentro do proteoma. De forma geral, os proteomas estão representados por uma pequena quantidade de proteínas com alta concentração e uma maioria de espécies com baixa concentração, entre outras coisas, essa diferença se deve à diversidade das taxas de expressão ou atividade de cada gene. A variação dinâmica de abundancia e a complexidade dos proteomas representam grandes desafios nas atuais técnicas analíticas, já que seus sistemas de detecção são dependentes da concentração (NOGUEIRA; DOMONT, 2014). Para abordar esse desafio, atualmente usam-se diversas metodologias cromatográficas para fracionar e/ou enriquecer as proteínas ou peptídeos a serem analisados no espectrômetro de massas. Isto permite reduzir a complexidade da amostra com o intuito de identificar o máximo possível de proteínas independentemente do intervalo dinâmico que possuam no proteoma (ZHANG et al., 2013). Técnicas de fracionamento como as cromatografias de fase reversa em baixo e alto pH, interação hidrofílica, troca catiônica forte (SCX) e de afinidade e técnicas como eletroforese unidimensional, focalização isoelétrica e tecnologias de equalização, são usadas comumente nas analises proteômicas. Tais técnicas podem ser incorporadas de maneira simples ou combinadas em separações multidimensionais (ZHANG et al., 2013).

2.3.1 Cromatografia em fase reversa

A cromatografia de fase reversa (reverse phase chromatography – RPC) separa compostos de acordo com sua hidrofobicidade utilizando uma fase estacionária apolar e uma fase orgânica, as fases estacionárias mais comuns contem grupamentos alquil com cadeia de 4, 8 ou 18 carbonos ligados covalentemente a partículas de sílica. As moléculas de natureza apolar apresentam mais interações com a fase estacionária e, assim, precisam de maior tempo de eluição; as de maior polaridade eluem primeiro (AGUILAR, 2004). Dentro das diversas técnicas de cromatografia líquida, a RPC é a que apresenta maior resolução, eficiência e reprodutibilidade, além do fato que as fases móveis são compatíveis com a ionização por ESI na espectrometria de massas. Devido a este tipo de configurações, a RPC é utilizada como único ou último método de fracionamento em processos multidimensionais de separação em proteômica antes da análise por espectrometria de massas (FOURNIER et al., 2007).

O fracionamento de peptídeos para análise por espectrometria de massas geralmente é feito por meio de nanocromatografía líquida (nLC) que usa fases estacionárias com cadeias de 18 carbonos (C-18) empacotadas em colunas de mais de 15 cm de comprimento e com diâmetro reduzido (75-100 µm). Entre as principais vantagens deste sistema destacam-se a aumento da capacidade de pico, capacidade de carregamento e maior sensibilidade (ZHANG et al., 2013). O uso de tamanhos de partícula de C-18 menores de 2 μm permite a elaboração de colunas com capacidade de pico superiores a 1.500, um aumento maior que três vezes comparado com colunas comumente utilizadas. Porém, é necessário o uso de bombas especiais nos cromatógrafos que permitam controlar e atingir os altos valores de pressão que estas colunas geram. O aumento da capacidade de pico na separação de peptídeos com hidrofobicidade parecida pode ser interpretado como uma forma de “concentrar” a amostra na coluna capilar para aumentar a probabilidade de o espectrômetro de massas detectar mais peptídeos em amostras muito complexas (SHEN et al., 2005).

2.3.2 Cromatografía de interação hidrofílica

A cromatografia de interação hidrofílica (Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography- HILIC) é uma técnica cromatográfica de amplo uso e versatilidade que surgiu, inicialmente, da necessidade de analisar moléculas altamente polares que têm pouca ou nenhuma retenção na RPC. Pela compatibilidade das fases moveis utilizadas com a ionização por ESI nos espectrômetros de massas, sua aplicabilidade na área de proteômica tem crescido significativamente permitindo o fracionamento e/ou enriquecimento de fosfopeptídeos, N-glicopeptideos e peptídeos N-acetilados. Nesta cromatografia os analitos interagem em uma fase estacionária polar e uma fase móvel composta por um solvente orgânico miscível em água; os analitos mais hidrofílicos têm tempos de retenção maiores que os hidrofóbicos, um comportamento contrario à RPC. As fases estacionárias mais utilizadas neste sistema são o intercambiador catiônico fraco Polycat A, o intercambiador aniônico fraco PolyWAX, TSKgel amide 80, ZIC-HILIC (zwitterionico) e alguns sacarídeos específicos. A fase móvel inicialmente contém mais de 70% de acetonitrila (ACN) que ao longo da eluição é diluída com solução aquosa de ácido trifluoroacético (TFA) (BOERSEMA; MOHAMMED; HECK, 2008). Atualmente, se aceitam dois mecanismos de interação dos analitos com a fase estacionaria que estão superpostos: separação por partição onde a fase móvel aquosa permite formar uma camada polar na superfície da resina e, interação eletrostática direta com a fase estacionaria (HEMSTRÖM; IRGUM, 2006).

Devido ao mecanismo de separação e à capacidade de pico maior que a SCX, a HILIC possui um grau de ortogonalidade maior com a RPC. Na SCX a separação é limitada pelo fato de que peptídeos carregados formam clusters que eluem em conjunto, comportamento que não se evidencia na HILIC. A desvantagem frente a ferramentas como MudPIT é que a HILIC como cromatografia ortogonal deve ser executada *off-line* pela incompatibilidade das suas fases móveis com a RPC (GILAR et al., 2005).

2.4 Estratégias de abordagens proteômicas

Além de combinar diversas ferramentas cromatográficas para reduzir a complexidade das amostras, a análise por espectrometria de massas geralmente incorpora alguns parâmetros na aquisição de dados, aquisição que pode ser dependente de dados onde a informação do espectro de massa é utilizada para determinar os parâmetros de espectros subsequentes. Por outro lado, também é utilizada a espectrometria de massas em sequência onde a massa dos íons intactos é detectada, e, posteriormente, algum desses íons são selecionados para fragmentação permitindo identificar a sequência da cadeia polipeptídica (ZHANG et al., 2013). Assim, as análises de proteínas em estudos proteômicos se dão por duas abordagens principais: na primeira, na análise *top-down* se estudam proteínas intactas a fim de identificar a proteína e diversos fatores estruturais dela, usam-se principalmente métodos de fragmentação alternativos como Dissociação por Captura de Elétrons (Electron Capture Dissociation – ECD) (ZUBAREV; KELLEHER; MCLAFFERTY, 1998) e a Dissociação por Transferência de Elétrons (Electron Transfer Dissociation – ETD) (SYKA et al., 2004).

Na segunda abordagem, denominada *bottom-up* as proteínas são hidrolisadas a peptídeos que posteriormente são analisados e identificados por MS; a amostra de proteínas pode ser fracionada antes da hidrólise enzimática utilizando eletroforese em gel (*gel-based*) e/ou as proteínas/peptídeos podem ser fracionados por métodos cromatográficos de separação (*gel-free*). Nesta última estratégia, uma mistura complexa de proteínas é hidrolisada em solução e os peptídeos são separados por cromatografia líquida (LC) e analisados no espectrometro; esta metodologia é denominada proteômica s*hotgun* (MCCORMACK et al., 1997). A abordagem *bottom-up* é considerada o padrão ouro na análise proteômica devido a sua grande sensibilidade e excelentes resultados em análises de larga escala (Figura 7) (WOLTERS; WASHBURN; YATES, 2001; YATES, 1998).

Na análise *shotgun/bottom-up* as proteínas extraídas são hidrolisadas a peptídeos devido à sua menor complexidade na hora de serem separados, ionizados e analisados no espectrômetro de massas, porém, este passo aumenta dramaticamente a complexidade da amostra além de perder a informação estrutural das proteínas intactas. A proteólise geralmente é realizada com enzimas de diversas especificidades de clivagem entre diferentes aminoácidos, a enzima mais comum é a tripsina. É espcífica para os resíduos de arginina (R) e lisina (K) C – terminais sempre que não estejam seguidos de uma prolina ou resíduos ácidos. Desta forma, se garante que os peptídeos gerados contenham um resíduo K ou R susceptível de se protonar na região C – terminal além do grupo amino N- terminal, assim, os peptídeos trípticos são facilmente ionizados e fragmentados em fase gasosa (KOLSRUD et al., 2012).

Após a digestão, diversas ferramentas cromatográficas podem ser utilizadas para fracionar os peptídeos: RPC em alto e/ou baixo pH (WANG et al., 2011), SCX (LAU et al., 2011), HILIC (BOERSEMA; MOHAMMED; HECK, 2008), focalização isoelétrica (XIE; BANDHAKAVI; GRIFFIN, 2005), entre outras. Antes da RPC acoplada à espectrometria de massas (LC-MS/MS), uma das técnicas mais utilizadas é a tecnologia multidimensional de identificação de proteínas (MudPIT) que associa a SCX intercalada com RPC na LC-MS/MS. Desta forma, a diminuição da complexidade da amostra permite que poucos peptídeos sejam analisados pelo espectrômetro permitindo uma maior cobertura do proteoma (NOGUEIRA; DOMONT, 2014).

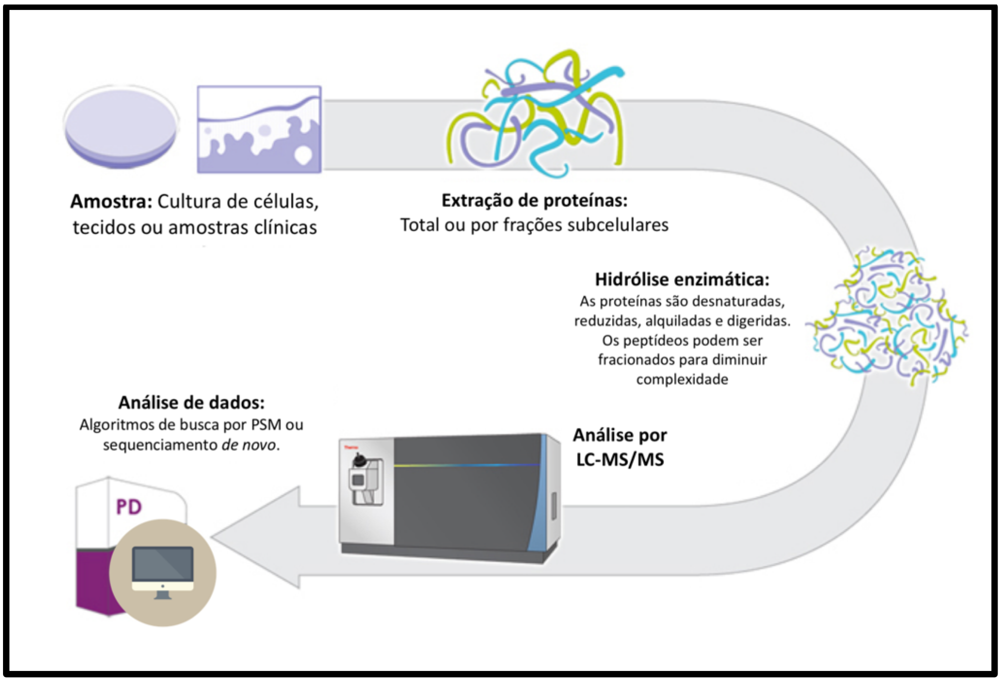


Figura 7. Estratégia *bottom-up/shotgun* na análise proteômica. Esta estratégia compreende a extração de proteínas a partir de diversas fontes, hidrólise enzimática em solução e posterior análise por LC-MS/MS com possibilidade de prefracionamento da amostra utilizando técnicas ortogonais à RPC. Figura adaptada de http://planetorbitrap.com/bottom-up-proteomics.

2.5 Modificações pós-traducionais

A diversidade dos diferentes processos biológicos de uma célula se refletem na complexidade do seu proteoma, onde incluem-se as modificações pós-traducionais. As PTMs são modificações químicas nas cadeias laterais de um ou mais resíduos nas proteínas ou nas extremidades C- e N-terminais que conferem propriedades específicas as mesmas como forma de regulação reversível ou irreversível na identidade celular, função, atividade e interações proteicas no organismo, que são importantes para a sinalização celular, desenvolvimento e dinâmica. As PTMs mais comuns são a fosforilação, metilaçao, N- e O-glicosilação e acetilação (MELO-BRAGA et al., 2015) (Figura 8). Devido às mudanças de massa que provocam as PTMs nos peptídeos, a espectrometria de massas é considerada uma ferramenta muito útil na caracterização e identificação das mesmas. Junto com diversas técnicas cromatográficas de enriquecimento das PTMs é possível analisar esses peptídeos que se encontram em baixa quantidade ou em quantidades subestequiométricas partindo de quantidades de amostra cada vez menores (LARSEN et al., 2006; MERTINS et al., 2013).

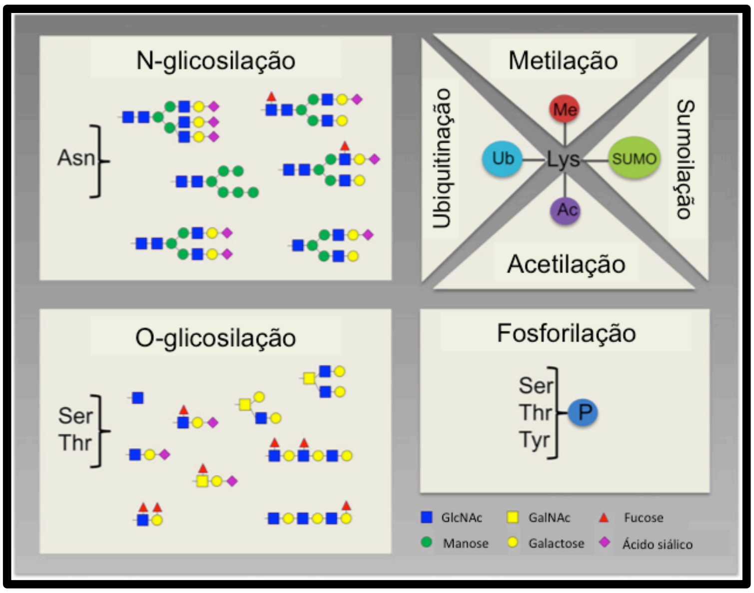


Figura 8. Resumo das principais PTMs em sistemas biológicos, N- e O-glicosilação, fosforilação, ubiquitinação, metilação, sumoilação e acetilação (Figura adaptada de MELO-BRAGA et al., 2015).

2.5.1 Fosforilação

A fosforilação de proteínas é a PTM mais estudada devido a seu papel chave na sinalização celular em processos relacionados com o ciclo celular, apoptose e diferenciação celular (HUNTER, 2000). As proteínas são modificadas usualmente em resíduos de serina, treonina e tirosina (em eucariontes) pela ação de diferentes cinases, a remoção desses grupos fosfato é feita pelas fosfatases. Em termos gerais, a fosforilação afeta a conformação de proteínas, sua atividade, parceiros de interação assim como sua localização subcelular. Em respeito a analises em larga escala de PTMs, a fosforilação é a modificação mais estudada até hoje, principalmente pelos grandes avanços tanto das técnicas analíticas de enriquecimento como das metodologias de detecção de sítios de fosforilação por espectrometria de massas. Os diferentes métodos para a análise do fosfoproteoma estão baseados na sua eficiência do enriquecimento, especialmente quando se dispõe de uma baixa quantidade de material inicial. Atualmente conhecem-se diversas ferramentas para enriquecimento de fosfopeptídeos: cromatografia de afinidade por metal imobilizado (immobilized metal affinity chromatography – IMAC) (KOKUBU et al., 2005; NEVILLE et al., 1997; THINGHOLM; JENSEN; LARSEN, 2009); derivatização química (ARRIGONI et al., 2006); uso de esferas de dióxido de titânio (TiO_2) (LARSEN et al., 2005; THINGHOLM; JENSEN; LARSEN, 2009), dióxido de zircônio ou de alumínio (ZHOU et al., 2007); e precipitação com fosfato de cálcio (ZHANG et al., 2007). Algumas incorporações, modificações e combinações dessas técnicas permitem hoje isolar e caracterizar em grande escala o fosfoproteoma de diversos organismos. Metodologias como eluição sequencial do IMAC (conhecido como SIMAC) e TiO_2-SIMAC-HILIC (TiSH) foram aplicadas com sucesso em diferentes tipos de amostras. Um dos parâmetros chave desta última técnica e conseguir separar eficientemente peptídeos monofosforilados de multifosforilados (ENGHOLM-KELLER et al., 2011, 2012; THINGHOLM et al., 2008). A identificação de sítios de fosforilação por MS baseia-se nas técnicas de fragmentação em CID/HCD auxiliada pela perda característica de ácido fosfórico que permite selecionar o íon para ser novamente fragmentado - MS^3 ou a perda neutra ser fragmentada simultaneamente com o íon precursor (Multi-Stage Activation - MSA). Desta forma, tanto a identificação do peptídeo modificado quanto a localização das possíveis modificações pós traducionais podem ser obtidas (BEAUSOLEIL et al., 2004; SCHROEDER et al., 2004; ZHANG et al., 2007). Utilizando-se ETD e ECD como métodos de fragmentação o grupo fosfato é preservado, assim, o sítio de fosforilação pode ser facilmente localizado (SCHROEDER et al., 2004).

A fosforilação é uma modificação importante na diferenciação celular, pois participa na indução neuronal, proliferação, sobrevivência e especialização celular. Os diversos sistemas dependentes de MAP, MAPK, STAT e os receptores tipos PKC/Trk são exemplos significativos da relevância da fosforilação na modulação de processos envolvidos na diferenciação; alterações nesses processos associam-se a doenças neurológicas. Nesse sentido, algumas cinases são utilizadas como alvos terapêuticos (MELO-BRAGA et al., 2015).

2.6 Proteômica quantitativa

Além de identificar proteínas, a proteômica também procura quantificar alterações na expressão de proteínas em um sistema biológico determinado. Existem métodos de quantificação absoluta onde é determinada a quantidade de uma proteína em unidades de concentração e relativa que é definida pela relação (número de vezes) de uma substância em diferentes amostras (ELLIOTT et al., 2009). Na proteômica *shotgun* existem duas formas básicas de aplicar esses métodos de quantificação: amostras isentas de marcação (*label-free*) e marcação isotópica estável (*label-dependent*). Na estratégia *label-free* a quantificação é determinada pela comparação do número de espectros MS/MS adquiridos para uma proteína em condições determinadas (*spectral count*) ou com o cálculo das áreas dos picos extraídos do cromatograma (XIC) (BANTSCHEFF et al., 2007; YATES; RUSE; NAKORCHEVSKY, 2009). O uso da quantificação isenta de marcação é popular devido a seu baixo custo e a ausência de qualquer tratamento adicional à amostra; em princípio os dados quantitativos estão presentes em qualquer das corridas de LC-MS/MS, porém, este tipo de quantificação não é tão acurado quanto os métodos que utilizam marcação e é muito dependente da reprodutibilidade dos cromatogramas e das ferramentas de processamento de dados (WONG; CAGNEY, 2010).

Dentro das estratégias *label-dependent*, destacam-se a adição de peptídeos análogos isotopicamente marcados, introdução química de marcadores isotópicos nos peptídeos, a incorporação metabólica da marcação isotópica (SILAC) (BANTSCHEFF et al., 2007; ONG et al., 2002), e a marcação com moléculas isobáricas do tipo iTRAQ (Isobaric Tags for Relative and Absolute Quantification) ou TMT (Tandem Mass Tag) (BONDARENKO; CHELIUS; SHALER, 2002; CHAHROUR; COBICE; MALONE, 2015; ZHANG et al., 2013).

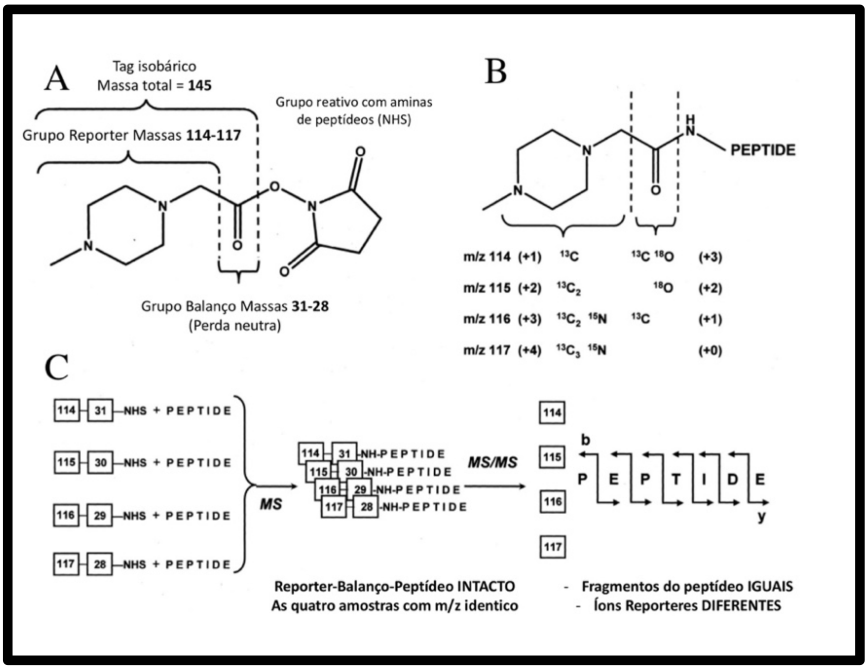


Figura 9. Estratégia de marcação com iTRAQ. A: Estrutura da etiqueta do iTRAQ, grupor repórter, grupo de balanço e grupo reativo NHS. B: Ligação do tag de iTRAQ na região N-terminal do peptídeo. C: Analise de peptídeos marcados com iTRAQ por LC-MS/MS (Figura adaptada de ROSS et al., 2004).

2.6.1 Marcação com iTRAQ

A marcação com iTRAQ tem se tornado uma das metodologias de quantificação relativa mais utilizadas na proteômica quantitativa por permitir analisar múltiplas amostras relacionadas de forma simultânea. Nesta marcação química, é introduzida uma diferença de massa nas amostras que é suscetível de ser detectada por MS. O reagente do iTRAQ é constituído por um grupo repórter (N-metilpiperazina), um grupo balanço (carbonil) e um grupo amino-reativo (éster-NHS) que é capaz de se ligar covalentemente aos grupos ε-amino da lisina e a extremidade N-terminal dos peptídeos. Cada condição biológica estará marcada com um grupo repórter diferente, porém a utilização do grupo de balanço com ^{13}C, ^{15}N e ^{18}O faz com que a massa total do reagente seja a mesma. Quando as diferentes amostras são submetidas a uma varredura inicial em MS, inicialmente não se detecta nenhuma diferença de massa entre elas. Após sofrer o processo de fragmentação (CID ou HCD), os grupos reporteres são liberados e a concentração relativa dos peptídeos é deduzida a partir da intensidade desses grupos (Figura 9) (ROSS et al., 2004). Dependendo do tipo de estudo, pode-se utilizar o reagente de quatro canais (4-plex; 114, 115, 116 e 117) ou de oito canais (8-plex; 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 121) (CHOE et al., 2007). As principais vantagens do iTRAQ são a diminuição do tempo de análises no espectrômetro de massas, a melhora na reprodutibilidade dos experimentos e a grande faixa de trabalho em valores de *fold-change*. Entre as desvantagens destaca-se o elevado custo dos reagentes, o número de canais de marcação restritos (comparação de número de amostras limitada) e a dependência da intensidade dos íons repórteres em amostras complexas na hora de fazer a análise estatística (DOWLE; WILSON; THOMAS, 2016). Existem outros métodos de marcação isobáricos disponíveis como TMT 2-plex, 6-plex e 10-plex, porém, na literatura destaca-se o iTRAQ 4-plex como o sistema mais eficiente em termos de quantificação e identificação (PICHLER et al., 2010).

2.7 Análise de dados

O processamento das amostras no espectrômetro de massas se dá em duas etapas. Primeiro o instrumento realiza uma inspeção (*full scan* ou MS^1) que analisa todos os íons intactos injetados, em uma segunda etapa, um ou mais peptídeos são sequencialmente isolados, fragmentados (CID/HCD) e os íons resultantes são analisados também (MS^n ou MS/MS); todos os peptídeos da amostra são processados da mesma forma. Os espectros de MS1 contêm as massas experimentais dos peptídeos e sua carga e os espectros MS/MS contêm os padrões de fragmentação dos peptídeos. Com o objetivo de maximizar o número de peptídeos a serem processados, a aquisição de espectros está sob a supervisão de parâmetros previamente estabelecidos, ou seja, por aquisição dependente dos dados (data dependent acquisition – DDA). Nesta estratégia, selecionam-se os íons mais abundantes no MS^1, íons com carga específica, íons monoisotópicos e a criação de uma lista de exclusão dinâmica de precursores. Finalmente, todas essas informações são guardadas em um arquivo .RAW (bruto) (ENG et al., 2011).

A análise dos dados contidos no arquivo .RAW compreende a identificação dos espectros utilizando algum algoritmo de busca, validação das identificações, identificação das proteínas, organização dos dados em listas e o armazenamento de dados em repositórios públicos (DEUTSCH; LAM; AEBERSOLD, 2008). Durante o processamento eliminam-se espectros de pouca qualidade e espectros originados de contaminação, detectam-se picos monoisotópicos, determina-se a carga do precursor e reduz-se o sinal-ruído (MUJEZINOVIC et al., 2006; NESVIZHSKII, 2007). Dependendo do sistema biológico de estudo, a identificação de peptídeos baseada na interpretação de espectros de MS/MS pode ser realizada de duas maneiras, uma dependente de banco de dados e a outra independente. Na estratégia de busca com dados não interpretados dependente de banco de dados utilizam-se diversas estratégias de alinhamento entre o espectro teórico, gerado *in silico*, e o experimental, sendo este método conhecido como Peptide Spectrum Match (PSM), método considerado padrão ouro nas ferramentas de busca atuais.

A PSM consiste em correlacionar espectros MS/MS experimentalmente obtidos com padrões teóricos de fragmentação *in silico* de peptídeos de um banco de dados atribuindo um s*core* para essa associação, dessa forma, normalmente o peptídeo com melhor *score* (*rank* 1) é escolhido para as seguintes etapas. No algoritmo devem-se ter presentes alguns critérios como tolerância de massa, enzima utilizada, presença de PTMs, entre outras. Dentre as ferramentas computacionais disponíveis para fazer PSM encontram-se SEQUEST (ENG; MCCORMACK; YATES, 1994), Mascot (PERKINS et al., 1999), ProLuCID (XU et al., 2006), X-Tandem (CRAIG; BEAVIS, 2004), Comet (ENG; JAHAN; HOOPMANN, 2013), entre outras. Os resultados dessas ferramentas de busca atualmente podem ser validados com abordagens que usam bancos de dados alvo-isca (target-decoy) para estimar a taxa de descoberta falsa (False Discovery Rate – FDR) (ELIAS; GYGI, 2007).

A dependência da metodologia PSM nas bases de dados representa uma das desvantagens da técnica, pois qualquer diferença entre os dados experimentais e os peptídeos preditos *in silico* não geram nenhuma identificação. Entre os casos mais comuns se destacam a presença de PTMs não previstas, substituição de aminoácidos, fragmentação incompleta dos peptídeos ou ausência de entradas na base de dados (ZHANG et al., 2013). Por outro lado, deve-se considerar que a maioria dos organismos não possui o genoma seqüenciado e, assim, torna-se inviável a análise por PSM (SHEVCHENKO et al., 2001). Mediante o uso de sequenciamento *de novo* dos espectros MS/MS e busca por similaridade de sequencia de proteínas nas bases de dados é possível abordar este tipo de desafios. A sequencia do peptídeo é reconstruída a partir dos fragmentos do espectro, tarefa que pode ser manual ou automática, sendo nos dois casos gerada uma lista de sequencias candidatas que são comparadas com os bancos de dados permitindo certo erro/tolerância por conta de múltiplos desalinhamentos de aminoácidos aumentando o número de identificações entre diversas espécies (SHEVCHENKO; VALCU; JUNQUEIRA, 2009). Esta estratégia não compara diretamente os espectros MS/MS com espectros teóricos, podendo ser considerada como metodologia ortogonal de busca utilizada para validar identificações pouco confiáveis geradas por PSM (LEPREVOST et al., 2014).

CAPÍTULO III

JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS

3.1 Justificativa

Atualmente, numerosos estudos abordam a caracterização da diferenciação celular em múltiplos níveis moleculares. Dentre os principais desafios nesses estudos, encontra-se a escolha de um sistema biológico apropriado que permita evidenciar as mudanças morfológicas e bioquímicas durante a diferenciação. Embora os trabalhos realizados com ESCs/iPSCs/NSCs mostraram grandes avanços na identificação de proteínas chave na diferenciação de neurônios, existe uma enorme variedade de linhagens dessas células com diferentes respostas aos estímulos utilizados durante a diferenciação em cariótipo anormal, mutações específicas, fenótipos de doenças, entre outras. Devido às múltiplas origens das mesmas, se torna complexo selecionar uma linhagem "representativa" ou realizar estudos de similaridade dessas células (ADEWUMI et al., 2007). Por outro lado, as estratégias de diferenciação celular compreendem distintos meios de cultura, métodos de passagens, fatores de crescimento e fatores de indutores de diferenciação; todos eles têm um impacto significativo na caraterização molecular da diferenciação (MELO-BRAGA et al., 2015).

Nesse panorama, as células de neuroblastoma humano SH-SY5Y apresentam-se como um sistema robusto, simples e padronizado em respeito aos estudos de diferenciação celular. Mesmo sendo um sistema reportado na literatura, são relativamente poucos os trabalhos que estão focados no proteoma da diferenciação dessas células. Os principais estudos abordam a caracterização de marcadores pontuais ou eventos específicos de forma reducionista que não descrevem completamente a dinâmica da diferenciação (CONSTANTINESCU et al., 2007; DWANE; DURACK; KIELY, 2013; EMDAL et al., 2015; KOVALEVICH; LANGFORD, 2013), não realizam análises quantitativas em larga escala e não discutem a inegável influência que tem as PTMs em proteínas-chave relacionadas com a diferenciação neuronal.

Da mesma forma, a utilização de neuroesferas supõe um avanço significativo no modelamento *in vitro* da diferenciação neuronal, devido ao maior grau de interação entre as células e a ECM em comparação à cultura 2D de NSCs, fácil implementação e isolamento a partir de pacientes com doenças específicas. Estas células representam uma potencial e alternativa fonte de informação de proteínas, processos biológicos e vias de sinalização chave no desenvolvimento de neurônios não detectados com métodos "tradicionais" (DELEYROLLE; REYNOLDS, 2009). Por outro lado, por ser uma metodologia relativamente nova, a caracterização molecular das neuroesferas limita-se a identificação de marcadores comuns na diferenciação neuronal ou de identificação dos tipos celulares presentes nas mesmas; assim, há uma ausência de estudos em larga escala e de PTMs que descrevam com mais detalhe a dinâmica de interação e diferenciação dessas células.

O crescente avanço da instrumentação em espectrometria de massas combinado com a implementação de estratégias de fracionamento, enriquecimento de PTMs e metodologias sensíveis de quantificação absoluta e relativa, têm permitido aumentar significativamente a sensibilidade, robustez e rapidez na identificação de proteínas em larga escala em qualquer sistema biológico. Nesse sentido, como poucas abordagens proteômicas foram aplicadas à caracterização da diferenciação celular de SH-SY5Y e de neuroesferas (EMDAL et al., 2015; KRISHNA et al., 2014; MARIMPIETRI et al., 2013; REN et al., 2015; SAINI et al., 2014) torna-se conveniente aplicar a proteômica ao estudo da diferenciação destas células a fim de detectar proteínas adicionais que estejam relacionadas com estes tipos de processos e que por outras metodologias seriam difíceis de identificar ou quantificar.

Este trabalho estuda diversas proteínas chave e processos envolvidos na diferenciação de células SH-SY5Y e de neuroesferas pelo uso combinado de equipamentos de LC-MS/MS de alto desempenho com metodologias de fracionamento e/ou enriquecimento de fosfopeptídeos, e quantificação baseada em iTRAQ. A abordagem apresentada aqui permite comparar qualitativa e quantitativamente o proteoma destas células ao longo do tratamento com fatores de diferenciação, desta forma, avaliando o impacto da fosforilação e a descoberta de potenciais marcadores que contribuam ao conhecimento atual da diferenciação neuronal nos campos da neurobiologia e neuroproteômica.

3.2 Objetivos

3.2.1 Objetivo geral

Detectar e analisar proteínas e vias de sinalização relacionadas com a diferenciação neuronal em larga escala utilizando proteômica quantitativa aplicada aos modelos de cultura *in vitro* de células de neuroblastoma humano SH-SY5Y e neuroesferas.

3.2.2 Objetivos específicos

- Analisar, por espectrometria de massas o proteoma total de células SH-SY5Y e de neuroesfera.
- Comparar quantitativamente os perfis proteômicos de células SH-SY5Y tratadas e não tratadas com AR/BDNF utilizando a estratégia de marcação iTRAQ.
- Analisar o impacto da fosforilação a partir do fosfoproteoma de células SH-SY5Y tratadas e não tratadas com AR/BDNF utilizando iTRAQ.
- Comparar quantitativamente os perfis proteômicos de neuroesferas cultivadas em presença e ausência de fatores de crescimento e suplementadas com B27/N2 utilizando iTRAQ.
- Comparar os resultados quantitativos com a literatura publicada com o propósito de propor novos potenciais candidatos a marcadores de diferenciação neuronal.

CAPITULO IV

MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Fluxograma geral de trabalho

O trabalho experimental compreendeu três grandes fases descritas na figura 10. Na primeira, foi realizado um teste de variabilidade na quantificação por iTRAQ, para isto foram cultivadas quatro replicatas biológicas de células SH-SY5Y (Figura 10 A), em segundo lugar foi realizado o protocolo geral de análise quantitativa do proteoma e fosfoproteoma na diferenciação de células SH-SY5Y, onde foram utilizadas duas replicatas biológicas de células diferenciadas e mais duas de células não diferenciadas (Figura 10B), e, finalmente, esse mesmo protocolo foi aplicado para a análise quantitativa do proteoma das neuroesferas diferenciadas e não diferenciadas (Figura 10C).

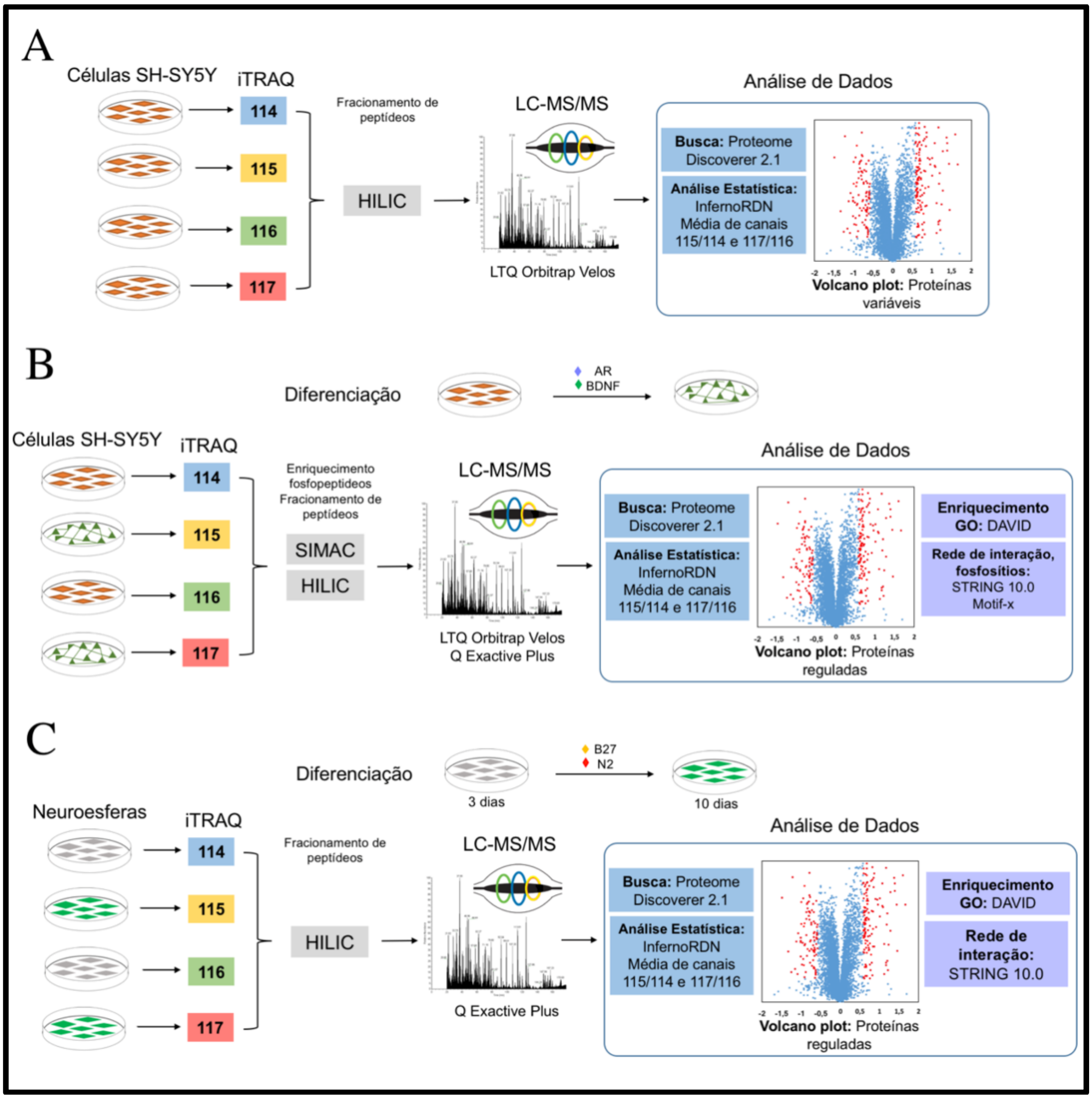


Figura 10. Fases do fluxograma de trabalho. A: teste de variabilidade do iTRAQ em células SH-SY5Y não diferenciadas. B: Proteomica quantitativa baseada em iTRAQ da diferenciação de células SH-SY5Y (proteoma e fosfoproteoma). C: Proteomica quantitativa baseada em iTRAQ da diferenciação de neuroesferas.

4.1.1 Cultura e diferenciação de células de neuroblastoma SH-SY5Y

Duas replicatas biológicas de células SH-SY5Y (ATCC CRL – 2266) foram cultivadas em meio DMEM/F12 – GlutaMAX (Dulbecco's Modified Essential Medium – Gibco) suplementado com 15% de soro fetal bovino (SFB), 100 IU/ml de penicilina e 100 μg/ml de estreptomicina. As culturas foram incubadas a 37ºC com 5% de dióxido de carbono (CO_2). O meio de cultura foi trocado a cada 3 dias até atingir a confluência para diferenciação (70%), colheita para analise proteômica e western blot (70% de confluência) ou subcultura (Figura 10A). As células foram contabilizadas em todos os passos utilizando a câmera de Neubauer.

O protocolo de diferenciação foi realizado em dois passos. Primeiro, o meio de cultura das células foi suplementado com 10 μM de AR (dia 0) com troca de meio após dois dias de incubação, posteriormente, no dia 5, as células foram lavadas com meio DMEM/F12 e incubadas nesse mesmo meio suplementado com 100 IU/ml de penicilina, 100 μg/ml e de estreptomicina e 50 ng/mL de BDNF (sem SFB). O meio de cultura foi trocado nos dias 8 e 11, e no dia 15 as células foram coletadas para western blot e analise proteômica (ENCINAS et al., 2000). A morfologia das células nos dois estágios foi visualizada no microscópio Axiovert 135 e a documentação foi realizada no programa AxioVisionLE (Zeiss).

Para a coleta de células nas duas condições, estas foram lavadas duas vezes com tampão de fosfato salino 1X (PBS) (NaCl 137 mM, KCl 2.7 mM, Na_2HPO_4 10 mM, KH_2PO_4 2 mM, pH 7.4), coletadas por raspagem e armazenadas a -80ºC até o uso.

4.1.2 Western blot de amostras de células SH-SY5Y

Aproximadamente $2*10^5$ células de cada condição foram homogeneizadas em tampão de lise (SDS 2%, Tris 125 mM pH 6.8 e inibidores de proteases) sonicadas por 10 minutos e incubadas em água fervendo por 5 minutos. As proteínas extraídas foram quantificadas pelo ensaio fluorimétrico Qubit© utilizando 1μl de amostra; a curva de calibração foi elaborada a partir dos padrões fornecidos pelo kit; 20 μg de proteínas foram resolvidas por eletroforese em um gel de poliacrilamida de 12% com SDS (SDS-PAGE) e transferidas a uma membrana de nitrocelulose. A membrana foi bloqueada com uma suspensão de 5% (p/v) de leite em pó livre de gorduras em tampão tris salino (pH 7.4) e

Tween-20 0.1%, posteriormente, foram testados os anticorpos rabbit anti-Tubb3 (diluição 1:1000), mouse anti-Nestin (diluição 1:1000) e rabbit anti-MAP2 (diluição 1:1000). Finalmente, as membranas foram incubadas com os anticorpos secundários conjugados à HRP (peroxidase de rábano) (diluição 1:2000 ou 1:10000) e as bandas foram visualizadas utilizando um kit de quimioluminiscencia (ECL) na câmera ImageQuant LAS 4000 (GE Healthcare).

4.1.3 Cultura, diferenciação e coleta de neuroesferas

Foram utilizadas duas replicatas biológicas de iPSCs obtidas no Banco de células tronco pluripotentes do Ministério Brasileiro da Saúde (CONEP B-027 # 25000.111598/2014-04). De acordo com o provedor, as células foram reprogramadas utilizando o protocolo desenvolvido por Paulsen et al. 2012 (PAULSEN et al., 2012) sendo transduzidas com o kit CytoTune ®-iPS Sendai (o cariótipo e a presença de marcadores de pluripotência foram confirmados). As iPSCs foram cultivadas em Meio Essencial 8 contendo DMEM/F12 e mTeSR1 em placas com matriz Matrigel. As passagens das colônias celulares foram feitas com Accutase® após 5 - 7 dias de cultura (70 – 80% de confluência); a cultura foi mantida a 37ºC em ar húmido com 5% de CO_2.

Para induzir a diferenciação a NSCs, as iPSCs foram cultivadas no meio PSC de indução neural (composto por meio Neurobasal e suplemento de indução neural PSC 1X), este meio foi trocado diariamente até o dia 7, posteriormente, as células neuronais foram expandidas em meio de indução neuronal (DMEM/F12 e Neurobasal (1:1) com suplemento PSC) até uma confluência de 80%.

A obtenção das neuroesferas foi realizada a partir das NSCs obtidas no passo anterior. As NSCs foram tratadas com Accutase® e ressuspendidas em meio DMEM/F12 e Neurobasal (1:1) suplementado com N2 e B27 1X, estas células suspendidas foram cultivadas a 37ºC e com rotação a 90 rpm com troca de meio cada 4 dias. As células foram documentadas utilizando o sistema EVOS Cell Imaging System (Thermo Scientific). Após 3 e 10 dias de incubação (Figura 10C), as neuroesferas foram coletadas por centrifugação a 1.000 rpm, lavadas duas vezes com tampão PBS 1X frio, e armazenadas a -80ºC até o uso.

4.1.4 Lise celular para análise proteômica

Foram utilizadas aproximadamente $3*10^6$ células SH-SY5Y e $3*10^6$ células de neuroesferas para cada condição e/ou replicata biológica (Figura 10). A lise celular foi realizada utilizando tampão de lise: ureia 7M, tioureia 2M, HEPES 50 mM pH 8, NaCl 75 mM, EDTA 1mM, PMSF 1 mM, e coquetel de inibidores de proteases e fosfatases, uma vez adicionado o tampão, a solução foi homogeneizada suavemente com micropipeta, depois foi submetida a sonicação com frequência de 40 kHz durante 10 minutos e finalmente centrifugada a 10.000 x *g* durante 10 minutos a 4ºC, o sobrenadante foi recuperado para fazer quantificação de proteínas e digestão. As proteínas foram quantificadas pelo ensaio fluorométrico Qubit© corrigindo a composição dos padrões fornecidos pelo kit com o tampão de lise utilizado.

4.1.5 Digestão de proteínas

Foram processados volumes equivalentes a 100 µg de proteína total extraída para realizar a digestão. Inicialmente, as amostras foram incubadas com ditiotreitol (DTT) em concentração final 10 mM a 30ºC por uma hora, posteriormente, foi adicionada iodoacetamida (IAA) até uma concentração de 40 mM a temperatura ambiente em ausência de luz por 30 minutos. A mistura foi diluída 10 vezes utilizando tampão HEPES 50 mM pH 8 para reduzir a concentração de ureia/tioureia para posterior digestão. A digestão foi executada incubando a solução resultante com tripsina em uma relação 1:50 (enzima:proteína) a 37ºC durante 16 horas. A reação foi interrompida pela adição de ácido trifluoroacético (TFA) 10% até em concentração final de 0.1%.

4.1.6 Dessalinização de amostras em macro colunas com resina de C-18 Poros R2

A dessalinização das amostras na metodologia geral foi feita utilizando a resina Poros 20 R2 de C-18 (Applied Biosystems). As amostras foram processadas em macro-colunas (Macrospin column – Harvard Apparatus) de R2 previamente lavadas com ACN 100% e equilibradas com TFA 0.1%; as amostras foram incubadas com a resina e eluidas por centrifugação a 2000 x*g* (duas vezes), posteriormente, a resina foi lavada duas vezes com TFA 0.1% e os peptídeos retidos foram eluídos sequencialmente com ACN

50%/TFA 0.1% e ACN 80%/TFA 0.1%, finalmente, os peptídeos foram secos em concentrador a vácuo tipo *speedvac*.

4.1.7 Marcação com iTRAQ 4-plex

De acordo com a informação descrita na figura 10, foram marcados peptídeos procedentes de duas replicatas biológicas de cada condição de cultura, assim, os canais 114 e 116 corresponderam a células não diferenciadas e os canais 115 e 117 corresponderam a células diferenciadas (Figuras 10 B e C). No caso do teste de variabilidade de iTRAQ, os quatro canais foram utilizados para marcar peptídeos procedentes de células SH-SY5Y não diferenciadas (Figura 10A).

Seguindo as instruções do fabricante (ABSciex), foram marcados 100 µg de peptídeos para cada um dos reagentes do iTRAQ. Inicialmente, os peptídeos foram redissolvidos em 30 µl de tampão bicarbonato de trietilamônia (TEAB) 0.5 M, pH 8.5; e foi adicionado o respectivo reagente iTRAQ previamente dissolvido em etanol absoluto (concentração final de etanol na mistura de 70% v/v), a reação foi incubada a temperatura ambiente por 1 hora; posteriormente, as soluções dos 4 reagentes foram misturadas em um único tubo em uma relação de 1:1:1:1; a solução resultante foi parcialmente seca no concentrador a vácuo tipo *speedvac*, acidificada com TFA a uma concentração final de 0.1% e dessalinizada de acordo com o protocolo 4.1.6.

4.1.8 Enriquecimento de fosfopeptídeos (SIMAC) em amostras de células SH-SY5Y

A análise do fosfoproteoma foi realizdo em células SH-SY5Y nas duas condições de cultura, assim, todos os passos de cultura e de tratamento de amostra foram realizados de acordo com os itens 4.1.1 a 4.1.7. Para o isolamento de fosfopeptídeos foi preparada a matriz de IMAC PHOS-Select© com Fe^{3+} quelatado (Sigma), 120µl de pérolas de gel foram colocadas em um cartucho vazio (dos usados para dessalinização com R2), as pérolas foram lavadas com água para remover excesso de íons Fe^{3+} e equilibradas com solução de ACN 50%/TFA 0.1%. Aproximadamente 400 µg de peptídeos previamente marcados com iTRAQ foram ressuspendidos em ACN 50%/TFA 0.1% e misturaram-se com o gel, depois de recuperar a fração não retida, e lavar mais duas vezes com ACN 50%/TFA 0.1%, a fração ácida (duas vezes 100 µl de ACN 20%/TFA 0.1%) foi coletada junto com a fração de peptídeos não retidos. A fração básica foi recuperada com a adição de 100 µl de hidróxido de amônia - NH_4OH 1% pH 11.3 duas vezes. A mistura das frações não retida e a ácida foi utilizada para incubação com esferas TiO_2; a fração básica que corresponde a peptídeos multifosforilados foi seca em concentrador a vácuo e resuspendida em ácido fórmico (FA) 0,1% para análise por LC-MS/MS.

Os peptídeos recuperados da fração ácida e os não retidos do IMAC foram resuspendidos em ACN 80%/ácido glicólico 1M/TFA 5% e quantificados, incubados com as esferas de TiO_2 de 5 µm de diâmetro (GL Sciences) previamente lavadas e equilibradas com o mesmo tampão; foram utilizados 0.6 mg de TiO_2 por cada 100 µg de proteína. Esse sistema foi incubado à temperatura ambiente e sob agitação constante por 30 minutos. Após deixar decantar as esferas de TiO_2, o sobrenadante (peptídeos não retidos) foi retirado, as esferas foram lavadas com ACN 80%/TFA 5% e incubadas por mais 20 minutos sob agitação com solução de NH_4OH 1% pH 11.3 para eluir os peptídeos monofosforilados; a mistura foi transferida para uma ponteira P200 que continha um *plug* de resina C8 (marca 3M), utilizando uma seringa (RAPPSILBER; ISHIHAMA; MANN, 2003), a solução básica dos peptídeos foi coletada e as esferas foram lavadas com ACN80%/TFA 1% (essas lavagens juntaram-se com a fração eluida). Os peptídeos fosforilados foram lavados utilizando a Resina Oligo R3 de forma similar ao descrito no item 4.1.6.

4.1.9 Fracionamento off-line de peptídeos por cromatografia de interação hidrofílica

A mistura das amostras marcadas com iTRAQ procedentes de células SH-SY5Y (prova de conceito, proteoma total e fosfoproteoma) e neuroesferas foram fracionadas *off-line* pela estratégia HILIC. As amostras previamente secas foram redissolvidas em ACN 90%/TFA 0.1% e injetadas no cromatógrafo UFLC Shimadzu utilizando uma coluna TSKGel Amide-80 (5 cm x 2 mm i.d. x 5 µm - Supelco), fluxo de 0.2 ml/minuto; fases móveis A (ACN 90%/TFA 0.1%) e B (TFA 0.1%); gradiente: 0% de B durante 10 minutos; 0% a 12% de B em 2 minutos; 12% a 20% de B em 13 minutos; 20% a 30% de B em 30 minutos; 30% a 100% de B em 5 minutos; e, 100% a 0% de B em 5 minutos. Para cada conjunto de misturas, coletaram-se 26 de frações de 500 µl (aquelas com baixa intensidade na absorbância foram misturadas em um único tubo), foram secas em concentrador a vácuo tipo *speedvac* e ressuspendidas em FA 0.1% para analise por LC-

MS/MS.

4.1.10 Análise por espectrometria de massas – LC-MS/MS

Cada fração ou mistura de frações foi analisada em três replicatas técnicas por nanocromatografia líquida (nLC) no instrumento Easy-nLC 1000 acoplado aos espectrômetros de massas Q-Exactive ou LTQ Orbitrap Velos (Thermo Scientific). As frações dissolvidas em FA 0.1% (solvente A) foram carregadas em uma coluna guarda (*trap*) (ReprosilPur C18, 2 cm x 150µm i. d. x 5 µm) com fluxo de 5 µL/min e separadas na coluna analítica (ReprosilPur C18, 30 cm x 75 µm i.d. x 1.7 µm) com um fluxo constante de 300 nL/min e um gradiente linear de 5-40% de solvente B (95% ACN, 0.1% FA) em 130 minutos. Na fonte de ionização por ESI foram configurados uma voltagem de 2.0 kV e 200ºC no aquecimento do capilar. O espectrômetro Q-Exactive foi operado no modo de aquisição dependente de dados (data dependent analysis - DDA); exclusão dinâmica de 30 ms, *full scan* ou MS1 na faixa de 375 – 1800 m/z, resolução de 70.000 (200 m/z), fragmentação dos 12 íons mais intensos no modo HCD com energia de colisão normalizada (NCE) de 30 e resolução de 17.000 (m/z 200) na aquisição dos espectros MS/MS. O equipamento LTQ Orbitrap Velos foi operado em modo DDA em alta resolução utilizando exclusão dinâmica de 45 ms, MS1 com resolução de 60000 (400 m/z) na faixa anteriormente descrita e seguido da fragmentação dos 5 ions mais intensos com HCD, NCE de 35 e resolução de 7500 na aquisição de espectros MS/MS. Espécies carregadas com +1 ou maiores a +4 foram excluídas do analise MS/MS.

4.1.11 Análise de dados

4.1.11.1 Busca de proteínas por PSM

Os arquivos dos espetros de massas experimentais (*.*RAW files*) foram processados no programa Proteome Discoverer 2.1 (arquivos da prova de conceito, proteoma total e fosfoproteoma). A identificação dos peptídeos foi realizada com o algoritmo Sequest HT contra a base de dados de *Homo sapiens* disponível em Uniprot (http://www.uniprot.org/) levando em conta os seguintes parâmetros: tolerância de massa do peptídeo de 10 ppm, tolerância de massa dos fragmentos de MS/MS de 0.1 Da, clivagem tríptica, máximo de duas clivagens enzimáticas ausentes permitidas, carbamidometilação da cisteina (+57.021 Da) como modificação fixa e, modificação por iTRAQ 4-plex (+144.102 Da em tirosina, lisina e extremidade N-terminal), fosfato (+79.966 Da em serina, treonina e tirosina) e a oxidação da metionina (+15.999 Da) como modificações variáveis. Somente os peptídeos de alta confiabilidade baseada nos valores de *XCorr* (>2.28, em alta resolução) e de ΔCn (>0.15) foram considerados para os seguintes passos da analise. Para estimar a taxa de falsa descoberta ou FDR, a busca foi processada contra uma base de dados decoy reversa; assim, os dados foram processados no módulo *Target Decoy PSM Validator* onde foram selecionadas identificações com um *q* valor igual ou menor a 0.01. Os fosfopeptideos foram analisados no modulo ptmRS e aqueles com uma probabilidade maior de 75% na identificação do sítio de fosforilação foram utilizados para os subsequentes analises.

4.1.11.2 Análise estatística

Os dados de quantificação baseada nas relações dos canais do iTRAQ foram processados nos programas InfernoRDN (Pacific Northwest National Laboratory, https://omics.pnl.gov/software/infernordn) e Perseus (TYANOVA et al., 2016). Os dados de quantificação de cada uma das análises e suas respectivas replicatas técnicas foram extraídos do arquivo de resultados do Proteome Discoverer respectivo. A quantificação relativa foi baseada nos valores das relações dos canais 115/114 e 117/116, em outras palavras, intensidade de peptídeos procedentes de células diferenciadas sobre intensidade de células não diferenciadas (Figuras 10 B e C); foram utilizados somente peptídeos únicos para a analise. Os valores das relações foram transformados a escala logarítmica em base 2 e normalizados com a mediana dos mesmos. Com base nos resultados do teste estatístico Grubb, os valores de quantificação de peptídeos foram levados para proteínas. Os valores das relações proteicas nas replicatas técnicas e biológicas foram comparados com o teste *t* bicaudal. Os valores da média aritmética do *fold-change* entre as replicatas e o *p*-valor foram plotados em um *Vulcano plot* para detectar as proteínas reguladas estabelecendo-se dois valores de *cut-off*: *p*-valor menor a 0.05 e *fold-change* maior ou igual a 1.5 ou menor ou igual a 0.67. No caso da analise de variabilidade, além de realizar o protocolo anteriormente mencionado, foram calculados e plotados os valores de coeficiente de variação (CV) de peptídeos/proteínas que tivessem os seis valores de quantificação por iTRAQ (relações 115/114 e 117/116 cada uma em triplicata técnica).

4.1.11.3 Análise de enriquecimento de Gene Ontology, redes de interação e sítios de fosforilação

As analises de enriquecimento de termos de Gene Ontology (GO) e de vias de sinalização foram realizadas no programa on-line DAVID (https://david.ncifcrf.gov/). Tanto o proteoma total quanto o set de proteínas reguladas foram analisadas comparando-as com a base dados do *Homo sapiens* disponível no programa. Da mesma forma, esta base de dados foi utilizada como background para quantificação dos termos relacionados com Processos Biologicos, Função Molecular, Componente Celular; vias de sinalização foram analisadas a partir do repositório de vias do KEGG. Para facilitar a visualização dos resultados, foram plotados em gráfico de barras os valores negativos de p em escala logarítmica de cada termo em cada condição ou set de dados.

A rede de interação das proteínas reguladas foi estudada a partir dos programas STRING 10.0 (http://string-db.org/) e Cytoscape, somente foram consideradas interações descritas a partir de dados experimentais na base de dados e com score superior a 0.9; proteínas sem nenhuma interação no mapa foram excluídas.

As sequências consenso dos sítios de fosforilação regulados foram obtidas a partir do algoritmo on-line Motif-x (http://motif-x.med.harvard.edu/) onde as sequências dos fosfopeptídeos detectados foram alinhadas e inseridas no programa. Foram avaliados sítios com seis aminoácidos á esquerda e seis a direita, o caracter central foi o correspondente a resíduos de serina, treonina ou tirosina, utilizando um *background* de *Homo sapiens* e um valor de significância de 0.0001.

CAPÍTULO V
RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Diferenciação de células SH-SY5Y

As células de neuroblastoma humano SH-SH5Y foram utilizadas como um dos modelos celulares de diferenciação neuronal *in vitro* neste trabalho. Em presença de SFB, as células mostram extensões discretas, baixa polaridade e alta capacidade de expansão (Figura 11A). Durante a incubação sequencial com AR e BDNF e em ausência de SFB, as células mostraram projeções extensas a partir do corpo celular (ou soma) similares a neuritos de neurônios maduros, transporte vesicular ao longo dessas projeções e uma forte inibição da proliferação celular (AGHOLME et al., 2010) (Figura 11B). Essa mudança morfológica foi coerente com o incremento da expressão da proteína MAP2 (proteína de citoesqueleto de neurônios) e pela ausência da expressão da nestina (marcador de NSCs) em células diferenciadas. Em ambas as condições da cultura, foi detetada a tubulina βIII, marcadora de citoesqueleto de células com características neurais (Figura 11C).

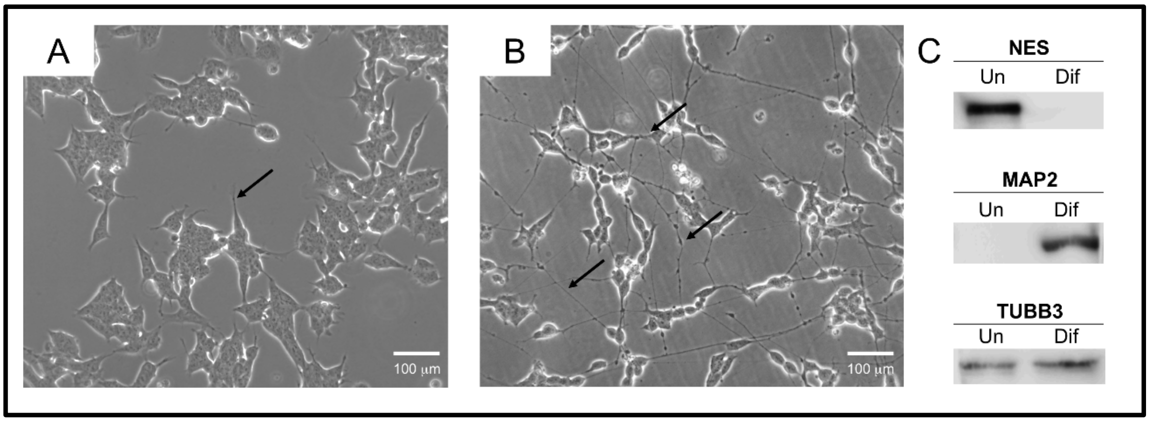


Figura 11. Morfologia das células SH-SY5Y. A: Células não diferenciadas com extensões discretas. B: Células diferenciadas depois da incubação com AR/BDNF, as setas indicam a formação e conexões de neuritos e o transporte vesicular ao longo delas. C: Expressão de marcadores de diferenciação neuronais detectados por western blot; nestina em células não diferenciadas, MAP2 em células diferenciadas e Tubulina βIII (TUBB3) em ambas condições.

O comportamento descrito na figura 11 é esperado já que a ação dos fatores neurotróficos induz a polarização das células gerando extensões axônicas que mediam a interação entre as células, neste caso, sinapses. A inibição da proliferação celular pode ser explicada, em parte, pela ação de AR/BDNF onde somente as células capazes de expressar os receptores de neurotrofinas desenvolvem mecanismos de sobrevivência e comunicação com outras células, este mecanismo é essencial no desenvolvimento do SNC porque permite maior especificidade da sinapse e um ajuste na população neuronal (ENCINAS et al., 2000; LENT, 2002).

5.2 Teste de variabilidade do iTRAQ no proteoma de células SH-SY5Y não diferenciadas

5.2.1 Proteoma de células SH-SY5Y não diferenciadas

Devido à ausência de abordagens proteômicas quantitativas em grande escala aplicadas à diferenciação de células de neuroblastoma SH-SY5Y na literatura, este trabalho incluiu o estudo prévio do proteoma de células indiferenciadas para estabelecer o perfil de proteínas susceptíveis à identificação e quantificação com iTRAQ. Nesta fase do trabalho, escolheram-se ás células indiferenciadas devido à facilidade de cultura e crescimento abundante comparado com a cultura de células diferenciadas (Figura 11A).

Na figura 12 ilustra-se o pre-fracionamento com HILIC da mistura de peptídeos marcados com iTRAQ 4-plex nas quatro replicatas biológicas utilizadas. Foram obtidas 8 frações, cinco corresponderam a frações individuais (13 a 17) e as outras três compreenderam o *pool* de frações com baixa intensidade na cromatografia (1-9, 10-12 e 18-26). Cada fração foi analisada por LC-MS/MS; a analise bioinformática dos dados considerou todas as frações em conjunto obtendo um resultado com 1% de FDR (Figura 10A).

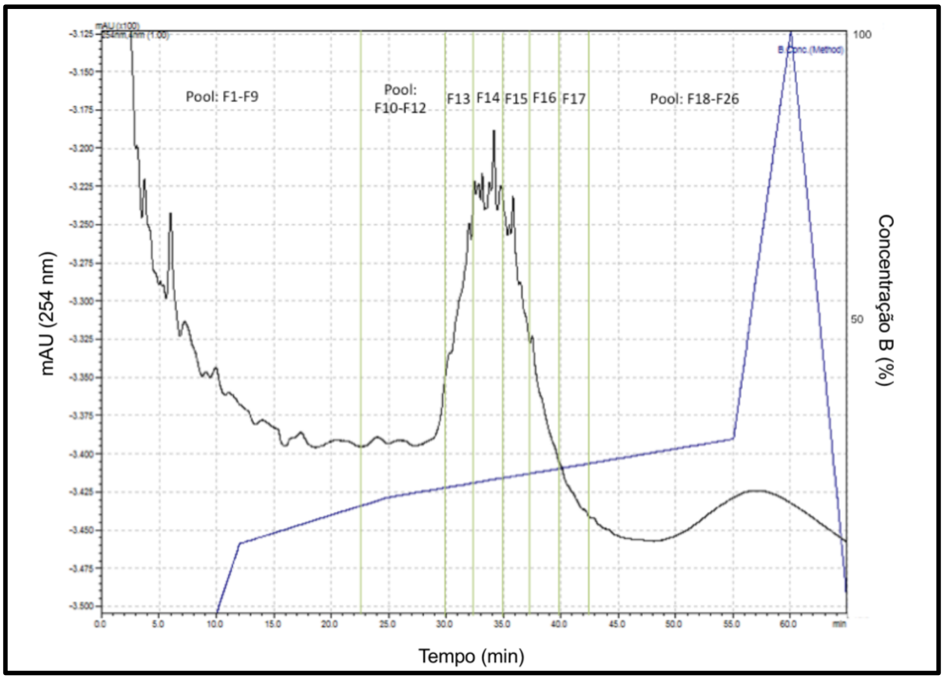


Figura 12. Fracionamento por HILIC dos peptídeos marcados com iTRAQ para a análise do proteoma total. As linhas verdes indicam como foram misturadas e/ou divididas as frações para a analise por LC-MS/MS. Fluxo: 200 µl/min, numero total de frações: 26 com 500 µl cada uma.

As análises por LC-MS/MS das frações listam 3218 grupos de proteínas (11323 proteínas com redundância) obtidos a partir de 15392 peptídeos e 66995 PSMs com FDR de 1%. Na figura 13A ilustra-se a distribuição da localização sub-celular das proteínas identificadas, que mostra uma alta proporção de proteínas de núcleo, citosol e região extracelular além de outras organelas em menor quantidade, comportamento que mostra que o protocolo de extração e análise não está limitado a uma organela em especifico e sim aos diversos compartimentos celulares que permitem estudar o proteoma de forma mais abrangente. Por outro lado, na figura 13B se mostram as principais vias (processos celulares) enriquecidas no proteoma; os termos relacionados com metabolismo de proteínas e processamento de mRNA refletem a natureza proliferativa das células analisadas e os processos relacionados com doenças neurodegenerativas (Hungtinton, Alzheimer e Parkinson) mostram coerência com o fenótipo neural que apresentam as células SH-SY5Y. Este comportamento também foi evidenciado no enriquecimento de termos GO correspondentes a “processos biológicos” e “função molecular” que mostram processos relacionados com o metabolismo de proteínas, transcrição/tradução e enovelamento de proteínas (Figura 14).

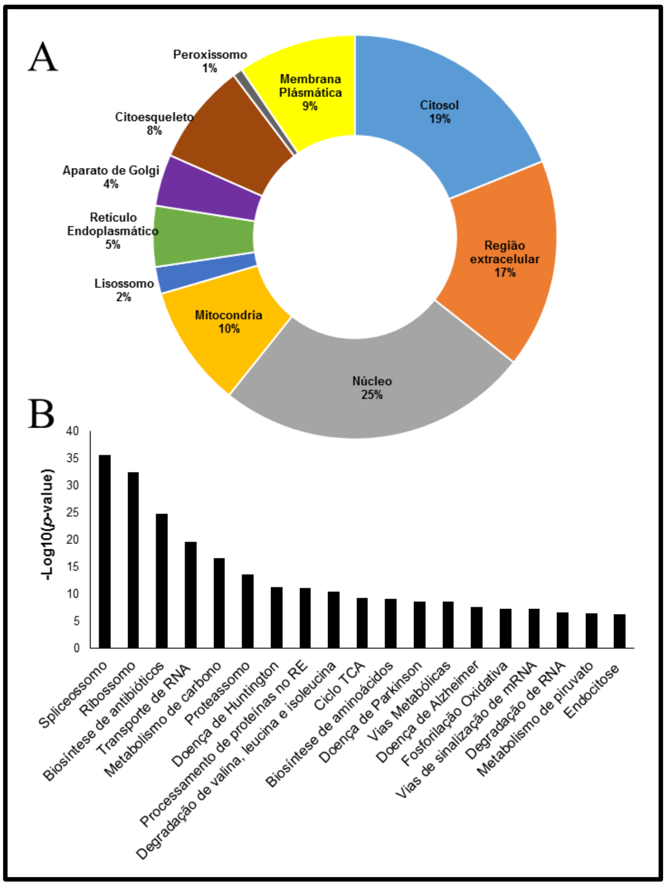


Figura 13. A: Distribuição de localização sub-celular das proteínas identificadas no proteoma de células SH-SY5Y não diferenciadas. B: Enriquecimento de vias ou processos celulares da base de dados KEGG (Top 20).

Dentre as proteínas de membrana detectadas destacam-se receptores tirosina e treonina cinases, canais de transporte de íons, receptores de açúcares (manose), moléculas de adesão neural, integrinas, entre outras. Por sua parte, no citoplasma e núcleo identificaram-se proteínas relacionadas com a transcrição/tradução, ubiquitinação, ciclinas, proteínas de processamento de AR, proteínas Ras, metabolismo, sinapses (sintaxina, SNARE, Hungtintina), complexos proteicos de associação a vesículas, clatrina, citoesqueleto (tubulina, quinesina, dineina, miosina, actina e laminina), sinalização intracelular (MAPK, sinalizador transdutor e ativador da transcrição – STAT, TrkB e processamento de IP3) e outros sistemas particulares (proteassomo, cinetócoro, fatores de transcrição, citocromo, entre outros).

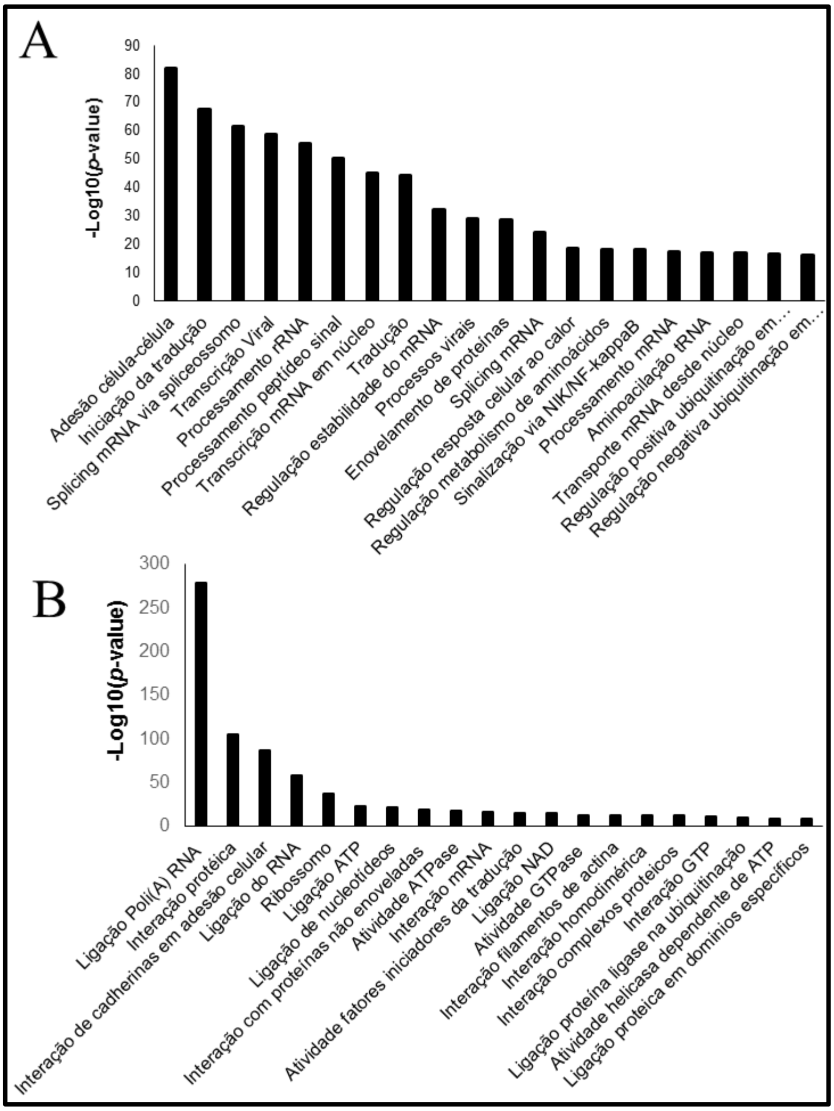


Figura 14. Enriquecimento de termos de GO no proteoma de células SH-SH5Y não diferenciadas. A: Processos biológicos (top 20). B: Função molecular (top 20).

5.2.2 Teste de variabilidade do iTRAQ

Uma vez identificado o proteoma das células SH-SY5Y foi realizado um teste estatístico para avaliar as proteínas susceptíveis de variação quantitativa em amostras iguais de células não diferenciadas utilizando iTRAQ. Esta análise permite estabelecer os níveis de variabilidade e/ou reprodutibilidade na cultura de células utilizadas para fins quantitativos. Foram realizados dois tipos de análise estatística para estabelecer essa variabilidade; o primeiro consistiu em simular uma quantificação relativa utilizando dados normalizados e plotando os dados em um *volcano-plot*, assim, os parâmetros de *fold-change* e *p* valor foram considerados para detectar as proteínas que possuem variação. Na segunda metodologia foram realizados analises de coeficiente de variação (CV) entre replicatas técnicas e biológicas para as diversas proteínas com um ou mais peptídeos únicos.

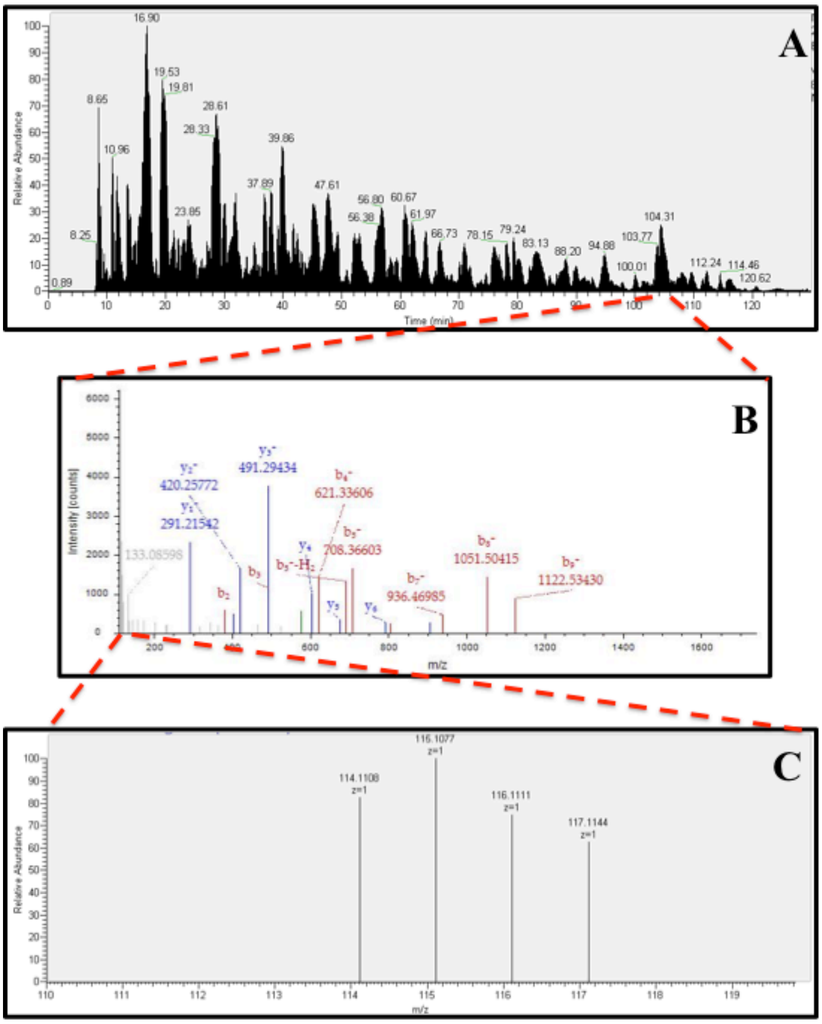


Figura 15. A: Perfil cromatográfico da fração 14 da HILIC, B: espectro MS/MS do peptídeo SFLESIDDALAEK (da proteína MAP cinase) e C: ampliação da região dos íons repórteres do iTRAQ.

Devido ao tipo de experimento sugerido (Figura 10A), espera-se que não existam valores muito distantes de 1 (um) que demostrem mudanças na abundância de proteínas. Na figura 15 se ilustra um dos cromatogramas de 130 minutos obtidos na análise, os íons repórteres do iTRAQ mostraram pequenas variações de intensidade entre eles mesmos utilizando uma única condição biológica para os quatro canais. Utilizando os parâmetros descritos no item 4.1.12.2, foram detectadas 21 proteínas com *fold-change*≥1.5 e $p<0.01$ (Tabela 1, figura 16), em relação ao total de proteínas detectadas pode ser considerado um número baixo e, diminuindo a estringência do *p*-valor a $p<0.05$, o total de proteínas variáveis só aumenta em uma proteína.

Tabela 1. Proteínas com abundancia diferencial no teste de variabilidade do iTRAQ utilizando quatro replicatas biológicas de células não diferenciadas.

Código Uniprot	**Descrição**	**Gene**	***p*-valor**	***Fold Change***
P04406	Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase	GAPDH	2,54E-07	1,50
P21333	Filamina-A	FLNA	6,29E-09	1,51
P14618	Piruvato cinase	PKM	5,29E-09	1,52
Q02790	Peptidil-prolil cis-trans isomerase	FKBP4	2,24E-07	1,52
P62277	Proteína Ribosomal 40S S13	RPS13	1,36E-07	1,52
P35908	Queratina, tipo II citoesqueleto epidermal	KRT2	3,78E-03	1.52
P07437	Tubulina cadeia beta	TUBB	7,38E-08	1,53
P40926	Malato desidrogenase mitocondrial	MDH2	6,60E-08	1,53
P09211	Glutatione S-transferase	GSTP1	8,94E-07	1,53
Q16658	Fascina	FSCN1	5,44E-11	1,53
P04264	Queratina, tipo II citoesqueleto	KRT1	4,56E-05	1,56
P13645	Queratina, tipo II citoesqueleto 10	KRT10	1,87E-05	1,57
P08238	Proteína Choque térmico 90 beta 1	HSP90AB1	3,00E-10	1,57
Q14315	Filamina-C	FLNC	6,87E-07	1,59
P13639	Fator de elongação 2	EEF2	3,25E-08	1,66
Q14108	Proteína de membrana lisosomal 2	SCARB2	5,09E-06	1,67
P04792	Proteína de Choque térmico beta 1	HSPB1	6,59E-08	1,71
P30101	Proteína dissulfuro-isomerase A3	PDIA3	2,39E-09	1,72
P35527	Queratina, tipo II citoesqueleto 9	KRT9	6,67E-04	1,75
H0Y860	Molécula de interação estromal 2	STIM2	2,25E-02	1,78
E9PAV3	Complexo associado a Polipeptídeo nascente subunidade alfa	NACA	1,10E-08	1,82

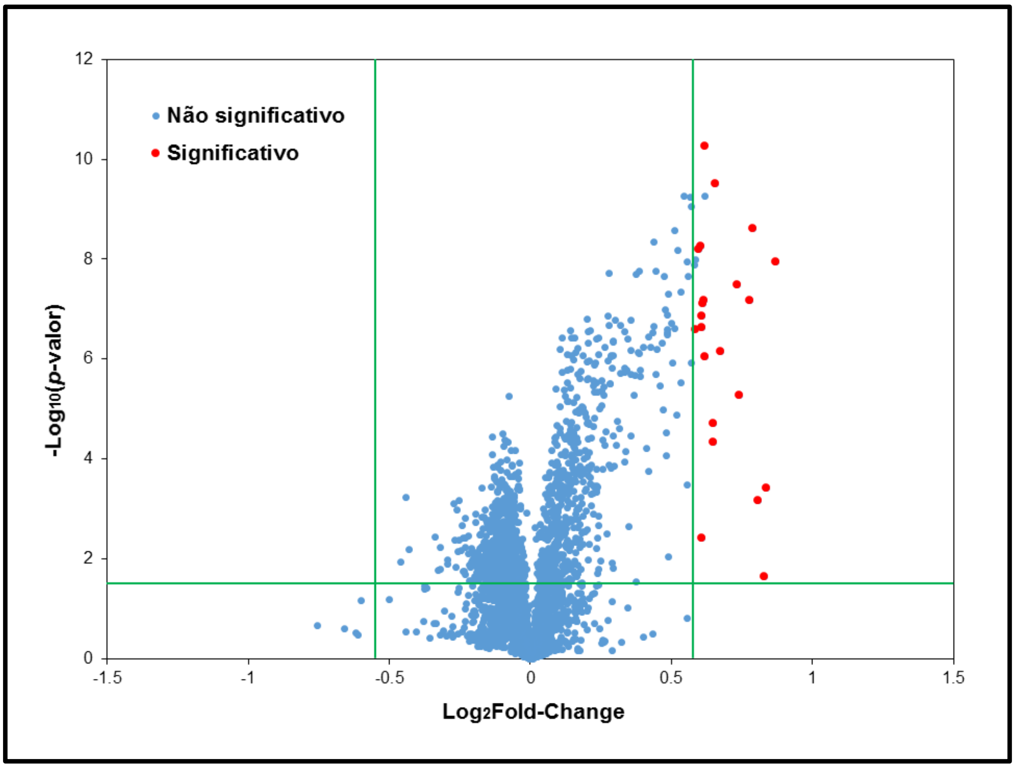


Figura 16. *Volcano plot* da distribuição de valores de *Fold-change* e *p*-valor na análise de variabilidade quantitativa do iTRAQ. As linhas verdes representam os critérios estatísticos de *fold-change*≥1.5 ou <0.67 e *p*<0.05. Os pontos em vermelho representam as proteínas que passaram esses critérios.

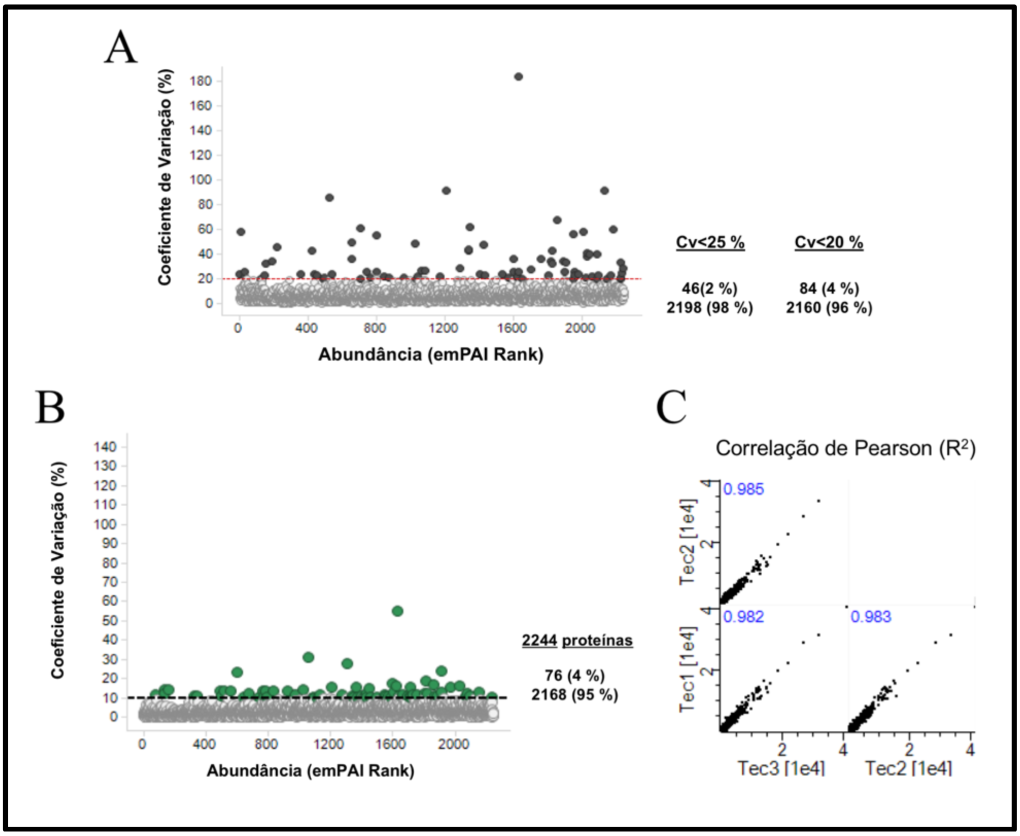


Figura 17. Analise de coeficiente de variação (CV) e correlação das amostras de células SH-SY5Y não diferenciadas. A: CV entre replicatas biológicas. B: CV entre replicatas técnicas. C: Coeficientes de correlação de Pearson entre replicatas técnicas.

A análise dos valores de CV reflete um alto grau de reprodutibilidade entre replicatas técnicas e biológicas (Figura 17). Como era de esperar, entre replicatas biológicas existe um maior número de proteínas susceptíveis a variação, mas em ambos casos mais do 95% das proteínas possuem um CV menor a 20%, comportamento normal em um experimento quantitativo em larga escala (GEYER et al., 2016); nas replicatas técnicas evidencia-se a relação significativa entre elas dada pelo coeficiente de correlação de Pearson (Figura 17C). Entre as proteínas mais variáveis encontram-se algumas isoformas da queratina, histonas e proteínas abundantes de metabolismo (Apêndice 1).

A variação da abundância das proteínas descritas na tabela 1 pode ser explicada tanto por mudanças reais nas amostras biológicas assim como pela variabilidade na manipulação ou tratamento das mesmas (extração, digestão, eficiência da marcação, separação cromatográfica, eficiência na detecção por espectrometria de massas, entre outras). Uma das proteínas encontradas corresponde à queratina, sua presença como contaminante na preparação de amostras não é totalmente controlável, por isto, se espera que mostre alguma variação em cada um dos canais do iTRAQ, dentre os peptídeos identificados como diferencialmente abundantes se encontra a sequência TNAENEFVTIKK que é um dos peptídeos proteotípicos da queratina melhor caracterizados (HODGE et al., 2013; NAWROT; BARYLSKI; SCHULZE, 2013).

Assumindo que os erros no tratamento da amostra foram minimizados e que as quatro amostras biológicas utilizadas são altamente homogeneas (Figura 10A), a variação apreciada pode se explicar com base na natureza da quantificação por iTRAQ e a robustez da análise estatística. O relatório quantitativo de uma proteína por esta estratégia se infere a partir da quantidade de peptídeos identificados para essa proteína assim como as intensidades dos íons precursores e dos íons repórteres detectados por MS/MS. Em geral, se aceita que baixas intensidades mostrem um CV maior do que intensidades altas, mas na medida que existam mais peptídeos disponíveis para identificar e/ou quantificar uma proteína a intensidade dos seus íons repórteres têm menor relevância estatística; isto é importante porque nas análises de espectrometria de massas com iTRAQ existem poucos peptídeos com intensidades significativas e muitos peptídeos com intensidades baixas ou moderadas; se fossem rejeitadas essas intensidades menores, o sistema biológico estaria perdendo informação (CHEE et al., 2007; HULTIN-ROSENBERG et al., 2013). As proteínas que mostraram variação são em boa parte do tipo *house keeping* presentes em células animais (por exemplo, a gliceraldeido 3-fosfato desidrogenase) que possuem uma cobertuda de sequência de mais de 50%, mas o número de peptídeos que determinam sua abundancia "diferencial" é muito baixo (entre um e quatro peptídeos), isto faz com que a quantificação seja altamente dependente da sua intensidade (e indiretamente, do *spectral count*), desta forma, a quantificação por iTRAQ em analisadores tipo Orbitrap traz consigo um erro associado em torno de 5% do total de proteínas quantificadas devido à presença reduzida de peptídeos com intensidades altas e variáveis (em parte, pela existência de PTMs que mudam a abundância de peptídeos específicos evidenciando uma discrepância na quantificação; em uma mesma proteína pode existir um peptídeo que aumenta e outro que diminui em relação ao controle). Nestes casos estão disponíveis ferramentas estatísticas adicionais que permitem quantificar proteínas em amostras complexas utilizando poucos peptídeos (HULTIN-ROSENBERG et al., 2013).

A análise feita nesta fase do trabalho estabelece um controle de qualidade na quantificação de proteínas por iTRAQ, sendo importante já que as proteínas alvo que se desejam estudar geralmente são de baixa abundancia (p. ex. fosfoproteínas) e em alguns casos, mudanças pequenas na abundancia podem gerar um efeito biológico significativo. Assim, foram padronizados alguns parâmetros estatísticos na quantificação para detectar proteínas envolvidas na diferenciação de células SH-SY5Y de forma confiável. Por outro lado, a abordagem apresentada aqui, permitiu verificar a reprodutibilidade da cultura realizada com as células de neuroblastoma, os dados mostraram que o CV das proteínas quantificadas é baixo em mais de 95%, isto demonstra que as replicatas biológicas utilizadas apresentam o mesmo tipo de comportamento e que as variações intrínsecas podem ser detectadas ou controladas, assim, o experimento realizado pode ser considerado reprodutível a nível proteômico; este tipo de análise pode ser extrapolado para qualquer tipo de célula que seja cultivada *in vitro* para fins quantitativos em larga escala.

5.3 Análise proteômica quantitativa da diferenciação das células SH-SY5Y utilizando iTRAQ

Como descrito na figura 10B, foram utilizadas duas replicatas biológicas de células SH-SY5Y não diferenciadas e outras duas de células diferenciadas com AR/BDNF (Figura 10 A e B). As proteínas extraídas dessas condições foram digeridas, os peptídeos marcados com iTRAQ e misturados em uma relação 1:1:1:1; os peptídeos foram fracionados com HILIC (Figura 18) e cada fração foi analisada por LC-MS/MS. A metodologia proposta incorporou também o enriquecimento de fosfopeptídeos utilizando a estratégia SIMAC. Desta forma, os dados obtidos a partir do proteoma total e do fosfoproteoma foram submetidos a análise estatística baseada nos valores das relações dos canais 115/114 e 117/116, análise de enriquecimento de termos de GO, análise de fosfosítios presentes em cada condição e rede de interação de proteínas chave.

A presente análise identificou 5587 grupos de proteínas considerando um FDR de 1%, desse total; 1321 foram fosfoproteínas identificadas a partir de 2683 fosfosítios com uma probabilidade maior a 75% gerada pelo algoritmo ptmRS (Tabela 2, figura 19A). A partir da análise de localizações subcelulares se evidenciou uma ampla distribuição de proteínas nos diferentes compartimentos celulares mostrando que o método de extração utilizado foi abrangente e não restringido a um só compartimento (Figura 19B). A da lista de identificações do proteoma total e fosfoproteoma foi contrastada com a base de dados do KEGG para estabelecer o enriquecimento de vias de sinalização ou processos celulares, similar ao descrito na figura 13B, diversos termos relacionados com o fenótipo neuronal aparecem enriquecidos: transporte vesicular baseado na interação de proteínas SNARE, sinalização de neurotrofinas, diversas vias metabólicas e as doenças de Huntington, Parkinson e Alzheimer (Figura 19C).

Tabela 2. Resumo de dados do proteoma e fosfoproteoma de células SH-SY5Y diferenciadas

Total de proteínas	5587
Fosfoproteínas	1321
Peptídeos únicos	29078
Fosfopeptídeos únicos	2283
Fosfosítios (Score >75)	2683
Proteínas com abundancia aumentada	207
Proteínas com abundancia diminuída	159
Fosfoproteínas com abundancia aumentada	67
Fosfoproteínas com abundancia diminuída	63
Relação S:T:Y	22:4:1

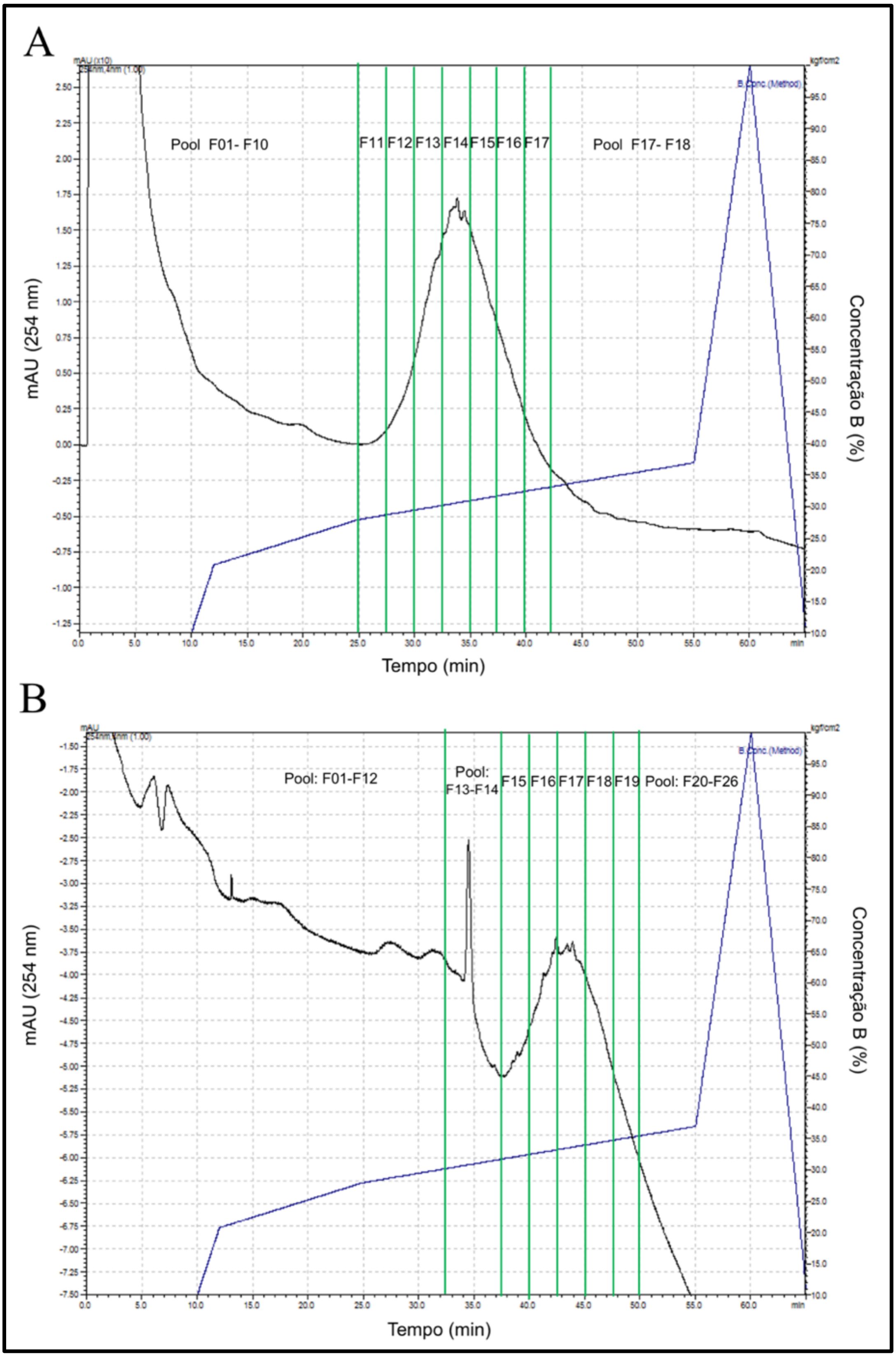


Figura 18. Fracionamento por HILIC dos peptídeos marcados com iTRAQ para a análise do proteoma total. As linhas verdes indicam como foram misturadas e/ou divididas as frações para a analise por LC-MS/MS. Fluxo: 200 µl/min, numero total de frações: 26 com 500 µl cada uma. A: Peptídeos do proteoma total. B: Peptídeos monofosforilados obtidos da estratégia SIMAC.

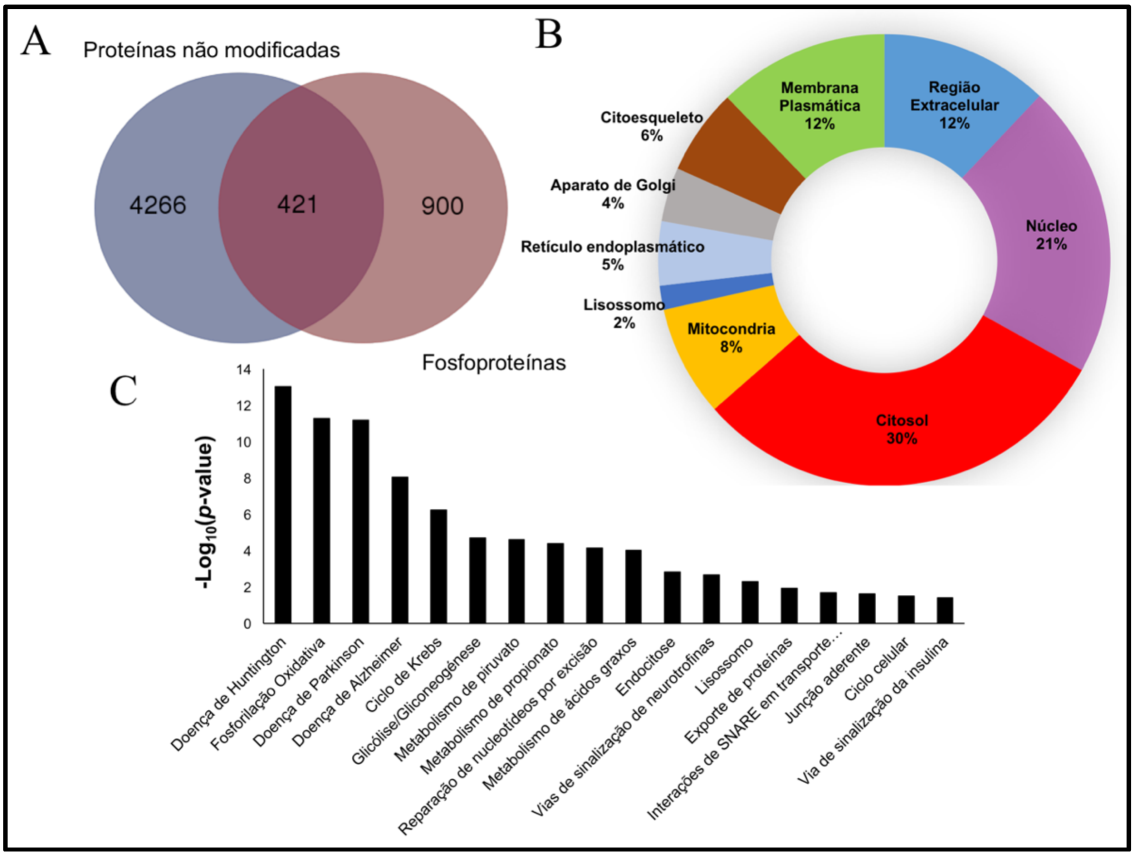


Figura 19. Proteoma e fosfoproteoma de células SH-SY5Y diferenciadas. A: Diagrama de venn do proteoma total e do fosfoproteoma. B: Distribuição de localizações sub-celulares das proteínas identificadas. C: Vias enriquecidas no proteoma total utilizando da base dados do KEGG e o programa DAVID.

As proteínas com abundancia diferencial foram detectadas a partir das relações dos íons repórteres do iTRAQ normalizadas e plotadas em um *volcano plot* (Figura 20). Um total de 366 proteínas que apresentaram um *fold change*$\geq$1.5 ou $\leq$0.67 e um *p*-valor <0.05 foram consideradas como diferencialmente abundantes. Em células diferenciadas, 207 proteínas aumentaram sua abundancia; 67 delas possuíram pelo menos um sítio de fosforilação, por outro lado, 159 proteinas diminuíram sua abundancia; 63 delas com pelo menos um sítio de fosforilação (tabela 2). Dentre as proteínas reguladas, foram detectados marcadores de diferenciação neuronal previamente caraterizados (nestina, MAP2, proteína TAU (MAPT), NSE e proteína de união a AR 2 (CRABP2), entre outras). Este resultado, junto com a análise por western blot (Figura 11C), permite validar os resultados quantitativos das outras proteínas reguladas identificadas já que sua presença pode ser considerada como um controle positivo. Nas tabelas 3 e 4 descrevem-se outras proteínas que podem ser consideradas chave na diferenciação das células SH-SY5Y e que ainda não foram estudadas a profundidade.

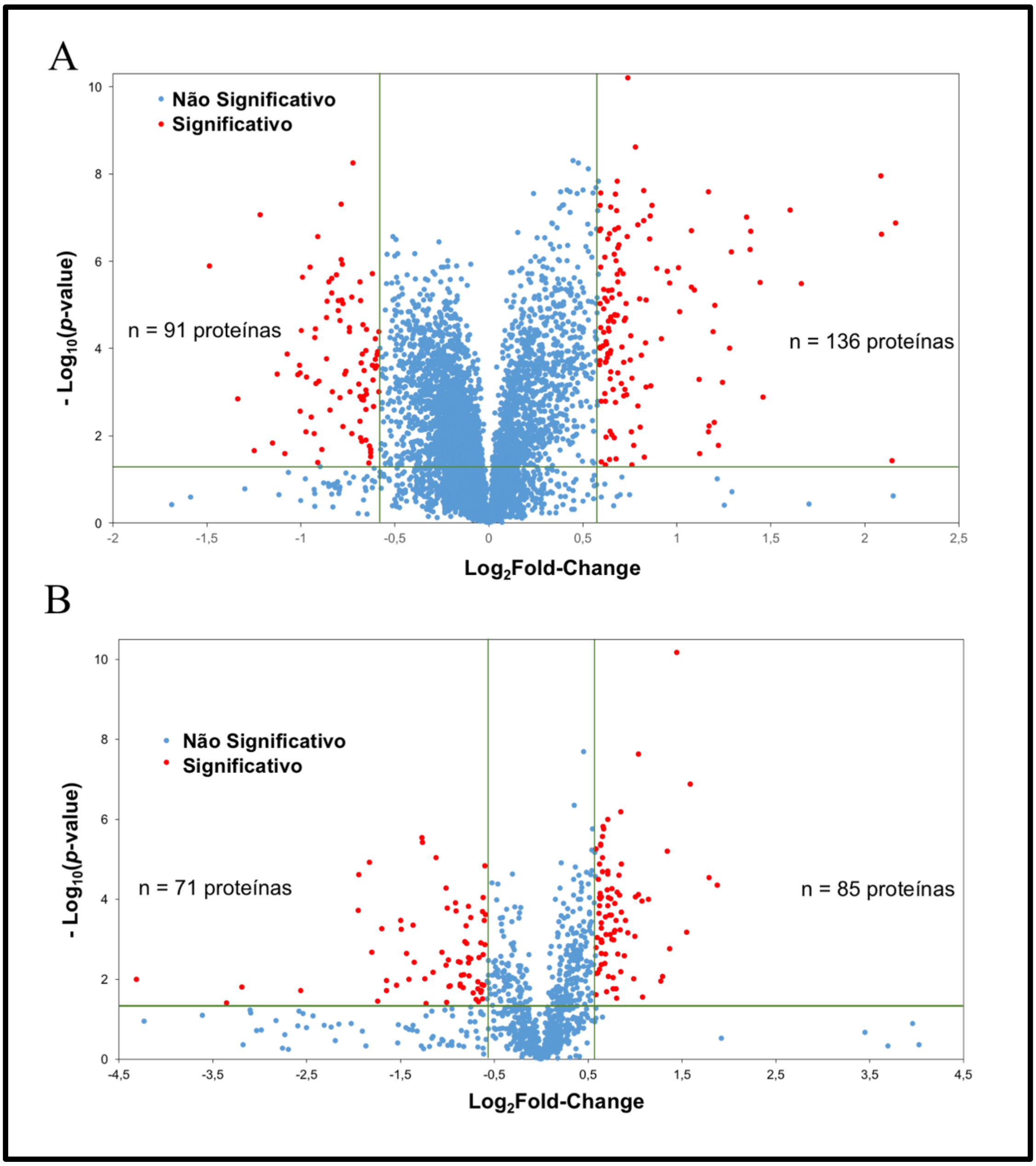


Figura 20. *Volcano plot* da distribuição de valores de *Fold-change* e p-valor na análise da diferenciação das células SH-SY5Y por iTRAQ. As linhas verdes representam os critérios estatísticos de *fold-change*≥1.5 ou <0.67 e p<0.05. Os pontos vermelhos representam as proteínas que passaram esses critérios. A: Proteoma total. B: Fosfoproteoma.

Tabela 3. Descrição parcial de proteínas com abundancia diminuída em células SH-SY5Y diferenciadas. As relações quantitativas (canais 115/114 e 117/116) dos peptídeos fosforilados e das proteínas foram obtidas a partir da média das replicatas técnicas e biológicas. Os fosfosítios são indicados pelo aminoácido, sua posição na proteína e o valor da relação de canais em parêntese.

Código Uniprot	**Descrição (Abreviação em inglês)**	**Fold-Change**	***p*-valor**	**Fold-Change fosfosítio**
Q96QR8	Ativador transcricional proteico Pur Beta (PURB)	0,10	3,94E-02	
Q16637	Proteina de sobrevivência de motoneurônios (SMN1)	0,30	3,58E-02	Ser28(0,53); Ser31(0,53)
P24941	Cinase dependente de ciclina 2 (CDK2)	0,31	5,64E-04	Thr14(0,31); Tyr15(0,31)

Q15911	Proteína homeobox dedo de zinco 3 (ZFHX3)	0,38	1,03E-02	
P48681	Nestina (NES)	0,42	3,89E-06	Ser471(0,56)
Q16512	Proteína serina/treonina cinase N1 (PKN1)	0,42	1,00E-02	Ser916(0,42)
Q9Y6A5	Proteina acidica com domínio *coiled-coil* 3 (TACC3)	0,45	1,48E-02	
P16949	Estatmina (STMN1)	0,46	1,51E-03	Ser16(0,41); Ser38(0,44)
O43663	Proteína reguladora de citocinesis 1 (PRC1)	0,46	4,00E-04	
Q13233	Proteina cinase cinase cinase mitogenica ativa (MAP3K1)	0,46	9,18E-06	S923(0,46)
Q66K89	Fator de transcrição E4F1 (E4F1)	0,47	2,64E-02	Thr325(0,64)
P31350	Subunidade M2 da ribonucleoside-difosfato reductase (RRM2)	0,48	1,38E-04	
Q96AA8	Proteína de interação com microtubulos e cinase Janus 2 (JAKMIP2)	0,50	4,00E-05	
P17252	Proteina cinase C alfa (PRKCA)	0,50	2,37E-06	
Q9Y328	Proteína neuronal específica 2 (NSG2)	0,51	8,18E-03	
Q9NXR1	Proteína de núcleo distribuída 1 homologa a nudE (NDE1)	0,51	1,52E-02	Ser282(0,51)
Q93045	Estatmina 2 (STMN2)	0,51	4,65E-04	
P29966	Proteína miristoilada e rica em alanina substrato da cinase C (MARCKS)	0,53	5,68E-05	Ser26/27(0,44)
O43602	Proteína de migração neuronal (DCX)	0,53	2,80E-07	Ser415(0,59)
P05129	Proteína cinase C gamma (PRKCG)	0,55	1,51E-02	Thr514(0,55)
Q04724	Proteína tipo transducina 1 (TLE1)	0,55	8,04E-03	
Q9BTT0	Fosfoproteína nuclear rica em leucina 32, membro E (ANP32E)	0,56	1,68E-02	
P06400	Proteína associada a retinoblastoma 1 (RB1)	0,57	1,16E-03	Ser249(0,57)
Q16566	Cinase dependente de cálcio/calmodulina tipo IV (CAMK4)	0,57	2,06E-06	
Q9NSC5	Proteina homologa a Homer 3 (HOMER3)	0,61	2,28E-02	Ser159(0,65)
O95343	Proteína homeobox SIX3 (SIX3)	0,62	2,16E-04	
Q71RC2	Proteína relacionada a La 4 (LARP4)	0,63	3,70E-02	Ser583(0,63)
Q9NZC4	Fator homologo a ETS (EHF)	0,64	1,29E-02	
P20839	Inosina-5'-monofosfato desidrogenase 1 (IMPDH1)	0,64	1,13E-03	
Q08211	RNA Helicase dependente de ATP (DHX9)	0,64	2,16E-02	Ser87(0,64)
P53804	Proteína Ubiquitin ligase E3 TTC3 (TTC3)	0,65	2,43E-02	
P0CG34	Timosina beta-15A (TMSB15A)	0,65	5,41E-04	

Tabela 4. Descrição parcial de proteínas com abundancia aumentada em células SH-SY5Y diferenciadas. As relações quantitativas (canais 115/114 e 117/116) dos peptídeos fosforilados e das proteínas foram obtidas a partir da média das replicatas técnicas e biológicas. Os fosfosítios são indicados pelo aminoácido, sua posição na proteína e o valor da relação de canais em parêntese.

Código Uniprot	**Descrição (Abreviação em inglês)**	**Fold-Change**	***p*-valor**	**Fold-Change fosfosítio**
Q8N163	Proteína reguladora de apoptose e ciclo celular 2 (CCAR2)	1,51	5,36E-08	
P27338	Amino oxidase B (MAOB)	1,52	1,62E-03	
Q9UMS6	Sinaptopodina 2 (SYNPO2)	1,53	4,48E-06	Ser204(1,6); Ser234(1,81); Ser604(1,85)

P21796	Proteína canal seletivo de aníons dependente de voltagem 1 (VDAC1)	1,53	4,32E-05	Ser104(1,55)
P10636	Proteína de associação a microtubulos Tau (MAPT)	1,56	2,32E-03	Thr720(1,56)/ Ser721(1,56)
O75781	Paralemina 1 (PALM)	1,56	5,44E-04	Ser116(1,54); Ser124(1,51); Ser162(1,60)
P27816	Proteína de associação a microtubulos 4 (MAP4)	1,56	4,46E-03	Ser297(1,56); Ser2073(1,72)
Q96FJ2	Dineína cadeia leve 2, citoplasmática (DYNLL2)	1,57	3,49E-04	
O75369	Filamina B (FLNB)	1,58	7,00E-06	Ser856(2,50)
Q9BY67	Molécula de adesão celular 1 (CADM1)	1,59	2,48E-05	
P19320	Proteína vascular de adesão celular 1 (VCAM1)	1,61	1,78E-05	
P07196	Polipeptídio leve de neurofilamento 1 (NEFL)	1,62	1,74E-07	
P05556	Integrina beta-1 (ITGB1)	1,62	4,26E-07	Tyr195(1,51)
Q8IZJ1	Receptor de netrina UNC5B (UNC5B)	1,63	2,07E-02	Ser528(1,62)
P10415	Regulador de Apoptose Bcl-2 (BCL2)	1,63	6,55E-04	
Q2M2I8	Proteína cinase 1 associada a AP2 (AAK1)	1,63	2,40E-05	
P46821	Proteína de associação a microtubulos 1B (MAP1B)	1,64	1,04E-06	Ser1154(1,68); Ser1265(1,54); Ser1396(1,73)
Q8ND76	Ciclina Y (CCNY)	1,64	2,04E-05	Ser326(1,63)
Q09666	Proteína AHNAK associada à diferenciação de neuroblastos (AHNAK)	1,65	1,26E-03	Ser4850(1,50)
O15394	Molécula de adesão neural 2 (NCAM2)	1,66	1,18E-03	
P22694	Proteína cinase dependente de cAMP subunidade catalítica beta (PRKACB)	1,68	2,56E-04	Ser345(1,68)
Q13098	Complexo COP9 do signalossomo subunidade 1 (GPS1)	1,69	1,02E-03	Ser509(1,68)
Q12888	Proteína 1 de união a p53 (TP53BP1)	1,72	2,45E-09	Ser500(1,53)
O75396	Proteína de trafico vesicular SEC22B (SEC22B)	1,72	1,33E-04	Ser(1,72)
P09104	Enolase gamma (ENO2/NSE)	1,73	3,98E-05	
P11137	Proteína de associação a microtubulos 2 (MAP2)	1,73	1,50E-07	Ser833(2,22); Thr1154(1,52); Ser1782(1,54); Ser1790(1,79)
P54826	Proteína de arresto do crescimento 1 (GAS1)	1,75	6,37E-03	
P07197	Polipeptídio de neurofilamento médio (NEFM)	1,75	3,00E-02	Ser837(1,75)
P13591	Molécula de adesão neural 1 (NCAM1)	1,78	7,50E-05	
Q14195	Proteína relacionada a dihidropiriminidase 3 (DPYSL3)	1,79	7,92E-06	Ser522(2,00)
O60716	Catenina delta-1 (CTNND1)	1,80	6,05E-04	Ser857(1,77)
O00443	Proteína do domínio fosfatidilinositol 4-fosfato 3-cinase C2 subunidade alpha (PIK3C2A)	1,81	2,15E-04	Ser259(1,81)
Q9Y639	Neuroplastina (NPTN)	1,86	1,49E-06	
P56199	Integrina alpha-1 (ITGA1)	2,25	2,64E-08	
Q8N111	Proteína de saída do ciclo celular e diferenciação neuronal 1 (CEND1)	2,29	4,28E-05	
P49006	Proteína tipo MARCKS 1 (MARCKSL1)	2,72	6,82E-11	Thr148(2,93)
P29373	Proteína de união a ácido retinóico 2 (CRABP2)	3,17	3,29E-06	

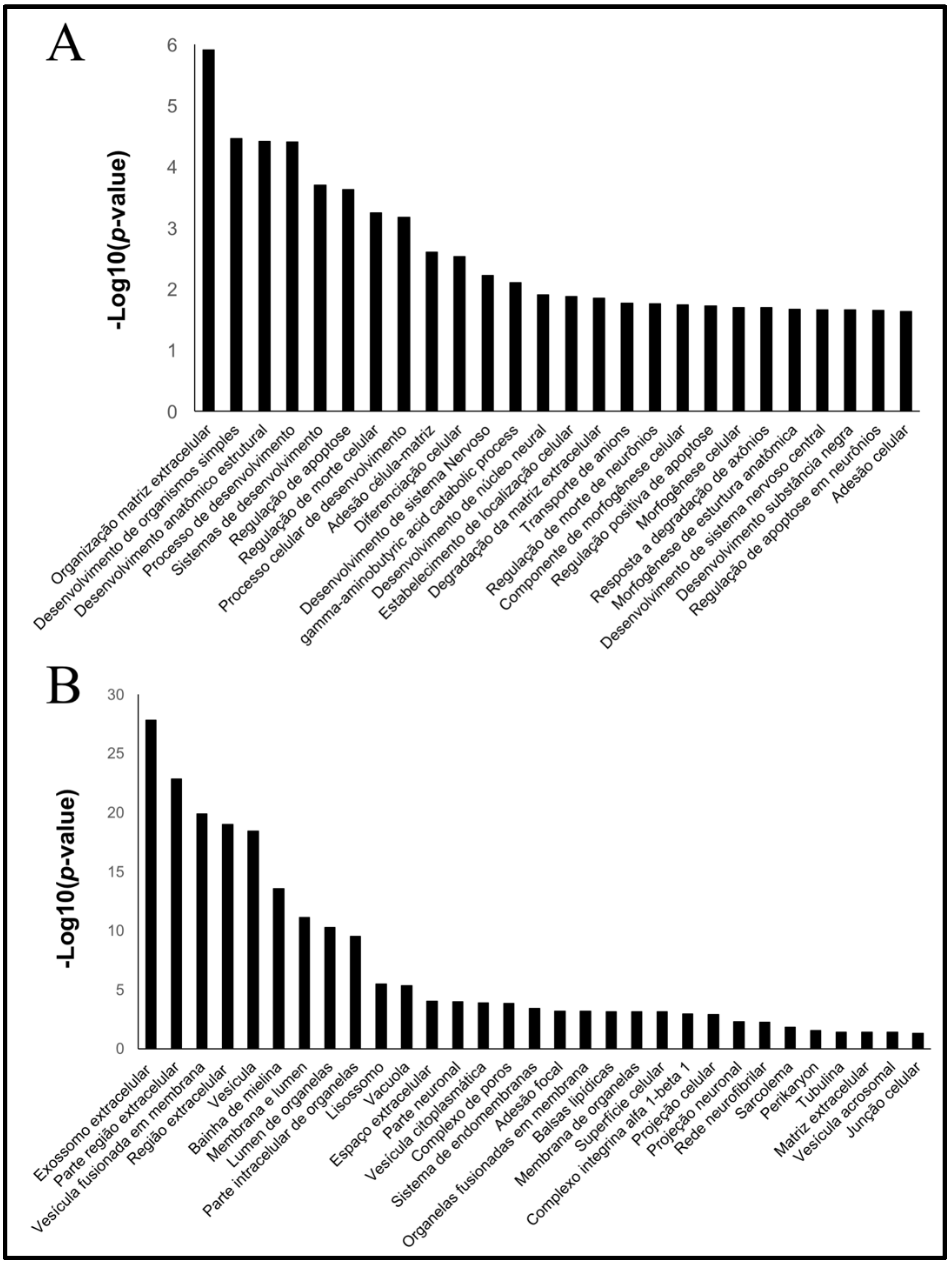


Figura 21. Enriquecimento de termos de GO das proteínas que aumentaram sua abundancia em células SH-SY5Y diferenciadas (proteoma total). A: processos biológicos. B: Componente celular. Somente foram incluídos termos com $p<0.01$.

De acordo com a análise de enriquecimento de termos de GO, as proteínas com abundancia aumentada em células diferenciadas mostraram enriquecimento de termos associados com desenvolvimento neural, especificamente interação com ECM e regulação da apoptose (Figura 21); em contraste, as proteínas de abundancia diminuída estiveram mais relacionadas com proliferação celular, síntese de DNA e regulação do ciclo celular (Figura 22). Esta mesma análise foi realizada para as proteínas reguladas do fosfoproteoma; as fosfoproteínas que aumentaram sua expressão exibiram termos associados à projeção de neuritos, axogênese, sinapse, entre outros (Figura 23), as fosfoproteínas de abundancia diminuída também mostraram termos enriquecidos relacionados com ciclo celular, splicing do RNA e organização de cromossomos (Figura 24). Diversos estudos utilizam as células SH-SY5Y não diferenciadas como modelo neuronal *in vitro* (KRISHNA et al., 2014; SCIFO et al., 2013; TANG et al., 2014; YUSUF et al., 2013). Nossos dados sugerem que as células diferenciadas são mais adequadas para tais experimentos pois elas têm um *background* molecular e processos biológicos mais próximos aos neurônios maduros que resultam ser mais evidentes durante a diferenciação deste tipo de células.

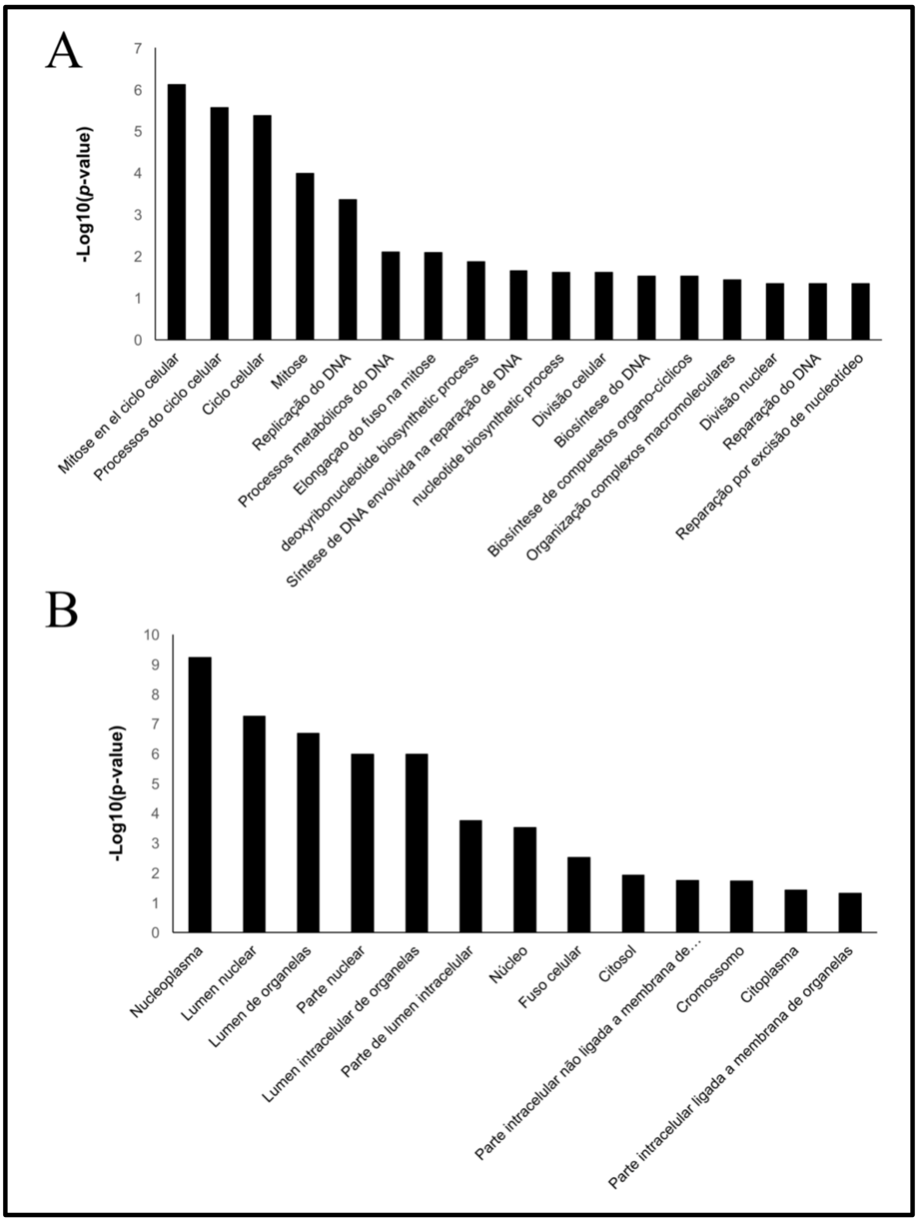


Figura 22. Enriquecimento de termos de GO das proteínas que diminuíram sua abundancia em células SH-SY5Y diferenciadas (proteoma total). A: processos biológicos. B: Componente celular. Somente foram incluídos termos com $p<0.01$.

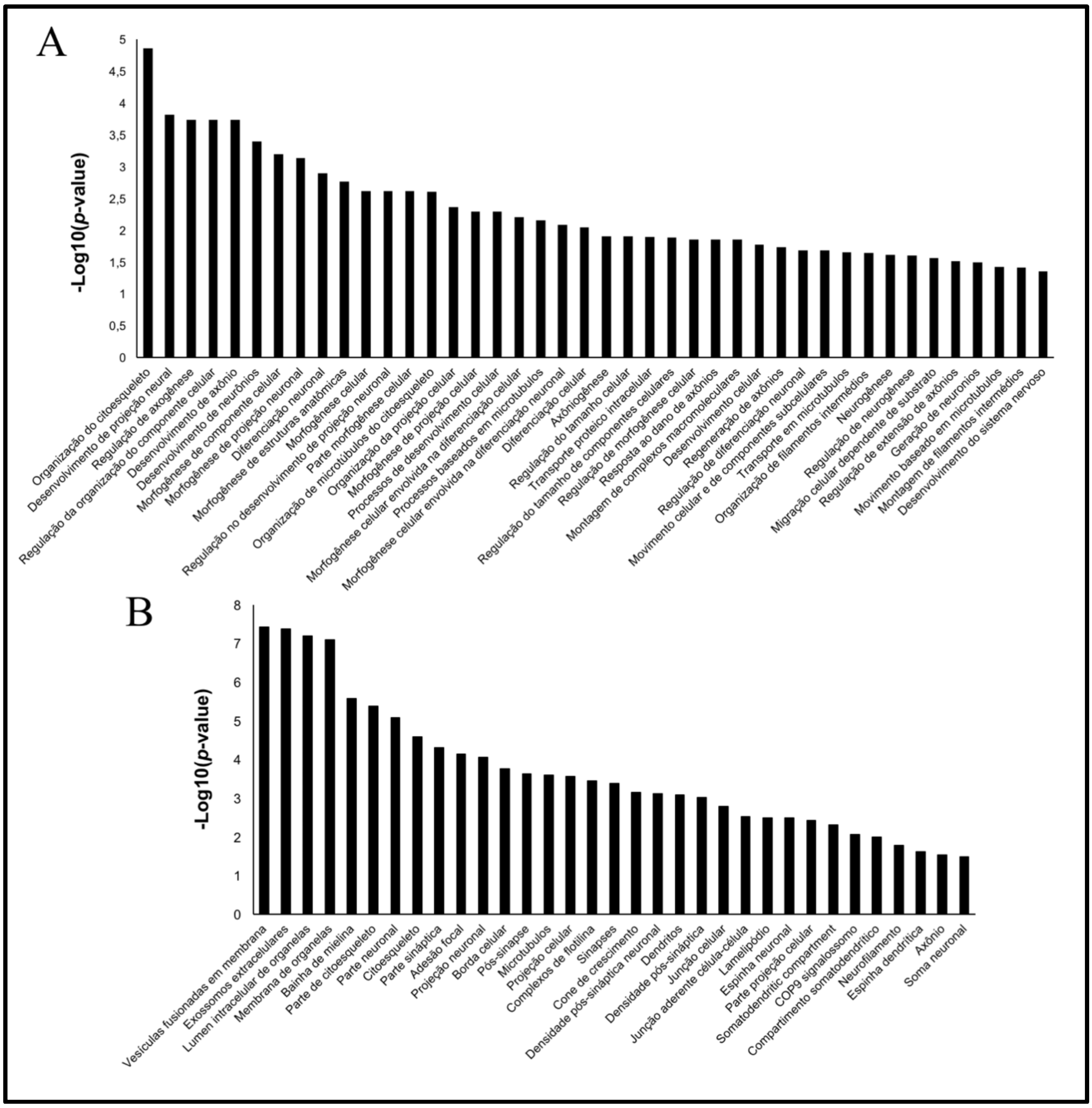


Figura 23. Enriquecimento de termos de GO das proteínas que aumentaram sua abundancia em células SH-SY5Y diferenciadas (fosfoproteoma). A: processos biológicos. B: Componente celular. Somente foram incluídos termos com p<0.01.

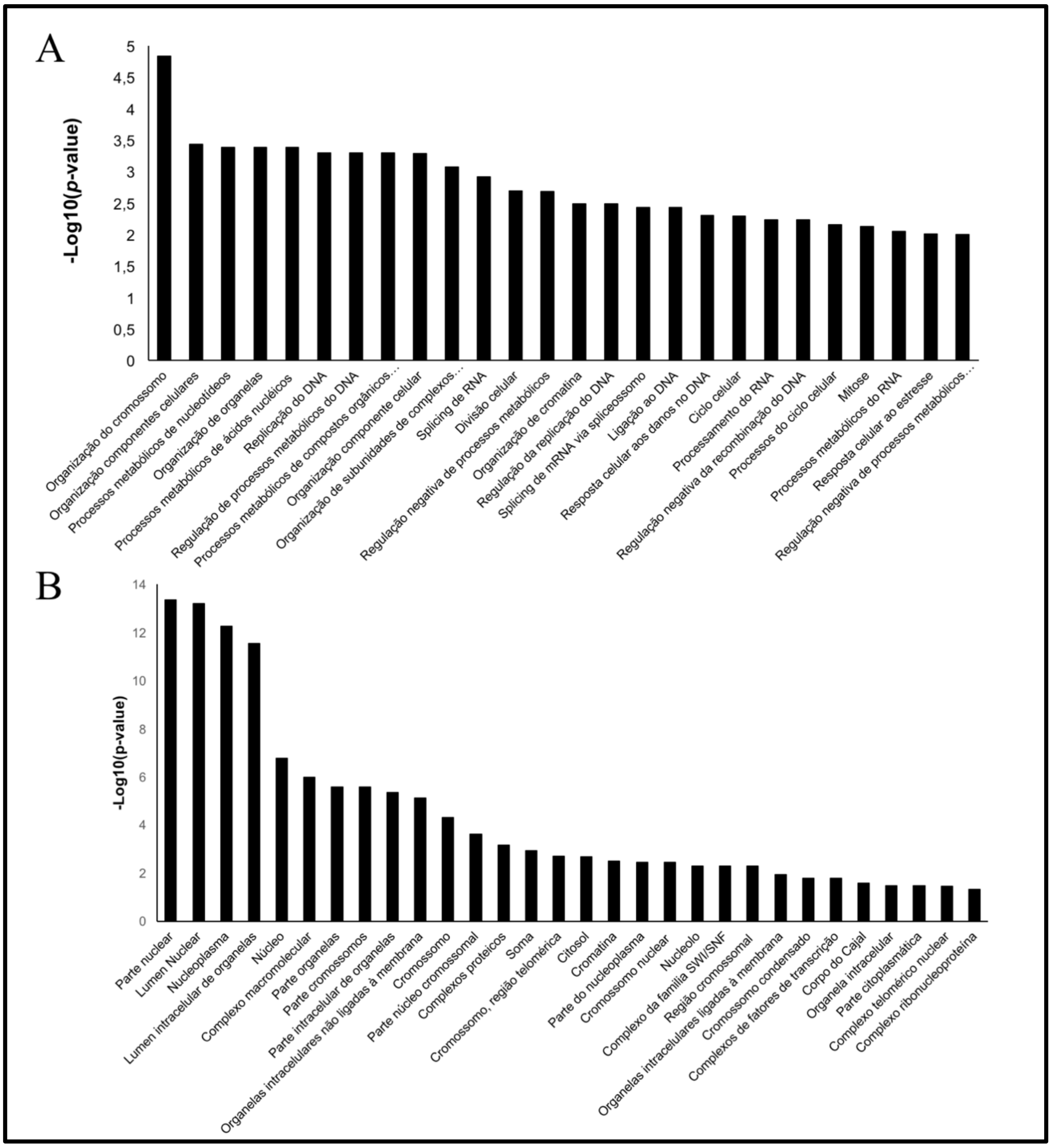


Figura 24. Enriquecimento de termos de GO das proteínas que diminuíram sua abundancia em células SH-SY5Y diferenciadas (fosfoproteoma). A: processos biológicos. B: Componente celular. Somente foram incluídos termos com $p<0.01$.

5.3.1 Motivos de fosforilação regulados

Os fosfosítios regulados no fosfoproteoma foram analisados para detectar os motivos sobre-representados utilizando o algoritmo do programa Motif-x (Figura 25). O motivo pS-P foi sobre-representado em ambas condições de cultura, 67.2% dos fosfopeptídeos continham esta sequência consenso, um alvo conhecido do grupo de prolina-cinases CMCG (ADAMS, 2001). O motivo pS-P-X-K (7.8% dos fosfopeptídeos) alvo da ciclina cinase 2 (CDK2) e o motivo acidico pS-X-D (9.2% do total de fosfosítios) alvo da caseína cinase 2 (CK2) estiveram mais presentes em células não diferenciadas, isto é coerente com o papel destas cinases na regulação do ciclo celular e da proliferação (CHOHAN et al., 2015; LITCHFIELD, 2003) e com o comportamento evidenciado no enriquecimento de termos GO (Figuras 21 a 24). Por outro lado, nas células diferenciadas foram representados os sítios correspondentes à cinase dependente de calmodulina 2 (CaMK2) R-X-X-pS (12.4% do total de fosfosítios) e ao motivo de treonina (T) do receptor cinase acoplado à proteína G (GRK) (7.8% do total de motivos). CaMK2 participa na diferenciação neuronal de NCSs e na transmissão sináptica e plasticidade neurônios maduros (COLBRAN, 2004; MELO-BRAGA et al., 2013) enquanto as GRKs estão envolvidas na recepção de dopamina em neurônios estriados e na fosforilação de proteínas de citoesqueleto, histona deacetilases, entre outros (GUREVICH et al., 2012; GUREVICH; GAINETDINOV; GUREVICH, 2016). A presença dessas cinases também corrobora o resultado obtido no enriquecimento de termos GO relacionados com funções neurais.

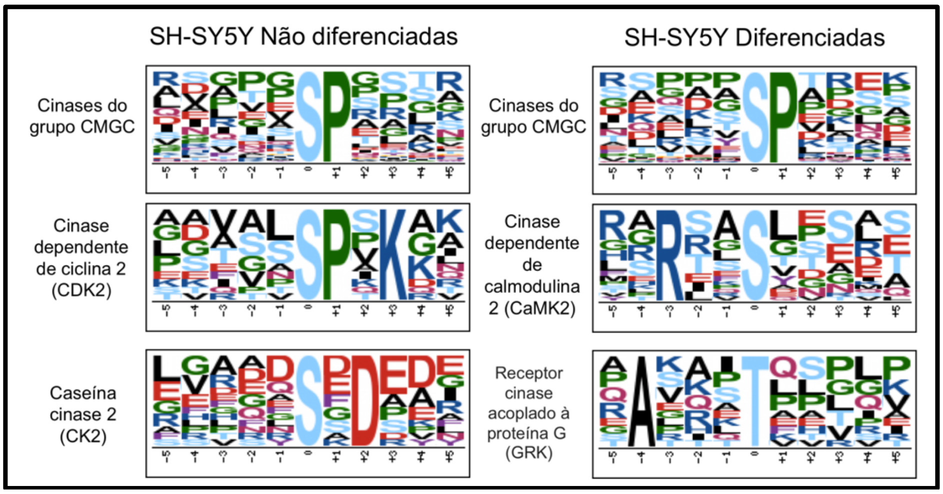


Figura 25. Motivos de fosforilação sobre representados em células diferenciadas e não diferenciadas gerados pelo programa Motif-x (significância de 0.0001) e as respectivas cinases envolvidas.

5.3.2 Mapa de interação e vias de sinalização/processos celulares regulados

A rede de interação das proteínas reguladas entre as duas condições de cultura foi realizada utilizando os programas STRING 10.0 e Cytoscape (SHANNON et al., 2003; SZKLARCZYK et al., 2015). Somente as interações de alta confiança foram consideradas, sendo os pontos sem nenhuma interação excluídos. Os principais pontos de interação foram definidos pela presença de seis ou mais interações (Figura 26). Foram observados pontos correspondentes a cinases mais abundantes em células não diferenciadas como a CDK2 e a proteína cinase Cγ (PRKCG) e proteínas com aumento da expressão em células diferenciadas como BCL2 e as integrinas α1 e β1 (ITGB1/ITGA1). Outros grupos presentes no mapa correspondem a proteínas relacionadas com o metabolismo de neurotransmissores, estrutura da cromatina e síntese do DNA. A análise da rede de interação também mostrou alteração de vias de sinalização especificas, relacionadas com o desenvolvimento de neurônios refletindo a influência de RA/BDNF na diferenciação; vias de sinalização como PI3K-Akt e MAPK foram significativamente reguladas em células diferenciadas (Figura 27A; Apêndice 4 e 5).

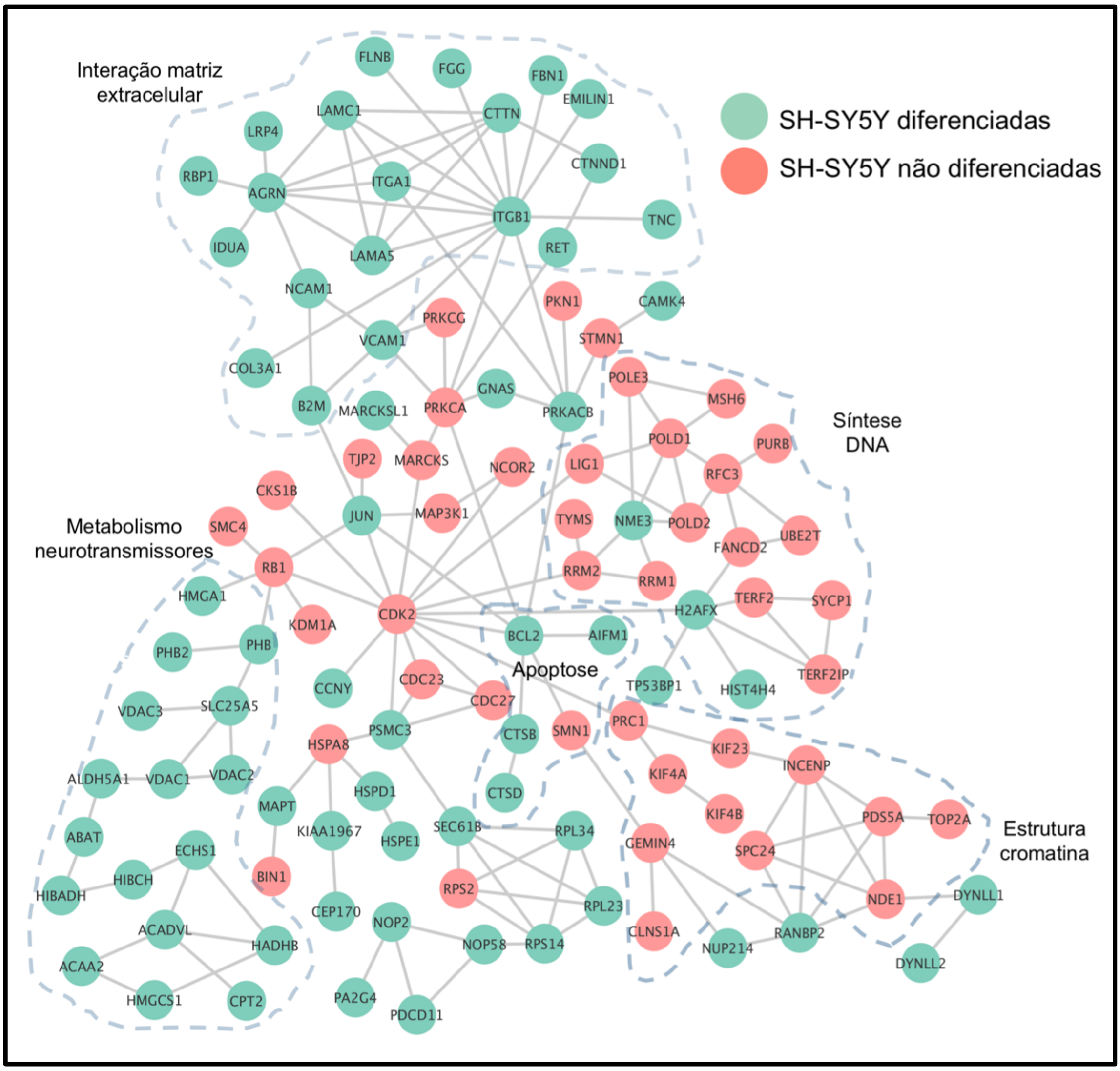


Figura 26. Principais proteínas reguladas no mapa de interação construído a partir de STRING 10.0 e Cytoscape. A rede de interação foi construída utilizando uma pontuação de 0.9, os pontos sem conexões ou interações foram excluídos da analise. As proteínas foram agrupadas dependendo seu papel biológico, entre os grupos encontrados destacaram-se proteínas de interação com a matriz extracelular, metabolismo de neurotransmissores, estrutura da cromatina, apoptose e síntese de DNA.

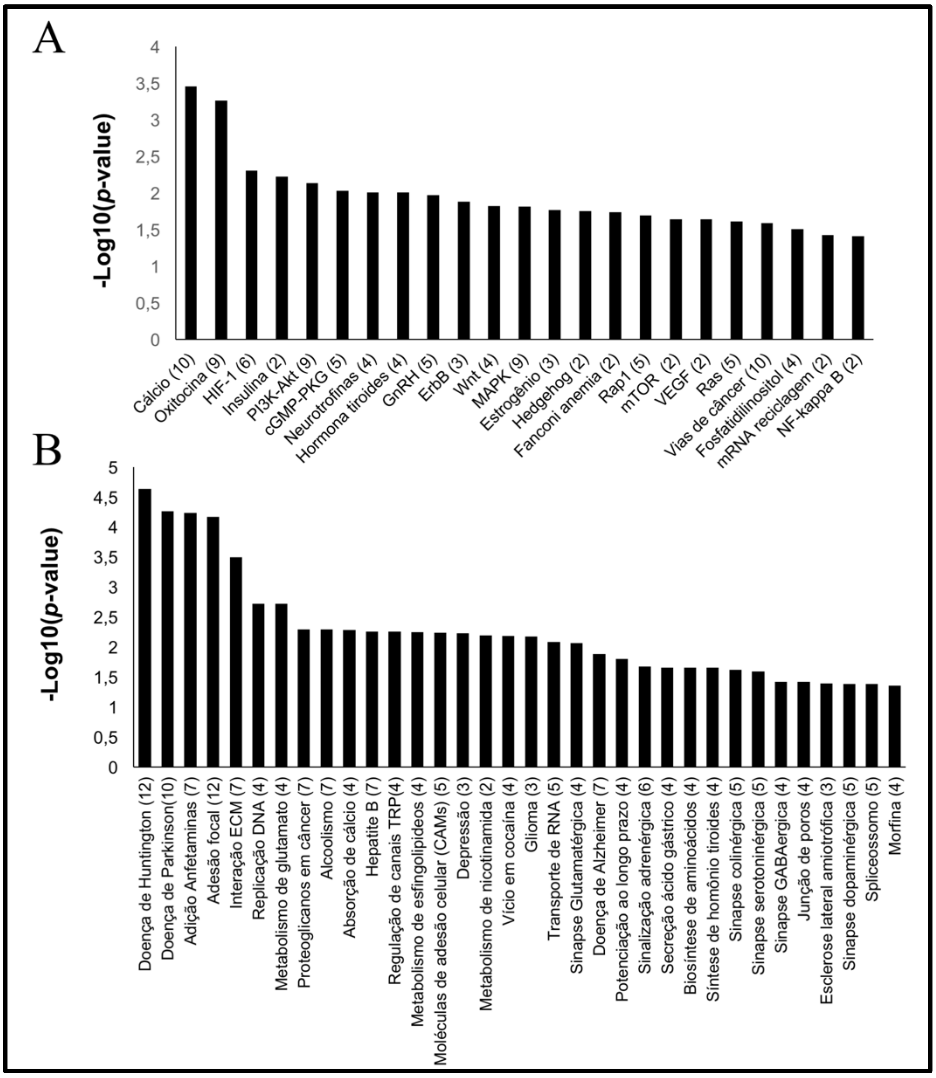


Figura 27. Enriquecimento de vias de sinalização e processos celulares da base de dados KEGG das proteínas reguladas do mapa de interação. A: Vias de sinalização intracelulares. B: Processos celulares relacionados com fenótipo neuronal. Somente foram considerados os termos com p<0.01. O numero de proteínas reguladas em cada termo é indicado em parêntese.

Dentre as cinases presentes na rede de interação, destacam-se as isoformas da proteína cinase C (PKC), MAP3K1, cinase do fator de elongação 2 (EEFK2) e CDK2 que foram mais abundantes em células não diferenciadas. A cinase PKCγ, isotipo neuronal, corresponde a uma cinase localizada no soma, espinhas dendríticas, axônios e terminais sinápticos realizando um papel relevante nas fases iniciais do desenvolvimento de neurônios do hipocampo, particularmente na formação de sinapses (SAITO; SHIRAI, 2002). Adicionalmente, a PKCγ mostrou interação com a isoforma PKCα quem possui múltiplos papeis no desenvolvimento celular; especificamente promove o crescimento celular ativando as vias de sinalização dependentes de ERK/MAPK (NAKASHIMA, 2002). PKCγ/PKCα regulam diversas vias de sinalização incluindo Wnt, oxitocina, ou mTOR que estão comumente associadas à migração celular, formação de ribossomos e proliferação celular (Figura 27A) (KOMIYA; HABAS, 2008; LAPLANTE; SABATINI, 2009). Este comportamento é consistente com as características proliferativas e de neurônios imaturos das células SH-SY5Y não diferenciadas. Um dos principais alvos da PKC é a proteína MARCKS (*myristoylated alanine-rich C-kinase substrate*) que está envolvida na dinâmica do citoesqueleto durante o desenvolvimento embrionário do cérebro e nas células que rodeiam o tubo neural. MARCKS faz entrecruzamentos dos filamentos de actina na membrana plasmática possivelmente para facilitar as mudanças de morfologia na membrana e, adicionalmente, tem a capacidade de concentrar moléculas de sinalização em micro domínios da membrana para induzir sinapses, funções controladas pelo domínio efetor que é regulado por fosforilação (BRUDVIG; WEIMER, 2015). A fosforilação no resíduo Ser26, detectada neste estudo, é específica de células neuronais mas não afeta sua associação à membrana (TINOCO et al., 2014). Devido a estas características e ao fenótipo das células não diferenciadas, MARCKS pode ser explorada como potencial candidata a marcador de diferenciação de células SH-SY5Y.

A proteína cinase A fosforilada (PRKACB) foi mais expressa em células diferenciadas (Tabela 4 e figura 26). Esta cinase está envolvida na recepção de dopamina, excitabilidade, controle da plasticidade e sistema de receptação de neurotransmissores de neurônios espinhosos (NAGAI et al., 2016), características que estão correlacionadas com a natureza dopaminérgica descrita para células SH-SY5Y diferenciadas (KOVALEVICH; LANGFORD, 2013). PRKACB é uma cinase chave que é regulada em diferentes vias (MAPK, GnRH, entre outras) (Figura 27A), isto se relaciona com os fenótipos ou processos enriquecidos a partir da rede de interação como a doença de Huntington, sinapses GABAergica, serotoninérgica, colinérgica e glutamatérgica (Figura 27B e Apêndice 6). Uma das proteínas alvo ou parceira de interação da PRKACB é a proteína fosforilada estatmina 1 (STMN1) predominante em células não diferenciadas. STMN1 se liga aos microtúbulos e sua regulação é dependente de fosforilação, sua expressão é significativa em neurônios imaturos durante o desenvolvimento do embrião (CHAUVIN; SOBEL, 2015). A proteína desfosforilada está envolvida na plasticidade e regeneração de neurônios no hipocampo enquanto a fosforilação temporal nos resíduos Ser16 e Ser38 está relacionada com a regulação negativa do sequestro da tubulina, permitindo uma regulação da polimerização de microtubulos. Este processo é relevante na motilidade celular, proliferação e mitose celular (CASSIMERIS, 2002; CHAUVIN; SOBEL, 2015) e, por estas características, STMN1 pode ser explorada como candidata a marcador de diferenciação de células de neuroblastoma, neste caso, um potencial marcador relacionado com proliferação ativado por sinais extracelulares (CHAUVIN; SOBEL, 2015).

A rede de interação também mostrou proteínas relacionadas com a apoptose (Figura 26). A proteína anti-apoptótica BCL2 está fortemente envolvida na sobrevivência de neurônios durante a ação dos fatores neurotróficos que induzem morte celular para ajustar a população de neurônios precursores (AKHTAR; NESS; ROTH, 2004; SHACKA; ROTH, 2005) um comportamento consistente com os alvos da via de sinalização que ativa o BDNF em células diferenciadas (KOVALEVICH; LANGFORD, 2013). A proteína fosforilada AIFM1 (*Apoptosis Inducing Factor, Mitochondria Associated 1*) é uma flavoproteína essencial na desintegração de núcleos de células em apoptose e, aparentemente, sua liberação desde a mitocôndria e transporte ao núcleo é dependente de BCL2 (HANGEN et al., 2010). Mutações e deleções em AIFM1 resultam em deficiências na fosforilação oxidativa e na síndrome de Cowchock em neurônios motores e sua regulação contribui ao fenótipo da doença de Parkinson (DIODATO et al., 2016; HANGEN et al., 2010; SEVRIOUKOVA, 2016). Por outro lado, a proteína SMN1 (*Survival motor neuron 1*) abundante em células não diferenciadas aparentemente interage com BCL2, esta proteína é comumente associada como um marcador de atrofia espinhal-muscular. SMN1 interage com o citoesqueleto no cone de crescimento e nas neuritas de neurônios motores primários promovendo sobrevivência (GIAVAZZI et al., 2006; KERR et al., 2000; MARTINEZ et al., 2012). A diminuição na abundancia de SMN1 ao longo do desenvolvimento neural, sugerindo que seu principal papel está restrito a neurônios precursores (GIAVAZZI et al., 2006). Outra das funções atribuídas a SMN1 é a oligomerização e interação com as proteínas Gemin 2 – 8 (a Gemin 4 foi detectada no presente trabalho), um complexo que permite a montagem das partículas pequenas nucleares de ribonucleoproteína (snRNPs) que são componentes chave no funcionamento do *spliceosomo*; esta maquinaria é altamente regulada por fosforilação nos resíduos Ser28 e Ser31 da SMN1 pela cinase PKA (BURNETT et al., 2009; GRIMMLER et al., 2005) (ver tabela 3). O estudo de funções mais específicas de AIFM1 e SMN1 em células de neuroblastoma deve ser aprofundado; devido à sua abundancia diferencial e papeis estudados, podem ser consideradas candidatas potenciais a marcadores de diferenciação neuronal.

A adesão e migração celular são duas das características bem estabelecidas em células SH-SY5Y (KOVALEVICH; LANGFORD, 2013), assim, a regulação de proteínas de interação com a matriz extracelular (ECM) é esperada já que representa um aspecto chave no desenvolvimento de neuritos (AGHOLME et al., 2010; CONSTANTINESCU et al., 2007). Como receptor fundamental na adesão celular e migração, a integrina β1 aparece como uma proteína chave em células diferenciadas (Figura 26; Apêndice 7 e 8, tabela 4). Trabalhos prévios demostram seu papel na polarização neuronal, crescimentos de neuritos e sua ramificação em conjunto com a cinase de adesão focal (FAK) em neurônios do gânglio da raiz dorsal (DRG) (RIBEIRO et al., 2013) e envolvimento em neurogênese, diferenciação glial, migração neuronal e formação de capas neurais no córtex cerebral (SCHMID; ANTON, 2003). A expressão de ITGB1 é acompanhada pelo seu parceiro heterodimérico integrina α1 e seus ligantes comuns como tenascina C (TNC), subunidades α e γ da laminina (LAMA5 e LAMC1) e o colágeno (COL3A1). A presença desses receptores é relevante na sobrevivência e crescimento de neuritos de neurônios do hipocampo no embrião (CHEN; INDYK; STRICKLAND, 2003; RIGATO et al., 2002), particularmente, o par ITGB1-LAMC1 é crucial na dinâmica do tubo neural mas sofre repressão durante a diferenciação (CAO; PFAFF; GAGE, 2007) sugerindo que a expressão de tais proteínas é restrita a determinados tipos de neurônios ou fases do seu desenvolvimento. Como esperado, as integrinas e seus parceiros de interação detectados estão envolvidos em processos relevantes na diferenciação neuronal tais como adesão focal, interação com ECM e moléculas adesivas (Figura 27B e apêndice 7 e 8).

Dentre os parceiros de interação de ITGB1/ITGA1 que aumentaram sua abundancia em células diferenciadas, foi encontrada a proteína de secreção neuronal agrina (AGRN) que é um proteoglicano envolvido na junção neuromuscular por meio do recrutamento de receptores de acetilcolina na sinaptogênese interagindo com seu receptor LRP4 (ZONG; JIN, 2013) também detectado no presente estudo (Figura 26). Embora a literatura descreva a agrina como um fator de aderência em células SH-SY5Y proliferativas (WOLFRAM; SPATZ; BURGESS, 2008), o resultado obtido neste trabalho sugere que seu papel pode estar mais relacionado com a sinapse de neuritos devido ao comportamento do enriquecimento de termos GO detectado (Figuras 21 e 23) assim como o fenótipo observado nas células (Figura 11). Outros parceiros de interação das integrinas regulados estão relacionados com a estabilização da interação com ECM, um deles é a glicoproteína extracelular EMILIN-1 (*Elastin Microfibrils Interface Located proteINs*) que aparentemente promove a ativação de vias apoptóticas de forma extrínseca e regula também a disponibilidade dos ligantes das proteínas Hedgehog e Wnt em fibroblastos embrionários em sinergia com as integrinas $\alpha4/\alpha9\beta1$ (PIVETTA et al., 2014). Por outro lado, também foi detectada a proteína de adesão neural (NCAM), de origem neuroectodérmico, a NCAM aparece como responsável de mudanças na plasticidade e na atividade do receptor de NDMA em células de neuroblastoma diferenciadas com RA (SINGH; KAUR, 2007). Similar à agrina, se acredita que NCAM é um fator de motilidade em células SH-SY5Y não diferenciadas devido a seu alto grau de polisialilação, mas, em células diferenciadas a diminuição desse açúcar permite que sua ação seja mais restrita à adesão celular (VALENTINER et al., 2011). Como complemento as proteínas de aderência a substratos, foi detectada a catenina δ (CTNND1), uma proteína cérebro-específica envolvida na junção aderente de neurônios em desenvolvimento na zona ventricular e no tubo neural, da mesma forma regula a sinapses de neurônios maduros (MATTER et al., 2009).

Em termos gerais, a análise da diferenciação de células SH-SY5Y abarcou diversas proteínas e/ou vias de sinalização chaves que podem ser aplicadas no contexto do desenvolvimento neuronal. Durante o processo de aquisição de uma morfologia mais neuronal, foi evidenciada a ação de proteínas reguladoras da estrutura do citoesqueleto destacando-se as proteínas MARCKS, estatmina e SMN1 em células não diferenciadas. Por outro lado, a interação com ECM na estimulação do crescimento de neuritos e o controle da população celular por apoptose foram os principais processos enriquecidos em células diferenciadas. A regulação dos parceiros de interação do complexo ITGB1/ITGA1 como NCAM, agrina e CTNND1 refletiram as mudanças na interação com ECM que estão correlacionadas com sinaptogênese, plasticidade e localização sináptica. Por sua parte, os mecanismos de apoptose foram evidenciados pela regulação das proteínas AIFM1 e EMILIN-1. Ao todo, os resultados obtidos nesta fase da tese representam uma fonte de informação no campo da diferenciação neuronal e no estudo das doenças neurodegenerativas que, esperamos no futuro, tenha um forte impacto na pesquisa relacionada à neurociência e neuroproteômica.

5.4 Cultura e diferenciação de neuroesferas

A cultura de neuroesferas contemplada neste trabalho nasceu como colaboração com o Instituto D’Or de Pesquisa e Ensino (IDOR). Neste Instituto são isoladas NSCs de pacientes com doenças neuronais específicas que permitirão uma caracterização mais profunda destas patologias, um dos passos na obtenção destas células e a diferenciação das NSCs em cultura 3D com meios de cultura definidos. Assim, no contexto do presente trabalho, a cultura de neuroesferas representa um modelo alternativo para estudar vias e proteínas relacionadas com o desenvolvimento neuronal.

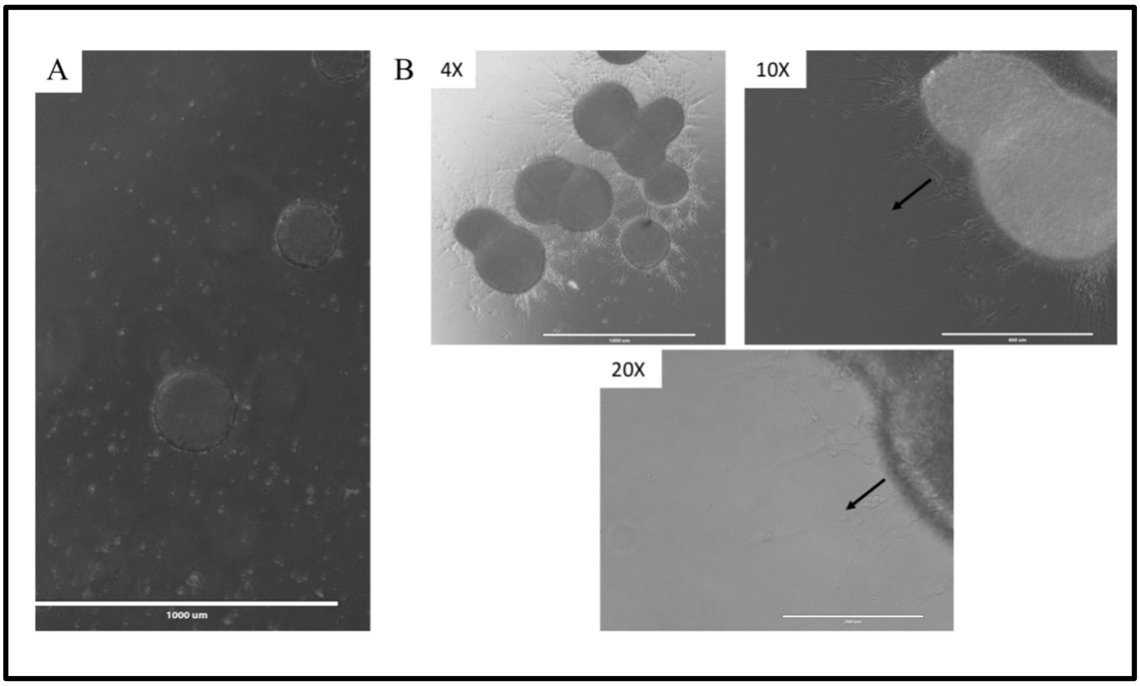


Figura 28. Morfologia das neuroesferas cultivadas em rotação e em presença de B27 e N2. A: Neuroesferas cultivadas no terceiro dia. B: Neuroesferas cultivadas no décimo dia, aumento de 4X, 10X e 20X. As setas indicam morfologia neuronal de células que emergem da região central.

Durante a incubação das NSCs com B27 e N2 e em rotação, as neuroesferas mostraram tamanhos variáveis entre 100 – 300 µm conforme o esperado (JENSEN, PARMAR, 2006), entre as condições de cultura analisadas (3 e 10 dias) não se observam grandes mudanças morfológicas das esferas, somente com aumento da lente é possível apreciar algumas células com morfologia neuronal emergindo da região central da esfera (Figura 28). A presença dos marcadores MAP2 e TUBB3 depois do quarto dia de incubação foi reportada recentemente (GARCEZ et al., 2016) validando assim o processo de diferenciação das neuroesferas em células neuronais pós-mitóticas.

5.5 Análise proteômica quantitativa da diferenciação das neuroesferas utilizando iTRAQ

De acordo com o descrito na figura 10C, foram utilizadas duas replicatas biológicas de neuroesferas cultivadas por 3 dias e outras duas replicatas de células cultivadas por 10 dias em meio suplementado com B27 e N2. As proteínas dessas condições foram digeridas, os peptídeos foram marcados com iTRAQ e misturados em uma relação 1:1:1:1 e fracionados *off-line* com HILIC (Figura 29) e as respectivas frações ou pool de frações foram analisadas por LC-MS/MS. Os dados obtidos foram submetidos a análise estatística baseada nos valores das relações dos canais 115/114 e 117/116, analise de enriquecimento de termos de GO e rede de interação de proteínas chave.

A análise proteômica identificou 6697 grupos de proteínas considerando um FDR de 1%. A figura 3A descreve a distribuição de localizações subcelulares das proteínas identificadas. Como nos casos anteriores, o método de extração utilizado permitiu obter informação de distintos compartimentos celulares com o fim de ser mais abrangente na análise de vias e proteínas envolvidas na diferenciação das neuroesferas. Por outro lado, a lista de identificação foi comparada com a base de dados do KEGG para visualizar os processos e vias relacionados direta ou indiretamente com o fenótipo neuronal. Foram encontrados termos relacionados com as doenças de Huntington, Parkinson e Alzheimer, orientação no crescimento dos axônios, regulação da sinapse, liberação de vesículas durante sinapses, entre outros (Figura 30).

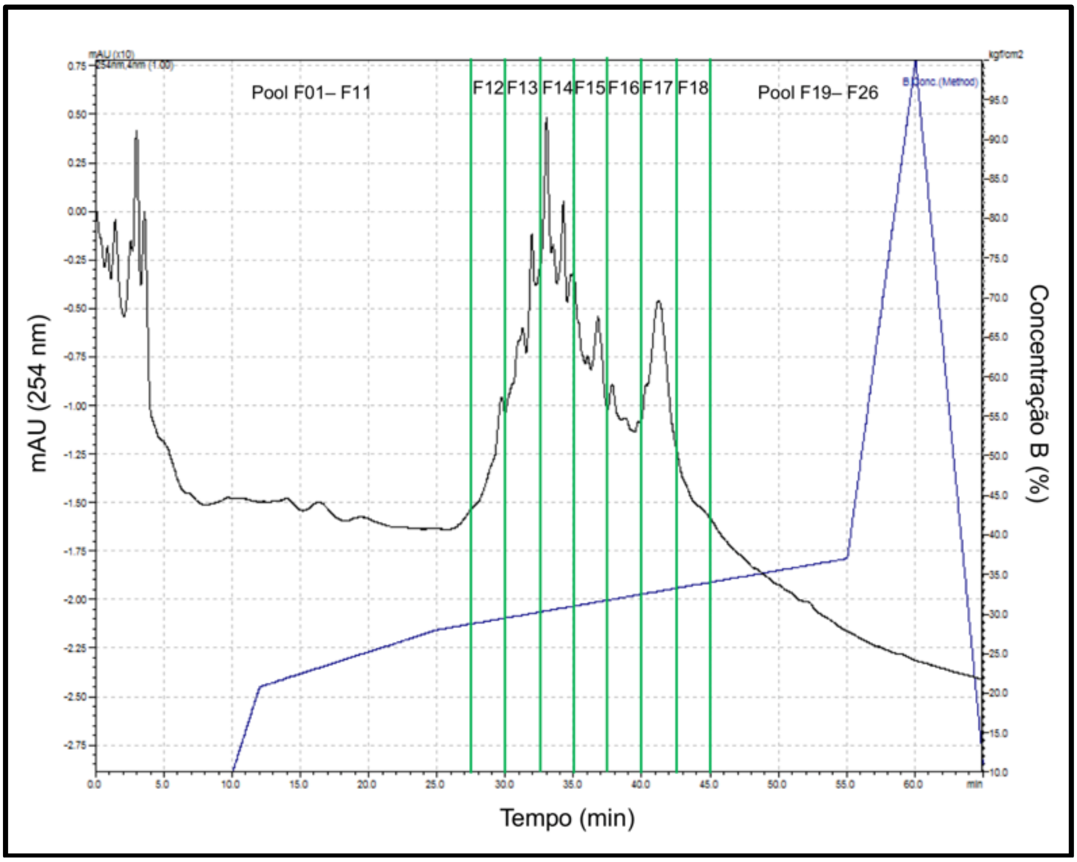


Figura 29. Fracionamento por HILIC dos peptídeos marcados com iTRAQ para a análise do proteoma total das neuroesferas. As linhas verdes indicam como foram misturadas e/ou divididas as frações para a analise por LC-MS/MS. Fluxo: 200 µl/min, numero total de frações: 26 com 500 µl cada uma.

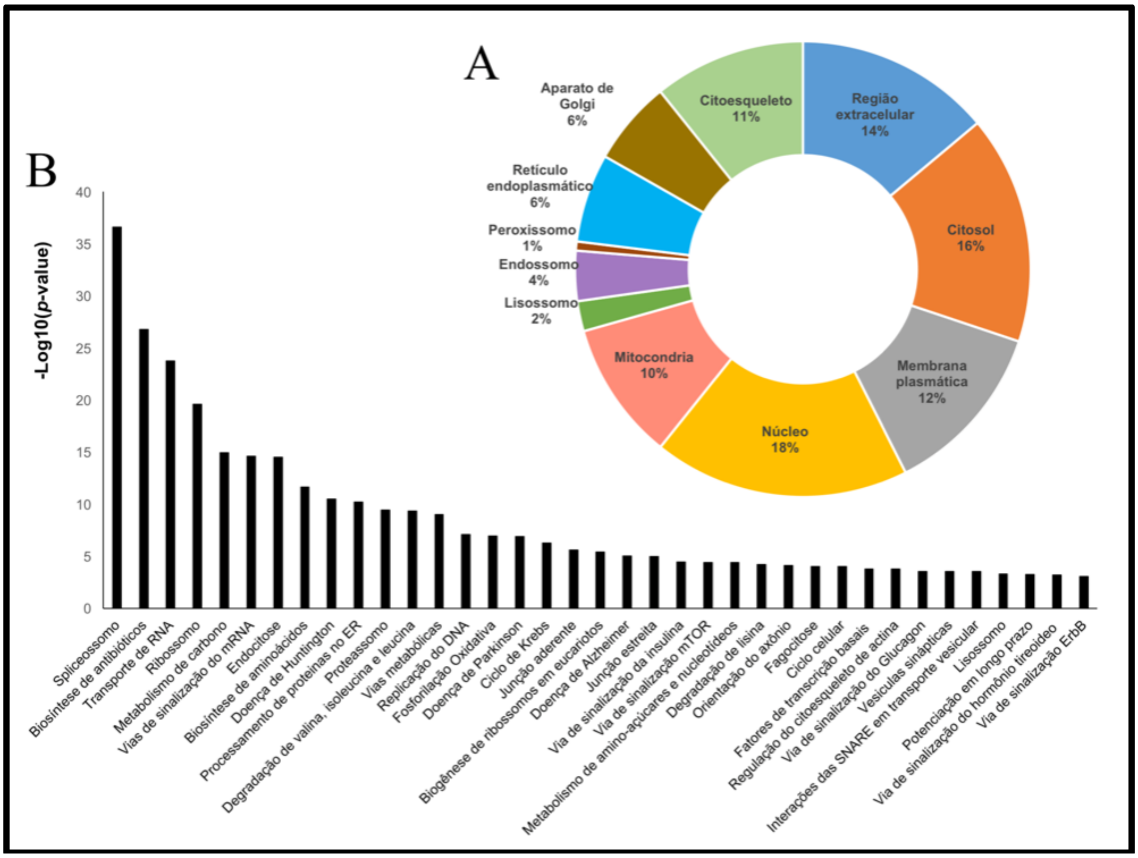


Figura 30. Descrição do proteoma das neuroesferas identificado. A: Distribuição de localizações sub-celulares. B: Vias enriquecidas no proteoma total utilizando da base dados do KEGG e o programa DAVID.

A partir das relações dos íons repórteres do iTRAQ normalizadas e plotadas em um *volcano plot* foram detectadas as proteínas com abundancia diferencial entre as duas condições de cultura (Figura 31). Um total de 1048 proteínas que apresentaram um *fold change*≥1.5 ou ≤0.67 e um *p*-valor <0.05 foram consideradas como diferencialmente abundantes. Nas neuroesferas cultivadas durante 10 dias (consideradas como diferenciadas), 921 proteínas aumentaram sua abundancia, e 127 mostraram diminuição da abundância (tabelas anexas 9 e 10). Dentre as proteínas presentes neste grupo, foram detectados diversos marcadores de diferenciação neuronal (MAP2, TUBB3, NSE, NEFL, NEFM, proteína Tau, entre outras) que permitem validar tanto o protocolo de diferenciação das neuroesferas assim como o tratamento estatístico aplicado já que sua presença pode ser considerada como um controle positivo (Tabelas anexas 9 e 10).

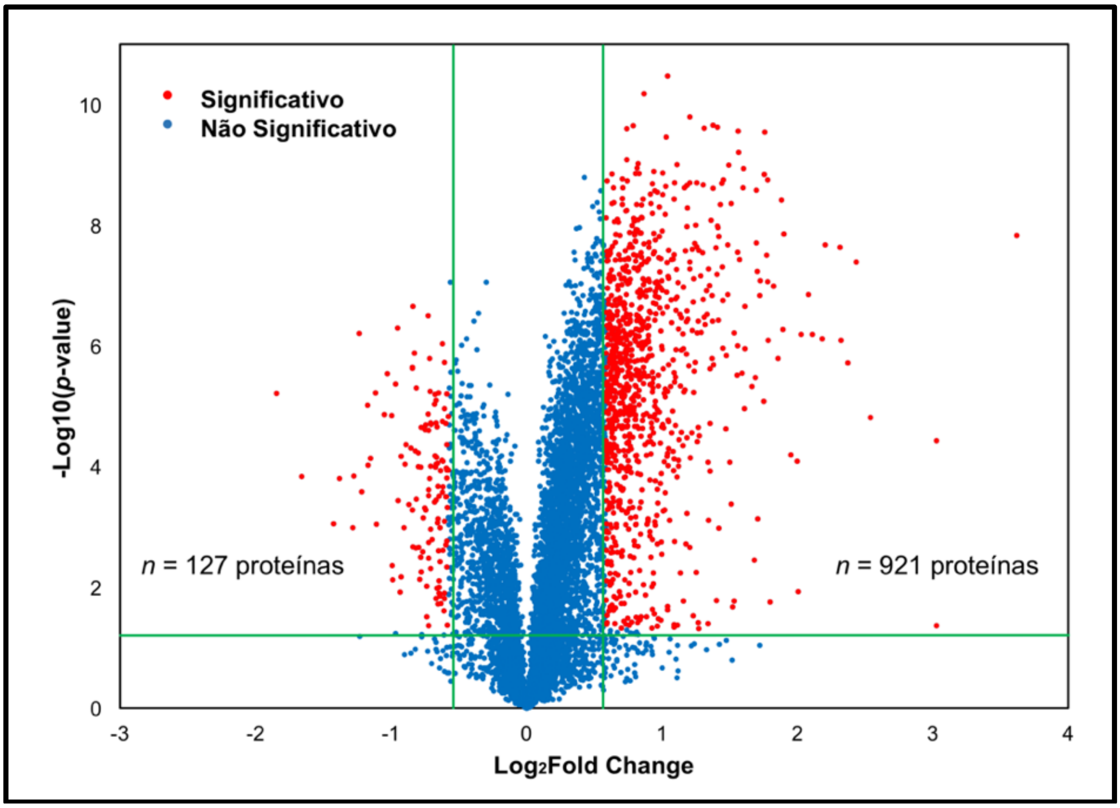


Figura 31. *Volcano plot* da distribuição de valores de *Fold-change* e *p*-valor na análise da diferenciação das neuroesferas por iTRAQ. As linhas vermelhas representam os critérios estatísticos de *fold-change*≥1.5 ou <0.67 e *p*<0.05. Os pontos vermelhos representam as proteínas que passaram esses critérios.

A análise de enriquecimento de termos GO das proteínas reguladas mostrou um comportamento similar às células de neuroblastoma, o grupo de proteínas com abundancia aumentada em células diferenciadas está fortemente associado a termos envolvidos com desenvolvimento neuronal e localizações celulares neuronais, o termo “adesão célula-célula” foi o mais enriquecido no conjunto de dados refletindo a influência da cultura em 3D ou em forma de neuroesferas; outros termos enriquecidos estão relacionados com o desenvolvimento da substancia negra, organização e regulação do citoesqueleto, processamento de neurotransmissores, regulação da sinapse, orientação e migração de axônios, entre outros (Figura 32). Pelo contrário, as proteínas com abundancia diminuída (ou mais expressas em células não diferenciadas) apresentaram enriquecimento de termos relacionados com proliferação celular como replicação e transcrição do DNA, processamento do RNA, remodelamento da cromatina e regulação do ciclo celular (Figura 33).

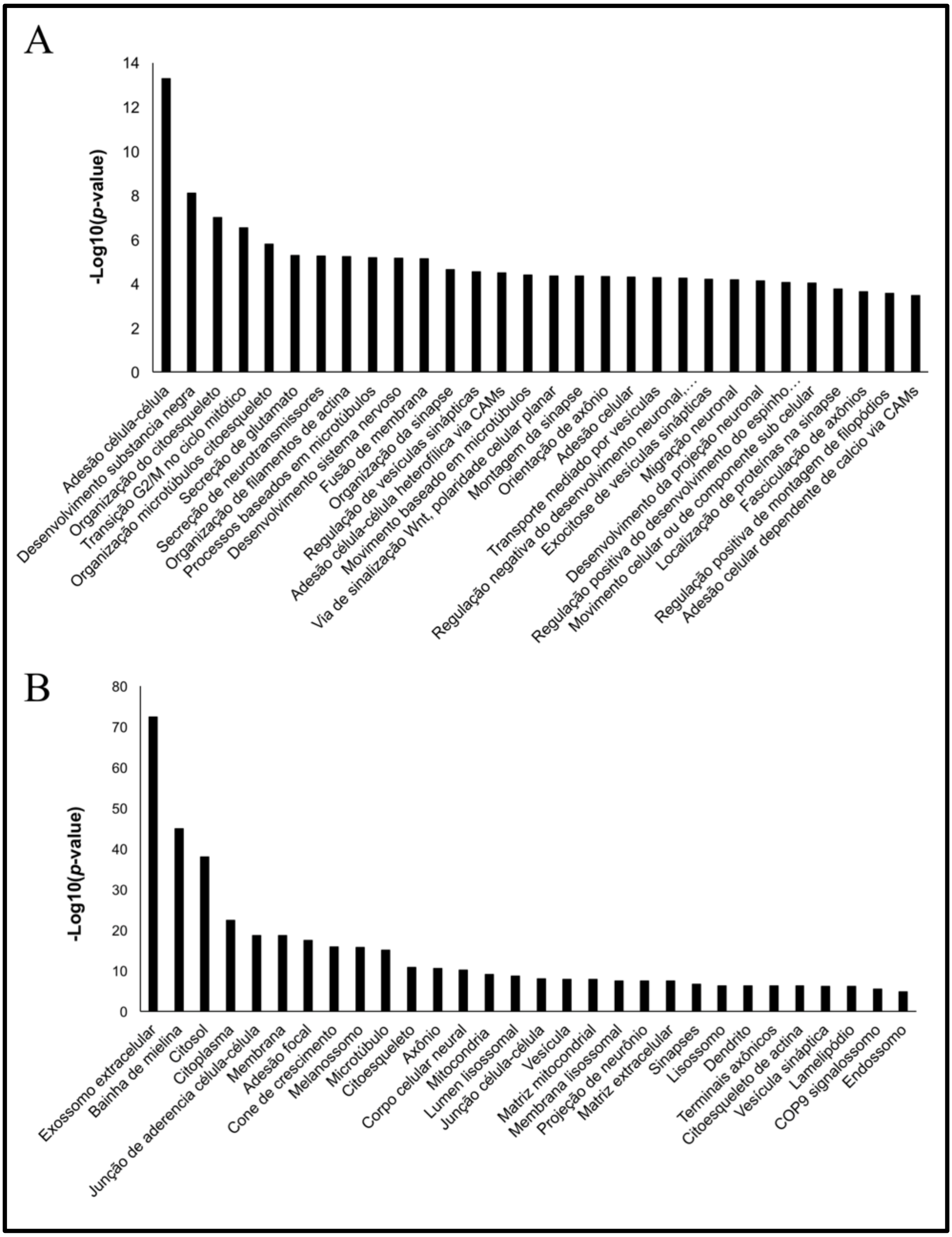


Figura 32. Enriquecimento de termos de GO das proteínas que aumentaram sua abundancia em neuroesferas cultivadas por 10 dias (diferenciadas). A: processos biológicos. B: Componente celular. Somente foram incluídos termos com $p<0.01$.

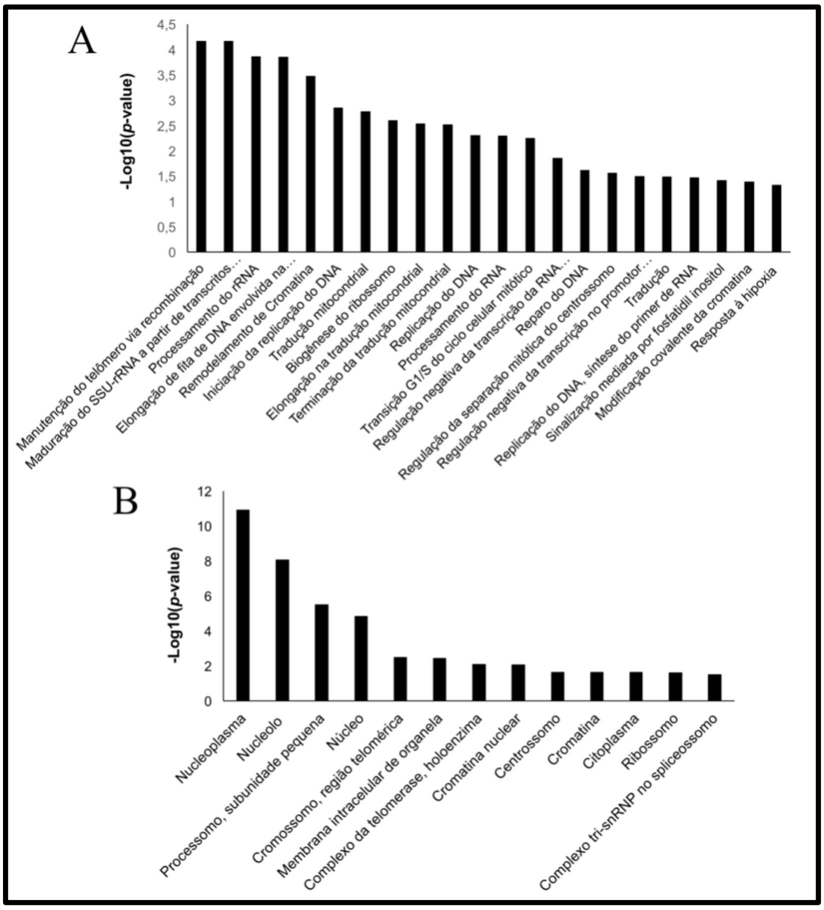


Figura 33. Enriquecimento de termos de GO das proteínas que diminuiram sua abundancia em neuroesferas cultivadas por 10 dias (diferenciadas). A: processos biológicos. B: Componente celular. Somente foram incluídos termos com $p<0.01$.

5.5.1 Rede de interação de proteínas reguladas

A análise da rede de interação de proteínas reguladas na diferenciação das neuroesferas foi realizada com a ajuda dos programas STRING 10.0 e Cytoscape, dentre os parâmetros considerados destacam-se o uso de interações de alta confidencia, exclusão de pontos sem parceiros de interação e, para simplificar a análise foram utilizadas somente as proteínas que aumentaram sua abundancia em neuroesferas cultivadas por 10 dias (tabela anexa 9). O mapa de interações descrito na figura 34, contem informação significativa de proteínas previamente relacionadas com funções neuronais e alguns elementos ainda pouco explorados em relação à diferenciação neuronal. Em termos gerais o mapa destaca o papel central da proteína precursora β-amilóide (APP) e da α-sinucleína (SNCA), proteínas relacionadas com doenças de Alzheimer e Parkinson (DAWKINS; SMALL, 2014; STEFANIS, 2012) e a integração de diversas proteínas de interação com ECM e célula-célula, regulação do citoesqueleto, sinalização das proteínas G, orientação do crescimento de axônios, detoxificação celular e trafico vesicular.

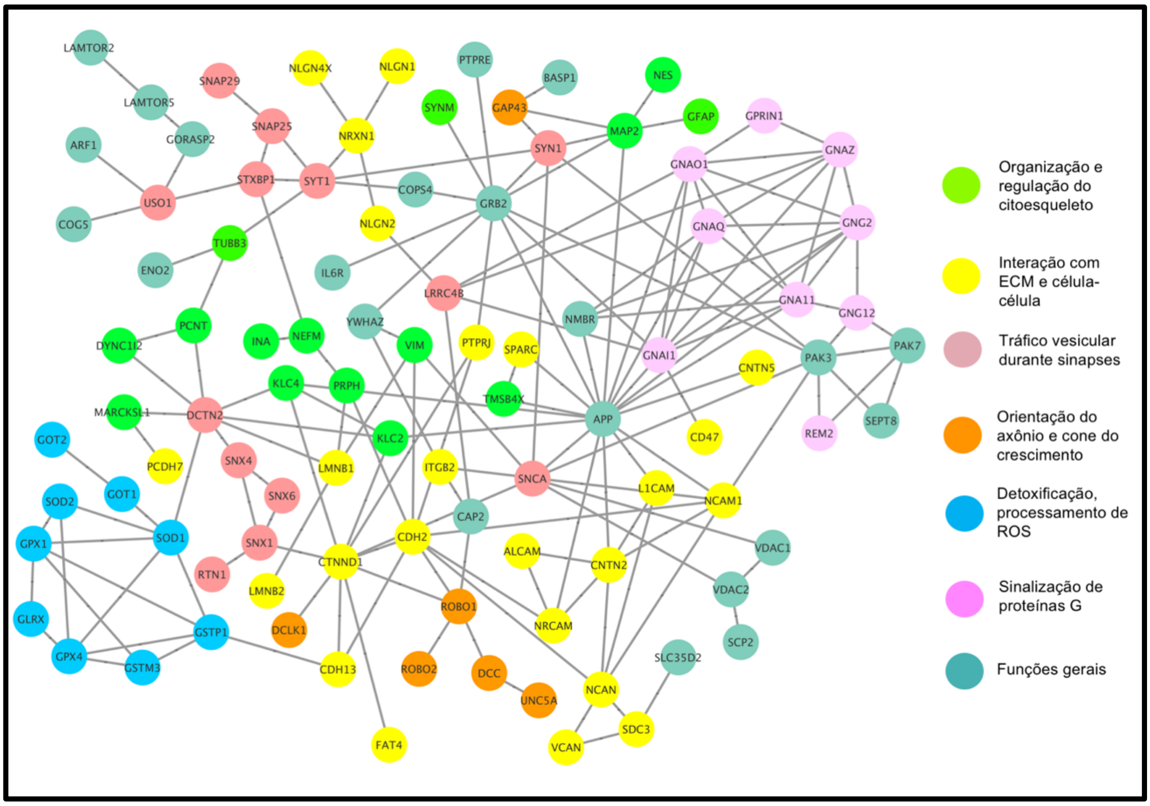


Figura 34. Principais proteínas reguladas em neuroesferas diferenciadas no mapa de interação construído a partir de STRING 10.0 e Cytoscape. A rede de interação foi construída utilizando uma pontuação de 0.9, os pontos sem conexões ou interações foram excluídos da análise. Dentre os grupos de proteínas destacaram-se elementos envolvidos na organização e regulação do citoesqueleto, interação com a matriz extracelular e célula-célula, trafico vesicular, orientação do axônio e cone do crescimento, detoxificação, proteínas G, entre outras.

As interações célula-célula e com a ECM foram altamente enriquecidas no grupo de proteínas reguladas na diferenciação das neuroesferas (Figuras 32A e 34) comportamento esperado devido à natureza da cultura 3D onde as células crescem em um nicho diferente das células em cultura 2D. Tais interações são relevantes no desenvolvimento dos axônios, cone de crescimento e sinapses (DALVA; MCCLELLAND; KAYSER, 2007; GIACHINO; BASAK; TAYLOR, 2009; JENSEN; PARMAR, 2006). A caderina 2 (CDH2), proteína chave na adesão célula-célula, foi regulada em células diferenciadas. Esta proteína de membrana possui domínios extracelulares que mediam interações heterofílicas entre células adjacentes garantindo assimetria celular e migração coletiva de neurônios, processos importantes dos neurônios em desenvolvimento (REBMAN; KIRCHOFF; WALSH, 2016). Um dos parceiros de interação da CDH2 é a integrina β2 (ITGB2). Em princípio, esta integrina não está envolvida no desenvolvimento do cérebro tal como ocorre com o complexo ITGA1/ITGB1 descrito em células de neuroblastoma, e sua regulação possivelmente está relacionada com a diferenciação de células gliais presentes nas neuroesferas; a interação da ITGB2 com as integrinas αM e αL é chave no desenvolvimento de células gliais no hipocampo servindo como receptor da molécula de adesão intracelular (ICAM) (WU; REDDY, 2012). Por outro lado, no mapa de interação também estão descritos nós pertencentes à contactina 2 (CNTN2), proteína neuronal ancorada à membrana pela molécula glicosilfosfatidil inositol que está associada à migração do neurônios e desenvolvimento de axônios no cerebelo e córtex cerebral (GAUTAM et al., 2014; NAMBA et al., 2014); proteínas NCAN e VCAN, proteoglicanos envolvidos na modulação da adesão celular, migração de neurônios e plasticidade, alterações na expressão de NCAN se relacionam à bipolaridade (DANNLOWSKI et al., 2015); a molécula de adesão celular L1CAM fortemente implicada no crescimento de neuritos e diferenciação neuronal e mielinação, falhas na sua expressão ou funcionamento provocam hipoplasia do corpo caloso, afasia receptiva, paraplegia espástica e doença de Hirschsprung (COMOGLIO; BOCCACCIO; TRUSOLINO, 2003; SAMATOV; WICKLEIN; TONEVITSKY, 2016); e a NCAM detectada também nas células SH-SY5Y diferenciadas e suas proteínas similares NRCAM (envolvida na sinalização no cone de crescimento e na migração celular por meio da interação do seu domínio citoplasmático com citoesquleto de actina (DAI et al., 2013; FAIVRE-SARRAILH et al., 1999) e ALCAM. O mapa de interação também reflete a relevância da catenina neuronal CTNND1, mostrando assim, a importância das junções aderentes no desenvolvimento cognitivo normal, deleções desta proteína provocam anormalidades na plasticidade sináptica em hipocampo, fenótipos recorrentes em doenças de Alzheimer e na síndrome de Cri-du-Chat (ISRAELY et al., 2016).

A adesão celular também pode ser estudada desde o ponto de vista da interação de neurônios pós-sinápticos e pré-sinápticos. Neste sentido, foi detectada a neurexina (NRXN1), elemento pre-sináptico que ajuda a conectar os neurônios durante a sinapse, que é uma proteína de membrana que utiliza seu domínio extracelular para interagir com a fenda sináptica. Alterações na expressão ou função desta proteína estão relacionadas com o autismo, síndrome de Tourette e esquizofrenia (CAO; TABUCHI, 2016; SÜDHOF, 2008). A NRXN1 interage com a neuroligina (NLGN) em forma de “aperto de mãos”. Esta proteína, também detectada neste estudo (Figura 34), é uma molécula de adesão celular localizada na membrana de neurônios pós-sinápticos que além de interagir com NRXN1, é um ponto de regulação de outras proteínas pós-sinápticas na localização de receptores de neurotransmissores e canais iônicos falhas no seu funcionamento estão relacionadas com as desordens do espectro autista (ASD) (CAO; TABUCHI, 2016; DEAN; DRESBACH, 2006).

O enriquecimento de vias relacionadas com as moléculas de adesão celular (CAMs) obtido a partir do programa DAVID, evidenciou uma ampla cobertura de CAMs envolvidas em sinapses e desenvolvimento de axônios (Figura 35). Além dos elementos identificados no mapa de interação, outras proteínas se destacaram: nectinas 1 e 3 (PVRL1/3) relacionadas com junções aderentes e evolução da sinapse química de neurônios, são proteínas altamente expressas nos estágios iniciais do desenvolvimento do cérebro e no processo de envelhecimento (MIZUTANI; TAKAI, 2016); molécula de adesão intracelular IGSF4 (ou SynCAM), relevante na formação de sinapses (FREI; STOECKLI, 2016); netrina G2, fortemente associada a orientação dos axônios em crescimento e ao fenótipo do síndrome de Rett (WOO; KWON; KIM, 2009); o proteoglicano syndecan-1 (SDC) relacionado com migração celular e interação com a ECM (MAEDA, 2015); e a proteína tirosina fosfatase, receptor tipo F (PTPRF), implicada principalmente na regulação das vias de sinalização dependentes da catenina β e dos receptores de neurotrofinas (TCHETCHELNITSKI et al., 2014).

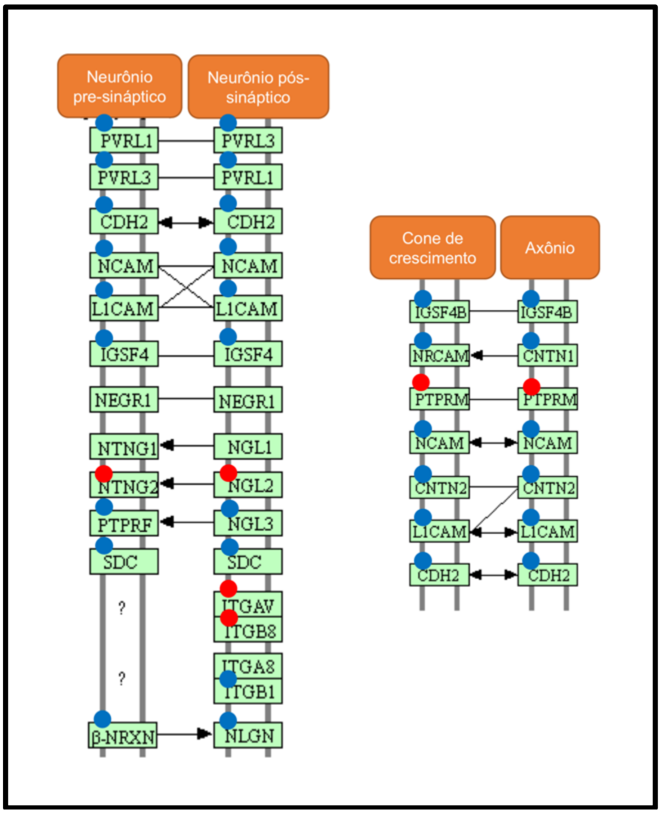


Figura 35. Esquema das vias relacionadas com as CAMs. As proteínas com pontos vermelhos representam aquelas que foram identificadas e aquelas com ponto azul representam proteínas detectadas e reguladas durante a diferenciação.

Outras proteínas presentes no mapa de interação estão envolvidas no tráfico vesicular durante a sinapse. Além da SNCA, foram identificadas as sinaptotagmina (SYT1), proteína sensor de íons cálcio na membrana da zona terminal de axônios de neurônios pre-sinapticos (PINHEIRO; HOUY; SORENSEN, 2016) e a sinapsina 1 (SYN1) que regula a liberação de neurotransmissores na sinapse controlando o número de vesículas disponível via exocitose, diversos estudos reportam a relação do mal funcionamento destas proteínas com defeitos na aprendizagem, desordens bipolares e esquizofrenia (EGBUJO; SINCLAIR; HAHN, 2016; GIOVEDÍ et al., 2014; SONG; AUGUSTINE, 2015). Por outro lado, também foram detectadas proteínas reguladoras do crescimento do axônio que interagem com a ECM, que é o caso das proteínas integrais de membrana ROBO 1 e 2 (roundabout) que agem como como orientadores do crescimento axonal assim como receptores da adesão celular, são as encarregadas de "tomar decisões" sobre o melhor caminho que os axônios devem tomar na linha media do sistema nervoso central para realizar sinapses especifica em músculos e outros órgãos, mutações e defeitos na liberação destas proteínas provocam dislexia severa e desordens de comunicação (HANNULA-JOUPPI et al., 2005; JAWORSKI; LONG; TESSIER-LAVIGNE, 2010).

O grupo de proteínas integrado pelas subunidades α e γ da proteína G também foi destaque no mapa de interação (Figura 34), as vias de sinalização que envolvem proteínas G regulam uma grande diversidade de processos envolvidos na fisiologia normal do organismo assim como na progressão de doenças, muitas vezes, de forma redundante (VASSILATIS et al., 2003). No caso da diferenciação neuronal, as proteínas G são chave na ação das vias de sinalização dependentes dos receptores TrkA/B, ERK e Akt que promovem diferenciação e sobrevivência (WANG; WONG, 2009). Cabe aprofundar em estudos complementares se as subunidades detectadas aqui ($G_{\alpha i}$, $G_{\alpha q}$, $G_{\alpha o}$, $G_{\alpha 11}$, $G_{\gamma 2}$, $G_{\gamma 12}$) são específicas para o fenótipo das células cultivadas na neuroesfera e/ou para o tipo de diferenciação induzido; em qualquer caso, a presença destas subunidades pode ser um ponto de partida para estabelecer quais vias de sinalização são mais relevantes na diferenciação no modelo de neuroesferas.

Os dados apresentados da diferenciação das NSCs cultivadas como neuroesferas mostraram uma vasta diversidade de processos pelos quais a análise da diferenciação pode ser direcionada, assim, a abordagem aplicada nesta fase do trabalho evidenciou um enriquecimento significativo de proteínas de adesão celular, muitas delas reguladas durante a aquisição da morfologia de neurônios maduros, proteínas como NCAN, L1CAM, NRXN1, NLGN ou CTNND1 e seus parceiros de interação representam fontes alternativas de estudo da diferenciação neuronal que podem ser aprofundados por técnicas ou metodologias ortogonais. Por outro lado, muitas das proteínas detectadas e discutidas aqui têm uma estreita relação com diversas desordens neurológicas, demostrando o enorme potencial do uso das neuroesferas, já que atualmente é possível isolar iPSCs/NSCs de pacientes com síndromes específicos (QUADRATO; BROWN; ARLOTTA, 2016). Assim, ao aplicar a metodologia proposta neste trabalho podem ser comparados os perfis proteômicos de células isoladas de pacientes controles com aquelas isoladas de pacientes com algum tipo de doença neurológica. Da mesma forma, podem ser aplicados protocolos de diferenciação de NSCs isoladas deste tipo de pacientes e verificar quais são as vias ou proteínas que sofrem alterações anormais e que ampliam a informação sobre o fenótipo dessa doença.

CAPÍTULO VI

CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

6.1 Conclusões

O presente trabalho abordou o estudo da diferenciação neuronal em escala proteômica utilizando os modelos *in vitro* de células de neuroblastoma SH-SY5Y e NSCs cultivadas em formato de neuroesferas. Por meio da quantificação com iTRAQ foi possível comparar os proteomas das células cultivadas em condições que induziram a diferenciação. As análises das proteínas reguladas em ambos tipos celulares foram complementares, mas também apresentaram diferenças como é de esperar pela natureza do formato dos dois modelos de cultura.

Durante o trabalho com as células SH-SY5Y, foi possível verificar a reprodutibilidade e variabilidade de proteínas específicas na cultura celular a nível proteômico, utilizando a mesma condição de cultura na análise por iTRAQ 95% das proteínas mostraram um CV menor a 20% entre replicatas biológicas e menor a 10% entre replicatas técnicas, desta forma, constitui um controle de qualidade dos dados proteômicos quantitativos escaláveis a qualquer sistema biológico.

A diferenciação das células SH-SY5Y com AR/BDNF mostrou a regulação de proteínas de interação com a matriz extracelular, apoptose e regulação do citoesqueleto importantes para sinaptogênese e orientação axonal, assim, destacaram-se CTNND1, EMILIN-1, AGRN, AIFM1, SMN1 e STMN1. Da mesma forma foram detectados fosfosítios específicos das cinases CaMKII e GRK em células diferenciadas confirmando o fenótipo de neurônios maduros. Os dados apresentados aqui, sugerem que as células SH-SY5Y devem ser utilizadas como modelo neuronal em seu estado diferenciado já que o fenótipo neural é mais presente neste estado, contrário das células não diferenciadas que apresentam mais relação com células proliferativas.

A cultura e diferenciação das neuroesferas destacou o papel das moléculas de adesão e interação célula-célula, NCAN, L1CAM, NRXN1, NLGN, CTNND1, entre outras, que mostraram regulação nas neuroesferas diferenciadas, da mesma forma, foram regulados importantes processos como o tráfico vesicular, sinapse, sinalização de proteínas G e organização do citoesqueleto. Muitas das proteínas identificadas e discutidas no presente documento têm uma relação direta em distintas desordens neurológicas o qual mostra o enorme potencial que tem este tipo de cultura na caracterização de patologias neuronais e na busca de novos alvos terapêuticos.

De forma geral, os resultados apresentados aqui constituem um avanço significativo no estudo em larga escala da diferenciação neuronal, além disso, refletem a relevância do uso de modelos celulares alternativos no estudo de fenótipos ou processos biológicos específicos do desenvolvimento neuronal pouco caracterizados, contribuindo para pesquisa da neurobiologia e da neuroproteômica.

6.2 Perspectivas

Os resultados obtidos neste trabalho podem ser considerados como ponto de partida para futuras análises na busca de candidatos a marcadores de diferenciação e/ou caraterização de alvos terapêuticos em doenças neurodegenerativas e, por isto, as perspectivas podem ser focadas em dois blocos: aprimoramento da análise da diferenciação com os modelos utilizados e ensaios de validação.

Devido à complexidade dos fenômenos de diferenciação celular, os modelos *in vitro* restringem os tempos de tratamento com os fatores indutores para simplificar os estudos podendo ser explorados tempos de incubação mais curtos dentro do processo de diferenciação, (uma hora, um dia, dois dias, etc.) que permitam identificar elementos adicionais envolvidos com o desenvolvimento das células assim como a caracterização de vias de sinalização adicionais, que, como é o caso da fosforilação, podem ter lugar em tempos muito curtos (minutos ou horas). Nesta direção, o iTRAQ permite analisar de forma simultânea até oito condições diferentes.

Respondendo às necessidades dos estudos clínicos assim como às exigências das revistas de alto impacto no processo de publicação, é imprescindível que as proteínas discutidas neste trabalho sejam avaliadas por técnicas complementares ou ortogonais que garantam a presença ou relação dessas moléculas nos fenótipos que estão sendo submetidos a avaliação. Para tanto, sugere-se a implementação de técnicas como Western blot, qPCR, ensaios de transcriptômica e análise alvo direcionado de SRM (Selected Reaction Monitoring).

CAPÍTULO VII
PRODUÇÃO E COLABORAÇÕES

Artigo submetido para publicação em revista

Quantitative proteomic analysis identifies proteins and pathways related to neuronal development in differentiated SH-SY5Y neuroblastoma cells.
Autores:
Jimmy Rodriguez Murillo[a], Livia Goto-Silva[b], Aniel Sánchez[c,d], Fábio C. S. Nogueira[a], Gilberto B. Domont[a] e Magno Junqueira[a].
Filiações:
[a]Proteomics Unit, Chemistry Institute, Federal University of Rio de Janeiro, 21941-909, Rio de Janeiro, Brazil.
[b]D'Or Institute for Research and Education(IDOR), 22281-100, Rio de Janeiro, Brazil.
[c]Section for Clinical Chemistry, Department of Translational Medicine, Lund University, Skåne University Hospital Malmö, 205 02 Malmö, Sweden.
[d]Center of Excellence in Biological and Medical Mass Spectrometry, Biomedical Center D13, Lund University, 221 84 Lund, Sweden.
Revista: *EuPa Open Proteomics*
Data submissão: 1 novembro de 2016.
Status: Sob revisão (Ver Apêndice 11).

Apresentação de trabalho em congressos

Palestra: Quantitative proteomic analysis identifies proteins and signaling pathways regulated in neuronal development using human cell models.
Palestrante: **Jimmy Esneider Rodriguez Murillo**
Evento: 6th BrMASS 2016 - 1st IbMSS (PS1: Employing mass spectrometry to understand the human brain)
Data: 12 de dezembro de 2016.

Quantitative proteomic analysis identifies proteins and pathways related to neuronal development in differentiated SH-SY5Y neuroblastoma cells
Jimmy Rodriguez Murillo, Livia Goto-Silva, Aniel Sánchez, Fábio C. S. Nogueira, Gilberto B. Domont e Magno Junqueira
Modalidade: Pôster
Evento: 6th BrMASS 2016 - 1st IbMSS

Data: 10 -14 de dezembro de 2016.

EXPLORING SH-SY5Y NEUROBLASTOMA CELLS DIFFERENTIATION INDUCED BY RETINOIC ACID AND BRAIN-DERIVED NEUROTROPHIC FACTOR USING ITRAQ-BASED QUANTITATIVE PROTEOMICS
Jimmy Rodriguez Murillo, Livia Goto-Silva, Aniel Sánchez, Fábio C. S. Nogueira, Gilberto B. Domont e Magno Junqueira
Modalidade: Pôster
Evento: V Latin American Protein Society Meeting
Data: 7 -10 de novembro de 2016.

Artigos/capítulos de livro em Colaboração

PINHEIRO, GUILHERME L.; **RODRIGUEZ, JIMMY ESNEIDER**; DOMONT, GILBERTO B.; DE SOUZA, WANDERLEY; JUNQUEIRA, MAGNO; FRASES, SUSANA. Characterization of *Streptomyces sp.* I1.2 Secretome Reveals the Presence of Multienzymatic Complexes Containing Cellulases and Accessory Enzymes. BioEnergy Research (2016). doi:10.1007/s12155-016-9771-x.

Goto-Silva, Livia; Maliga, Zoltan; Slabicki, Mikolaj; **Murillo, Jimmy Rodriguez**; Junqueira, Magno. Application of Shotgun Proteomics for Discovery-Driven Protein-Protein Interaction. Methods in Molecular Biology. 1ed.: Springer New York, 2014, v. 1156, p. 265-278. doi:10.1007/978-1-4939-0685-7_18

DiagnoProt: a tool for discovery of new molecules by mass spectrometry. André R F Silva, Diogo B Lima, Alejandro Peña, Rosario Duran, Carlos Batthyany, Priscila F Aquino, Juliana C Leal, **Jimmy E Rodriguez**, Gilberto B Domont, Marlon D M Santos, Julia Chamot-Rooke, Valmir C Barbosa, and Paulo C Carvalho. Bioinformatics (2017). doi: 10.1093/bioinformatics/btx093

Apresentação de trabalhos de colaborações em congressos

Characterization of selected proteins encoded by 15q11-q13 region of human chromosome 15.

Autores: **Rodriguez J**; Goto-Silva, L; JUNQUEIRA, M.; DOMONT, G.
Evento: 2nd Proteomics Meeting of the Brazilian Proteomics Society and 2nd Pan American HUPO Meeting.
Modalidade: Pôster
Búzios – RJ, Brasil, 2014.

Characterization of golgins encoded by 15q11-q13 region of chromosome 15.
Autores: **Rodriguez J**; Goto-Silva, L; JUNQUEIRA, M.; DOMONT, G.
Evento: ChemRio 2014
Modalidade: Apresentação Oral
Lugar: Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil, 2014.

Bottom-up and middle-down approaches for comprehensive analysis of chromatin-binding proteins after treatment with sodium butyrate
Autores: Goto-Silva, Livia; **RODRIGUEZ, JIMMY E.**; JUNQUEIRA, M.; DOMONT, G.
Evento: 62th ASMS 2014 – Estados Unidos.
Modalidade: Pôster

PROTEOMIC ANALYSIS OF *ASPERGILLUS SPP.* ISOLATED FROM AMAZON SOILS
Autores: LEAL, J. C.; ARAUJO, C. P. M.; CASTRO, C. P.; RODRIGUES, J. C.; **RODRIGUEZ, JIMMY E.**; NOGUEIRA, P. P. O.; CARVALHO, P. C.; FERNANDES, O. C. C.; AQUINO, P. F.
Modalidade: Pôster
Evento: 45a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia
Molecular, realizada em Natal,
Lugar e Data: Rio Grande do Norte, 18 a 21 de Junho de 2016.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS, J. A. Kinetic and catalytic mechanisms of protein kinases. **Chemical Reviews**, v. 101, n. 8, p. 2271-2290, 2001.

ADEWUMI, O. et al. Characterization of human embryonic stem cell lines by the International Stem Cell Initiative. **Nature biotechnology**, v. 25, n. 7, p. 803–816, 2007.

AEBERSOLD, R.; MANN, M. Mass spectrometry-based proteomics. **Nature**, v. 422, n. 6928, p. 198–207, 2003.

AGHOLME, L. et al. An in vitro model for neuroscience: Differentiation of SH-SY5Y cells into cells with morphological and biochemical characteristics of mature neurons. **Journal of Alzheimer's Disease**, v. 20, n. 4, p. 1069–1082, 2010.

AGUILAR, M. HPLC of Peptides and Proteins Methods and Protocols. **Methods in Molecular Biology**, v. 251, p. 3–8, 2004.

AHRENS, C. H. et al. Generating and navigating proteome maps using mass spectrometry. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 11, n. 11, p. 789–801, 2010.

AIRAKSINEN, M. S.; SAARMA, M. the Gdnf Family: Signalling, Biological Functions and Therapeutic Value. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 3, n. 5, p. 383–394, 2002.

AKHTAR, R. S.; NESS, J. M.; ROTH, K. A. Bcl-2 family regulation of neuronal development and neurodegeneration. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research**, v. 1644, n. 2–3, p. 189–203, 2004.

ARRIGONI, G. et al. Chemical derivatization of phosphoserine and phosphothreonine containing peptides to increase sensitivity for MALDI-based analysis and for selectivity of MS/MS analysis. **Proteomics**, v. 6, n. 3, p. 757–766, 2006.

BANERJEE, S.; MAZUMDAR, S. Electrospray ionization mass spectrometry: a technique to access the information beyond the molecular weight of the analyte. **International Journal of Analytical Chemistry**, v. 2012, p. 282574, 2012.

BANTSCHEFF, M. et al. Quantitative mass spectrometry in proteomics: A critical review. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 389, n. 4, p. 1017–1031, 2007.

BEAUSOLEIL, S. A. et al. Large-scale characterization of HeLa cell nuclear phosphoproteins. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 101, n. 33, p. 12130–5, 2004.

BOERSEMA, P. J.; MOHAMMED, S.; HECK, A. J. R. Hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC) in proteomics. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 391, n. 1, p. 151–159, 2008.

BONDARENKO, P. V.; CHELIUS, D.; SHALER, T. A. Identification and relative quantitation of protein mixtures by enzymatic digestion followed by capillary reversed-phase liquid chromatography - Tandem mass spectrometry. **Analytical Chemistry**, v. 74, n. 18, p. 4741–4749, 2002.

BRUDVIG, J. J.; WEIMER, J. M. X MARCKS the spot: myristoylated alanine-rich C kinase substrate in neuronal function and disease. **Frontiers in Cellular Neuroscience**, v. 9, n. October, p. 1–10, 2015.

BURNETT, B. G. et al. Regulation of SMN protein stability. **Molecular and cellular biology**, v. 29, n. 5, p. 1107–15, 2009.

CAO, X.; PFAFF, S. L.; GAGE, F. H. A functional study of miR-124 in the developing neural tube. **Genes and Development**, v. 21, n. 5, p. 531–536, 2007.

CAO, X.; TABUCHI, K. Functions of synapse adhesion molecules neurexin/neuroligins and neurodevelopmental disorders. **Neuroscience Research**, 2016.

CASSIMERIS, L. The oncoprotein 18/stathmin family of microtubule destabilizers. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 14, n. 1, p. 18–24, 2002.

CHAHROUR, O.; COBICE, D.; MALONE, J. Stable isotope labelling methods in mass spectrometry-based quantitative proteomics. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 113, p. 2-20, 2015.

CHAUVIN, S.; SOBEL, A. Neuronal stathmins: A family of phosphoproteins cooperating for neuronal development, plasticity and regeneration. **Progress in Neurobiology**, v. 126, p. 1-18, 2015.

CHEE, S. G. et al. Technical, experimental, and biological variations in isobaric tags for relative and absolute quantitation (iTRAQ). **Journal of Proteome Research**, v. 6, n. 2, p. 821–827, 2007.

CHEFFER, A.; TÁRNOK, A.; ULRICH, H. Cell cycle regulation during neurogenesis in the embryonic and adult brain. **Stem cell reviews**, v. 9, n. 6, p. 794–805, 2013.

CHEN, Z.-L.; INDYK, J. A; STRICKLAND, S. The hippocampal laminin matrix is dynamic and critical for neuronal survival. **Molecular biology of the cell**, v. 14, n. 7, p. 2665–76, 2003.

CHOE, L. et al. 8-Plex Quantitation of changes in cerebrospinal fluid protein expression in subjects undergoing intravenous immunoglobulin treatment for Alzheimer’s disease. **Proteomics**, v. 7, n. 20, p. 3651–3660, out. 2007.

CHOHAN, T. A. et al. Cyclin-Dependent Kinase-2 as a Target for Cancer Therapy : Progress in the Development of CDK2 Inhibitors as Anti-Cancer Agents. **Current Medicinal Chemistry**, v. 22, p. 237–263, 2015.

COLBRAN, R. J. Targeting of calcium ⁄ calmodulin-dependent protein kinase II. **Biochem. J**, v. 378, p. 1–16, 2004.

COMOGLIO, P. M.; BOCCACCIO, C.; TRUSOLINO, L. Interactions between growth factor receptors and adhesion molecules: Breaking the rules. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 15, n. 5, p. 565-571, 2003.

CONSTANTINESCU, R. et al. Neuronal differentiation and long-term culture of the human neuroblastoma line SH-SY5Y. **Journal of neural transmission. Supplementum**, n. 72, p. 17–28, 2007.

CRAIG, R.; BEAVIS, R. C. TANDEM: Matching proteins with tandem mass spectra. **Bioinformatics**, v. 20, n. 9, p. 1466–1467, 2004.

DAI, J. et al. Neuron glia-related cell adhesion molecule (NrCAM) promotes topographic retinocollicular mapping. **PloS one**, v. 8, n. 9, p. e73000, 2013.

DALVA, M. B.; MCCLELLAND, A. C.; KAYSER, M. S. Cell adhesion molecules: signalling functions at the synapse. **Nature reviews. Neuroscience**, v. 8, n. 3, p. 206–220, 2007.

DANNLOWSKI, U. et al. NCAN Cross-Disorder Risk Variant Is Associated With Limbic Gray Matter Deficits in Healthy Subjects and Major Depression. **Neuropsychopharmacology: official publication of the American College of Neuropsychopharmacology**, v. 40, n. 11, p. 2510–6, 2015.

DAWKINS, E.; SMALL, D. H. Insights into the physiological function of the β-amyloid precursor protein: beyond Alzheimer’s disease. **Journal of Neurochemistry**, v. 129, n. 5, p. 756–769, 7 jun. 2014.

DEAN, C.; DRESBACH, T. Neuroligins and neurexins: Linking cell adhesion, synapse formation and cognitive function. **Trends in Neurosciences**, v. 29, n. 1, p 21-29, 2006.

DELEYROLLE, L. P.; REYNOLDS, B. A. Isolation, expansion, and differentiation of adult Mammalian neural stem and progenitor cells using the neurosphere assay. **Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)**, v. 549, p. 91–101, 2009.

DENERIS, E. S.; HOBERT, O. Maintenance of postmitotic neuronal cell identity. **Nature neuroscience**, v. 17, n. 7, p. 899–907, 2014.

DERDA, R. et al. Paper-supported 3D cell culture for tissue-based bioassays. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 106, n. 44, p. 18457–18462, 2009.

DEUTSCH, E. W.; LAM, H.; AEBERSOLD, R. Data analysis and bioinformatics tools for tandem mass spectrometry in proteomics. **Physiological genomics**, v. 33, n. 1, p. 18–25, 2008.

DIODATO, D. et al. A novel AIFM1 mutation expands the phenotype to an infantile motor neuron disease. **European journal of human genetics : EJHG**, v. 24, n. 3, p. 463–6, 2016.

DOWLE, A. A.; WILSON, J.; THOMAS, J. R. Comparing the Diagnostic Classification Accuracy of iTRAQ, Peak-Area, Spectral-Counting, and emPAI Methods for Relative Quantification in Expression Proteomics. **Journal of Proteome Research**, p. acs.jproteome.6b00308, 2016.

DWANE, S.; DURACK, E.; KIELY, P. A. Optimising parameters for the differentiation of SH-SY5Y cells to study cell adhesion and cell migration. **BMC research notes**, v. 6, n. 1, p. 366, 2013.

EDSJÖ, A.; HOLMQUIST, L.; PAHLMAN, S. Neuroblastoma as an experimental model for neuronal differentiation and hypoxia-induced tumor cell dedifferentiation. **Seminars in Cancer Biology**, v. 17, n. 3, p. 248-256, 2007.

EGBUJO, C. N.; SINCLAIR, D.; HAHN, C. G. Dysregulations of Synaptic Vesicle Trafficking in Schizophrenia. **Current Psychiatry Reports**, v. 8, n. 18, p. 77, 2016.

EIDHAMMER, I. et al. Computational Methods for Mass Spectrometry Proteomics. **Wiley**, p. 296, 2008.

ELIAS, J. E.; GYGI, S. P. Target-decoy search strategy for increased confidence in large-scale protein identifications by mass spectrometry. **Nature Methods**, v. 4, n. 3, p. 207–214, 2007.

ELLIOTT, M. H. et al. Current trends in quantitative proteomics. **Journal of Mass Spectrometry**, v. 44, n. 12, p. 1637-1660, 2009.

EMDAL, K. B. et al. Temporal proteomics of NGF-TrkA signaling identifies an inhibitory role for the E3 ligase Cbl-b in neuroblastoma cell differentiation. **Science Signaling**, v. 8, n. 374, p. ra40-ra40, 2015.

ENCINAS, M. et al. Sequential treatment of SH-SY5Y cells with retinoic acid and brain-derived neurotrophic factor gives rise to fully differentiated, neurotrophic factor-dependent, human neuron-like cells. **Journal of Neurochemistry**, v. 75, n. 3, p. 991–1003, 2000.

ENG, J. K. et al. **A face in the crowd: recognising peptides through database search. Molecular & Cellular Proteomics**, v. 10, n. 11, publicação online, 2011.

ENG, J. K.; JAHAN, T. A.; HOOPMANN, M. R. Comet: An open-source MS/MS sequence database search tool. **Proteomics**, v. 13, n. 1, p. 22–24, 2013.

ENG, J. K.; MCCORMACK, A. L.; YATES, J. R. An Approach to Correlate Tandem Mass Spectral Data of Peptides with Amino Acid Sequences in a Protein Database. **American society for Mass Spectrometry**, v. 5, p. 976–989, 1994.

ENGHOLM-KELLER, K. et al. Multidimensional Strategy for Sensitive Phosphoproteomics Incorporating Protein Prefractionation Combined with SIMAC, HILIC, and TiO2

Chromatography Applied to Proximal EGF Signaling. **Journal of Proteome Research**, v. 10, n. 12, p. 5383–5397, 2 dez. 2011.

ENGHOLM-KELLER, K. et al. TiSH - a robust and sensitive global phosphoproteomics strategy employing a combination of TiO2, SIMAC, and HILIC. **Journal of Proteomics**, v. 75, n. 18, p. 5749–5761, 2012.

FAIVRE-SARRAILH, C. et al. NrCAM, cerebellar granule cell receptor for the neuronal adhesion molecule F3, displays an actin-dependent mobility in growth cones. **Journal of cell science**, v. 112 Pt 18, p. 3015–27, 1999.

FENN, J. B. et al. Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules. **Science**, v. 246, n. 4926, p. 64–71, 1989.

FORONI, C. et al. Resilience to transformation and inherent genetic and functional stability of adult neural stem cells ex vivo. **Cancer Research**, v. 67, n. 8, p. 3725–3733, 2007.

FOURNIER, M. L. et al. **Multidimensional separations-based shotgun proteomicsChemical Reviews**, 2007.

FREI, J. A.; STOECKLI, E. T. SynCAMs - From axon guidance to neurodevelopmental disorders. **Molecular and Cellular Neuroscience**, 2016.

GAGE, F. H. Mammalian neural stem cells. **Science**, v. 287, n. 5457, p. 1433–1438, 2000.

GARCEZ, P. P. et al. Combined proteome and transcriptome analyses reveal that Zika virus circulating in Brazil alters cell cycle and neurogenic programmes in human neurospheres. **PeerJ Preprints**, v. 4, n. e2033v1, 2016.

GAUTAM, V. et al. BACE1 activity regulates cell surface contactin-2 levels. **Molecular neurodegeneration**, v. 9, p. 4, 2014.

GEYER, P. E. et al. Plasma Proteome Profiling to Assess Human Health and Disease. **Cell Systems**, v. 2, n. 3, p. 185–195, 2016.

GIACHINO, C.; BASAK, O.; TAYLOR, V. Stem Cells in Regenerative Medicine. **Stem Cells in Regenerative Medicine**, v. 482, p. 143–158, 2009.

GIAVAZZI, A. et al. Neuronal-specific roles of the survival motor neuron protein: evidence from survival motor neuron expression patterns in the developing human central nervous system. **Journal of neuropathology and experimental neurology**, v. 65, n. 3, p. 267–277, 2006.

GIBBONS, H. M.; DRAGUNOW, M. Adult human brain cell culture for neuroscience research. **The international journal of biochemistry & cell biology**, v. 42, n. 6, p. 844–56, 2010.

GILAR, M. et al. Orthogonality of separation in two-dimensional liquid chromatography. **Analytical Chemistry**, v. 77, n. 19, p. 6426–6434, 2005.

GIOVEDÍ, S. et al. Involvement of synaptic genes in the pathogenesis of autism spectrum disorders: the case of synapsins. **Frontiers in pediatrics**, v. 2, p. 94, 2014.

GÖTZ, M.; HUTTNER, W. B. The cell biology of neurogenesis. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 6, n. 10, p. 777–788, 2005.

GRIMMLER, M. et al. Phosphorylation regulates the activity of the SMN complex during assembly of spliceosomal U snRNPs. **EMBO Rep**, v. 6, n. 1, p. 70–76, 2005.

GROSS, J. H. Jürgen H. Gross: Mass spectrometry–A Textbook, 2nd ed. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, 2011.

GUREVICH, E. V. et al. G protein-coupled receptor kinases: More than just kinases and not only for GPCRs. **Pharmacology and Therapeutics**, v. 133, n. 1, p. 40–69, 2012.

GUREVICH, E. V.; GAINETDINOV, R. R.; GUREVICH, V. V. G protein-coupled receptor kinases as regulators of dopamine receptor functions. **Pharmacological Research**, v. 111, p. 1–16, 2016.

HANGEN, E. et al. A brain-specific isoform of mitochondrial apoptosis-inducing factor: AIF2. **Cell death and differentiation**, v. 17, n. 7, p. 1155–1166, 2010.

HANNULA-JOUPPI, K. et al. The Axon Guidance Receptor Gene ROBO1 Is a Candidate Gene for Developmental Dyslexia. **PLOS Genetics**, v. 1, n. 4, p. e50, 28 out. 2005.

HEMSTRÖM, P.; IRGUM, K. Hydrophilic interaction chromatography. **Journal of Separation Science**, v. 29, n. 12, p. 1784-1821, 2006.

HODGE, K. et al. Cleaning up the masses: Exclusion lists to reduce contamination with HPLC-MS/MS. **Journal of Proteomics**, v. 88, p. 92–103, 2013.

HOFFMANN, E. DE; STROOBANT, V. **Mass Spectrometry - Priniples and Applications.** [s.l: s.n.]. v. 29

HORVATH, P. et al. Screening out irrelevant cell-based models of disease. **Nature reviews. Drug discovery**, v. 15, n. 11, p. 751–769, 2016.

HU, Q. et al. The Orbitrap: A new mass spectrometer. **Journal of Mass Spectrometry**, v. 40, n. 4, p. 430-443, 2005.

HUBER, L. A. Is proteomics heading in the wrong direction? **Nature reviews. Molecular cell biology**, v. 4, n. 1, p. 74–80, 2003.

HULTIN-ROSENBERG, L. et al. Defining, comparing, and improving iTRAQ quantification in mass spectrometry proteomics data. **Molecular & cellular proteomics : MCP**, v. 12, n. 7, p. 2021–31, 2013.

HUNTER, T. Signaling--2000 and beyond. **Cell**, v. 100, n. 1, p. 113–127, 2000.

ISRAELY, I. et al. Deletion of the Neuron-Specific Protein Delta-Catenin Leads to Severe Cognitive and Synaptic Dysfunction. **Current Biology**, v. 14, n. 18, p. 1657–1663, 22 dez. 2016.

JAWORSKI, A.; LONG, H.; TESSIER-LAVIGNE, M. Collaborative and specialized functions of Robo1 and Robo2 in spinal commissural axon guidance. **The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 30, n. 28, p. 9445–9453, 2010.

JENSEN, J. B.; PARMAR, M. Strengths and limitations of the neurosphere culture system. **Molecular neurobiology**, v. 34, n. 3, p. 153–161, 2006.

KARAS, M.; HILLENKAMP, F. Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10,000 daltons. **Analytical chemistry**, v. 60, n. 20, p. 2299–2301, 1988.

KELAVA, I.; LANCASTER, M. A. Stem Cell Models of Human Brain Development. **Cell Stem Cell**, v. 18, p. 736-748, 2016.

KERR, D. A. et al. Survival motor neuron protein modulates neuron-specific apoptosis. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 97, n. 24, p. 13312–7, 2000.

KOKUBU, M. et al. Specificity of immobilized metal affinity-based IMAC/C18 tip enrichment of phosphopeptides for protein phosphorylation analysis. **Analytical Chemistry**, v. 77, n. 16, p. 5144–5154, 2005.

KOLSRUD, H. et al. A Critical Review of Trypsin Digestion for LC-MS Based Proteomics. In: LEUNG, D. H.-C. (Ed.). . **Integrative Proteomics**. [s.l.] In Tech, 2012. p. 73–92.

KOMIYA, Y.; HABAS, R. Wnt signal transduction pathways. **Organogenesis**, v. 4, n. 2, p. 68–

75, 2008.

KORECKA, J. A.; LEVY, S.; ISACSON, O. In vivo modeling of neuronal function, axonal impairment and connectivity in neurodegenerative and neuropsychiatric disorders using induced pluripotent stem cells. **Molecular and Cellular Neuroscience**, v. 73, p. 3–12, 2015.

KOVALEVICH, J.; LANGFORD, D. Considerations for the use of SH-SY5Y neuroblastoma cells in neurobiology. **Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)**, v. 1078, p. 9–21, 2013.

KRISHNA, A. et al. Systems genomics evaluation of the SH-SY5Y neuroblastoma cell line as a model for Parkinson's disease. **BMC genomics**, v. 15, p. 1154, 2014.

LAPLANTE, M.; SABATINI, D. M. mTOR signaling at a glance. **J Cell Sci**, v. 122, n. Pt 20, p. 3589–3594, 2009.

LARSEN, M. R. et al. Highly selective enrichment of phosphorylated peptides from peptide mixtures using titanium dioxide microcolumns. **Molecular & Cellular Proteomics**, v. 4, n. 7, p. 873–886, 2005.

LARSEN, M. R. et al. Analysis of posttranslational modifications of proteins by tandem mass spectrometry. **BioTechniques**, v. 40, n. 6, p. 790-798.2006.

LAU, E. et al. Combinatorial use of offline SCX and online RP-RP liquid chromatography for iTRAQ-based quantitative proteomics applications. **Molecular bioSystems**, v. 7, n. ii, p. 1399–1408, 2011.

LENT, R. Cem Bilhões de neurônios. **S50 Paulo: Ed. Atheneu**, p. 698, 2002.

LEPREVOST, F. V et al. PepExplorer: a similarity-driven tool for analyzing de novo sequencing results. **Molecular & cellular proteomics: MCP**, v. 13, n. 9, p. 2480–9, 2014.

LEWIS, J. K.; WEI, J.; SIUZDAK, G. Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry in Peptide and Protein Analysis. In: **Encyclopedia of Analytical Chemistry**. [s.l: s.n.]. p. 5880–5894.

LITCHFIELD, D. W. Protein kinase CK2: structure, regulation and role in cellular decisions of life and death. **The Biochemical journal**, v. 369, n. Pt 1, p. 1–15, 2003.

LÓPEZ-CARBALLO, G. et al. Activation of the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling pathway by retinoic acid is required for neural differentiation of SH-SY5Y human neuroblastoma cells. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 28, p. 25297–25304, 2002.

MAEDA, N. Proteoglycans and neuronal migration in the cerebral cortex during development and disease. **Frontiers in Neuroscience**, v. 9, n. 98, 2015.

MAKAROV, A. Electrostatic axially harmonic orbital trapping: A high-performance technique of mass analysis. **Analytical Chemistry**, v. 72, n. 6, p. 1156–1162, 2000.

MAKAROV, A. et al. Dynamic Range of Mass Accuracy in LTQ Orbitrap Hybrid Mass Spectrometer. **Journal of the American Society for Mass Spectrometry**, v. 17, n. 7, p. 977–982, 2006.

MARIMPIETRI, D. et al. Proteome Profiling of Neuroblastoma-Derived Exosomes Reveal the Expression of Proteins Potentially Involved in Tumor Progression. **PLoS ONE**, v. 8, n. 9, 2013.

MARTINEZ, T. L. et al. Survival motor neuron protein in motor neurons determines synaptic integrity in spinal muscular atrophy. **The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 32, n. 25, p. 8703–15, 2012.

MATTER, C. et al. δ-Catenin Is Required for the Maintenance of Neural Structure and Function in Mature Cortex In Vivo. **Neuron**, v. 64, n. 3, p. 320–327, 2009.

MCCORMACK, A L. et al. Direct analysis and identification of proteins in mixtures by LC/MS/MS and database searching at the low-femtomole level. **Analytical chemistry**, v. 69, n. 4, p. 767–776, 1997.

MELO-BRAGA, M. N. et al. Comprehensive quantitative comparison of the membrane proteome, phosphoproteome and sialiome of human embryonic and neural stem cells. **Molecular & cellular proteomics: MCP**, v. 13, n. 1, p. 311–328, 2013.

MELO-BRAGA, M. N. et al. Characterization of human neural differentiation from pluripotent stem cells using proteomics/PTMomics-Current state-of-the-art and challenges. **Proteomics**, v. 15, n. 4, p 656 - 674, 2015.

MERTINS, P. et al. Integrated proteomic analysis of post-translational modifications by serial enrichment. **Nature methods**, v. 10, n. 7, p. 634–637, 2013.

MICHALSKI, A. et al. Mass Spectrometry-based Proteomics Using Q Exactive, a High-performance Benchtop Quadrupole Orbitrap Mass Spectrometer. **Molecular & cellular proteomics : MCP**, v. 10, n. 9, p. M111.011015, 2011.

MIZUTANI, K.; TAKAI, Y. Nectin spot : a novel type of nectin-mediated cell adhesion apparatus. **Biochemical Journal**, p. 2691–2715, 2016.

MUJEZINOVIC, N. et al. Cleaning of raw peptide MS/MS spectra: Improved protein identification following deconvolution of multiply charged peaks, isotope clusters, and removal of background noise. **Proteomics**, v. 6, n. 19, p. 5117–5131, 2006.

NAGAI, T. et al. Phosphoproteomics of the Dopamine Pathway Enables Discovery of Rap1 Activation as a Reward Signal In Vivo. **Neuron**, v. 89, n. 3, p. 550–565, 2016.

NAKASHIMA, S. Protein kinase Ca (PKCa): regulation and biological function. **Journal of biochemistry**, v. 132, n. 5, p. 669–675, 2002.

NAMBA, T. et al. Pioneering Axons Regulate Neuronal Polarization in the Developing Cerebral Cortex. **Neuron**, v. 81, n. 4, p. 814–829, 22 dez. 2014.

NAWROT, R.; BARYLSKI, J.; SCHULZE, W. X. Incorrectly annotated keratin derived peptide sequences lead to misleading MS/MS data interpretation. **Journal of Proteomics**, v. 91, p. 270–273, 2013.

NESVIZHSKII, A. I. Protein identification by tandem mass spectrometry and sequence database searching. **Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)**, v. 367, p. 87–119, 2007.

NEVILLE, D. C. et al. Evidence for phosphorylation of serine 753 in CFTR using a novel metal-ion affinity resin and matrix-assisted laser desorption mass spectrometry. **Protein Science : A Publication of the Protein Society**, v. 6, n. 11, p. 2436–2445, nov. 1997.

NOGUEIRA, F. C. S.; DOMONT, G. B. Survey of shotgun proteomics. **Methods in Molecular Biology**, v. 1156, p. 2–23, 2014.

O'CONNOR, C.; ADAMS, J. U. Essentials of Cell Biology. **Nature education**, p. 1–100, 2010.

OLSEN, J. V et al. Higher-energy C-trap dissociation for peptide modification analysis. **Nature methods**, v. 4, n. 9, p. 709–12, 2007.

OLSEN, J. V et al. A dual pressure linear ion trap Orbitrap instrument with very high sequencing speed. **Molecular & Cellular Proteomics : MCP**, v. 8, n. 12, p. 2759–2769, 2009.

OMENN, G. S. et al. Metrics for the human proteome project 2015: Progress on the human proteome and guidelines for high-confidence protein identification. **Journal of Proteome Research**, v. 14, n. 9, p. 3452–3460, 2015.

ONG, S. et al. Stable Isotope Labeling by Amino Acids in Cell Culture, SILAC, as a Simple and Accurate Approach to Expression Proteomics. **Molecular & Cellular Proteomics**, v. 1, n. 5, p. 376–386, 2002.

PACEY, L. et al. Neural Stem Cell Culture: Neurosphere generation, microscopical analysis and cryopreservation. **Protocol Exchange**, Published online. 25 ago. 2006.

PAMPALONI, F.; REYNAUD, E. G.; STELZER, E. H. K. The third dimension bridges the gap between cell culture and live tissue. **Nature reviews. Molecular cell biology**, v. 8, n. 10, p. 839–845, 2007.

PAULSEN, B. DA S. et al. Altered Oxygen Metabolism Associated to Neurogenesis of Induced Pluripotent Stem Cells Derived From a Schizophrenic Patient. **Cell Transplantation**, v. 21, p. 1547–1559, 2012.

PERKINS, D. N. et al. Probability-based protein identification by searching sequence databases using mass spectrometry data. **Electrophoresis**, v. 20, n. 18, p. 3551–67, 1999.

PICHLER, P. et al. Peptide labeling with isobaric tags yields higher identification rates using iTRAQ 4-plex compared to TMT 6-plex and iTRAQ 8-plex on LTQ orbitrap. **Analytical Chemistry,** v. 82, n. 15, p. 6549-6558, 2010.

PINHEIRO, P. S.; HOUY, S.; SORENSEN, J. B. C2-domain containing calcium sensors in neuroendocrine secretion. **Journal of Neurochemistry**, 2016.

PIVETTA, E. et al. Neutrophil elastase-dependent cleavage compromises the tumor suppressor role of EMILIN1. **Matrix Biology**, v. 34, p. 22–32, 2014.

QUADRATO, G.; BROWN, J.; ARLOTTA, P. The promises and challenges of human brain organoids as models of neuropsychiatric disease. **Nature medicine**, v. 22, n. 11, p. 1220–1228, 2016.

RAPPSILBER, J.; ISHIHAMA, Y.; MANN, M. Stop And Go Extraction tips for matrix-assisted laser desorption/ionization, nanoelectrospray, and LC/MS sample pretreatment in proteomics. **Analytical Chemistry**, v. 75, n. 3, p. 663–670, 2003.

REBMAN, J. K.; KIRCHOFF, K. E.; WALSH, G. S. Cadherin-2 is required cell autonomously for collective migration of facial branchiomotor neurons. **PLoS ONE**, v. 11, n. 10, 2016.

REN, X. et al. Quantitative Nuclear Proteomics Identifies that miR-137-mediated EZH2 Reduction Regulates Resveratrol-induced Apoptosis of Neuroblastoma Cells. **Molecular & Cellular Proteomics**, v. 14, n. 2, p. 316–328, 2015.

REYNOLDS, B. A; WEISS, S. Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system. **Science**, 1992.

RHINN, M.; DOLLE, P. Retinoic acid signalling during development. **Development**, v. 139, n. 5, p. 843–858, 2012.

RIBEIRO, A. et al. b1 -Integrin cytoskeletal signaling regulates sensory neuron response to matrix dimensionality. **Neuroscience**, v. 248, p. 67–78, 2013.

RIGATO, F. et al. Tenascin-C promotes neurite outgrowth of embryonic hippocampal neurons through the alternatively spliced fibronectin type III BD domains via activation of the cell adhesion molecule F3/contactin. **The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 22, n. 15, p. 6596–6609, 2002.

ROSS, P. L. et al. Multiplexed protein quantitation in Saccharomyces cerevisiae using amine-reactive isobaric tagging reagents. **Molecular & Cellular Proteomics**, v. 3, n. 12, p. 1154–1169, 2004.

ROSS, R. A.; SPENGLER, B. A. **Human neuroblastoma stem cellsSeminars in Cancer Biology**, 2007.

SAINI, R. K. R. et al. Proteomics of dedifferentiation of SK-N-BE2 neuroblastoma cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 454, n. 1, p. 202–209, 2014.

SAITO, N.; SHIRAI, Y. Protein kinase C gamma (PKC gamma): function of neuron specific isotype. **Journal of biochemistry**, v. 132, n. 5, p. 683–7, 2002.

SAMATOV, T. R.; WICKLEIN, D.; TONEVITSKY, A. G. **L1CAM: Cell adhesion and moreProgress in Histochemistry and Cytochemistry**, 2016.

SANTIAGO, C.; BASHAW, G. J. Transcription factors and effectors that regulate neuronal morphology. **Development**, v. 141, p. 4667–4680, 2014.

SCHMID, R. S.; ANTON, E. S. Role of integrins in the development of the cerebral cortex 2. **Cerebral Cortex**, v. 13, n. 1047–3211, p. 219–224, 2003.

SCHROEDER, M. J. et al. A neutral loss activation method for improved phosphopeptide sequence analysis by quadrupole ion trap mass spectrometry. **Analytical Chemistry**, v. 76, n. 13, p. 3590–3598, 2004.

SCHWARTZ, J. C.; SENKO, M. W.; SYKA, J. E. P. A two-dimensional quadrupole ion trap mass spectrometer. **Journal of the American Society for Mass Spectrometry**, v. 13, n. 6, p. 659–669, 2002.

SCIFO, E. et al. Drafting the CLN3 protein interactome in SH-SY5Y human neuroblastoma cells: A label-free quantitative proteomics approach. **Journal of Proteome Research**, v. 12, n. 5, p. 2101–2115, 2013.

SECOND, T. P. et al. Dual-pressure linear ion trap mass spectrometer improving the analysis of complex protein mixtures. **Analytical Chemistry**, v. 81, n. 18, p. 7757–7765, 2009.

SEVRIOUKOVA, I. F. Structure/function relations in AIFM1 variants associated with neurodegenerative disorders. **Journal of molecular biology**, p. 1–16, 2016.

SHACKA, J. J.; ROTH, K. A. Regulation of neuronal cell death and neurodegeneration by members of the Bcl-2 family: therapeutic implications. **Curr Drug Targets CNS Neurol Disord**, v. 4, n. 1, p. 25–39, 2005.

SHANNON, P. et al. Cytoscape: A software Environment for integrated models of biomolecular interaction networks. **Genome Research**, v. 13, n. 11, p. 2498–2504, 2003.

SHEN, Y. et al. Automated 20 kpsi RPLC-MS and MS/MS with chromatographic peak capacities of 1000-1500 and capabilities in proteomics and metabolomics. **Analytical Chemistry**, v. 77, n. 10, p. 3090–3100, 2005.

SHEVCHENKO, A. et al. Charting the proteomes of organisms with unsequenced genomes by MALDI-quadrupole time-of-flight mass spectrometry and BLAST homology searching. **Analytical Chemistry**, v. 73, n. 9, p. 1917–1926, 2001.

SHEVCHENKO, A.; VALCU, C. M.; JUNQUEIRA, M. **Tools for exploring the proteomosphereJournal of Proteomics**, 2009.

SINGH, J.; KAUR, G. Transcriptional regulation of polysialylated neural cell adhesion molecule expression by NMDA receptor activation in retinoic acid-differentiated SH-SY5Y neuroblastoma cultures. **Brain Research**, v. 1154, n. 1, p. 8–21, 2007.

SKÅLHEGG, B. S.; TASKÉN, K. Specificity in the cAMP/PKA signaling pathway. differential expression, regulation, and subcellular localization of subunits of PKA. **Frontiers in bioscience: a journal and virtual library**, v. 2, n. 13, p. d331–d342, 1997.

SOCHACKI, J. et al. Generation of iPS cell lines from schizophrenia patients using a non-integrative method. **Stem Cell Research**, v. 17, n. 1, p. 97–101, 2016a.

SOCHACKI, J. et al. Generation of urine iPS cell lines from patients with Attention Deficit Hyperactivity Disorder (ADHD) using a non-integrative method. **Stem Cell Research**, v. 17, n. 1, p. 102–106, 2016b.

SOCHACKI, J. et al. Generation of urine iPS cell line from a patient with obsessive-compulsive disorder using a non-integrative method. **Stem Cell Research**, v. 17, n. 1, p. 107–110, jul. 2016c.

SONG, S.; AUGUSTINE, G. J. Synapsin Isoforms and Synaptic Vesicle Trafficking. **Molecules and Cells**, v. 38, n. 11, p. 936–940, 2015.

STEEN, H.; MANN, M. The ABC's (and XYZ's) of peptide sequencing. **Nature reviews. Molecular cell biology**, v. 5, n. 9, p. 699–711, 2004.

STEFANIS, L. α-Synuclein in Parkinson's Disease. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, v. 2, n. 2, p. a009399, fev. 2012.

SÜDHOF, T. C. Neuroligins and neurexins link synaptic function to cognitive disease. **Nature**, v. 455, n. 7215, p. 903–11, 2008.

SUN, T. et al. Culture of skin cells in 3D rather than 2D improves their ability to survive exposure to cytotoxic agents. **Journal of Biotechnology**, v. 122, n. 3, p. 372–381, 2006.

SYKA, J. E. P. et al. Peptide and protein sequence analysis by electron transfer dissociation mass spectrometry. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 101, n. 26, p. 9528–33, 2004.

SZKLARCZYK, D. et al. STRING v10: Protein-protein interaction networks, integrated over the tree of life. **Nucleic Acids Research**, v. 43, n. D1, p. D447–D452, 2015.

TANAKA, K. et al. Protein and polymer analyses up to m/z 100,000 by laser ionization time-of-flight mass spectrometry. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 2, n. 8, p. 151–153, 1988.

TANAKA, K. et al. Role of down-regulated neutral ceramidase during all-trans retinoic acid-induced neuronal differentiation in SH-SY5Y neuroblastoma cells. **Journal of Biochemistry**, v. 151, n. 6, p. 611–620, 2012.

TANG, Z. et al. MTor is a signaling hub in cell survival: A mass-spectrometry-based proteomics investigation. **Journal of Proteome Research**, v. 13, n. 5, p. 2433–2444, 2014.

TCHETCHELNITSKI, V. et al. Developmental co-expression and functional redundancy of tyrosine phosphatases with neurotrophin receptors in developing sensory neurons. **International Journal of Developmental Neuroscience**, v. 34, p. 48–59, 2014.

THINGHOLM, T. E. et al. SIMAC (sequential elution from IMAC), a phosphoproteomics strategy for the rapid separation of monophosphorylated from multiply phosphorylated peptides. **Molecular & cellular proteomics: MCP**, v. 7, n. 4, p. 661–671, 2008.

THINGHOLM, T. E.; JENSEN, O. N.; LARSEN, M. R. Analytical strategies for phosphoproteomics. **Proteomics**, 2009.

TINOCO, L. W. et al. Structural characterization of a neuroblast-specific phosphorylated region of MARCKS. **Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics**, v. 1844, n. 4, p. 837–849, 2014.

TORRADO, E. F. et al. Directing mouse embryonic neurosphere differentiation toward an enriched neuronal population. **International Journal of Developmental Neuroscience**, v. 37, p. 94–99, 2014.

TYANOVA, S. et al. The Perseus computational platform for comprehensive analysis of (prote)omics data. **Nature methods**, v. 13, n. 9, p. 731–40, 2016.

VALENTINER, U. et al. Expression of the neural cell adhesion molecule and polysialic acid in human neuroblastoma cell lines. **International Journal of Oncology**, v. 39, n. 2, p. 417–424, 2011.

VASSILATIS, D. K. et al. The G protein-coupled receptor repertoires of human and mouse. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 100, n. 8, p. 4903–4908, 2003.

WANG, K.; WONG, Y. H. **G Protein signaling controls the differentiation of multiple cell lineagesBioFactors**, 2009.

WANG, Y. et al. Reversed-phase chromatography with multiple fraction concatenation strategy for proteome profiling of human MCF10A cells. **Proteomics**, v. 11, n. 10, p. 2019–2026, 2011.

WEI, Z. Z. et al. Regulatory role of the JNK-STAT1/3 signaling in neuronal differentiation of cultured mouse embryonic stem cells. **Cellular and Molecular Neurobiology**, v. 34, n. 6, p. 881–893, 2014.

WICHTERLE, H. et al. Directed differentiation of embryonic stem cells into motor neurons. **Cell**, v. 110, n. 3, p. 385–397, 2002.

WILKINS, M. R. et al. From proteins to proteomes: large scale protein identification by two-dimensional electrophoresis and amino acid analysis. **Bio/technology (Nature Publishing Company)**, v. 14, n. 1, p. 61–5, 1996.

WOLFRAM, T.; SPATZ, J. P.; BURGESS, R. W. Cell adhesion to agrin presented as a nanopatterned substrate is consistent with an interaction with the extracellular matrix and not transmembrane adhesion molecules. **BMC cell biology**, v. 9, p. 64, 2008.

WOLTERS, D. A.; WASHBURN, M. P.; YATES, J. R. An automated multidimensional protein identification technology for shotgun proteomics. **Analytical Chemistry**, v. 73, n. 23, p. 5683–5690, 2001.

WONG, J. W. H.; CAGNEY, G. An Overview of Label-Free Quantitation Methods in Proteomics by Mass Spectrometry BT - Proteome Bioinformatics. In: HUBBARD, S. J.; JONES, A. R. (Eds.). Totowa, NJ: Humana Press, 2010. p. 273–283.

WOO, J.; KWON, S. K.; KIM, E. The NGL family of leucine-rich repeat-containing synaptic adhesion molecules. **Molecular and Cellular Neuroscience**, 2009.

WU, X.; REDDY, D. S. Integrins as Receptor Targets for Neurological Disorders. **Pharmacology & therapeutics**, v. 134, n. 1, p. 68–81, 30 abr. 2012.

XIE, H.; BANDHAKAVI, S.; GRIFFIN, T. J. Evaluating preparative isoelectric focusing of complex peptide mixtures for tandem mass spectrometry-based proteomics: A case study in profiling chromatin-enriched subcellular fractions in Saccharomyces cerevisiae. **Analytical Chemistry**, v. 77, n. 10, p. 3198–3207, 2005.

XU, T. et al. ProLuCID, a fast and sensitive tandem mass spectra-based protein identification program. **Molecular Cellular Proteomics**, v. 5, p. S174, 2006.

YATES, J. R. Mass spectrometry and the age of the proteome. **Journal of Mass Spectrometry**, 1998.

YATES, J. R.; RUSE, C. I.; NAKORCHEVSKY, A. Proteomics by mass spectrometry: approaches, advances, and applications. **Annual review of biomedical engineering**, v. 11, p. 49–79, 2009.

YUSUF, M. et al. Comprehensive cytogenomic profile of the in vitro neuronal model SH-SY5Y.

Neurogenetics, v. 14, n. 1, p. 63–70, 2013.

ZHANG, X. et al. Highly Efficient Phosphopeptide Enrichment by Calcium Phosphate Precipitation Combined with Subsequent IMAC Enrichment. **Molecular & Cellular Proteomics**, v. 6, n. 11, p. 2032–2042, 2007.

ZHANG, Y. et al. Protein analysis by shotgun/bottom-up proteomics. **Chemical Reviews**, v. 113, n. 4, p. 2343–2394, 2013.

ZHENG, M.; LEUNG, C. L.; LIEM, R. K. H. Region-specific expression of cyclin-dependent kinase 5 (cdk5) and its activators, p35 and p39, in the developing and adult rat central nervous system. **Journal of Neurobiology**, v. 35, n. 2, p. 141–159, 1998.

ZHOU, H. et al. Highly specific enrichment of phosphopeptides by zirconium dioxide nanoparticles for phosphoproteome analysis. **Electrophoresis**, v. 28, n. 13, p. 2201–2215, 2007.

ZONG, Y.; JIN, R. Structural mechanisms of the agrin-LRP4-MuSK signaling pathway in neuromuscular junction differentiation. **Cellular and Molecular Life Sciences**, 2013.

ZUBAREV, R.; KELLEHER, N. L.; MCLAFFERTY, F. W. Electron capture dissociation of multiply charged protein cations. **Journal of Americam Chemical Society**, v. 120, n. 16, p. 3265–3266, 1998.

APÊNDICE

Apêndice 1: Proteínas com coeficiente de variação (CV) maior a 20% em replicatas biológicas e maior a 10% em replicatas técnicas. As proteínas em cinza no final da tabela correspondem a aquelas com CV>20% somente entre replicatas biológicas, as 76 restantes apresentaram CV tanto nas replicatas técnicas quanto as biológicas.

Código Uniprot	**Descrição**
P07437	Tubulin beta chain
P62805	Histone H4
Q01995	Transgelin
P60174	Triosephosphate isomerase
E5RGW4	Nucleophosmin (Fragment)
P04792	Heat shock protein beta-1
Q5TEC6	Histone H3
H0Y3Z3	Protein disulfide-isomerase (Fragment)
P84243	Histone H3.3
O00151	PDZ and LIM domain protein 1
P00505	Aspartate aminotransferase, mitochondrial
P56385	ATP synthase subunit e, mitochondrial
Q13162	Peroxiredoxin-4
Q969H8	Myeloid-derived growth factor
P62879	Guanine nucleotide-binding protein G(I)/G(S)/G(T) subunit beta-2
P04264	Keratin, type II cytoskeletal 1
O75915	PRA1 family protein 3
P31949	Protein S100-A11
A6NHL2	Tubulin alpha chain-like 3
P51571	Translocon-associated protein subunit delta
P61960	Ubiquitin-fold modifier 1
P62256	Ubiquitin-conjugating enzyme E2 H
J3KQ48	Peptidyl-tRNA hydrolase 2, mitochondrial
P17661	Desmin
Q00325	Phosphate carrier protein, mitochondrial
Q15056	Eukaryotic translation initiation factor 4H
Q14315	Filamin-C OS=Homo sapiens
P54105	Methylosome subunit pICln
P02511	Alpha-crystallin B chain
Q86UP2	Kinectin OS=Homo sapiens GN=KTN1 PE=1 SV=1
Q14108	Lysosome membrane protein 2
H0Y886	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 beta subcomplex subunit 5, mitochondrial (Fragment)
Q86SX6	Glutaredoxin-related protein 5, mitochondrial
Q9UNW9	RNA-binding protein Nova-2
P13645	Keratin, type I cytoskeletal 10
P54578	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 14
P21980	Protein-glutamine gamma-glutamyltransferase 2
P53367	Arfaptin-1
P35527	Keratin, type I cytoskeletal 9
P50416	Carnitine O-palmitoyltransferase 1, liver isoform
M0R0E1	Zinc finger protein 799
O95292	Vesicle-associated membrane protein-associated protein B/C
Q99496	E3 ubiquitin-protein ligase RING2
F8VYN9	ADP-ribosylation factor-like protein 1
O95757	Heat shock 70 kDa protein 4L
Q9NRL3	Striatin-4
E9PAV3	Nascent polypeptide-associated complex subunit alpha, muscle-specific form
Q9C0B1	Alpha-ketoglutarate-dependent dioxygenase FTO
P35908	Keratin, type II cytoskeletal 2 epidermal
P04438	Ig heavy chain V-II region SESS
O15116	U6 snRNA-associated Sm-like protein LSm1
P32321	Deoxycytidylate deaminase

P02768	Serum albumin
O76062	Delta(14)-sterol reductase
Q96MC2	Dynein regulatory complex protein 1
Q9H477	Ribokinase
Q9BXA6	Testis-specific serine/threonine-protein kinase 6
Q9UFN0	Protein NipSnap homolog 3A
A0A075B6F9	Nitric oxide synthase-interacting protein
O95340	Bifunctional 3'-phosphoadenosine 5'-phosphosulfate synthase 2
G5EA09	Syndecan binding protein (Syntenin), isoform CRA_a
Q15599	Na(+)/H(+) exchange regulatory cofactor NHE-RF2
M0QXF9	Branched-chain-amino-acid aminotransferase
Q96N66	Lysophospholipid acyltransferase 7
P13521	Secretogranin-2
Q6PJT7	Zinc finger CCCH domain-containing protein 14
P49441	Inositol polyphosphate 1-phosphatase
P51688	N-sulphoglucosamine sulphohydrolase
Q9BSQ5	Cerebral cavernous malformations 2 protein
Q9Y5B0	RNA polymerase II subunit A C-terminal domain phosphatase
Q9BVI4	Nucleolar complex protein 4 homolog
Q5JRX3	Presequence protease, mitochondrial
Q49MI3	Ceramide kinase-like protein
Q13367	AP-3 complex subunit beta-2
H0Y860	Stromal interaction molecule 2
Q06033	Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H3
P40763	Signal transducer and activator of transcription 3
O60292	Signal-induced proliferation-associated 1-like protein 3
P53355	Death-associated protein kinase 1
Q92547	DNA topoisomerase 2-binding protein 1
A0A0G2JPP5	Protein scribble homolog
I3L2J0	Protein capicua homolog
A0A075B6G3	Dystrophin

Apêndice 2: Lista de proteínas que aumentaram sua abundância em células SH-SY5Y diferenciadas a partir dos dados do proteoma total e do fosfoproteoma.

Código Uniprot	**Gene**	**Descrição**	**Fold Change**	***p* Valor**	**Fold Change Aminoácido fosforilado**
Q16555	DPYSL2	Dihydropyrimidinase-related protein 2	1,50	5,57421E-06	Ser522(1,51)
Q99081	TCF12	Transcription factor 12	1,50	0,001648372	Ser558(1,50)
J3KTA1	FBXL20	F-box and leucine-rich repeat protein 20, isoform CRA_a	1,50	0,024872931	Thr419(1,50)
Q8NFW8	CMAS	N-acylneuraminate cytidylyltransferase	1,50	2,00905E-07	
Q9Y2X3	NOP58	Nucleolar protein 58	1,51	0,007307685	Ser502(1,50)
P45880	VDAC2	Voltage-dependent anion-selective channel protein 2	1,51	0,000241601	
Q8N163	CCAR2	Cell cycle and apoptosis regulator protein 2	1,51	5,35738E-08	
Q15637	SF1	Splicing factor 1	1,51	0,000100845	
P11117	ACP2	Lysosomal acid phosphatase	1,51	9,5186E-06	
Q07065	CKAP4	Cytoskeleton-associated protein 4	1,51	0,000195741	
Q9NUJ1	ABHD10	Mycophenolic acid acyl-glucuronide esterase, mitochondrial	1,51	9,35607E-05	
Q03252	LMNB2	Lamin-B2	1,51	2,79216E-08	
Q14690	PDCD11	Protein RRP5 homolog	1,51	1,81551E-07	
B4DLN1	N/A	Uncharacterized protein	1,51	3,36834E-05	
P61604	HSPE1	10 kDa heat shock protein, mitochondrial	1,51	1,40192E-06	
P24821	TNC	Tenascin	1,52	0,001624629	
Q8WTQ4	C16orf78	Uncharacterized protein C16orf78	1,52	0,040623854	
P35658	NUP214	Nuclear pore complex protein Nup214	1,52	0,000920107	
Q9GZY8	MFF	Mitochondrial fission factor	1,52	0,007212435	Ser96(1,52)
Q6NVY1	HIBCH	3-hydroxyisobutyryl-CoA hydrolase, mitochondrial	1,53	8,87214E-05	
Q14194	CRMP1	Dihydropyrimidinase-related protein 1	1,53	3,28833E-05	
Q9UMS6	SYNPO2	Synaptopodin-2	1,53	4,47838E-06	
P21796	VDAC1	Voltage-dependent anion-selective channel protein 1	1,53	4,32141E-05	Ser104(1,55)
P06576	ATP5B	ATP synthase subunit beta, mitochondrial	1,53	1,26005E-05	
Q13232	NME3	Nucleoside diphosphate kinase 3	1,53	0,001112809	
E7ETB3	DNPEP	Aspartyl aminopeptidase	1,54	7,20287E-06	
Q9P265	DIP2B	Disco-interacting protein 2 homolog B	1,54	8,09222E-07	Tyr1145(2,12)
P35475	IDUA	Alpha-L-iduronidase	1,54	0,047404207	
A6NFI3	ZNF316	Zinc finger protein 316	1,54	9,41599E-05	Ser112(1,54)
Q8NCW5	APOA1BP	NAD(P)H-hydrate epimerase	1,54	0,005773206	
P25705	ATP5A1	ATP synthase subunit alpha, mitochondrial	1,54	0,000214872	
Q9UHG3	PCYOX1	Prenylcysteine oxidase 1	1,54	0,00164278	
P30084	ECHS1	Enoyl-CoA hydratase, mitochondrial	1,54	0,000207341	
P0C0S5	H2AFZ	Histone H2A.Z	1,54	1,37355E-05	
Q9Y5J7	TIMM9	Mitochondrial import inner membrane translocase subunit Tim9	1,54	7,14093E-05	
P04054	PLA2G1B	Phospholipase A2	1,54	0,01104599	
P05141	SLC25A5	ADP/ATP translocase 2	1,54	0,000152229	
P40926	MDH2	Malate dehydrogenase, mitochondrial	1,55	8,06771E-05	
O15230	LAMA5	Laminin subunit alpha-5	1,55	0,000166146	
O15085	ARHGEF11	Rho guanine nucleotide exchange factor 11	1,55	7,25506E-05	
Q92945	KHSRP	Far upstream element-binding protein 2	1,55	8,33685E-06	
P49748	ACADVL	Very long-chain specific acyl-CoA dehydrogenase, mitochondrial	1,55	3,1013E-07	
P61769	B2M	Beta-2-microglobulin	1,55	0,000133379	
Q5SW79	CEP170	Centrosomal protein of 170 kDa	1,55	4,55602E-06	Ser1160(1,53)
Q02952	AKAP12	A-kinase anchor protein 12	1,55	4,23487E-06	Ser1331(1,60)
P27338	MAOB	Amine oxidase [flavin-containing] B	1,55	3,53388E-05	
P09622	DLD	Dihydrolipoyl dehydrogenase, mitochondrial	1,56	2,42759E-05	
P54289	CACNA2D1	Voltage-dependent calcium channel subunit alpha-2/delta-1	1,56	4,7641E-06	
P10636	MAPT	Microtubule-associated protein	1,56	0,002315393	Thr720(1,56); Ser721(1,56)
P04062	GBA	Glucosylceramidase	1,56	4,13058E-05	
Q8WW12	PCNP	PEST proteolytic signal-containing nuclear protein	1,56	0,001203987	Ser147(1,56)
Q8NDW8	TTC21A	Tetratricopeptide repeat protein 21A	1,56	9,05728E-05	Ser100(1,56)
Q9C0C2	TNKS1BP1	182 kDa tankyrase-1-binding protein	1,56	0,000395373	Ser672(1,56)
O75781	PALM	Paralemmin-1	1,56	0,000544005	Ser116(1,54); Ser124(1,51); Ser162(1,60)
Q8N3V7	SYNPO	Synaptopodin	1,56	2,37381E-07	
Q9UHN1	POLG2	DNA polymerase subunit gamma-2, mitochondrial	1,56	0,035615591	
P27816	MAP4	Microtubule-associated protein	1,56	0,004457609	Ser297(1,56); Ser2073(1,72)
Q9NRW1	RAB6B	Ras-related protein Rab-6B	1,56	0,000131668	
Q9NP80	PNPLA8	Calcium-independent phospholipase A2-gamma	1,57	0,007885372	
Q9BTV4	TMEM43	Transmembrane protein 43	1,57	0,000507757	
Q13825	AUH	Methylglutaconyl-CoA hydratase, mitochondrial	1,57	1,91825E-05	
Q96FJ2	DYNLL2	Dynein light chain 2, cytoplasmic	1,57	0,000348547	
P36542	ATP5C1	ATP synthase subunit gamma, mitochondrial	1,57	2,07023E-05	
P07949	RET	Proto-oncogene tyrosine-protein kinase receptor Ret	1,57	0,001242089	Ser696(1,57)
P23786	CPT2	Carnitine O-palmitoyltransferase 2, mitochondrial	1,57	0,000114563	
P51991	HNRNPA3	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A3	1,57	5,8158E-08	
Q96JM3	CHAMP1	Chromosome alignment-maintaining phosphoprotein 1	1,57	2,7869E-06	Ser204(1,56)

Q9Y2W1	THRAP3	Thyroid hormone receptor-associated protein 3	1,57	2,11834E-05	Ser55(1,52); Ser248(1,58)
P00441	SOD1	Superoxide dismutase [Cu-Zn]	1,57	4,72199E-06	
Q8IXQ5	KLHL7	Kelch-like protein 7	1,58	0,009594039	
O75369	FLNB	Filamin-B	1,58	7,00461E-06	Ser856(2,50)
Q8WWM7	ATXN2L	Ataxin-2-like protein	1,58	9,29775E-06	Ser558(1,60)
Q9UKV3	ACIN1	Apoptotic chromatin condensation inducer in the nucleus	1,58	1,53585E-06	Ser1004(1,57)
P07602	PSAP	Prosaposin	1,58	0,000877669	
Q9BY67	CADM1	Cell adhesion molecule 1	1,59	2,47704E-05	
P02679	FGG	Fibrinogen gamma chain	1,59	0,011283715	
P35611	ADD1	Alpha-adducin	1,59	1,80032E-06	Ser358(1,60); Ser465(2,23)
P07686	HEXB	Beta-hexosaminidase subunit beta	1,59	7,05321E-07	
Q9UEY8	ADD3	Gamma-adducin	1,59	1,925E-07	
P15289	ARSA	Arylsulfatase A	1,59	1,71589E-05	
Q8TAE8	GADD45GIP1	Growth arrest and DNA damage-inducible proteins-interacting protein 1	1,59	0,001754591	
Q9P0M6	H2AFY2	Core histone macro-H2A.2	1,60	1,7749E-05	
P31937	HIBADH	3-hydroxyisobutyrate dehydrogenase, mitochondrial	1,60	2,90881E-08	
P63167	DYNLL1	Dynein light chain 1, cytoplasmic	1,60	9,99146E-07	
Q6JBY9	RCSD1	CapZ-interacting protein	1,60	0,034359997	Ser82(2,18); Ser83(2,18)
Q9NQC3	RTN4	Reticulon-4	1,60	7,11598E-08	
Q8N3C7	CLIP4	CAP-Gly domain-containing linker protein 4	1,61	0,0041352	Ser581(1,60)
P09455	RBP1	Retinol binding protein 1, cellular	1,61	1,50596E-08	
Q9Y3E1	HDGFRP3	Hepatoma-derived growth factor, related protein 3, isoform CRA_a	1,61	1,99793E-06	
P19320	VCAM1	Vascular cell adhesion protein 1	1,61	1,78008E-05	
O75874	IDH1	Isocitrate dehydrogenase [NADP] cytoplasmic	1,61	5,04244E-07	
Q13423	NNT	NAD(P) transhydrogenase, mitochondrial	1,61	0,00037169	
Q5JWF2	GNAS	Guanine nucleotide-binding protein G(s) subunit alpha isoforms XLas	1,61	0,000281481	Ser995(1,61)
P07197	NEFM	Neurofilament medium polypeptide	1,61	3,01475E-06	Ser837(1,75)
P55084	HADHB	Trifunctional enzyme subunit beta, mitochondrial	1,61	0,000783123	
P07196	NEFL	Neurofilament light polypeptide	1,62	1,74465E-07	
P05556	ITGB1	Integrin beta-1	1,62	4,25939E-07	Tyr195(1,51)
P36957	DLST	Dihydrolipoyllysine-residue succinyltransferase	1,62	5,71585E-06	
P43490	NAMPT	Nicotinamide phosphoribosyltransferase	1,62	1,59577E-06	
Q8IZJ1	UNC5B	Netrin receptor UNC5B	1,63	0,02072385	Ser528(1,62)
P49792	RANBP2	E3 SUMO-protein ligase RanBP2	1,63	5,97981E-05	Ser1456(1,60)
P10415	BCL2	Apoptosis regulator Bcl-2	1,63	0,000655119	
H3BNQ7	ABAT	4-aminobutyrate aminotransferase, mitochondrial	1,63	9,39566E-05	
Q2M2I8	AAK1	AP2-associated protein kinase 1	1,63	2,40291E-05	Thr653(1,51)
P46821	MAP1B	Microtubule-associated protein 1B	1,64	1,04363E-06	Ser1154(1,68); Ser1265(1,54); Ser1396(1,73)
Q8ND76	CCNY	Cyclin-Y	1,64	2,04131E-05	Ser326(1,63)
Q99541	PLIN2	Perilipin-2	1,64	1,9581E-06	
Q96A57	TMEM230	Transmembrane protein 230	1,64	0,008841218	
P17096	HMGA1	High mobility group protein HMG-I/HMG-Y	1,64	0,000212632	
P49257	LMAN1	Protein ERGIC-53	1,64	9,36076E-05	
Q09666	AHNAK	Neuroblast differentiation-associated protein AHNAK	1,65	0,001257639	Ser4850(1,50)
Q92542	NCSTN	Nicastrin	1,65	2,3409E-05	
Q6UW68	TMEM205	Transmembrane protein 205	1,65	0,000870098	
P10809	HSPD1	60 kDa heat shock protein, mitochondrial	1,66	2,04159E-05	
Q14103	HNRNPD	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein D0	1,66	0,000258131	
P00505	GOT2	Aspartate aminotransferase, mitochondrial	1,66	9,58515E-06	
O15394	NCAM2	Neural cell adhesion molecule 2	1,66	0,001183502	
Q99623	PHB2	Prohibitin-2	1,67	2,7195E-07	
Q14247	CTTN	Src substrate cortactin	1,67	0,000793213	Thr411(1,85)
P23284	PPIB	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase B	1,67	6,28454E-11	
Q9UN36	NDRG2	Protein NDRG2	1,67	9,86501E-05	Ser332(1,67)
P22694	PRKACB	cAMP-dependent protein kinase catalytic subunit beta	1,68	0,000255543	Ser345(1,68)
Q13098	GPS1	COP9 signalosome complex subunit 1	1,69	0,00101784	Ser509(1,68)
Q5TEC6	HIST2H3PS2	Histone H3	1,69	0,000185323	
P51649	ALDH5A1	Succinate-semialdehyde dehydrogenase, mitochondrial	1,69	5,26121E-05	
Q5HYI7	MTX3	Metaxin-3	1,69	5,65737E-05	Ser311(1,69)
P35555	FBN1	Fibrillin-1	1,69	0,00837667	
Q4G0I0	CCSMST1	Protein CCSMST1	1,70	0,047193305	
Q9Y6C2	EMILIN1	EMILIN-1	1,70	0,000491062	
Q9UQ80	PA2G4	Proliferation-associated protein 2G4	1,70	0,017588936	Ser363(1,70)
Q8WX93	PALLD	Palladin	1,71	0,001050857	Ser893(1,72)
P00750	PLAT	Tissue-type plasminogen activator	1,71	0,017026519	
Q9UDT6	CLIP2	CAP-Gly domain-containing linker protein 2	1,72	0,000681186	Ser207(1,71)
Q12888	TP53BP1	Tumor suppressor p53-binding protein 1	1,72	2,44747E-09	Ser500(1,53)
O75396	SEC22B	Vesicle-trafficking protein SEC22b	1,72	0,000132948	Ser137(1,72)
P09104	ENO2	Gamma-enolase	1,73	3,97594E-05	
Q9Y277	VDAC3	Voltage-dependent anion-selective channel protein 3	1,73	0,002123547	
P11137	MAP2	Microtubule-associated protein 2	1,73	1,49618E-07	Ser833(2,22); Thr1154(1,52); Ser1782(1,54); Ser1790(1,79)

P60468	SEC61B	Protein transport protein Sec61 subunit beta	1,74	0,017566804	Ser29(1,73)
O95831	AIFM1	Apoptosis-inducing factor 1, mitochondrial	1,74	0,000351904	Ser260(1,74)
P42765	ACAA2	3-ketoacyl-CoA thiolase, mitochondrial	1,74	7,3483E-06	
P54826	GAS1	Growth arrest-specific protein 1	1,75	0,006373487	
P07910	HNRNPC	Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins C1/C2	1,76	0,000145248	
P49207	RPL34	60S ribosomal protein L34	1,76	6,98191E-05	Ser12(1,76)
Q8TB36	GDAP1	Ganglioside-induced differentiation-associated protein 1	1,76	0,002407838	Ser11(1,76)
O75955	FLOT1	Flotillin-1	1,77	1,18335E-07	
P07339	CTSD	Cathepsin D	1,77	2,48879E-08	
Q13609	DNASE1L3	Deoxyribonuclease gamma	1,78	0,031469074	
P13591	NCAM1	Neural cell adhesion molecule 1	1,78	7,49881E-05	
Q14195	DPYSL3	Dihydropyrimidinase-related protein 3	1,79	7,91938E-06	Ser522(2,00)
O75911	DHRS3	Short-chain dehydrogenase/reductase 3	1,79	0,000786528	
O60716	CTNND1	Catenin delta-1	1,80	0,000604879	Ser857(1,77)
Q9P219	CCDC88C	Protein Daple	1,80	0,006549541	
O00443	PIK3C2A	Phosphatidylinositol 4-phosphate 3-kinase C2 domain-containing subunit alpha	1,81	0,000215169	Ser259(1,81)
Q14254	FLOT2	Flotillin-2	1,81	3,15738E-07	
P17980	PSMC3	26S protease regulatory subunit 6A	1,82	9,30308E-08	
P51970	NDUFA8	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 8	1,82	0,000743969	
Q92626	PXDN	Peroxidasin homolog	1,83	5,24415E-08	
P84243	H3F3B	Histone H3.3	1,85	0,002649703	
Q9Y639	NPTN	Neuroplastin	1,86	1,49277E-06	
P24539	ATP5F1	ATP synthase F(0) complex subunit B1, mitochondrial	1,89	6,21295E-05	
Q92890	UFD1L	Ubiquitin fusion degradation protein 1 homolog	1,90	0,000708458	Ser299(1,90)
P30048	PRDX3	Thioredoxin-dependent peroxide reductase, mitochondrial	1,93	1,73113E-06	
G3V3D1	NPC2	Epididymal secretory protein E1	1,95	3,25382E-06	
P62829	RPL23	60S ribosomal protein L23	1,98	0,010123445	Ser41(1,97)
P17152	TMEM11	Transmembrane protein 11, mitochondrial	2,00	0,000882733	Ser17(2,00)
P11047	LAMC1	Laminin subunit gamma-1	2,01	9,10448E-05	
C9JIZ6	PSAP	Prosaposin	2,01	1,42797E-06	
Q13011	ECH1	Delta(3,5)-Delta(2,4)-dienoyl-CoA isomerase, mitochondrial	2,02	1,45873E-05	
P08559	PDHA1	Pyruvate dehydrogenase E1 component subunit alpha, somatic form, mitochondrial	2,05	7,7566E-05	Ser293(2,05)
E1CKY7	M20	Protein phosphatase 1 regulatory subunit 12B	2,10	0,000113201	Ser21(2,1)
Q13510	ASAH1	Acid ceramidase	2,11	3,92467E-06	
P07858	CTSB	Cathepsin B	2,11	2,00908E-07	
P05412	JUN	Transcription factor AP-1	2,11	0,02895208	Ser63(2,11)
P15586	GNS	N-acetylglucosamine-6-sulfatase	2,13	4,60876E-06	
Q9H477	RBKS	Ribokinase	2,17	0,000524407	
O00468	AGRN	Agrin	2,18	0,026449827	
P16104	H2AFX	Histone H2AX	2,21	0,000102997	Ser140(1,56)
P56199	ITGA1	Integrin alpha-1	2,25	2,63944E-08	
P23634	ATP2B4	Plasma membrane calcium-transporting ATPase 4	2,25	0,008387284	
P28845	HSD11B1	Corticosteroid 11-beta-dehydrogenase isozyme 1	2,25	0,006125533	
Q8N111	CEND1	Cell cycle exit and neuronal differentiation protein 1	2,29	4,27927E-05	
Q14699	RFTN1	Raftlin	2,31	1,04515E-05	
P16870	CPE	Carboxypeptidase E	2,33	0,016856264	
P62805	HIST1H4A	Histone H4	2,37	0,000607254	
P02765	AHSG	Alpha-2-HS-glycoprotein	2,42	0,011307935	Ser138(1,54)
P20671	HIST1H2AD	Histone H2A type 1-D	2,43	9,92515E-05	
P80723	BASP1	Brain acid soluble protein 1	2,45	6,17593E-07	
Q8WYN3	CSRNP3	Cysteine/serine-rich nuclear protein 3	2,45	0,008665703	
O95772	STARD3NL	MLN64 N-terminal domain homolog	2,54	6,44427E-06	Ser39(2,59)
Q9H1E3	NUCKS1	Nuclear ubiquitous casein and cyclin-dependent kinase substrate 1	2,59	9,97921E-08	
Q96TC7	RMDN3	Regulator of microtubule dynamics protein 3	2,59	0,001748819	Ser46(2,59)
Q86VY4	TSPYL5	Testis-specific Y-encoded-like protein 5	2,62	5,43992E-07	Tyr297(3,49); Tyr303(3,49)
P35232	PHB	Prohibitin	2,63	2,05992E-07	
P49006	MARCKSL1	MARCKS-related protein	2,72	6,82187E-11	Thr148(2,93)
P28799	GRN	Granulins	2,73	3,10547E-06	
E5RIU9	CHMP7	Charged multivesicular body protein 7	2,76	0,001312401	
O75096	LRP4	Low-density lipoprotein receptor-related protein 4	2,93	0,000696725	
P08670	VIM	Vimentin	3,01	1,33144E-07	Ser430(2,46)
P02461	COL3A1	Collagen alpha-1(III) chain	3,04	6,82249E-08	
P29373	CRABP2	Cellular retinoic acid-binding protein 2	3,17	3,29183E-06	
Q92597	NDRG1	Protein NDRG1	3,46	2,95214E-05	Ser330(3,46)
P62263	RPS14	40S ribosomal protein S14	3,67	4,57329E-05	Thr140(1,87)
P04179	SOD2	Superoxide dismutase	4,25	1,13756E-08	
P21980	TGM2	Protein-glutamine gamma-glutamyltransferase 2	4,26	2,4179E-07	
O95302	FKBP9	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase FKBP9	4,42	0,037799646	
P10909	CLU	Clusterin	4,49	1,36561E-07	

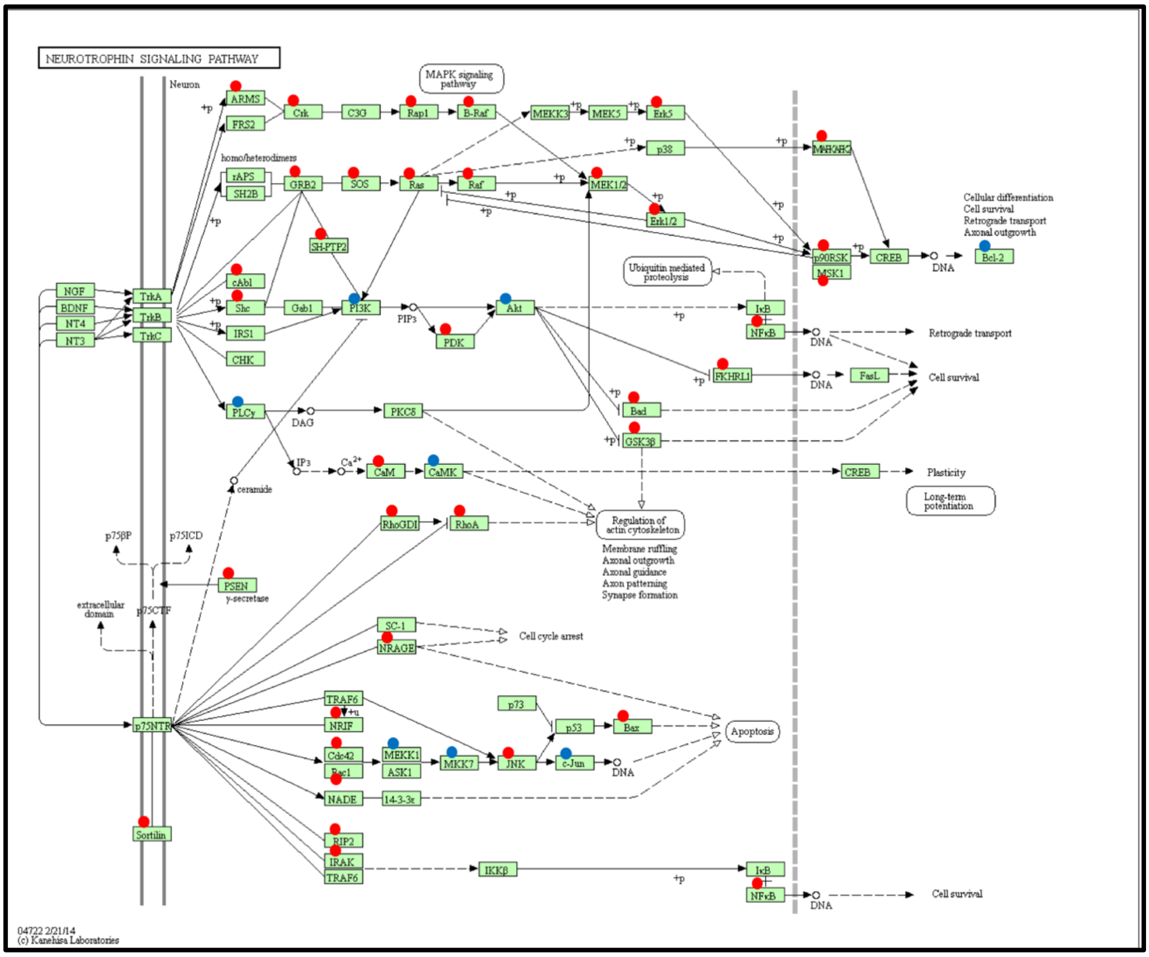
Apêndice 3: Lista de proteínas que diminuíram sua abundância em células SH-SY5Y diferenciadas a partir dos dados do proteoma total e do fosfoproteoma.

Código Uniprot	**Gene**	**Descrição**	**Fold Change**	***p* Valor**	**Fold Change aminoácido fosforilado**
Q9Y4P1	ATG4B	Cysteine protease ATG4B	0,02	0,020893985	Ser383(0,02)
O00629	KPNA4	Importin subunit alpha-3	0,05	0,010165846	
Q96QR8	PURB	Transcriptional activator protein Pur-beta	0,10	0,039445206	Ser100/101(0,10)
Q2VIQ3	KIF4B	Chromosome-associated kinesin KIF4B	0,11	0,015989828	
Q9P2P5	HECW2	E3 ubiquitin-protein ligase HECW2	0,17	0,019609322	Ser48(0,17)
Q13330	MTA1	Metastasis-associated protein MTA1	0,26	0,000196187	Ser576(0,26)
Q9UPN4	CEP131	Centrosomal protein of 131 kDa	0,28	1,23588E-05	Ser47(0,31)
P49916	LIG3	DNA ligase 3	0,29	0,002171404	Ser210(0,29)
Q16637	SMN1	Survival motor neuron protein	0,30	0,035832199	Ser28(0,53); Ser31(0,53)
P24941	CDK2	Cyclin-dependent kinase 2	0,31	0,000564324	Thr14(0,31); Tyr15(0,31)
P13645	KRT10	Keratin, type I cytoskeletal 10	0,32	0,010859787	
H0YH80	HNRNPA1	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1	0,32	0,019942784	
Q5QJE6	DNTTIP2	Deoxynucleotidyltransferase terminal-interacting protein 2	0,34	0,014649213	Ser117(0,35)
Q9NQS7	INCENP	Inner centromere protein	0,36	0,000343325	Ser263(0,36)
O00418	EEF2K	Eukaryotic elongation factor 2 kinase	0,36	0,000585158	Ser18(0,36)
Q9BW19	KIFC1	Kinesin-like protein KIFC1	0,36	1,29933E-06	
P18858	LIG1	DNA ligase 1	0,37	0,002301809	Ser76(0,37)
Q15911	ZFHX3	Zinc finger homeobox protein 3	0,38	0,010258497	Ser1201(0,38)
Q15554	TERF2	Telomeric repeat-binding factor 2	0,39	0,00386794	Ser365(0,39)
Q8WWK9	CKAP2	Cytoskeleton-associated protein 2	0,40	0,001460052	
P46379	BAG6	Large proline-rich protein BAG6	0,42	2,90681E-06	Ser113(0,42)
P48681	NES	Nestin	0,42	3,89358E-06	Ser471(0,56)
E9PM36	RPS2	40S ribosomal protein S2	0,42	0,022126507	
Q16512	PKN1	Serine/threonine-protein kinase N1	0,42	0,010035812	Ser916(0,42)
Q8N5I9	C12orf45	Uncharacterized protein C12orf45	0,43	0,041205619	Ser178(0,43)
Q9UDY2	TJP2	Tight junction protein ZO-2	0,43	8,6524E-08	
Q7L014	DDX46	Probable ATP-dependent RNA helicase DDX46	0,45	0,006935786	Ser804(0,45)
Q9Y6A5	TACC3	Transforming acidic coiled-coil-containing protein 3	0,45	0,014780382	
O43663	PRC1	Protein regulator of cytokinesis 1	0,46	0,000399569	
P16949	STMN1	Stathmin	0,46	0,001506152	Ser16(0,41); Ser38(0,44)
Q13233	MAP3K1	Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 1	0,46	9,18057E-06	Ser923(0,46)
Q66K89	E4F1	Transcription factor E4F1	0,47	0,026365604	Thr325(0,64)
P31350	RRM2	Ribonucleoside-diphosphate reductase subunit M2	0,48	0,00013789	
O00499	BIN1	Myc box-dependent-interacting protein 1	0,48	0,002181049	Ser331(0,48)
Q01826	SATB1	DNA-binding protein SATB1	0,49	0,000410435	
P46087	NOP2	Probable 28S rRNA (cytosine(4447)-C(5))-methyltransferase	0,49	5,39442E-05	Thr776(0,49)
Q8IX07	ZFPM1	Zinc finger protein ZFPM1	0,50	0,004635299	Ser909(0,50)
O60341	KDM1A	Lysine-specific histone demethylase 1A	0,50	0,038528493	Ser131(0,49); Ser137(0,49)
Q8NBT2	SPC24	Kinetochore protein Spc24	0,50	0,000249013	
Q9NPD8	UBE2T	Ubiquitin-conjugating enzyme E2 T	0,50	0,002813439	
Q13112	CHAF1B	Chromatin assembly factor 1 subunit B	0,50	0,000372928	
Q9NYB0	TERF2IP	Telomeric repeat-binding factor 2-interacting protein 1	0,50	0,000169749	Ser203(0,50)
Q96AA8	JAKMIP2	Janus kinase and microtubule-interacting protein 2	0,50	4,00001E-05	
P17252	PRKCA	Protein kinase C alpha type	0,50	2,37006E-06	
O95544	NADK	NAD kinase	0,50	0,003326806	Ser48(0,50)
P54105	CLNS1A	Methylosome subunit pICln	0,51	0,015698732	Ser102(0,51)
Q9Y328	NSG2	Neuron-specific protein family member 2	0,51	0,008183556	
Q9NXR1	NDE1	Nuclear distribution protein nudE homolog 1	0,51	0,015216254	Ser282(0,51)
Q93045	STMN2	Stathmin-2	0,51	0,000465342	
Q9BTM9	URM1	Ubiquitin-related modifier 1	0,52	1,3684E-06	
Q9BXW9	FANCD2	Fanconi anemia group D2 protein	0,52	0,003775408	
P30532	CHRNA5	Neuronal acetylcholine receptor subunit alpha-5	0,53	0,00908424	
P29966	MARCKS	Myristoylated alanine-rich C-kinase substrate	0,53	5,67667E-05	Ser26/27(0,44)
Q9UNF1	MAGED2	Melanoma-associated antigen D2	0,53	3,63056E-05	
Q9H467	CUEDC2	CUE domain-containing protein 2	0,53	0,000656409	
H0YJ60	N/A	Uncharacterized protein	0,53	0,000125546	Ser17(0,53)
P14859	POU2F1	POU domain, class 2, transcription factor 1	0,53	0,000200154	Ser448(0,53)
P04818	TYMS	Thymidylate synthase	0,53	0,041440822	
O43602	DCX	Neuronal migration protein doublecortin	0,53	2,79617E-07	Ser415(0,59)
Q02241	KIF23	Kinesin-like protein KIF23	0,54	0,000565449	
Q6ZU80	CEP128	Centrosomal protein of 128 kDa	0,54	0,020780368	
P35637	FUS	RNA-binding protein FUS	0,54	0,003778002	
Q96T60	PNKP	Bifunctional polynucleotide phosphatase/kinase	0,55	0,003838786	Thr118(0,55)
P60891	PRPS1	Ribose-phosphate pyrophosphokinase 1	0,55	2,01978E-05	
P69905	HBA1	Hemoglobin subunit alpha	0,55	0,000177957	
P46100	ATRX	Transcriptional regulator ATRX	0,55	0,013463589	Thr32(0,55)
Q14558	PRPSAP1	Phosphoribosyl pyrophosphate synthase-associated protein 1	0,55	8,51439E-06	

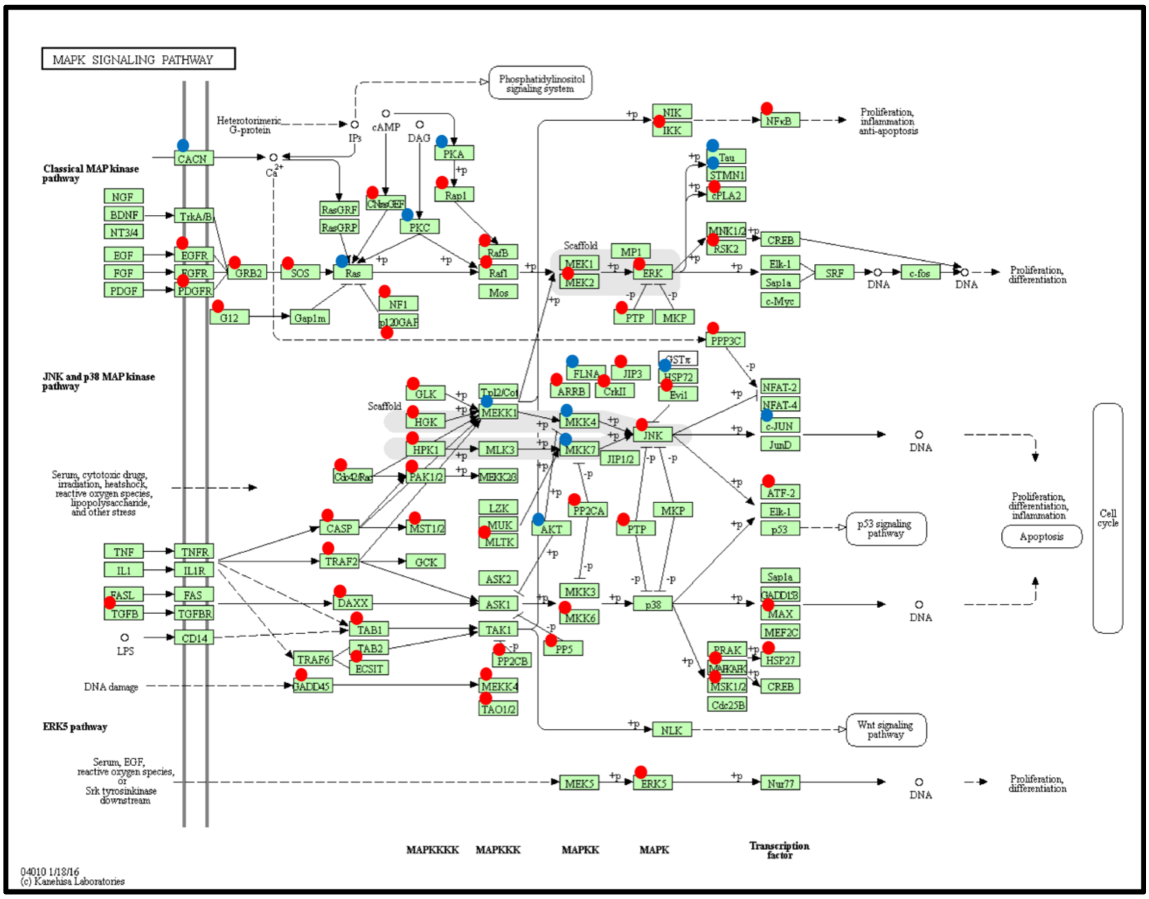
P05129	PRKCG	Protein kinase C gamma type	0,55	0,015141277	Thr514(0,55)
Q04724	TLE1	Transducin-like enhancer protein 1	0,55	0,008044093	Ser284/Ser285(0,55)
B1AJZ9	FHAD1	Forkhead-associated domain-containing protein 1	0,56	2,9837E-06	
Q9BQ15	NABP2	SOSS complex subunit B1	0,56	0,002625203	
Q96CX2	KCTD12	BTB/POZ domain-containing protein KCTD12	0,56	2,4667E-06	
M0R2B7	POLD1	DNA polymerase	0,56	5,3809E-06	
Q9BTT0	ANP32E	Acidic leucine-rich nuclear phosphoprotein 32 family member E	0,56	0,01683457	
Q9UJX2	CDC23	Cell division cycle protein 23 homolog	0,56	0,001015311	
Q29RF7	PDS5A	Sister chromatid cohesion protein PDS5 homolog A	0,56	0,007788409	Ser1305(0,56)
P06400	RB1	Retinoblastoma-associated protein	0,57	0,001162716	Ser249(0,57)
Q16566	CAMK4	Calcium/calmodulin-dependent protein kinase type IV	0,57	2,0605E-06	
O95696	BRD1	Bromodomain-containing protein 1	0,57	0,000468237	Ser128(0,57)
Q9Y605	MRFAP1	MORF4 family-associated protein 1	0,57	1,37843E-05	
Q9GZN8	C20orf27	UPF0687 protein C20orf27	0,57	8,07209E-06	
Q9NRF9	POLE3	DNA polymerase epsilon subunit 3	0,58	0,001369697	
Q06210	GFPT1	Glutamine--fructose-6-phosphate aminotransferase [isomerizing] 1	0,58	2,34126E-05	
P54687	BCAT1	Branched-chain-amino-acid aminotransferase, cytosolic	0,58	9,29955E-07	
P11166	SLC2A1	Solute carrier family 2, facilitated glucose transporter member 1	0,58	4,97744E-08	
P61024	CKS1B	Cyclin-dependent kinases regulatory subunit 1	0,58	7,81789E-06	
Q14692	BMS1	Ribosome biogenesis protein BMS1 homolog	0,58	1,17647E-06	
Q6UXX5	ITIH6	Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H6	0,58	9,36645E-06	
Q9NTJ3	SMC4	Structural maintenance of chromosomes protein 4	0,58	0,002990267	Ser41(0,58)
P26447	S100A4	Protein S100-A4	0,59	0,006326355	
Q9UK76	HN1	Hematological and neurological expressed 1 protein	0,59	0,003987264	Ser87(0,53)
Q14966	ZNF638	Zinc finger protein 638	0,59	0,000152591	Ser1401(0,58)
Q9UBF8	PI4KB	Phosphatidylinositol 4-kinase beta	0,59	0,008514995	Ser278(0,59)
P30260	CDC27	Cell division cycle protein 27 homolog	0,59	0,000396512	
C9J798	RASA4B	Ras GTPase-activating protein 4B	0,59	0,000334395	
Q9UBH6	XPR1	Xenotropic and polytropic retrovirus receptor 1	0,60	0,003147106	Ser668(0,45)
Q92522	H1FX	Histone H1x	0,60	0,000295891	Ser31(0,60)
Q9BPZ3	PAIP2	Polyadenylate-binding protein-interacting protein 2	0,60	4,24899E-05	
Q01581	HMGCS1	Hydroxymethylglutaryl-CoA synthase, cytoplasmic	0,60	3,38146E-05	
H0YA96	HNRNPD	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein D0	0,60	0,001008046	
Q9H0L4	CSTF2T	Cleavage stimulation factor subunit 2 tau variant	0,60	0,009158354	
P37268	FDFT1	Squalene synthase	0,60	6,68822E-06	
Q9NSC5	HOMER3	Homer protein homolog 3	0,61	0,022818326	Ser159(0,65)
Q5TBB1	RNASEH2B	Ribonuclease H2 subunit B	0,61	5,76988E-09	
P52756	RBM5	RNA-binding protein 5	0,62	0,032805537	Ser624(0,62)
P23921	RRM1	Ribonucleoside-diphosphate reductase large subunit	0,62	0,000660384	
Q9P0L1	ZKSCAN7	Zinc finger protein with KRAB and SCAN domains 7	0,62	0,001278009	
Q01995	TAGLN	Transgelin	0,62	0,004689651	
P11388	TOP2A	DNA topoisomerase 2-alpha	0,62	2,9767E-06	
Q15022	SUZ12	Polycomb protein SUZ12	0,62	0,011289786	
O15270	SPTLC2	Serine palmitoyltransferase 2	0,62	8,19791E-06	
O95343	SIX3	Homeobox protein SIX3	0,62	0,000215607	
O60256	PRPSAP2	Phosphoribosyl pyrophosphate synthase-associated protein 2	0,63	0,011674699	Ser227(0,51)
J3KTD8	CBFB	Core-binding factor subunit beta	0,63	0,001479738	
Q14687	GSE1	Genetic suppressor element 1	0,63	0,013563822	
Q96FC7	PHYHIPL	Phytanoyl-CoA hydroxylase-interacting protein-like	0,63	0,017739688	Ser12(0,63)
O95239	KIF4A	Chromosome-associated kinesin KIF4A	0,63	0,000135783	
O15217	GSTA4	Glutathione S-transferase A4	0,63	2,94468E-05	
Q71RC2	LARP4	La-related protein 4	0,63	0,036988229	Ser583(0,63)
Q9Y618	NCOR2	Nuclear receptor corepressor 2	0,63	0,002899733	Ser1487(0,63)
P51003	PAPOLA	Poly(A) polymerase alpha	0,63	0,001279713	
Q9UDR5	AASS	Alpha-aminoadipic semialdehyde synthase, mitochondrial	0,63	0,001567047	
D6RDG3	BTF3	Transcription factor BTF3	0,63	0,000330901	
P57076	C21orf59	UPF0769 protein C21orf59	0,64	0,000114933	
Q8N6N7	ACBD7	Acyl-CoA-binding domain-containing protein 7	0,64	0,002572779	
Q9BY42	RTFDC1	Protein RTF2 homolog	0,64	0,000899476	
Q9NZC4	EHF	ETS homologous factor	0,64	0,012934853	
Q9NZD8	SPG21	Maspardin	0,64	3,68091E-05	
P20839	IMPDH1	Inosine-5'-monophosphate dehydrogenase 1	0,64	0,001130215	
Q08211	DHX9	ATP-dependent RNA helicase A	0,64	0,021566371	Ser87(0,64)
Q96EU6	RRP36	Ribosomal RNA processing protein 36 homolog	0,64	0,001244987	Ser73(0,64)
Q92625	ANKS1A	Ankyrin repeat and SAM domain-containing protein 1A	0,64	0,019707925	Ser624(0,64)
Q9NW75	GPATCH2	G patch domain-containing protein 2	0,64	0,042853351	
Q16850	CYP51A1	Lanosterol 14-alpha demethylase	0,64	0,017223856	
P11142	HSPA8	Heat shock cognate 71 kDa protein	0,65	0,014118024	
P53804	TTC3	E3 ubiquitin-protein ligase TTC3	0,65	0,024297704	
Q96NC0	ZMAT2	Zinc finger matrin-type protein 2	0,65	0,021272455	
Q9C0F1	CEP44	Centrosomal protein of 44 kDa	0,65	0,029997752	
O00505	KPNA3	Importin subunit alpha-4	0,65	0,000209819	Ser60(0,65)
E9PKU7	GANAB	Neutral alpha-glucosidase AB	0,65	0,031247499	
P40938	RFC3	Replication factor C subunit 3	0,65	1,94105E-06	
O15119	TBX3	T-box transcription factor TBX3	0,65	0,000249913	

G5EA03	LIMCH1	LIM and calponin homology domains-containing protein 1	0,65	0,002479522	
P0CG34	TMSB15A	Thymosin beta-15A	0,65	0,000541195	
Q14739	LBR	Lamin-B receptor	0,65	9,42193E-05	Ser99(0,65)
Q9BWF3	RBM4	RNA-binding protein 4	0,65	0,014441029	Ser86(0,65)
Q14527	HLTF	Helicase-like transcription factor	0,65	0,002144424	
P00451	F8	Coagulation factor VIII	0,66	0,000291497	
A0A075B7C2	C17orf50	Uncharacterized protein C17orf50	0,66	0,000180337	
Q15121	PEA15	Astrocytic phosphoprotein PEA-15	0,66	1,50636E-05	Ser116(0,66)
Q86UU1	PHLDB1	Pleckstrin homology-like domain family B member 1	0,66	0,001379385	Ser443(0,66)
P49005	POLD2	DNA polymerase delta subunit 2	0,66	6,14644E-05	
P57678	GEMIN4	Gem-associated protein 4	0,66	0,000272799	
Q96JH7	VCPIP1	Deubiquitinating protein VCIP135	0,66	0,000256423	
Q15431	SYCP1	Synaptonemal complex protein 1	0,66	0,000143326	
Q16222	UAP1	UDP-N-acetylhexosamine pyrophosphorylase	0,66	0,000121667	
P52701	MSH6	DNA mismatch repair protein Msh6	0,66	0,000252833	Ser137(0,53)
Q5BIX2	ARKL1	Chromosome 18 open reading frame 25, isoform CRA_a	0,67	0,001003037	
Q7Z7L8	C11orf96	Uncharacterized protein C11orf96	0,67	4,2662E-05	Ser406(0,52)

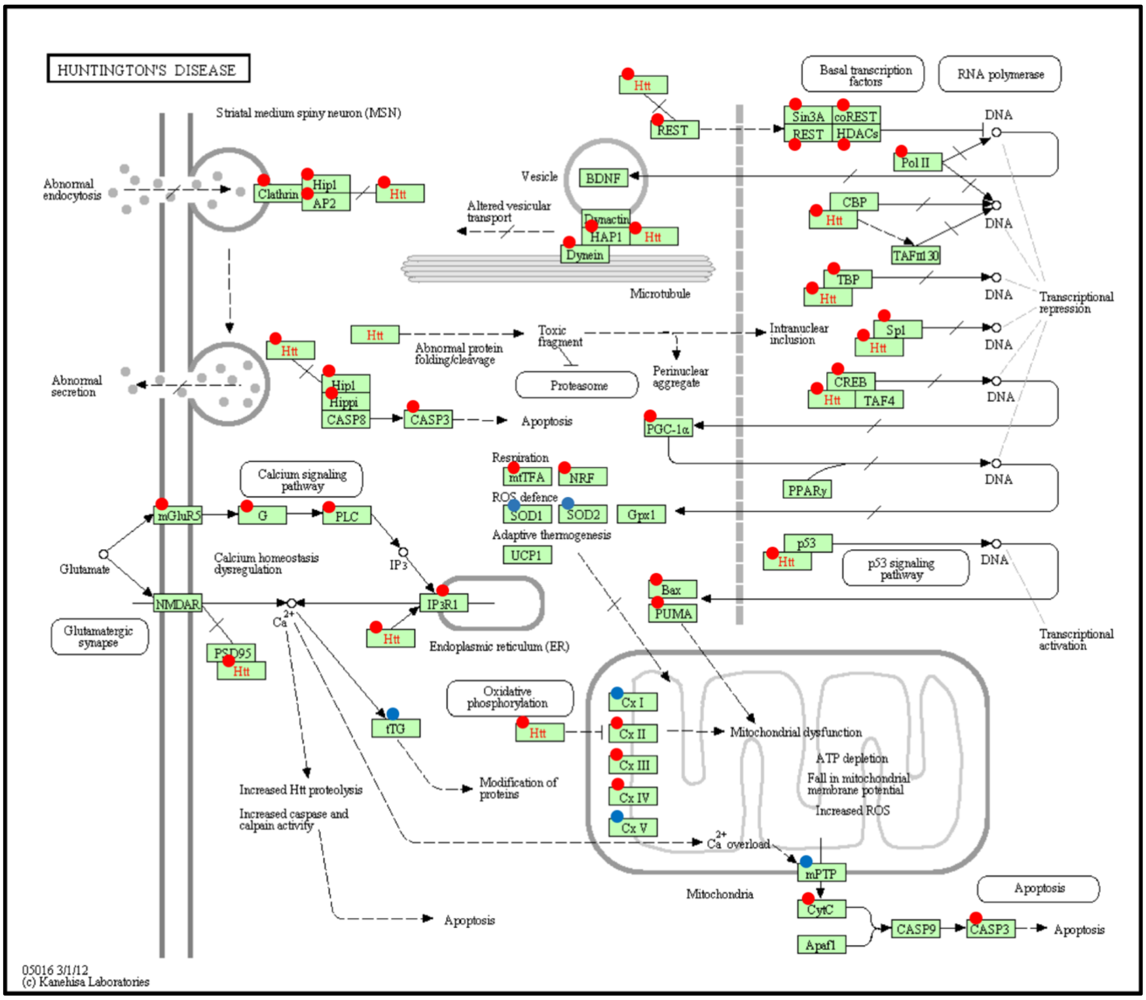
Apêndice 4: Esquema da via de sinalização das neurotrofinas, se incluem asvias dependentes de PI3K/Akt e de apoptose. As proteínas com pontos vermelhos representam aquelas que foram identificadas e aquelas com ponto azul representam proteínas detectadas e reguladas durante a diferenciação. Linha contínua: relação direta; Linha descontinua: efeito indireto; +p: fosforilação: -p: defosforilação.



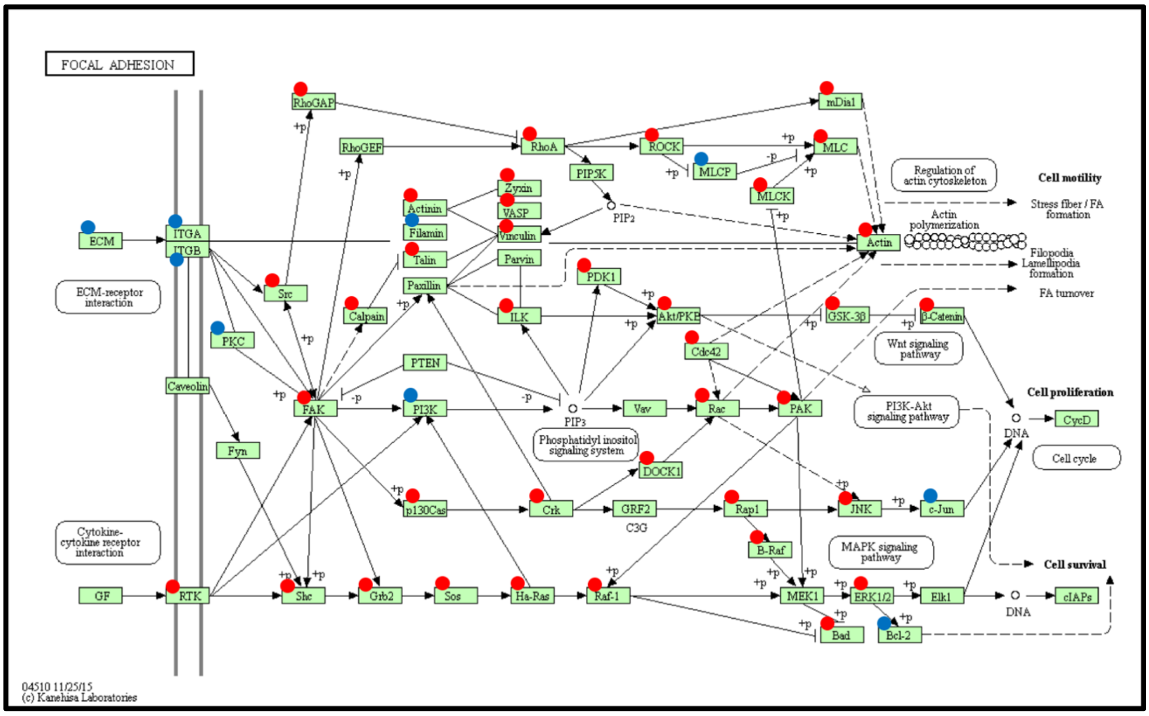
Apêndice 5: Esquema da via de sinalização dependente de MAPK. As proteínas com pontos vermelhos representam aquelas que foram identificadas e aquelas com ponto azul representam proteínas detectadas e reguladas durante a diferenciação. Linha contínua: relação direta; Linha descontinua: efeito indireto; +p: fosforilação: -p: defosforilação.



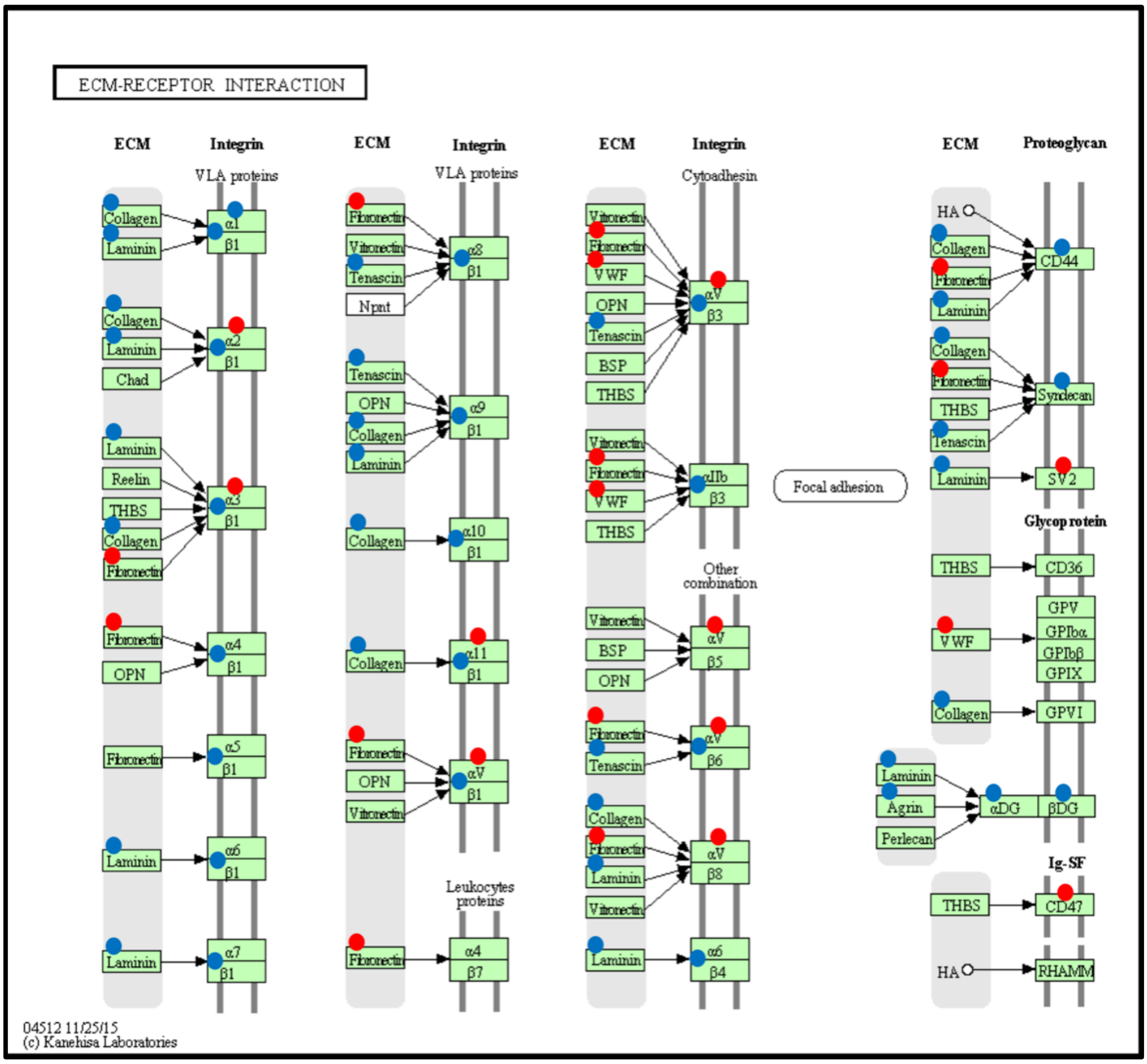
Apêndice 6: Esquema das vias de sinalização relacionadas à doença de Huntington, se incluem vias relacionadas com processamento de glutamato e fosforilação oxidativa. As proteínas com pontos vermelhos representam aquelas que foram identificadas e aquelas com ponto azul representam proteínas detectadas e reguladas durante a diferenciação. Linha contínua: relação direta; Linha descontinua: efeito indireto; +p: fosforilação: -p: defosforilação.



Apêndice 7: Esquema das vias de sinalização relacionadas com adesão focal. As proteínas com pontos vermelhos representam aquelas que foram identificadas e aquelas com ponto azul representam proteínas detectadas e reguladas durante a diferenciação. Linha contínua: relação direta; Linha descontinua: efeito indireto; +p: fosforilação: -p: defosforilação.



Apêndice 8: Esquema das interações com ECM. As proteínas com pontos vermelhos representam aquelas que foram identificadas e aquelas com ponto azul representam proteínas detectadas e reguladas durante a diferenciação. Linha contínua: relação direta; Linha descontinua: efeito indireto; +p: fosforilação: -p: defosforilação.



Apêndice 9: Lista de proteínas que aumentaram sua abundância em neuroesferas cultivadas por 10 dias (diferenciadas).

Código Uniprot	**Gene**	**Descrição**	**Fold Change**	***p* Valor**
Q04721	NOTCH2	Neurogenic locus notch homolog protein 2	1,50	0,016260532
P50502	ST13	Hsc70-interacting protein	1,50	2,72297E-07
P62306	SNRPF	Small nuclear ribonucleoprotein F	1,50	7,40799E-09
Q9UHY7	ENOPH1	Enolase-phosphatase E1	1,50	3,66625E-05
P41231	P2RY2	P2Y purinoceptor 2	1,50	6,85182E-06
Q9UBI6	GNG12	Guanine nucleotide-binding protein G(I)/G(S)/G(O) subunit gamma-12	1,50	1,28751E-06
Q96DZ1	ERLEC1	Endoplasmic reticulum lectin 1	1,50	8,04276E-06
Q13362	PPP2R5C	Serine/threonine-protein phosphatase 2A 56 kDa regulatory subunit gamma isoform	1,50	5,34258E-05
Q5VW36	FOCAD	Focadhesin	1,50	1,24459E-05
P38571	LIPA	Lysosomal acid lipase/cholesteryl ester hydrolase	1,50	2,26321E-05
Q9UQF2	MAPK8IP1	C-Jun-amino-terminal kinase-interacting protein 1	1,50	0,001531435
X5DQS5	CADM1	Cell adhesion molecule 1	1,50	0,001207501
Q9Y483	MTF2	Metal-response element-binding transcription factor 2	1,50	0,040859376
Q96JB5	CDK5RAP3	CDK5 regulatory subunit-associated protein 3	1,50	5,84955E-06
Q96A83	COL26A1	Collagen alpha-1(XXVI) chain	1,50	4,70108E-05
Q8NI77	KIF18A	Kinesin-like protein KIF18A	1,50	0,001150431
Q8WXD9	CASKIN1	Caskin-1	1,50	0,00242156
P11532	DMD	Dystrophin	1,50	4,34742E-05
Q96RD7	PANX1	Pannexin-1	1,50	0,000871151
Q9UN71	PCDHGB4	Protocadherin gamma-B4	1,51	0,007768128
Q9HCJ6	VAT1L	Synaptic vesicle membrane protein VAT-1 homolog-like	1,51	2,90949E-06
Q7Z422	SZRD1	SUZ domain-containing protein 1	1,51	0,000364752
P04062	GBA	Glucosylceramidase	1,51	4,42725E-06
P29218	IMPA1	Inositol monophosphatase 1	1,51	6,90974E-06
Q7Z6Z7	HUWE1	E3 ubiquitin-protein ligase HUWE1	1,51	4,56815E-07
Q14118	DAG1	Dystroglycan	1,51	8,49053E-05
Q14315	FLNC	Filamin-C	1,51	1,82354E-09
O60784	TOM1	Target of Myb protein 1	1,51	7,75448E-05
Q7Z6J0	SH3RF1	E3 ubiquitin-protein ligase SH3RF1	1,51	3,89912E-08
P67775	PPP2CA	Serine/threonine-protein phosphatase 2A catalytic subunit alpha isoform	1,51	2,22662E-06
Q8WV41	SNX33	Sorting nexin-33	1,51	0,028828789
P35803	GPM6B	Neuronal membrane glycoprotein M6-b	1,51	6,55819E-05
Q92743	HTRA1	Serine protease HTRA1	1,51	7,64524E-05
Q99689	FEZ1	Fasciculation and elongation protein zeta-1	1,51	7,99495E-06
P60174	TPI1	Triosephosphate isomerase	1,51	2,6566E-08
Q9UJ70	NAGK	N-acetyl-D-glucosamine kinase	1,51	5,6781E-05
O43657	TSPAN6	Tetraspanin-6	1,51	0,000256309
Q9BYV8	CEP41	Centrosomal protein of 41 kDa	1,51	5,67E-05
Q9UKF6	CPSF3	Cleavage and polyadenylation specificity factor subunit 3	1,51	2,21993E-06
Q8IVF5	TIAM2	T-lymphoma invasion and metastasis-inducing protein 2	1,51	0,038306839
P54709	ATP1B3	Sodium/potassium-transporting ATPase subunit beta-3	1,51	3,96122E-06
Q9H307	PNN	Pinin	1,51	4,50494E-07
P13489	RNH1	Ribonuclease inhibitor	1,51	3,16279E-08
Q8NCM8	DYNC2H1	Cytoplasmic dynein 2 heavy chain 1	1,51	0,000514441
Q93008	USP9X	Probable ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase FAF-X	1,51	4,24877E-06
P61201	COPS2	COP9 signalosome complex subunit 2	1,51	1,08115E-07
O60443	DFNA5	Non-syndromic hearing impairment protein 5	1,51	6,55113E-06
Q9UI08	EVL	Ena/VASP-like protein	1,51	7,11911E-07
Q86UW7	CADPS2	Calcium-dependent secretion activator 2	1,51	0,003669853
Q9NY59	SMPD3	Sphingomyelin phosphodiesterase 3	1,51	0,004135781
O75056	SDC3	Syndecan-3	1,51	0,0002514
Q9P2B4	CTTNBP2NL	CTTNBP2 N-terminal-like protein	1,51	5,30508E-06
Q13813	SPTAN1	Spectrin alpha chain, non-erythrocytic 1	1,51	7,27501E-05
Q9Y3C6	PPIL1	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase-like 1	1,51	9,36302E-07
P21333	FLNA	Filamin-A	1,51	3,77338E-08
P61960	UFM1	Ubiquitin-fold modifier 1	1,52	0,000259016
P52565	ARHGDIA	Rho GDP-dissociation inhibitor 1	1,52	3,49941E-07
Q9NQP4	PFDN4	Prefoldin subunit 4	1,52	1,19732E-05
Q86WK6	AMIGO1	Amphoterin-induced protein 1	1,52	1,66215E-05
P04632	CAPNS1	Calpain small subunit 1	1,52	1,97911E-07
P18583	SON	Protein SON	1,52	7,53998E-08
Q13596	SNX1	Sorting nexin-1	1,52	5,03779E-07
Q9BX66	SORBS1	Sorbin and SH3 domain-containing protein 1	1,52	0,001233121
Q8N1I0	DOCK4	Dedicator of cytokinesis protein 4	1,52	1,68933E-07
P61925	PKIA	cAMP-dependent protein kinase inhibitor alpha	1,52	0,000112377
Q9NQ86	TRIM36	E3 ubiquitin-protein ligase TRIM36	1,52	7,06945E-06
O14818	PSMA7	Proteasome subunit alpha type-7	1,52	6,35329E-07
Q9NP72	RAB18	Ras-related protein Rab-18	1,52	1,31066E-05
A0A024R216	HDGFRP3	Hepatoma-derived growth factor, related protein 3, isoform CRA_a	1,52	0,000501169
P62072	TIMM10	Mitochondrial import inner membrane translocase subunit Tim10	1,52	2,10067E-05
O75874	IDH1	Isocitrate dehydrogenase [NADP] cytoplasmic	1,52	3,08075E-07
P31939	ATIC	Bifunctional purine biosynthesis protein PURH	1,52	3,09157E-08
O60927	PPP1R11	Protein phosphatase 1 regulatory subunit 11	1,52	0,000247715
Q15233	NONO	Non-POU domain-containing octamer-binding protein	1,52	4,81647E-07
O95372	LYPLA2	Acyl-protein thioesterase 2	1,52	3,00556E-07
O95208	EPN2	Epsin-2	1,52	2,22053E-05
Q6UXH1	CRELD2	Cysteine-rich with EGF-like domain protein 2	1,52	5,29169E-05
Q8IY22	CMIP	C-Maf-inducing protein	1,52	0,00018276
Q6EEV4	POLR2M	DNA-directed RNA polymerase II subunit GRINL1A, isoforms 4/5	1,52	0,024317063
P80404	ABAT	4-aminobutyrate aminotransferase, mitochondrial	1,52	5,64047E-06

Q86WG3	ATCAY	Caytaxin	1,53	0,000441102
P12109	COL6A1	Collagen alpha-1(VI) chain	1,53	1,96419E-05
P57737	CORO7-PAM16	Coronin	1,53	1,5829E-06
O75061	DNAJC6	Putative tyrosine-protein phosphatase auxilin	1,53	0,00810742
Q9UJU6	DBNL	Drebrin-like protein	1,53	0,000398043
Q08380	LGALS3BP	Galectin-3-binding protein	1,53	1,8471E-06
Q5T0N5	FNBP1L	Formin-binding protein 1-like	1,53	6,65675E-06
B4DLN1	N/A	Uncharacterized protein	1,53	9,06344E-06
P30086	PEBP1	Phosphatidylethanolamine-binding protein 1	1,53	4,29103E-07
P00558	PGK1	Phosphoglycerate kinase 1	1,53	6,41051E-08
Q99714	HSD17B10	3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase type-2	1,53	2,70109E-07
Q8N5Z0	AADAT	Kynurenine/alpha-aminoadipate aminotransferase, mitochondrial	1,53	0,009136584
P30049	ATP5D	ATP synthase subunit delta, mitochondrial	1,53	0,000214099
Q8IXF0	NPAS3	Neuronal PAS domain-containing protein 3	1,53	1,10632E-05
O43300	LRRTM2	Leucine-rich repeat transmembrane neuronal protein 2	1,53	0,02096881
P46459	NSF	Vesicle-fusing ATPase	1,53	6,17059E-06
Q8NB66	UNC13C	Protein unc-13 homolog C	1,53	0,00587502
P04040	CAT	Catalase	1,53	8,38079E-08
P20340	RAB6A	Ras-related protein Rab-6A	1,53	4,15522E-05
Q9HCJ0	TNRC6C	Trinucleotide repeat-containing gene 6C protein	1,53	2,97363E-06
Q9Y646	CPQ	Carboxypeptidase Q	1,53	0,000908473
Q9UBQ0	VPS29	Vacuolar protein sorting-associated protein 29	1,53	2,49505E-08
Q15393	SF3B3	Splicing factor 3B subunit 3	1,53	2,87533E-08
Q14444	CAPRIN1	Caprin-1	1,53	6,22693E-07
Q9UKG1	APPL1	DCC-interacting protein 13-alpha	1,53	0,000460914
Q9Y2Q5	LAMTOR2	Ragulator complex protein LAMTOR2	1,54	4,87764E-05
P09211	GSTP1	Glutathione S-transferase P	1,54	2,99285E-07
P55795	HNRNPH2	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H2	1,54	5,20592E-07
Q96EY7	PTCD3	Pentatricopeptide repeat domain-containing protein 3, mitochondrial	1,54	1,08191E-05
Q9GZP4	PITHD1	PITH domain-containing protein 1	1,54	4,50139E-06
P53999	SUB1	Activated RNA polymerase II transcriptional coactivator p15	1,54	4,60964E-06
Q9Y4G6	TLN2	Talin-2	1,54	2,66478E-06
Q86VM9	ZC3H18	Zinc finger CCCH domain-containing protein 18	1,54	1,9695E-06
Q9UL25	RAB21	Ras-related protein Rab-21	1,54	3,52042E-06
P23469	PTPRE	Receptor-type tyrosine-protein phosphatase epsilon	1,54	8,68521E-05
Q99757	TXN2	Thioredoxin, mitochondrial	1,54	0,003716424
O14879	IFIT3	Interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 3	1,54	1,40688E-06
Q86YM7	HOMER1	Homer protein homolog 1	1,54	4,74889E-07
Q7M4L6	SHF	SH2 domain-containing adapter protein F	1,54	3,24215E-07
P00813	ADA	Adenosine deaminase	1,54	4,85622E-06
Q96DA2	RAB39B	Ras-related protein Rab-39B	1,54	0,002669336
P84090	ERH	Enhancer of rudimentary homolog	1,54	7,87811E-07
P43686	PSMC4	26S protease regulatory subunit 6B	1,54	5,44338E-08
P29320	EPHA3	Ephrin type-A receptor 3	1,54	0,004279328
P11413	G6PD	Glucose-6-phosphate 1-dehydrogenase	1,54	1,44488E-07
O14948	TFEC	Transcription factor EC	1,54	0,002163198
Q4G0X4	KCTD21	BTB/POZ domain-containing protein KCTD21	1,54	0,00102196
Q5T0Z8	C6orf132	Uncharacterized protein C6orf132	1,54	0,008494194
Q96GS4	C17orf59	Uncharacterized protein C17orf59	1,55	2,72744E-05
Q9BZQ6	EDEM3	ER degradation-enhancing alpha-mannosidase-like protein 3	1,55	3,19845E-05
Q99436	PSMB7	Proteasome subunit beta type-7	1,55	3,01949E-07
P40926	MDH2	Malate dehydrogenase, mitochondrial	1,55	1,49689E-06
P50395	GDI2	Rab GDP dissociation inhibitor beta	1,55	4,34131E-09
I3L4Q0	FAM195B	HCG1818442, isoform CRA_a	1,55	1,21395E-06
P28070	PSMB4	Proteasome subunit beta type-4	1,55	1,38295E-09
Q9UBB6	NCDN	Neurochondrin	1,55	2,38907E-05
Q9H492	MAP1LC3A	Microtubule-associated proteins 1A/1B light chain 3A	1,55	6,4004E-07
Q02818	NUCB1	Nucleobindin-1	1,55	3,40084E-07
Q969J3	LOH12CR1	Loss of heterozygosity 12 chromosomal region 1 protein	1,55	6,01433E-05
P15374	UCHL3	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase isozyme L3	1,55	3,58527E-07
Q6ZMV8	ZNF730	Putative zinc finger protein 730	1,55	0,021870963
P61163	ACTR1A	Alpha-centractin	1,55	1,58345E-05
O43504	LAMTOR5	Hepatitis B virus x interacting protein	1,55	4,95432E-05
Q9ULK5	VANGL2	Vang-like protein 2	1,55	9,6637E-07
P50579	METAP2	Methionine aminopeptidase 2	1,55	2,02797E-06
Q9Y3F4	STRAP	Serine-threonine kinase receptor-associated protein	1,55	2,19027E-08
Q08170	SRSF4	Serine/arginine-rich splicing factor 4	1,55	0,000459708
P63000	RAC1	Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1	1,55	3,39833E-07
O75431	MTX2	Metaxin-2	1,55	2,0379E-05
Q13867	BLMH	Bleomycin hydrolase	1,55	2,31336E-06
Q08257	CRYZ	Quinone oxidoreductase	1,55	2,09071E-07
Q5T5H1	ENSA	Alpha-endosulfine	1,55	0,000327741
Q9NSC5	HOMER3	Homer protein homolog 3	1,55	4,86582E-05
Q17RY0	CPEB4	Cytoplasmic polyadenylation element-binding protein 4	1,55	6,7349E-05
O00499	BIN1	Myc box-dependent-interacting protein 1	1,55	3,68159E-06
P59533	TAS2R38	Taste receptor type 2 member 38	1,55	5,34341E-06
O14686	KMT2D	Histone-lysine N-methyltransferase 2D	1,55	0,007278386
P41219	PRPH	Peripherin	1,55	0,002634374
Q9Y3C0	CCDC53	WASH complex subunit CCDC53	1,55	1,03371E-05
Q13011	ECH1	Delta(3,5)-Delta(2,4)-dienoyl-CoA isomerase, mitochondrial	1,55	1,58658E-06
Q9P0M6	H2AFY2	Core histone macro-H2A.2	1,55	1,73636E-06
P28336	NMBR	Neuromedin-B receptor	1,56	0,001474519
Q8NAA4	ATG16L2	Autophagy-related protein 16-2	1,56	1,80395E-05
O75914	PAK3	Serine/threonine-protein kinase PAK 3	1,56	5,37064E-07
Q8WVD5	RNF141	RING finger protein 141	1,56	0,02374783
Q96JB2	COG3	Conserved oligomeric Golgi complex subunit 3	1,56	1,37211E-06

Q9UIW2	PLXNA1	Plexin-A1	1,56	7,05728E-08
Q6UUV9	CRTC1	CREB-regulated transcription coactivator 1	1,56	0,000582698
P43007	SLC1A4	Neutral amino acid transporter A	1,56	7,16642E-06
O14737	PDCD5	Programmed cell death protein 5	1,56	2,38325E-09
Q9P0J0	NDUFA13	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 13	1,56	1,04798E-06
Q16134	ETFDH	Electron transfer flavoprotein-ubiquinone oxidoreductase, mitochondrial	1,56	0,000376649
Q6PIF6	MYO7B	Unconventional myosin-VIIb	1,56	4,52535E-05
O95721	SNAP29	Synaptosomal-associated protein 29	1,56	4,1004E-06
Q96B97	SH3KBP1	SH3 domain-containing kinase-binding protein 1	1,56	6,79893E-05
O75608	LYPLA1	Acyl-protein thioesterase 1	1,56	4,18419E-09
O43854	EDIL3	EGF-like repeat and discoidin I-like domain-containing protein 3	1,56	4,17314E-05
O00442	RTCA	RNA 3'-terminal phosphate cyclase	1,56	7,71968E-07
P68366	TUBA4A	Tubulin alpha-4A chain	1,56	8,01252E-06
P16402	HIST1H1D	Histone H1.3	1,56	3,32501E-05
P24752	ACAT1	Acetyl-CoA acetyltransferase, mitochondrial	1,56	2,31169E-06
Q5SW79	CEP170	Centrosomal protein of 170 kDa	1,56	0,014083485
Q96QK1	VPS35	Vacuolar protein sorting-associated protein 35	1,56	7,62996E-08
Q96CX2	KCTD12	BTB/POZ domain-containing protein KCTD12	1,56	5,44359E-06
Q9NQE9	HINT3	Histidine triad nucleotide-binding protein 3	1,57	0,000102276
Q86YR5	GPSM1	G-protein-signaling modulator 1	1,57	1,00966E-06
P45880	VDAC2	Voltage-dependent anion-selective channel protein 2	1,57	8,64964E-09
Q4G0F5	VPS26B	Vacuolar protein sorting-associated protein 26B	1,57	1,20898E-06
O75367	H2AFY	Core histone macro-H2A.1	1,57	6,44284E-07
Q32MZ4	LRRFIP1	Leucine-rich repeat flightless-interacting protein 1	1,57	7,22686E-07
Q8NBP5	MFSD9	Major facilitator superfamily domain-containing protein 9	1,57	0,03954615
Q9UBC2	EPS15L1	Epidermal growth factor receptor substrate 15-like 1	1,57	2,33036E-05
Q5T3U5	ABCC10	Multidrug resistance-associated protein 7	1,57	0,00174729
P61088	UBE2N	Ubiquitin-conjugating enzyme E2 N	1,57	1,18499E-05
O60716	CTNND1	Catenin delta-1	1,57	1,73341E-07
Q15173	PPP2R5B	Serine/threonine-protein phosphatase 2A 56 kDa regulatory subunit beta isoform	1,57	1,87912E-06
P06744	GPI	Glucose-6-phosphate isomerase	1,57	3,17922E-06
Q9Y2B0	CNPY2	Protein canopy homolog 2	1,57	1,86774E-06
P07355	ANXA2	Annexin A2	1,57	5,6835E-06
A0A096LPI6	N/A	Uncharacterized protein	1,57	1,37761E-05
Q16795	NDUFA9	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 9, mitochondrial	1,57	4,97892E-07
P51003	PAPOLA	Poly(A) polymerase alpha	1,57	6,42503E-05
Q969H8	MYDGF	Myeloid-derived growth factor	1,57	1,88949E-08
O95630	STAMBP	STAM-binding protein	1,57	7,0472E-06
Q9BV35	SLC25A23	Calcium-binding mitochondrial carrier protein SCaMC-3	1,57	0,005898588
E9PBC6	TACC2	Transforming acidic coiled-coil-containing protein 2	1,57	1,10386E-06
O43491	EPB41L2	Band 4.1-like protein 2	1,57	3,71433E-08
Q92930	RAB8B	Ras-related protein Rab-8B	1,57	1,22092E-06
Q8NFZ4	NLGN2	Neuroligin-2	1,57	2,30105E-06
Q674X7	KAZN	Kazrin	1,57	0,021906627
P35237	SERPINB6	Serpin B6	1,57	1,4974E-05
O75971	SNAPC5	snRNA-activating protein complex subunit 5	1,58	0,002001676
Q9UKA9	PTBP2	Polypyrimidine tract-binding protein 2	1,58	1,88277E-06
Q9UNH7	SNX6	Sorting nexin 6, isoform CRA_b	1,58	1,20707E-06
Q15121	PEA15	Astrocytic phosphoprotein PEA-15	1,58	7,95682E-05
O95336	PGLS	6-phosphogluconolactonase	1,58	1,41155E-08
Q16658	FSCN1	Fascin	1,58	1,51488E-06
Q01581	HMGCS1	Hydroxymethylglutaryl-CoA synthase, cytoplasmic	1,58	3,71594E-06
Q9H3Z4	DNAJC5	DnaJ homolog subfamily C member 5	1,58	0,001010627
Q9NRL3	STRN4	Striatin-4	1,58	1,06085E-06
H0UI80	TH1L	Negative elongation factor C/D	1,58	4,09276E-06
O95167	NDUFA3	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 3	1,58	4,51344E-05
Q9BYM8	RBCK1	RanBP-type and C3HC4-type zinc finger-containing protein 1	1,58	4,81494E-05
Q8N9V7	TOPAZ1	Testis- and ovary-specific PAZ domain-containing protein 1	1,58	0,000900028
Q9GZT6	CCDC90B	Coiled-coil domain-containing protein 90B, mitochondrial	1,58	1,68101E-07
P06865	HEXA	Beta-hexosaminidase	1,58	7,31933E-07
P05771	PRKCB	Protein kinase C beta type	1,58	0,015167123
P48556	PSMD8	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 8	1,58	2,10162E-07
Q9H0N0	RAB6C	Ras-related protein Rab-6C	1,58	1,70674E-05
P62745	RHOB	Rho-related GTP-binding protein RhoB	1,59	0,00019615
Q05513	PRKCZ	Protein kinase C zeta type	1,59	3,19609E-06
Q8WUM4	PDCD6IP	Programmed cell death 6-interacting protein	1,59	3,04279E-07
P04075	ALDOA	Fructose-bisphosphate aldolase A	1,59	2,29174E-06
Q96QR8	PURB	Transcriptional activator protein Pur-beta	1,59	8,76171E-07
O60613	SEP15	15 kDa selenoprotein	1,59	2,70142E-06
Q5T359	NSMF	NMDA receptor synaptonuclear-signaling and neuronal migration factor	1,59	0,00258864
P68431	HIST1H3A	Histone H3.1	1,59	2,38796E-06
Q7Z4S6	KIF21A	Kinesin-like protein KIF21A	1,59	7,9197E-09
P30084	ECHS1	Enoyl-CoA hydratase, mitochondrial	1,59	6,02243E-07
Q9H9E3	COG4	Conserved oligomeric Golgi complex subunit 4	1,59	1,3878E-05
O15498	YKT6	Synaptobrevin homolog YKT6	1,59	2,40088E-06
Q9UJU6	DBNL	Drebrin-like protein	1,59	2,6454E-07
Q7Z4V5	HDGFRP2	Hepatoma-derived growth factor-related protein 2	1,59	2,86212E-06
Q12913	PTPRJ	Receptor-type tyrosine-protein phosphatase eta	1,59	1,16074E-07
Q8NCY6	MSANTD4	Myb/SANT-like DNA-binding domain-containing protein 4	1,59	0,006150465
O75947	ATP5H	ATP synthase subunit d, mitochondrial	1,59	2,45583E-06
P68402	PAFAH1B2	Platelet-activating factor acetylhydrolase IB subunit beta	1,60	1,32392E-05
Q7L5N1	COPS6	COP9 signalosome complex subunit 6	1,60	9,82852E-08
Q14847	LASP1	LIM and SH3 domain protein 1	1,60	5,20351E-07
Q96AE4	FUBP1	Far upstream element-binding protein 1	1,60	8,72577E-09
Q5TCZ1	SH3PXD2A	SH3 and PX domain-containing protein 2A	1,60	0,000368132
P31937	HIBADH	3-hydroxyisobutyrate dehydrogenase, mitochondrial	1,60	0,000114268
P35754	GLRX	Glutaredoxin-1	1,60	7,0008E-07

A6NCE7	MAP1LC3B2	Microtubule-associated proteins 1A/1B light chain 3 beta 2	1,60	1,48481E-06
O00625	PIR	Pirin	1,60	5,9938E-06
P11233	RALA	Ras-related protein Ral-A	1,60	5,44304E-05
P59768	GNG2	Guanine nucleotide-binding protein subunit gamma	1,60	0,000463897
Q5TF21	SOGA3	Protein SOGA3	1,60	0,000118602
Q9BT78	COPS4	COP9 signalosome complex subunit 4	1,60	3,04917E-08
P11142	HSPA8	Heat shock cognate 71 kDa protein	1,60	3,83337E-07
O75208	COQ9	Ubiquinone biosynthesis protein COQ9, mitochondrial	1,60	8,67163E-07
Q9UQF2	MAPK8IP3	C-Jun-amino-terminal kinase-interacting protein 3	1,60	2,09267E-05
P27449	ATP6V0C	V-type proton ATPase 16 kDa proteolipid subunit	1,60	0,000428668
P60520	GABARAPL2	Gamma-aminobutyric acid receptor-associated protein-like 2	1,60	1,36493E-05
Q9BSH3	NICN1	Nicolin-1	1,60	0,011734923
P27708	CAD	CAD protein	1,61	5,91872E-07
Q96B54	ZNF428	Zinc finger protein 428	1,61	6,42314E-08
Q92945	KHSRP	Far upstream element-binding protein 2	1,61	7,41289E-07
Q8NCC3	PLA2G15	Group XV phospholipase A2	1,61	0,000364177
Q9UN36	NDRG2	Protein NDRG2	1,61	4,5262E-06
O15031	PLXNB2	Plexin-B2	1,61	8,76108E-07
Q9NT99	LRRC4B	Leucine-rich repeat-containing protein 4B	1,61	8,80656E-06
P19022	CDH2	Cadherin-2	1,61	1,32939E-06
P00505	GOT2	Aspartate aminotransferase, mitochondrial	1,61	1,96354E-07
Q9UN86	G3BP2	Ras GTPase-activating protein-binding protein 2	1,61	1,5826E-07
P07954	FH	Fumarate hydratase, mitochondrial	1,61	1,45557E-08
Q6ZSJ8	C1orf122	Uncharacterized protein C1orf122	1,61	0,000399909
P35222	CTNNB1	Catenin beta-1	1,61	3,66698E-08
H3BU86	STX16-NPEPL1	Protein STX16-NPEPL1	1,61	1,18278E-05
O95219	SNX4	Sorting nexin-4	1,61	1,50038E-06
Q3SZV2	KXD1	KxDL motif-containing protein 1	1,61	1,70426E-06
P84157	MXRA7	Matrix-remodeling-associated protein 7	1,61	0,013929868
O75781	PALM	Paralemmin-1	1,61	0,000215717
P35232	PHB	Prohibitin	1,61	7,81059E-07
P14314	PRKCSH	Glucosidase 2 subunit beta	1,61	1,82754E-07
P23588	EIF4B	Eukaryotic translation initiation factor 4B	1,62	4,53206E-07
Q92820	GGH	Gamma-glutamyl hydrolase	1,62	1,87531E-06
Q96MY1	NOL4L	Nucleolar protein 4-like	1,62	0,002668834
A0A0D9SEI0	C6orf203	Uncharacterized protein C6orf203	1,62	9,74764E-05
Q6EKJ0	GTF2IRD2B	General transcription factor II-I repeat domain-containing protein 2B	1,62	0,00022945
Q8N2Q7	NLGN1	Neuroligin-1	1,62	0,018261334
Q9Y6N7	ROBO1	Roundabout homolog 1	1,62	1,23677E-05
O00217	NDUFS8	NADH dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur protein 8, mitochondrial	1,62	7,58763E-08
P35227	PCGF2	Polycomb group RING finger protein 2	1,62	0,046716138
P24043	LAMA2	Laminin subunit alpha-2	1,62	2,28498E-05
P20674	COX5A	Cytochrome c oxidase subunit 5A, mitochondrial	1,63	1,80866E-06
P22087	FBL	rRNA 2'-O-methyltransferase fibrillarin	1,63	6,91112E-06
Q92845	KIFAP3	Kinesin-associated protein 3	1,63	9,54033E-08
Q8TD16	BICD2	Protein bicaudal D homolog 2	1,63	5,6409E-06
Q5T4U5	ACADM	Acyl-Coenzyme A dehydrogenase, C-4 to C-12 straight chain, isoform CRA_a	1,63	2,49381E-06
P35908	KRT2	Keratin, type II cytoskeletal 2 epidermal	1,63	0,00305174
Q05193	DNM1	Dynamin-1	1,63	0,000514944
Q86W56	PARG	Poly(ADP-ribose) glycohydrolase	1,63	2,08205E-05
Q6ZMY3	SPOCD1	SPOC domain-containing protein 1	1,63	7,42814E-07
Q9BYT8	NLN	Neurolysin, mitochondrial	1,63	1,89047E-07
Q99426	TBCB	Tubulin-folding cofactor B	1,63	5,85445E-06
O75506	HSBP1	Heat shock factor-binding protein 1	1,63	0,002460813
Q9UIS9	MBD1	Methyl-CpG-binding domain protein 1	1,63	8,66672E-06
P46108	CRK	Adapter molecule crk	1,63	1,69646E-09
Q9UBB4	ATXN10	Ataxin-10	1,63	3,54721E-09
Q6PCE3	PGM2L1	Glucose 1,6-bisphosphate synthase	1,63	4,46956E-09
P29323	EPHB2	Ephrin type-B receptor 2	1,63	0,000244965
Q8TB36	GDAP1	Ganglioside-induced differentiation-associated protein 1	1,63	7,20304E-07
O00231	PSMD11	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 11	1,63	2,37974E-09
Q15075	EEA1	Early endosome antigen 1	1,63	5,03308E-08
O14979	HNRNPDL	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein D-like	1,64	7,50585E-08
P47755	CAPZA2	F-actin-capping protein subunit alpha-2	1,64	5,44684E-07
P51149	RAB7A	Ras-related protein Rab-7a	1,64	3,34634E-07
P11021	HSPA5	78 kDa glucose-regulated protein	1,64	3,65157E-07
P27986	PIK3R3	Phosphatidylinositol 3-kinase regulatory subunit gamma	1,64	0,000105023
P30101	PDIA3	Protein disulfide-isomerase A3	1,64	5,34531E-08
Q9UK41	VPS28	Vacuolar protein sorting-associated protein 28 homolog	1,64	0,00023113
Q9NSK0	KLC4	Kinesin light chain 4	1,64	7,15074E-06
O95319	CELF2	CUGBP Elav-like family member 2	1,64	1,33963E-05
Q08174	PCDH1	Protocadherin-1	1,64	0,036095518
Q8WU79	SMAP2	Stromal membrane-associated protein 2	1,64	4,8163E-06
P78362	SRPK2	SRSF protein kinase 2	1,64	2,1357E-07
Q6ZTN6	ANKRD13D	Ankyrin repeat domain-containing protein 13D	1,64	9,28013E-07
Q96M27	PRRC1	Protein PRRC1	1,64	5,33554E-05
Q15287	RNPS1	RNA-binding protein with serine-rich domain 1	1,64	1,86986E-07
O60763	USO1	General vesicular transport factor p115	1,65	1,26408E-06
P22415	USF1	Upstream stimulatory factor 1	1,65	6,91211E-06
P05107	ITGB2	Integrin beta-2	1,65	0,018449584
P43146	DCC	Netrin receptor DCC	1,65	0,00015001
P52306	RAP1GDS1	Rap1 GTPase-GDP dissociation stimulator 1	1,65	7,49001E-08
O95948	ONECUT2	One cut domain family member 2	1,65	0,007471953
P61020	RAB5B	Ras-related protein Rab-5B	1,65	6,48213E-06
Q9H6Z4	RANBP3	Ran-binding protein 3	1,65	3,63137E-08
Q96EQ0	SGTB	Small glutamine-rich tetratricopeptide repeat-containing protein beta	1,65	1,00255E-05

P55786	NPEPPS	Puromycin-sensitive aminopeptidase	1,65	2,39625E-07
Q99471	PFDN5	Prefoldin subunit 5	1,65	1,97574E-07
P84077	ARF1	ADP-ribosylation factor 1	1,65	3,10019E-05
Q6IQ49	SDE2	Protein SDE2 homolog	1,65	2,16796E-05
Q9ULJ8	PPP1R9A	Neurabin-1	1,65	0,000146413
P42166	TMPO	Lamina-associated polypeptide 2, isoform alpha	1,65	3,23539E-06
P19338	NCL	Nucleolin	1,66	2,62575E-08
Q9NP79	VTA1	Vacuolar protein sorting-associated protein VTA1 homolog	1,66	6,56732E-05
P18859	ATP5J	ATP synthase-coupling factor 6, mitochondrial	1,66	1,55562E-06
O75381	PEX14	Peroxisomal membrane protein PEX14	1,66	1,08984E-05
Q5SQI0	ATAT1	Alpha-tubulin N-acetyltransferase 1	1,66	6,098E-07
O14810	CPLX1	Complexin-1	1,66	0,000905366
Q96HE7	ERO1A	ERO1-like protein alpha	1,66	5,67349E-08
O75340	PDCD6	Programmed cell death protein 6	1,66	8,16873E-08
B7ZC38	SH3GLB2	Endophilin-B2	1,66	1,1485E-06
P40123	CAP2	Adenylyl cyclase-associated protein 2	1,66	3,27958E-07
Q8N350	CBARP	Voltage-dependent calcium channel beta subunit-associated regulatory protein	1,66	1,71404E-05
P00167	CYB5A	Cytochrome b5	1,66	1,24175E-05
Q9HA38	ZMAT3	Zinc finger matrin-type protein 3	1,66	0,040279426
P05165	PCCA	Propionyl-CoA carboxylase alpha chain, mitochondrial	1,66	5,73945E-09
P46736	BRCC3	Lys-63-specific deubiquitinase BRCC36	1,66	1,0494E-05
Q9UQ16	DNM3	Dynamin-3	1,66	0,000577736
P00338	LDHA	L-lactate dehydrogenase A chain	1,66	0,000563246
P05067	APP	Amyloid beta A4 protein	1,66	1,3106E-06
Q8WXF1	PSPC1	Paraspeckle component 1	1,66	1,37588E-06
Q4V328	GRIPAP1	GRIP1-associated protein 1	1,66	2,90791E-07
Q08AD1	CAMSAP2	Calmodulin-regulated spectrin-associated protein 2	1,66	1,40163E-07
P13804	ETFA	Electron transfer flavoprotein subunit alpha, mitochondrial	1,66	4,66586E-08
P05386	RPLP1	60S acidic ribosomal protein P1	1,67	6,65959E-07
P11171	EPB41	Protein 4.1	1,67	4,22601E-07
Q9Y333	LSM2	U6 snRNA-associated Sm-like protein LSm2	1,67	4,25881E-06
Q9NYQ7	CELSR3	Cadherin EGF LAG seven-pass G-type receptor 3	1,67	1,70388E-06
Q13308	PTK7	Inactive tyrosine-protein kinase 7	1,67	2,47725E-10
P30153	PPP2R1A	Serine/threonine-protein phosphatase 2A 65 kDa regulatory subunit A alpha isoform	1,67	8,1054E-10
Q6NYC8	PPP1R18	Phostensin	1,67	7,8137E-07
P09622	DLD	Dihydrolipoyl dehydrogenase, mitochondrial	1,67	1,98298E-06
Q9Y5J7	TIMM9	Mitochondrial import inner membrane translocase subunit Tim9	1,67	5,61573E-09
Q99909	SSX3	Protein SSX3	1,67	4,03912E-05
O14531	DPYSL4	Dihydropyrimidinase-related protein 4	1,67	9,93077E-07
Q96NT1	NAP1L5	Nucleosome assembly protein 1-like 5	1,67	0,000118481
O60229	KALRN	Kalirin	1,67	0,000567633
P23528	CFL1	Cofilin-1	1,67	1,81306E-09
O14907	TAX1BP3	Tax1-binding protein 3	1,67	2,17763E-05
Q9NVA2	SEPT11	Septin-11	1,67	5,43846E-06
Q16629	SRSF7	Serine/arginine-rich splicing factor 7	1,67	1,70816E-05
P52943	CRIP2	Cysteine-rich protein 2	1,68	2,09079E-05
P62330	ARF6	ADP-ribosylation factor 6	1,68	9,22885E-08
P50542	PEX5	Peroxisomal targeting signal 1 receptor	1,68	0,032438247
P61019	RAB2A	Ras-related protein Rab-2A	1,68	5,39546E-06
Q9UPQ0	LIMCH1	LIM and calponin homology domains-containing protein 1	1,68	1,11204E-05
Q8IYI6	EXOC8	Exocyst complex component 8	1,68	3,05981E-06
Q15819	UBE2V2	Ubiquitin-conjugating enzyme E2 variant 2	1,68	1,11625E-06
A6NHQ2	FBLL1	rRNA/tRNA 2'-O-methyltransferase fibrillarin-like protein 1	1,68	5,40804E-05
O43310	CTIF	CBP80/20-dependent translation initiation factor	1,68	2,13889E-06
Q9UKE5	TNIK	TRAF2 and NCK-interacting protein kinase	1,68	9,89306E-05
P50440	GATM	Glycine amidinotransferase, mitochondrial	1,68	3,00006E-06
Q2M2I8	AAK1	AP2-associated protein kinase 1	1,68	4,19839E-07
Q9H8Y8	GORASP2	Golgi reassembly-stacking protein 2	1,68	3,44351E-08
P02656	APOC3	Apolipoprotein C-III	1,68	7,9019E-05
P07686	HEXB	Beta-hexosaminidase subunit beta	1,68	2,6709E-06
Q9H3Q1	CDC42EP4	Cdc42 effector protein 4	1,68	5,90264E-08
Q96P15	SERPINB11	Serpin B11	1,68	0,013467625
Q8IZD9	DOCK3	Dedicator of cytokinesis protein 3	1,68	0,001075594
E9PL24	PDE4DIP	Myomegalin	1,68	3,85003E-05
P38646	HSPA9	Stress-70 protein, mitochondrial	1,68	3,59329E-08
Q8WZ42	TTN	Titin	1,68	1,26596E-05
Q8N5J2	FAM63A	Protein FAM63A	1,69	3,08396E-06
P21266	GSTM3	Glutathione S-transferase Mu 3	1,69	1,37506E-05
P27816	MAP4	Microtubule-associated protein	1,69	2,29236E-08
Q9BRL6	SRSF8	Serine/arginine-rich splicing factor 8	1,69	0,000494298
Q9UJZ1	STOML2	Stomatin-like protein 2, mitochondrial	1,69	8,82139E-08
Q99627	COPS8	COP9 signalosome complex subunit 8	1,69	4,73105E-06
Q96MC5	C16orf45	Uncharacterized protein C16orf45	1,69	1,16776E-06
Q5U5X0	LYRM7	Complex III assembly factor LYRM7	1,69	0,04207984
Q9UGI0	ZRANB1	Ubiquitin thioesterase ZRANB1	1,69	0,008480701
O00754	MAN2B1	Lysosomal alpha-mannosidase	1,69	6,48466E-07
O95196	CSPG5	Chondroitin sulfate proteoglycan 5	1,69	2,87096E-05
P50148	GNAQ	Guanine nucleotide-binding protein G(q) subunit alpha	1,69	3,16074E-05
P19367	HK1	Hexokinase-1	1,69	2,87336E-05
Q9UPX8	SHANK2	SH3 and multiple ankyrin repeat domains protein 2	1,70	0,000102897
Q9H1E3	NUCKS1	Nuclear ubiquitous casein and cyclin-dependent kinase substrate 1	1,70	1,29905E-08
P29692	EEF1D	Elongation factor 1-delta	1,70	7,80384E-08
Q9BRT6	LLPH	Protein LLP homolog	1,70	0,000374295
Q92734	TFG	Protein TFG	1,70	2,2251E-06
O75145	PPFIA3	Liprin-alpha-3	1,70	0,003019853
Q59A28	CRYZL1	Quinone oxidoreductase-like protein 1	1,70	9,68462E-06
P27348	YWHAQ	14-3-3 protein theta	1,70	3,93647E-07

P51571	SSR4	Translocon-associated protein subunit delta	1,70	4,49101E-05
O95865	DDAH2	N(G),N(G)-dimethylarginine dimethylaminohydrolase 2	1,70	3,02127E-07
P08887	IL6R	Interleukin-6 receptor subunit alpha	1,70	3,6188E-07
Q9BRP8	PYM1	Partner of Y14 and mago	1,70	1,76242E-06
Q9C0C2	TNKS1BP1	182 kDa tankyrase-1-binding protein	1,70	9,14304E-07
P48643	CCT5	T-complex protein 1 subunit epsilon	1,70	2,04082E-08
Q6P587	FAHD1	Acylpyruvase FAHD1, mitochondrial	1,70	5,86688E-07
O75663	TIPRL	TIP41-like protein	1,70	2,91738E-06
P29992	GNA11	Guanine nucleotide-binding protein subunit alpha-11	1,70	6,07379E-07
Q9H7R5	ZNF665	Zinc finger protein 665	1,70	1,0846E-05
O95819	MAP4K4	Mitogen-activated protein kinase kinase kinase kinase 4	1,70	0,000696407
O75334	PPFIA2	Liprin-alpha-2	1,70	0,005688942
P35611	ADD1	Alpha-adducin	1,70	2,96409E-06
O43678	NDUFA2	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 2	1,70	5,1065E-05
O00462	MANBA	Beta-mannosidase	1,71	0,000125176
Q6Y288	B3GLCT	Beta-1,3-glucosyltransferase	1,71	3,54428E-06
Q9HAU5	UPF2	Regulator of nonsense transcripts 2	1,71	7,44072E-06
Q8WVB3	HEXDC	Hexosaminidase D	1,71	0,037696923
Q16698	DECR1	2,4-dienoyl-CoA reductase, mitochondrial	1,71	1,43156E-06
Q5T5U3	ARHGAP21	Rho GTPase-activating protein 21	1,71	2,06149E-07
P58546	MTPN	Myotrophin	1,71	1,13854E-06
P14625	HSP90B1	Endoplasmin	1,71	2,30032E-08
P13667	PDIA4	Protein disulfide-isomerase A4	1,71	1,00949E-08
P41236	PPP1R2	Protein phosphatase inhibitor 2	1,72	5,93895E-07
P63220	RPS21	40S ribosomal protein S21	1,72	0,000473372
H7BYY1	TPM1	Tropomyosin 1 (Alpha), isoform CRA_m	1,72	1,03126E-05
P36969	GPX4	Glutathione peroxidase	1,72	1,33919E-05
Q9Y371	SH3GLB1	Endophilin-B1	1,72	3,20638E-05
P78371	CCT2	T-complex protein 1 subunit beta	1,72	2,22354E-10
Q9UNW9	NOVA2	RNA-binding protein Nova-2	1,72	7,09036E-06
P30048	PRDX3	Thioredoxin-dependent peroxide reductase, mitochondrial	1,73	3,01229E-08
O15075	DCLK1	Serine/threonine-protein kinase DCLK1	1,73	8,21043E-06
Q9Y6X4	FAM169A	Soluble lamin-associated protein of 75 kDa	1,73	1,15921E-05
Q9Y5E4	PCDHB5	Protocadherin beta-5	1,73	0,003181546
Q5LJA9	UCHL5	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase	1,73	7,59929E-09
A0A0B4J1R7	BORCS7-ASMT	Protein BORCS7-ASMT	1,73	8,49277E-09
O43602	DCX	Neuronal migration protein doublecortin	1,73	1,02045E-05
Q13702	RAPSN	43 kDa receptor-associated protein of the synapse	1,73	0,001706731
Q9UPT5	EXOC7	Exocyst complex component 7	1,73	5,0187E-08
Q9HCM3	KIAA1549	UPF0606 protein KIAA1549	1,73	2,12332E-05
Q13200	PSMD2	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 2	1,74	1,42484E-08
P42785	PRCP	Lysosomal Pro-X carboxypeptidase	1,74	7,74636E-07
Q9UHD9	UBQLN2	Ubiquilin-2	1,74	6,50637E-06
Q01064	PDE1B	Calcium/calmodulin-dependent 3',5'-cyclic nucleotide phosphodiesterase 1B	1,74	0,001996011
P51858	HDGF	Hepatoma-derived growth factor	1,74	1,79583E-06
Q9NZ53	PODXL2	Podocalyxin-like protein 2	1,74	1,64412E-05
P63104	YWHAZ	14-3-3 protein zeta/delta	1,74	1,79713E-08
Q14240	EIF4A2	Eukaryotic initiation factor 4A-II	1,74	3,05047E-06
Q9BV73	CEP250	Centrosome-associated protein CEP250	1,74	1,28358E-08
Q01538	MYT1	Myelin transcription factor 1	1,74	4,46696E-06
O60518	RANBP6	Ran-binding protein 6	1,74	1,37388E-09
Q8IVB5	LIX1L	LIX1-like protein	1,74	1,37271E-05
Q8N9R8	SCAI	Protein SCAI	1,74	0,011999592
Q1L5Z9	LONRF2	LON peptidase N-terminal domain and RING finger protein 2	1,74	6,28955E-06
P25788	PSMA3	Proteasome subunit alpha type-3	1,74	6,63722E-07
A8MVW0	FAM171A2	Protein FAM171A2	1,75	6,52931E-05
P78540	ARG2	Arginase-2, mitochondrial	1,75	0,000669955
O95613	PCNT	Pericentrin	1,75	1,63562E-05
P63010	AP2B1	AP-2 complex subunit beta	1,75	8,35549E-07
Q15276	RABEP1	Rab GTPase-binding effector protein 1	1,75	1,83371E-08
P13645	KRT10	Keratin, type I cytoskeletal 10	1,75	0,000906763
P37802	TAGLN2	Transgelin-2	1,75	3,88102E-08
Q96GD0	PDXP	Pyridoxal phosphate phosphatase	1,75	2,45753E-06
P14927	UQCRB	Cytochrome b-c1 complex subunit 7	1,75	4,63235E-06
P09086	POU2F2	POU domain protein	1,75	0,031111493
Q9H0Q0	FAM49A	Protein FAM49A	1,75	0,000888969
O94760	DDAH1	N(G),N(G)-dimethylarginine dimethylaminohydrolase 1	1,75	1,15598E-08
Q9Y586	MAB21L2	Protein mab-21-like 2	1,75	5,16832E-07
Q59EK9	RUNDC3A	RUN domain-containing protein 3A	1,75	6,50447E-05
Q96K76	USP47	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 47	1,75	3,00255E-07
O60502	MGEA5	Protein O-GlcNAcase	1,75	3,73237E-07
P55735	SEC13	Protein SEC13 homolog	1,75	3,04752E-07
P09960	LTA4H	Leukotriene A-4 hydrolase	1,75	4,51319E-09
Q9HCC0	MCCC2	Methylcrotonoyl-CoA carboxylase beta chain, mitochondrial	1,76	3,14832E-08
Q8NBF6	AVL9	Late secretory pathway protein AVL9 homolog	1,76	7,95467E-05
P49720	PSMB3	Proteasome subunit beta type-3	1,76	2,13867E-05
P21796	VDAC1	Voltage-dependent anion-selective channel protein 1	1,76	3,08138E-06
Q15019	SEPT2	Septin-2	1,76	1,10944E-09
P02787	TF	Serotransferrin	1,76	5,54785E-08
Q9UDT6	CLIP2	CAP-Gly domain-containing linker protein 2	1,76	5,27548E-07
O00154	ACOT7	Cytosolic acyl coenzyme A thioester hydrolase	1,76	1,25709E-07
P25440	BRD2	Bromodomain-containing protein 2	1,76	1,71584E-06
Q9ULT0	TTC7A	Tetratricopeptide repeat protein 7A	1,76	0,03836094
Q14204	DYNC1H1	Cytoplasmic dynein 1 heavy chain 1	1,76	1,19684E-08
P31948	STIP1	Stress-induced-phosphoprotein 1	1,77	5,4114E-08
P07237	P4HB	Protein disulfide-isomerase	1,77	9,37278E-10

O15540	FABP7	Fatty acid-binding protein, brain	1,77	7,96315E-09
Q9BW30	TPPP3	Tubulin polymerization-promoting protein family member 3	1,77	6,74388E-06
Q8TB96	ITFG1	T-cell immunomodulatory protein	1,77	0,002065651
P49418	AMPH	Amphiphysin	1,77	3,1407E-07
Q9Y3Y2	CHTOP	Chromatin target of PRMT1 protein	1,77	6,78864E-06
P78356	PIP4K2B	Phosphatidylinositol 5-phosphate 4-kinase type-2 beta	1,77	5,22686E-08
Q15717	ELAVL4	ELAV-like protein	1,77	8,26035E-05
P37840	SNCA	Alpha-synuclein	1,77	2,28888E-05
Q9UI12	ATP6V1H	V-type proton ATPase subunit H	1,77	9,68679E-07
Q92783	STAM	Signal transducing adapter molecule 1	1,77	2,87666E-06
Q15102	PAFAH1B3	Platelet-activating factor acetylhydrolase IB subunit gamma	1,77	4,94598E-08
P31946	YWHAB	14-3-3 protein beta/alpha	1,78	6,88289E-07
P78363	ABCA4	Retinal-specific ATP-binding cassette transporter	1,78	9,39651E-06
Q16555	DPYSL2	Dihydropyrimidinase-related protein 2	1,78	3,76016E-07
P61106	RAB14	Ras-related protein Rab-14	1,78	1,36097E-09
Q14657	LAGE3	EKC/KEOPS complex subunit LAGE3	1,78	2,57251E-06
P49821	NDUFV2	NADH dehydrogenase [ubiquinone] flavoprotein 2, mitochondrial	1,78	5,41931E-06
Q00610	CLTC	Clathrin heavy chain	1,78	5,4375E-07
Q9BXY0	MAK16	Protein MAK16 homolog	1,78	0,000482847
Q9BPU6	DPYSL5	Dihydropyrimidinase-related protein 5	1,78	1,5239E-07
O75037	KIF21B	Kinesin-like protein KIF21B	1,78	2,39747E-07
P41208	CETN2	Centrin-2	1,78	3,60494E-06
Q9P2E7	PCDH10	Protocadherin-10	1,78	0,005198079
Q96SF7	TBX15	T-box transcription factor TBX15	1,78	0,034062207
Q14019	COTL1	Coactosin-like protein	1,78	3,41561E-07
P31930	UQCRC1	Cytochrome b-c1 complex subunit 1, mitochondrial	1,79	1,33496E-08
Q86VW0	SESTD1	SEC14 domain and spectrin repeat-containing protein 1	1,79	1,14143E-07
P16298	PPP3CB	Serine/threonine-protein phosphatase 2B catalytic subunit beta isoform	1,79	0,000134279
R4GN45	KDM5B	Lysine-specific demethylase 5B	1,79	0,001299575
O75177	SS18L1	Calcium-responsive transactivator	1,79	3,13183E-05
Q02952	AKAP12	A-kinase anchor protein 12	1,79	2,81679E-08
Q9Y6R1	SLC4A4	Electrogenic sodium bicarbonate cotransporter 1	1,79	0,000384663
P07203	GPX1	Glutathione peroxidase 1	1,79	8,83588E-07
P45974	USP5	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 5	1,80	1,32592E-08
Q15113	PCOLCE	Procollagen C-endopeptidase enhancer 1	1,80	0,030350065
P23634	ATP2B4	Plasma membrane calcium-transporting ATPase 4	1,80	2,27805E-07
P54727	RAD23B	UV excision repair protein RAD23 homolog B	1,80	4,12902E-07
P22307	SCP2	Non-specific lipid-transfer protein	1,80	4,40652E-08
O00193	SMAP	Small acidic protein	1,80	5,27714E-07
Q96FC7	PHYHIPL	Phytanoyl-CoA hydroxylase-interacting protein-like	1,80	1,68735E-06
Q9H0B6	KLC2	Kinesin light chain 2	1,80	7,29091E-09
O96020	CCNE2	G1/S-specific cyclin-E2	1,80	3,2653E-06
P25705	ATP5A1	ATP synthase subunit alpha, mitochondrial	1,80	4,55921E-09
P61158	ACTR3	Actin-related protein 3	1,80	3,33179E-08
P11177	PDHB	Pyruvate dehydrogenase E1 component subunit beta, mitochondrial	1,80	1,40732E-07
P50453	SERPINB9	Serpin B9	1,80	3,83867E-07
Q15293	RCN1	Reticulocalbin-1	1,80	1,09703E-06
Q8N126	CADM3	Cell adhesion molecule 3	1,80	0,000239492
Q9UMZ2	SYNRG	Synergin gamma	1,80	7,47657E-09
Q7Z6B0	CCDC91	Coiled-coil domain-containing protein 91	1,81	1,64596E-06
Q5GH72	XKR7	XK-related protein 7	1,81	2,3193E-05
Q92558	WASF1	Wiskott-Aldrich syndrome protein family member 1	1,81	1,28208E-07
Q9NRW1	RAB6B	Ras-related protein Rab-6B	1,81	1,69151E-05
O75489	NDUFS3	NADH dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur protein 3, mitochondrial	1,81	1,00609E-06
Q9P2R7	SUCLA2	Succinyl-CoA ligase [ADP-forming] subunit beta, mitochondrial	1,81	4,63916E-07
P46527	CDKN1B	Cyclin-dependent kinase inhibitor 1B	1,81	8,51454E-07
P10253	GAA	Lysosomal alpha-glucosidase	1,81	3,60782E-09
P28066	PSMA5	Proteasome subunit alpha type-5	1,81	7,55144E-08
Q9ULH0	KIDINS220	Kinase D-interacting substrate of 220 kDa	1,81	2,24391E-06
P0CG34	TMSB15A	Thymosin beta-15A	1,82	0,009077431
Q12849	GRSF1	G-rich sequence factor 1	1,82	7,68241E-06
B1AK53	ESPN	Espin	1,82	3,91127E-07
O43852	CALU	Calumenin	1,82	4,13335E-06
Q16740	CLPP	ATP-dependent Clp protease proteolytic subunit, mitochondrial	1,82	1,37705E-05
Q5T1M5	FKBP15	FK506-binding protein 15	1,82	9,51272E-08
P20962	PTMS	Parathymosin	1,82	3,02612E-06
P17174	GOT1	Aspartate aminotransferase, cytoplasmic	1,82	2,77538E-06
P55072	VCP	Transitional endoplasmic reticulum ATPase	1,82	6,58013E-11
Q04917	YWHAH	14-3-3 protein eta	1,82	2,02442E-08
Q86UP2	KTN1	Kinectin	1,83	3,98001E-08
Q02790	FKBP4	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase FKBP4	1,83	8,26525E-08
Q9H1K1	ISCU	Iron-sulfur cluster assembly enzyme ISCU, mitochondrial	1,83	4,25613E-05
P54652	HSPA2	Heat shock-related 70 kDa protein 2	1,83	0,013495577
O94905	ERLIN2	Erlin-2	1,84	9,24293E-07
Q01484	ANK2	Ankyrin-2	1,84	1,48619E-07
Q52MB2	CCDC184	Coiled-coil domain-containing protein 184	1,84	1,70736E-06
O60282	KIF5C	Kinesin heavy chain isoform 5C	1,84	1,2038E-07
Q8N3J6	CADM2	Cell adhesion molecule 2	1,84	6,42939E-05
Q8IV08	PLD3	Phospholipase D3	1,84	3,1854E-06
O95071	UBR5	E3 ubiquitin-protein ligase UBR5	1,85	3,99001E-08
Q9NY47	CACNA2D2	Voltage-dependent calcium channel subunit alpha-2/delta-2	1,85	0,030383233
O95292	VAPB	Vesicle-associated membrane protein-associated protein B/C	1,85	1,319E-05
Q9HCK4	ROBO2	Roundabout homolog 2	1,85	8,1292E-07
B1AJZ9	FHAD1	Forkhead-associated domain-containing protein 1	1,85	0,000895827
P62995	TRA2B	Transformer-2 protein homolog beta	1,85	4,94215E-07
P61266	STX1B	Syntaxin-1B	1,86	0,000802342
P54920	NAPA	Alpha-soluble NSF attachment protein	1,86	7,87387E-07

A8MT19	RHPN2P1	Putative rhophilin-2-like protein RHPN2P1	1,86	0,000734061
Q07021	C1QBP	Complement component 1 Q subcomponent-binding protein, mitochondrial	1,86	3,49465E-07
Q8IYK8	REM2	GTP-binding protein REM 2	1,86	3,88689E-05
Q09666	AHNAK	Neuroblast differentiation-associated protein AHNAK	1,86	4,50115E-07
P09455	RBP1	Retinol binding protein 1, cellular	1,86	1,5246E-06
P49902	NT5C2	Cytosolic purine 5'-nucleotidase	1,86	6,59551E-07
Q5T1Z8	PUM1	Pumilio homolog 1	1,86	3,15996E-06
P35612	ADD2	Beta-adducin	1,86	8,35217E-07
Q15435	PPP1R7	Protein phosphatase 1 regulatory subunit 7	1,86	3,56473E-08
O75934	BCAS2	Pre-mRNA-splicing factor SPF27	1,87	8,36821E-07
Q16643	DBN1	Drebrin	1,87	7,81295E-08
Q9H1B7	IRF2BPL	Interferon regulatory factor 2-binding protein-like	1,87	2,28221E-08
Q13740	ALCAM	CD166 antigen	1,87	1,46698E-06
Q9P212	PLCE1	1-phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate phosphodiesterase epsilon-1	1,87	1,90209E-08
P22061	PCMT1	Protein-L-isoaspartate O-methyltransferase	1,87	4,62999E-07
Q14257	RCN2	Reticulocalbin-2	1,87	2,65375E-07
O75054	IGSF3	Immunoglobulin superfamily member 3	1,87	8,52021E-08
P15502	ELN	Elastin	1,88	0,001185095
Q9NZR1	TMOD2	Tropomodulin-2	1,88	1,09581E-06
Q9NWQ8	PAG1	Phosphoprotein associated with glycosphingolipid-enriched microdomains 1	1,88	0,001400789
P11279	LAMP1	Lysosome-associated membrane glycoprotein 1	1,88	1,47355E-05
O94772	LY6H	Lymphocyte antigen 6H	1,88	1,15622E-07
O15061	SYNM	Synemin	1,88	3,09987E-05
Q96SB3	PPP1R9B	Neurabin-2	1,88	4,28729E-06
O43617	TRAPPC3	Trafficking protein particle complex subunit 3	1,88	0,000165365
Q08722	CD47	Leukocyte surface antigen CD47	1,88	2,75965E-07
X6R8A1	CTSA	Carboxypeptidase	1,88	3,03022E-09
J3QTJ6	FSIP2	Fibrous sheath-interacting protein 2	1,89	0,003173487
Q6UXD5	SEZ6L2	Seizure 6-like protein 2	1,89	6,09272E-05
P20700	LMNB1	Lamin-B1	1,89	4,3249E-09
P55081	MFAP1	Microfibrillar-associated protein 1	1,89	3,82162E-05
O15085	ARHGEF11	Rho guanine nucleotide exchange factor 11	1,89	1,8655E-05
P47989	XDH	Xanthine dehydrogenase/oxidase	1,90	1,41732E-06
Q9NPG4	PCDH12	Protocadherin-12	1,90	0,046661242
Q8TEA8	DTD1	D-tyrosyl-tRNA(Tyr) deacylase 1	1,90	2,2432E-05
L7N2F9	N/A	Uncharacterized protein	1,90	0,009788677
O95757	HSPA4L	Heat shock 70 kDa protein 4L	1,90	6,24234E-09
Q8NCM2	KCNH5	Potassium voltage-gated channel subfamily H member 5	1,90	0,023108925
P21281	ATP6V1B2	V-type proton ATPase subunit B, brain isoform	1,90	2,04523E-09
H3BLU2	LSAMP	Limbic system-associated membrane protein	1,90	2,68796E-06
P48740	MASP1	Mannan-binding lectin serine protease 1	1,90	0,001593953
Q96MZ0	GDAP1L1	Ganglioside-induced differentiation-associated protein 1-like 1	1,90	5,75992E-06
A5A3E0	POTEF	POTE ankyrin domain family member F	1,90	4,05546E-06
Q9Y653	ADGRG1	Adhesion G-protein coupled receptor G1	1,90	4,97267E-06
Q9P121	NTM	Neurotrimin	1,91	2,70908E-05
P04350	TUBB4A	Tubulin beta-4A chain	1,91	0,008624597
P24821	TNC	Tenascin	1,91	1,92716E-07
Q76N89	HECW1	E3 ubiquitin-protein ligase HECW1	1,91	0,005709011
Q96T17	MAP7D2	MAP7 domain-containing protein 2	1,91	4,16908E-05
Q02153	GUCY1B3	Guanylate cyclase soluble subunit beta-1	1,91	3,40899E-06
Q15084	PDIA6	Protein disulfide-isomerase A6	1,91	2,93132E-08
Q9P286	PAK7	Serine/threonine-protein kinase PAK 7	1,91	1,47964E-05
P07437	TUBB	Tubulin beta chain	1,91	1,26115E-09
O15020	SPTBN2	Spectrin beta chain, non-erythrocytic 2	1,91	1,34393E-08
P05091	ALDH2	Aldehyde dehydrogenase, mitochondrial	1,92	2,68975E-08
Q9Y215	COLQ	Acetylcholinesterase collagenic tail peptide	1,92	0,027144175
H0Y568	NRXN1	Neurexin-1-beta	1,92	1,36443E-05
Q9NUN5	LMBRD1	Probable lysosomal cobalamin transporter	1,92	0,000818147
P30044	PRDX5	Peroxiredoxin-5, mitochondrial	1,93	3,65715E-07
Q12888	TP53BP1	Tumor suppressor p53-binding protein 1	1,93	2,62062E-09
Q8IXJ6	SIRT2	NAD-dependent protein deacetylase sirtuin-2	1,93	9,859E-06
P08133	ANXA6	Annexin A6	1,93	1,47074E-07
P43003	SLC1A3	Excitatory amino acid transporter 1	1,93	1,25164E-07
Q13045	FLII	Protein flightless-1 homolog	1,93	0,000928142
P09486	SPARC	SPARC	1,93	8,22497E-06
Q8IWP9	CCDC28A	Coiled-coil domain-containing protein 28A	1,93	0,000171785
P07339	CTSD	Cathepsin D	1,93	1,7126E-08
P22626	HNRNPA2B1	Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins A2/B1	1,93	8,79443E-08
P43034	PAFAH1B1	Platelet-activating factor acetylhydrolase IB subunit alpha	1,93	1,98658E-07
Q6P2E9	EDC4	Enhancer of mRNA-decapping protein 4	1,94	2,87719E-07
P35998	PSMC2	26S protease regulatory subunit 7	1,94	1,49441E-07
Q53QV2	LBH	Protein LBH	1,94	0,000632586
Q9UNZ2	NSFL1C	NSFL1 cofactor p47	1,94	8,57252E-08
Q9ULP0	NDRG4	Protein NDRG4	1,95	1,66605E-05
P19086	GNAZ	Guanine nucleotide-binding protein G(z) subunit alpha	1,95	1,07225E-07
Q16799	RTN1	Reticulon-1	1,95	0,001910043
P27797	CALR	Calreticulin	1,95	2,77494E-09
O94779	CNTN5	Contactin-5	1,95	0,043525637
Q93050	ATP6V0A1	V-type proton ATPase 116 kDa subunit a isoform 1	1,95	1,13349E-05
Q96BM9	ARL8A	ADP-ribosylation factor-like protein 8A	1,95	0,000234791
P41217	CD200	OX-2 membrane glycoprotein	1,96	0,000399388
Q9ULU8	CADPS	Calcium-dependent secretion activator 1	1,96	3,00472E-06
Q15008	PSMD6	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 6	1,96	4,58902E-06
Q07955	SRSF1	Serine/arginine-rich-splicing factor 1	1,96	9,76876E-08
Q96Q04	LMTK3	Serine/threonine-protein kinase LMTK3	1,96	0,032794761
Q92823	NRCAM	Neuronal cell adhesion molecule	1,96	1,5445E-07
O95989	NUDT3	Diphosphoinositol polyphosphate phosphohydrolase 1	1,96	3,38916E-08

Q8NFZ8	CADM4	Cell adhesion molecule 4	1,97	1,24238E-05
P62258	YWHAE	14-3-3 protein epsilon	1,97	4,95773E-09
X6RLX0	ERC1	ELKS/Rab6-interacting/CAST family member 1	1,97	1,50358E-08
P16278	GLB1	Beta-galactosidase	1,97	2,29217E-07
Q9NYB0	TERF2IP	Telomeric repeat-binding factor 2-interacting protein 1	1,98	5,82909E-08
O14639	ABLIM1	Actin-binding LIM protein 1	1,98	0,000187291
Q14168	MPP2	MAGUK p55 subfamily member 2	1,98	4,02198E-05
Q8N158	GPC2	Glypican-2	1,98	1,06532E-07
P78559	MAP1A	Microtubule-associated protein 1A	1,98	5,55788E-07
Q92616	GCN1	eIF-2-alpha kinase activator GCN1	1,98	3,52301E-08
Q9BR01	SULT4A1	Sulfotransferase 4A1	1,98	0,035176407
Q49AG3	ZBED5	Zinc finger BED domain-containing protein 5	1,99	0,000129403
Q05193	DNM1	Dynamin-1	1,99	0,001755567
Q5TIG5	MLLT4	Afadin	1,99	0,002822056
Q71U36	TUBA1A	Tubulin alpha-1A chain	2,00	9,92964E-07
P23246	SFPQ	Splicing factor, proline- and glutamine-rich	2,00	8,17042E-08
P63172	DYNLT1	Dynein light chain Tctex-type 1	2,00	2,17799E-05
O94967	WDR47	WD repeat-containing protein 47	2,00	1,16314E-07
Q14247	CTTN	Src substrate cortactin	2,00	1,12099E-06
Q6UB99	ANKRD11	Ankyrin repeat domain-containing protein 11	2,00	1,23814E-08
F5H039	GPHN	Gephyrin	2,00	3,08825E-09
Q8IWE5	PLEKHM2	Pleckstrin homology domain-containing family M member 2	2,00	2,81806E-07
P36543	ATP6V1E1	V-type proton ATPase subunit E 1	2,01	1,98446E-05
P12956	XRCC6	X-ray repair cross-complementing protein 6	2,01	1,34759E-09
Q2WGJ6	KLHL38	Kelch-like protein 38	2,01	0,000543472
Q16864	ATP6V1F	V-type proton ATPase subunit F	2,01	2,3596E-06
P51674	GPM6A	Neuronal membrane glycoprotein M6-a	2,01	2,27175E-05
O14773	TPP1	Tripeptidyl-peptidase 1	2,02	6,09046E-06
P61278	SST	Somatostatin	2,02	8,22228E-05
Q9BQI5	SGIP1	SH3-containing GRB2-like protein 3-interacting protein 1	2,02	0,000518199
Q13796	SHROOM2	Protein Shroom2	2,03	6,88505E-06
Q9HC98	NEK9	Serine/threonine-protein kinase Nek9	2,03	0,000269067
P10809	HSPD1	60 kDa heat shock protein, mitochondrial	2,03	6,47402E-09
H7BYZ3	N/A	Uncharacterized protein	2,03	5,16014E-06
P22033	MUT	Methylmalonyl-CoA mutase, mitochondrial	2,03	2,21667E-09
Q6V0I7	FAT4	Protocadherin Fat 4	2,04	3,44213E-10
O15511	ARPC5	Actin-related protein 2/3 complex subunit 5	2,04	1,25744E-07
P00441	SOD1	Superoxide dismutase [Cu-Zn]	2,05	2,21771E-07
Q92599	SEPT8	Septin-8	2,05	6,65854E-05
Q9Y6G9	DYNC1LI1	Cytoplasmic dynein 1 light intermediate chain 1	2,05	4,08815E-08
Q9H267	VPS33B	Vacuolar protein sorting-associated protein 33B	2,05	5,61213E-06
Q5XX13	FBXW10	F-box/WD repeat-containing protein 10	2,06	0,023577183
Q96CV9	OPTN	Optineurin	2,06	5,965E-05
P63313	TMSB10	Thymosin beta-10	2,06	0,020782164
Q5VWJ9	SNX30	Sorting nexin-30	2,06	3,34082E-11
Q96F85	CNRIP1	CB1 cannabinoid receptor-interacting protein 1	2,06	1,65546E-05
Q07954	LRP1	Prolow-density lipoprotein receptor-related protein 1	2,06	6,90768E-08
A6PVC2	TTLL8	Protein monoglycylase TTLL8	2,06	9,5839E-05
Q9HBG4	ATP6V0D1	V-type proton ATPase subunit d 1	2,06	2,05694E-06
P04406	GAPDH	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	2,06	7,43136E-08
Q13015	MLLT11	Protein AF1q	2,06	4,99079E-05
Q96PX8	SLITRK1	SLIT and NTRK-like protein 1	2,07	1,76274E-05
P52907	CAPZA1	F-actin-capping protein subunit alpha-1	2,07	2,57277E-08
P49768	PSEN1	Presenilin-1	2,08	0,000773132
P15586	GNS	N-acetylglucosamine-6-sulfatase	2,09	4,69874E-06
P07858	CTSB	Cathepsin B	2,09	1,71577E-07
Q12955	ANK3	Ankyrin-3	2,10	3,68769E-08
Q9NP97	DYNLRB1	Dynein light chain roadblock-type 1	2,10	2,74726E-05
Q14195	DPYSL3	Dihydropyrimidinase-related protein 3	2,10	4,0718E-07
Q14108	SCARB2	Lysosome membrane protein 2	2,11	1,20163E-05
A6NE02	BTBD17	BTB/POZ domain-containing protein 17	2,11	1,6865E-06
P62158	CALM2	Calmodulin	2,11	3,59962E-08
A0A0G2JLL6	N/A	Uncharacterized protein	2,12	5,56161E-05
P14136	GFAP	Glial fibrillary acidic protein	2,12	0,000115497
Q2Y0W8	SLC4A8	Electroneutral sodium bicarbonate exchanger 1	2,12	2,73214E-06
Q9NQX5	NPDC1	Neural proliferation differentiation and control protein 1	2,12	7,31575E-05
Q13561	DCTN2	Dynactin subunit 2	2,12	3,03172E-08
Q8WUG5	SLC22A17	Solute carrier family 22 member 17	2,12	0,045133439
P28331	NDUFS1	NADH-ubiquinone oxidoreductase 75 kDa subunit, mitochondrial	2,12	3,66928E-09
P02760	AMBP	Protein AMBP	2,12	0,04112937
O14594	NCAN	Neurocan core protein	2,13	3,92483E-06
P62328	TMSB4X	Thymosin beta-4	2,13	0,001736718
P08238	HSP90AB1	Heat shock protein HSP 90-beta	2,13	1,97315E-09
P62993	GRB2	Growth factor receptor-bound protein 2	2,14	1,6547E-07
Q16775	HAGH	Hydroxyacylglutathione hydrolase, mitochondrial	2,14	3,23597E-06
Q99614	TTC1	Tetratricopeptide repeat protein 1	2,14	2,043E-05
O60245	PCDH7	Protocadherin-7	2,14	1,14321E-06
Q86TP1	PRUNE	Protein prune homolog	2,15	2,5546E-07
Q14576	ELAVL3	ELAV-like protein 3	2,15	5,30944E-08
Q03252	LMNB2	Lamin-B2	2,16	9,78635E-10
P16949	STMN1	Stathmin	2,16	1,53338E-07
Q5VT06	CEP350	Centrosome-associated protein 350	2,16	0,000146855
Q969X6	UTP4	U3 small nucleolar RNA-associated protein 4 homolog	2,16	0,042406537
P48723	HSPA13	Heat shock 70 kDa protein 13	2,17	8,84492E-08
Q07866	KLC1	Kinesin light chain 1	2,17	9,72693E-05
O15027	SEC16A	Protein transport protein Sec16A	2,17	5,14923E-07
Q14203	DCTN1	Dynactin subunit 1	2,18	7,80775E-05

P13473	LAMP2	Lysosome-associated membrane glycoprotein 2	2,18	3,51538E-05
Q96PU5	NEDD4L	E3 ubiquitin-protein ligase NEDD4-like	2,19	2,91974E-07
Q8WXA3	RUFY2	RUN and FYVE domain-containing protein 2	2,20	4,60068E-06
Q15111	PLCL1	Inactive phospholipase C-like protein 1	2,20	0,005711542
O94811	TPPP	Tubulin polymerization-promoting protein	2,20	2,67261E-05
Q8N0W4	NLGN4X	Neuroligin-4, X-linked	2,21	3,3364E-07
P07910	HNRNPC	Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins C1/C2	2,21	1,15929E-06
O15126	SCAMP1	Secretory carrier-associated membrane protein 1	2,22	6,2303E-07
P17600	SYN1	Synapsin-1	2,22	4,41659E-05
P02649	APOE	Apolipoprotein E	2,23	1,10053E-06
Q9BZ72	PITPNM2	Membrane-associated phosphatidylinositol transfer protein 2	2,23	0,016661467
Q9BUF5	TUBB6	Tubulin beta-6 chain	2,23	1,04677E-07
Q86Y82	STX12	Syntaxin-12	2,24	5,7236E-06
Q12765	SCRN1	Secernin-1	2,24	2,35522E-09
P52895	AKR1C2	Aldo-keto reductase family 1 member C2	2,24	5,33996E-06
Q8WUW1	BRK1	Protein BRICK1	2,25	2,61183E-08
P09497	CLTB	Clathrin light chain B	2,26	0,00191336
Q9C0H2	TTYH3	Protein tweety homolog 3	2,26	1,35223E-06
Q8WZA9	IRGQ	Immunity-related GTPase family Q protein	2,27	3,91798E-07
Q05639	EEF1A2	Elongation factor 1-alpha 2	2,27	0,000594523
Q99996	AKAP9	A-kinase anchor protein 9	2,27	2,58971E-07
P48681	NES	Nestin	2,27	2,14304E-09
Q8N5H3	FAM89B	Protein FAM89B	2,27	3,31302E-05
Q99536	VAT1	Synaptic vesicle membrane protein VAT-1 homolog	2,27	1,03801E-08
P38606	ATP6V1A	V-type proton ATPase catalytic subunit A	2,27	5,14605E-09
Q14676	MDC1	Mediator of DNA damage checkpoint protein 1	2,28	3,53277E-07
P32119	PRDX2	Peroxiredoxin-2	2,29	2,12301E-06
O43237	DYNC1LI2	Cytoplasmic dynein 1 light intermediate chain 2	2,30	5,23791E-08
P43004	SLC1A2	Excitatory amino acid transporter 2	2,30	0,002148997
Q9NYU2	UGGT1	UDP-glucose:glycoprotein glucosyltransferase 1	2,30	4,03514E-08
P61978	HNRNPK	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K	2,30	1,58091E-10
P13611	VCAN	Versican core protein	2,30	1,94116E-09
P50213	IDH3A	Isocitrate dehydrogenase [NAD] subunit alpha, mitochondrial	2,31	7,12572E-05
P05026	ATP1B1	Sodium/potassium-transporting ATPase subunit beta-1	2,33	2,7054E-05
Q14194	CRMP1	Dihydropyrimidinase-related protein 1	2,33	2,47169E-08
P61981	YWHAG	14-3-3 protein gamma	2,33	5,5099E-07
P51513	NOVA1	RNA-binding protein Nova-1	2,34	1,82808E-07
Q9Y6V0	PCLO	Protein piccolo	2,34	0,029605939
P50990	CCT8	T-complex protein 1 subunit theta	2,35	7,63448E-08
Q13409	DYNC1I2	Cytoplasmic dynein 1 intermediate chain 2	2,35	5,78716E-06
Q5T6W2	HNRNPK	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K	2,36	2,6041E-06
P61764	STXBP1	Syntaxin-binding protein 1	2,36	1,96E-08
P16870	CPE	Carboxypeptidase E	2,37	1,84876E-06
P60709	ACTB	Actin, cytoplasmic 1	2,37	9,79027E-09
Q9H3K2	GHITM	Growth hormone-inducible transmembrane protein	2,38	0,005602989
P04179	SOD2	Superoxide dismutase	2,38	2,24538E-08
Q9Y4I1	MYO5A	Unconventional myosin-Va	2,39	1,94319E-09
Q02246	CNTN2	Contactin-2	2,39	6,0361E-07
Q96JE9	MAP6	Microtubule-associated protein 6	2,39	3,82989E-05
A6NHL2	TUBAL3	Tubulin alpha chain-like 3	2,40	0,038223149
P10636	MAPT	Microtubule-associated protein	2,40	2,22056E-05
Q9BVA1	TUBB2B	Tubulin beta-2B chain	2,40	3,80146E-07
Q9UHY1	NRBP1	Nuclear receptor-binding protein	2,41	2,55601E-08
A6NJ88	SAGE2P	Putative SAGE1-like protein	2,41	0,04840608
O75531	BANF1	Barrier-to-autointegration factor	2,41	3,07578E-05
Q16718	NDUFA5	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 5	2,43	6,81385E-08
P35080	PFN2	Profilin-2	2,44	5,92947E-07
G3V4P8	GMFB	Glia maturation factor beta	2,46	2,83877E-08
Q14141	SEPT6	Septin-6	2,46	1,66971E-07
P06576	ATP5B	ATP synthase subunit beta, mitochondrial	2,47	2,12966E-09
P13861	PRKAR2A	cAMP-dependent protein kinase type II-alpha regulatory subunit	2,47	2,43444E-10
Q13885	TUBB2A	Tubulin beta-2A chain	2,48	3,30425E-07
O00192	ARVCF	Armadillo repeat protein deleted in velo-cardio-facial syndrome	2,49	4,36743E-07
P09936	UCHL1	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase isozyme L1	2,51	1,19423E-07
Q04828	AKR1C1	Aldo-keto reductase family 1 member C1	2,52	2,93005E-07
Q96GE5	ZNF799	Zinc finger protein 799	2,53	0,03951846
O15394	NCAM2	Neural cell adhesion molecule 2	2,53	8,34039E-05
P55290	CDH13	Cadherin-13	2,53	0,000764455
Q9UPY8	MAPRE3	Microtubule-associated protein RP/EB family member 3	2,54	5,25035E-08
P08670	VIM	Vimentin	2,55	9,88177E-08
Q9H0H3	KLHL25	Kelch-like protein 25	2,55	1,91209E-05
Q8WXD2	SCG3	Secretogranin-3	2,55	0,000118398
O75781	PALM	Paralemmin-1	2,55	2,37954E-06
Q9UI15	TAGLN3	Transgelin-3	2,56	8,16117E-09
P49006	MARCKSL1	MARCKS-related protein	2,58	1,60488E-06
P13637	ATP1A3	Sodium/potassium-transporting ATPase subunit alpha-3	2,58	1,43764E-07
O43301	HSPA12A	Heat shock 70 kDa protein 12A	2,59	3,81084E-07
Q9UP83	COG5	Conserved oligomeric Golgi complex subunit 5	2,59	2,41824E-09
P22314	UBA1	Ubiquitin-like modifier-activating enzyme 1	2,59	2,16697E-10
P29966	MARCKS	Myristoylated alanine-rich C-kinase substrate	2,60	2,02082E-06
O15069	NACAD	NAC-alpha domain-containing protein 1	2,63	2,33372E-08
Q76EJ3	SLC35D2	UDP-N-acetylglucosamine/UDP-glucose/GDP-mannose transporter	2,64	0,016354049
Q9HAR2	ADGRL3	Adhesion G protein-coupled receptor L3	2,64	6,41324E-08
Q5SW79	CEP170	Centrosomal protein of 170 kDa	2,65	1,01376E-08
P07900	HSP90AA1	Heat shock protein HSP 90-alpha	2,65	2,36392E-10
Q9Y2J2	EPB41L3	Band 4.1-like protein 3	2,66	1,09035E-08
Q96E17	RAB3C	Ras-related protein Rab-3C	2,66	3,65865E-07

O95861	BPNT1	3'(2'),5'-bisphosphate nucleotidase 1	2,67	1,50949E-08
Q8TDX6	CSGALNACT1	Chondroitin sulfate N-acetylgalactosaminyltransferase 1	2,67	0,00103241
Q9UJQ1	LAMP5	Lysosome-associated membrane glycoprotein 5	2,69	4,45445E-09
P68032	ACTC1	Actin, alpha cardiac muscle 1	2,71	2,00843E-09
P08758	ANXA5	Annexin A5	2,72	4,85074E-08
O15400	STX7	Syntaxin-7	2,73	1,74574E-07
O14910	LIN7A	Protein lin-7 homolog A	2,73	1,08414E-06
Q00839	HNRNPU	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein U	2,73	1,75525E-09
P26232	CTNNA2	Catenin alpha-2	2,77	2,33752E-05
Q99487	PAFAH2	Platelet-activating factor acetylhydrolase 2, cytoplasmic	2,77	1,4261E-06
Q9UH03	SEPT3	Neuronal-specific septin-3	2,79	2,07082E-08
Q9H6K5	PRR36	Proline-rich protein 36	2,80	1,38484E-07
P29762	CRABP1	Cellular retinoic acid-binding protein 1	2,81	9,9176E-10
S4R3C0	N/A	Uncharacterized protein	2,82	8,42013E-05
P04792	HSPB1	Heat shock protein beta-1	2,84	4,31581E-09
P20336	RAB3A	Ras-related protein Rab-3A	2,85	0,000414677
F8VWS7	CNTN6	Contactin-6	2,86	0,020832045
P60880	SNAP25	Synaptosomal-associated protein 25	2,89	6,06246E-07
Q6ZN44	UNC5A	Netrin receptor UNC5A	2,89	0,016654716
P09471	GNAO1	Guanine nucleotide-binding protein G(o) subunit alpha	2,93	3,04393E-06
O94805	ACTL6B	Actin-like protein 6B	2,94	9,87577E-07
Q13367	AP3B2	AP-3 complex subunit beta-2	2,94	2,77856E-08
Q7L099	RUFY3	Protein RUFY3	2,95	2,7016E-10
P63096	GNAI1	Guanine nucleotide-binding protein G(i) subunit alpha-1	2,96	6,09528E-10
P31323	PRKAR2B	cAMP-dependent protein kinase type II-beta regulatory subunit	2,97	3,64215E-08
Q8WXI7	MUC16	Mucin-16	3,01	2,81101E-06
Q5T9B7	AK1	Adenylate kinase isoenzyme 1	3,02	2,37012E-09
P31150	GDI1	Rab GDP dissociation inhibitor alpha	3,03	1,13424E-09
P21579	SYT1	Synaptotagmin-1	3,05	1,08869E-05
Q9UPZ6	THSD7A	Thrombospondin type-1 domain-containing protein 7A	3,05	1,09256E-06
Q99719	SEPT5	Septin-5	3,06	2,16657E-07
Q7L576	CYFIP1	Cytoplasmic FMR1-interacting protein 1	3,16	4,64555E-06
Q8WWI5	SLC44A1	Choline transporter-like protein 1	3,20	0,003500538
Q9H4G0	EPB41L1	Band 4.1-like protein 1	3,22	3,31393E-06
P46821	MAP1B	Microtubule-associated protein 1B	3,23	2,61421E-09
Q15555	MAPRE2	Microtubule-associated protein RP/EB family member 2	3,24	1,92591E-08
Q9NQC3	RTN4	Reticulon-4	3,25	5,77176E-08
Q8WYQ9	ZCCHC14	Zinc finger CCHC domain-containing protein 14	3,26	0,000724437
Q13510	ASAH1	Acid ceramidase	3,29	1,43084E-07
Q93045	STMN2	Stathmin-2	3,30	8,21656E-08
Q7Z2K8	GPRIN1	G protein-regulated inducer of neurite outgrowth 1	3,36	8,24781E-06
Q13509	TUBB3	Tubulin beta-3 chain	3,37	1,41479E-09
P80723	BASP1	Brain acid soluble protein 1	3,38	2,81447E-10
Q13123	IK	Protein Red	3,41	3,06574E-08
P11137	MAP2	Microtubule-associated protein 2	3,43	1,76073E-09
P31949	S100A11	Protein S100-A11	3,43	8,48795E-08
P78310	CXADR	Coxsackievirus and adenovirus receptor	3,44	7,98023E-07
Q16623	STX1A	Syntaxin-1A	3,47	0,017260687
Q8NA03	FSIP1	Fibrous sheath-interacting protein 1	3,54	1,00667E-07
P32004	L1CAM	Neural cell adhesion molecule L1	3,61	1,5869E-06
Q9H115	NAPB	Beta-soluble NSF attachment protein	3,68	3,75435E-09
P13591	NCAM1	Neural cell adhesion molecule 1	3,71	5,28613E-07
P07197	NEFM	Neurofilament medium polypeptide	3,73	1,37636E-08
Q9UHG2	PCSK1N	ProSAAS	3,86	6,30441E-05
P10636	MAPT	Microtubule-associated protein	3,99	8,05193E-05
Q9UPA5	BSN	Protein bassoon	4,01	0,011706064
P09104	ENO2	Gamma-enolase	4,07	6,41286E-07
P17677	GAP43	Neuromodulin	4,23	1,39422E-07
P10645	CHGA	Chromogranin-A	4,31	6,34673E-07
P04350	TUBB4A	Tubulin beta-4A chain	4,53	7,53505E-07
P13591	NCAM1	Neural cell adhesion molecule 1	4,61	2,10081E-08
P07196	NEFL	Neurofilament light polypeptide	4,97	2,28112E-08
O76070	SNCG	Gamma-synuclein	4,99	7,90324E-07
Q9HCM2	PLXNA4	Plexin-A4	5,17	1,88945E-06
P10909	CLU	Clusterin	5,40	4,05262E-08
O60641	SNAP91	Clathrin coat assembly protein AP180	5,81	1,52039E-05
O00370	N/A	LINE-1 retrotransposable element ORF2 protein	8,13	0,042779557
E9PIX5	MS4A12	Membrane-spanning 4-domains subfamily A member 12	8,15	3,69172E-05
Q16352	INA	Alpha-internexin	12,28	1,47193E-08

Apêndice 10: Lista de proteínas que diminuíram sua abundância em neuroesferas cultivadas por 10 dias (diferenciadas).

Código Uniprot	**Gene**	**Descrição**	**Fold Change**	***p* Valor**
O15260	SURF4	Surfeit locus protein 4	0,28	6,09038E-06
O43818	RRP9	U3 small nucleolar RNA-interacting protein 2	0,32	0,000145065
P28799	GRN	Granulins	0,37	0,000882556
Q9UBC3	DNMT3B	DNA (cytosine-5)-methyltransferase 3B	0,38	0,000154846
Q9P2F6	ARHGAP20	Rho GTPase-activating protein 20	0,41	0,001024096
Q12986	NFX1	Transcriptional repressor NF-X1	0,41	0,000141048
Q14691	GINS1	DNA replication complex GINS protein PSF1	0,42	6,08676E-07
P07101	TH	Tyrosine 3-monooxygenase	0,43	0,000260423
P09884	POLA1	DNA polymerase	0,44	9,4296E-06
Q8TAE8	GADD45GIP1	Growth arrest and DNA damage-inducible proteins-interacting protein 1	0,44	9,44364E-05
Q8NEC7	GSTCD	Glutathione S-transferase C-terminal domain-containing protein	0,45	7,19753E-05
Q96MG7	NSMCE3	Non-structural maintenance of chromosomes element 3 homolog	0,46	5,96483E-06
Q9UBM7	DHCR7	7-dehydrocholesterol reductase	0,46	0,000887546
Q8NI36	WDR36	WD repeat-containing protein 36	0,48	1,35097E-05
P09132	SRP19	Signal recognition particle 19 kDa protein	0,49	2,85391E-06
P20265	POU3F2	POU domain, class 3, transcription factor 2	0,50	1,4158E-05
Q96GD4	AURKB	Aurora kinase B	0,50	0,004376715
Q14103	HNRNPD	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein D0	0,50	0,007484686
A0A0B4J1V9	HELLS	Helicase, lymphoid-specific, isoform CRA_b	0,51	4,27892E-06
Q8IY18	SMC5	Structural maintenance of chromosomes protein 5	0,52	5,01528E-07
J3QS41	HELZ	Probable helicase with zinc finger domain	0,52	0,000363193
Q96S94	CCNL2	Cyclin-L2	0,53	0,006667898
Q9HBD4	SMARCA4	SMARCA4 isoform 2	0,53	6,7323E-05
Q9Y5V0	ZNF706	Zinc finger protein 706	0,53	0,001014064
P56377	AP1S2	AP-1 complex subunit sigma-2	0,54	9,0403E-05
Q13813	SPTAN1	Spectrin alpha chain, non-erythrocytic 1	0,54	4,24571E-05
Q9HAU0	PLEKHA5	Pleckstrin homology domain-containing family A member 5	0,55	0,000426116
Q9UNL2	SSR3	Translocon-associated protein subunit gamma	0,55	4,83093E-05
O60293	ZFC3H1	Zinc finger C3H1 domain-containing protein	0,56	0,000519972
P06400	RB1	Retinoblastoma-associated protein	0,56	2,34525E-06
O14757	CHEK1	Serine/threonine-protein kinase Chk1	0,56	2,21872E-06
P20226	TBP	TATA-box-binding protein	0,56	0,002115101
O00755	WNT7A	Protein Wnt-7a	0,56	2,19322E-07
Q86TJ2	TADA2B	Transcriptional adapter 2-beta	0,56	1,29696E-06
O43511	SLC26A4	Pendrin	0,57	5,48289E-05
P01579	IFNG	Interferon gamma	0,57	0,002185407
Q9Y221	NIP7	60S ribosome subunit biogenesis protein NIP7 homolog	0,57	4,94765E-06
O75446	SAP30	Histone deacetylase complex subunit SAP30	0,57	0,000346673
Q92564	DCUN1D4	DCN1-like protein 4	0,57	5,90375E-05
Q6P2H3	CEP85	Centrosomal protein of 85 kDa	0,57	9,96672E-05
P56270	MAZ	Myc-associated zinc finger protein	0,58	0,002163693
Q8NDV7	TNRC6A	Trinucleotide repeat-containing gene 6A protein	0,58	0,007394845
Q92620	DHX38	Pre-mRNA-splicing factor ATP-dependent RNA helicase PRP16	0,58	0,003153954
Q969U7	PSMG2	Proteasome assembly chaperone 2	0,58	0,000101771
Q86WJ1	CHD1L	Chromodomain-helicase-DNA-binding protein 1-like	0,58	2,19617E-05
G5E9D4	ELP4	Elongation protein 4 homolog (S. cerevisiae), isoform CRA_b	0,58	0,00550727
P05114	HMGN1	Non-histone chromosomal protein HMG-14	0,59	0,002541059
Q9Y6A4	CFAP20	Cilia- and flagella-associated protein 20	0,59	0,00069649
Q6UW02	CYP20A1	Cytochrome P450 20A1	0,59	0,000482343
Q14103	HNRNPD	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein D0	0,60	2,41021E-05
Q9UH65	SWAP70	Switch-associated protein 70	0,60	2,01926E-05
Q6NXR4	TTI2	TELO2-interacting protein 2	0,60	0,000518575
Q9ULE6	PALD1	Paladin	0,60	0,030506886
O75157	TSC22D2	TSC22 domain family protein 2	0,60	0,009520527
P82933	MRPS9	28S ribosomal protein S9, mitochondrial	0,60	3,12128E-07
Q9Y606	PUS1	tRNA pseudouridine synthase A, mitochondrial	0,60	1,3292E-05
Q9NX20	MRPL16	39S ribosomal protein L16, mitochondrial	0,61	0,000302459
Q9Y2P8	RCL1	RNA 3'-terminal phosphate cyclase-like protein	0,61	0,000239418
Q12933	TRAF2	TNF receptor-associated factor 2	0,61	2,46562E-05
Q9UBD5	ORC3	Origin recognition complex subunit 3	0,61	0,003299944
Q8N5Y2	MSL3	Male-specific lethal 3 homolog	0,61	0,001781717
P67812	SEC11A	Signal peptidase complex catalytic subunit SEC11A	0,61	0,042500583
Q9H5V9	CXorf56	UPF0428 protein CXorf56	0,61	1,597E-06
B3KME9	DCAF13	DDB1- and CUL4-associated factor 13	0,61	0,000157433
Q9HCE1	MOV10	Putative helicase MOV-10	0,61	5,57161E-06
Q9NVX0	HAUS2	HAUS augmin-like complex subunit 2	0,61	0,001075349
Q6NUQ4	TMEM214	Transmembrane protein 214	0,61	1,8862E-05
Q6NZ67	MZT2B	Mitotic-spindle organizing protein 2B	0,61	0,004881509
Q13427	PPIG	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase G	0,61	9,72013E-05
P17483	HOXB4	Homeobox protein Hox-B4	0,61	1,96141E-05
P55061	TMBIM6	Bax inhibitor 1	0,62	0,001613902
P82921	MRPS21	28S ribosomal protein S21, mitochondrial	0,62	0,000384888
Q9BX10	GTPBP2	GTP-binding protein 2	0,63	9,12844E-06
P84022	SMAD3	Mothers against decapentaplegic homolog 3	0,63	6,52899E-05
Q12830	BPTF	Nucleosome-remodeling factor subunit BPTF	0,63	6,31576E-06

Q9Y4Z0	LSM4	U6 snRNA-associated Sm-like protein LSm4	0,63	0,000102127
Q9Y530	OARD1	O-acetyl-ADP-ribose deacetylase 1	0,63	1,87239E-05
Q12791	KCNMA1	Calcium-activated potassium channel subunit alpha-1	0,63	0,015361589
Q96T37	RBM15	Putative RNA-binding protein 15	0,63	8,99261E-05
O14682	ENC1	Ectoderm-neural cortex protein 1	0,63	7,89094E-06
Q7Z7H8	MRPL10	39S ribosomal protein L10, mitochondrial	0,63	0,000359469
Q9NY12	GAR1	H/ACA ribonucleoprotein complex subunit 1	0,63	6,94757E-05
P42338	PIK3CB	Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit beta isoform	0,63	0,010239763
Q13017	ARHGAP5	Rho GTPase-activating protein 5	0,63	2,19052E-05
Q9BVI4	NOC4L	Nucleolar complex protein 4 homolog	0,63	0,000848005
Q9UNS1	TIMELESS	Protein timeless homolog	0,63	8,77841E-05
Q5BJF6	ODF2	Outer dense fiber protein 2	0,64	0,000730873
Q00325	SLC25A3	Phosphate carrier protein, mitochondrial	0,64	0,000209115
Q96PV6	LENG8	Leukocyte receptor cluster member 8	0,64	0,018780396
Q86US8	SMG6	Telomerase-binding protein EST1A	0,64	5,91751E-06
Q96BZ8	LENG1	Leukocyte receptor cluster member 1	0,64	0,002447955
Q15054	POLD3	DNA polymerase delta subunit 3	0,64	0,00030704
Q9BVC6	TMEM109	Transmembrane protein 109	0,64	0,012352068
Q8N865	C7orf31	Uncharacterized protein C7orf31	0,64	0,007814816
P29084	GTF2E2	Transcription initiation factor IIE subunit beta	0,64	0,009940927
A6NMB9	FIGNL2	Putative fidgetin-like protein 2	0,64	0,013866509
Q9Y5J1	UTP18	U3 small nucleolar RNA-associated protein 18 homolog	0,64	0,003700837
Q9H939	PSTPIP2	Proline-serine-threonine phosphatase-interacting protein 2	0,64	0,001029752
P50914	RPL14	60S ribosomal protein L14	0,64	0,000115871
Q6R327	RICTOR	Rapamycin-insensitive companion of mTOR	0,65	0,01840632
Q9UPN4	CEP131	Centrosomal protein of 131 kDa	0,65	7,86226E-05
Q92979	EMG1	Ribosomal RNA small subunit methyltransferase NEP1	0,65	0,000264097
Q9BWT3	PAPOLG	Poly(A) polymerase gamma	0,65	1,77213E-05
Q8NBM4	UBAC2	Ubiquitin-associated domain-containing protein 2	0,65	9,16823E-07
Q9Y6R4	MAP3K4	Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 4	0,65	0,000213795
Q96MH6	TMEM68	Transmembrane protein 68	0,65	0,002441599
Q9NVM6	DNAJC17	DnaJ homolog subfamily C member 17	0,65	8,04528E-05
Q86VB7	CD163	Scavenger receptor cysteine-rich type 1 protein M130	0,66	0,024187785
O95801	TTC4	Tetratricopeptide repeat protein 4	0,66	1,075E-05
Q52LR7	EPC2	Enhancer of polycomb homolog 2	0,66	0,000805509
Q96HW7	INTS4	Integrator complex subunit 4	0,66	1,84146E-06
H0Y7R1	MYCBPAP	MYCBP-associated protein	0,66	0,012307744
P56282	POLE2	DNA polymerase epsilon subunit 2	0,66	0,015387798
Q5C9Z4	NOM1	Nucleolar MIF4G domain-containing protein 1	0,66	0,00196684
Q8TED0	UTP15	U3 small nucleolar RNA-associated protein 15 homolog	0,66	0,000314277
P62318	SNRPD3	Small nuclear ribonucleoprotein Sm D3	0,66	1,91727E-05
Q96D46	NMD3	60S ribosomal export protein NMD3	0,66	0,000312557
Q8IZ73	RPUSD2	RNA pseudouridylate synthase domain-containing protein 2	0,66	0,000105165
Q14CX7	NAA25	N-alpha-acetyltransferase 25, NatB auxiliary subunit	0,66	6,21368E-06
P49642	PRIM1	DNA primase small subunit	0,66	0,004563907
Q96PM9	ZNF385A	Zinc finger protein 385A	0,66	4,23544E-05
Q5T160	RARS2	Probable arginine--tRNA ligase, mitochondrial	0,66	0,000153228
P07996	THBS1	Thrombospondin-1	0,66	0,0001136
O95999	BCL10	B-cell lymphoma/leukemia 10	0,67	0,001707813
Q9NRP0	OSTC	Oligosaccharyltransferase complex subunit OSTC	0,67	0,041787879
Q9BXF3	CECR2	Cat eye syndrome critical region protein 2	0,67	0,00047131
Q9BQE5	APOL2	Apolipoprotein L2	0,67	1,45399E-05
O95159	ZFPL1	Zinc finger protein-like 1	0,67	0,000113489

Apêndice 11: Submissão do artigo ao Jornal *EuPA Open Proteomics*.

Manuscript Details

Manuscript number	EUPROT_2016_19
Title	Quantitative proteomic analysis identifies proteins and pathways related to neuronal development in differentiated SH-SY5Y neuroblastoma cells.
Article type	Full length article

Abstract

SH-SY5Y neuroblastoma cells are susceptible to differentiation using retinoic acid (RA) and brain-derived neurotrophic factor (BDNF), providing a model of neuronal differentiation. We compared SH-SY5Y cells proteome before and after RA/BDNF treatment using iTRAQ and phosphopeptide enrichment strategies. We identified 5587 proteins, 366 of them with differential abundance. Differentiated cells expressed proteins related to neuronal development, and, undifferentiated cells expressed proteins involved in cell proliferation. Interactive network covered focal adhesion, cytoskeleton dynamics and neurodegenerative diseases processes and regulation of mitogen-activated protein kinase-related signaling pathways; key proteins involved in those processes might be explored as markers for neuronal differentiation.

Keywords	SH-SY5Y cells; iTRAQ-based proteomics; neuronal differentiation; phosphoproteomics
Corresponding Author	Magno Junqueira
Corresponding Author's Institution	Proteomics Unit, Chemistry Institute, Federal University of Rio de Janeiro
Order of Authors	Jimmy Rodriguez Murillo, Livia Goto-Silva, Aniel Sánchez, Fábio CS Nogueira, Gilberto B Domont, Magno Junqueira
Suggested reviewers	Vitor Marcel Faça, Solange Serrano, Daniel Martins

Submission Files Included in this PDF

File Name [File Type]

cover letter EuPA.docx [Cover Letter]

Disclosure Domont G.pdf [Conflict of Interest]

Disclosure Goto Silva L.pdf [Conflict of Interest]

Disclosure Junqueira M.pdf [Conflict of Interest]

Disclosure Nogueira F.pdf [Conflict of Interest]

Disclosure Rodriguez J.pdf [Conflict of Interest]

Disclosure Sanchez A.pdf [Conflict of Interest]

Manuscript J Rodriguez et al 2016 EuPA.docx [Manuscript File]

Submission Files Not Included in this PDF

File Name [File Type]

Data in Brief.zip [Data in Brief]

To view all the submission files, including those not included in the PDF, click on the manuscript title on your EVISE Homepage, then click 'Download zip file'.