



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA

Centro de Ciências Biológicas

Graduação em Ciências Biológicas

Laboratório de Imunobiologia

Francisco Domiciano de Bem

**PROTEÍNAS QUE INTERAGEM COM O RNA DE *DENGUE*
VIRUS E SUA EXPRESSÃO EM PACIENTES COM DENGUE
CLÁSSICA E SÍNDROME DO CHOQUE DE DENGUE**

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao Curso de Ciências Biológicas, Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Santa Catarina, como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas, sob orientação da Prof^o. Dr^o. Daniel Santos Mansur

Florianópolis, 2017

Francisco Domiciano de Bem

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Bem, Francisco Domiciano de
PROTEÍNAS QUE INTERAGEM COM O RNA DE DENGUE VIRUSE SUA
EXPRESSÃO EM PACIENTES COM DENGUE CLÁSSICA E SÍNDROME DO
CHOQUE DE DENGUE / Francisco Domiciano de Bem ;
orientador, Daniel Santos Mansur, 2017.
61 p.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) -
Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências
Biológicas, Graduação em Ciências Biológicas, Florianópolis,
2017.

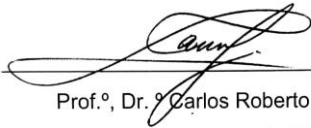
Inclui referências.

1. Ciências Biológicas. 2. Big data. 3. Dengue. 4.
Interferon. 5. SHMT1. I. Mansur, Daniel Santos. II.
Universidade Federal de Santa Catarina. Graduação em
Ciências Biológicas. III. Título.

**PROTEÍNAS QUE INTERAGEM COM O RNA DE *DENGUE*
VIRUSE SUA EXPRESSÃO EM PACIENTES COM DENGUE
CLÁSSICA E SÍNDROME DO CHOQUE DE DENGUE**


Este Trabalho de Conclusão de Curso foi julgado adequado para obtenção do título de bacharel em Ciências Biológicas, e aprovado em sua forma final pelo Curso de Ciências Biológicas.

Florianópolis, 24 de novembro de 2017



Prof.º, Dr.º Carlos Roberto Zanetti
COORDENADOR DO CURSO

Banca Examinadora:



Prof.º, Dr.º Daniel Santos Mansur
PRESIDENTE DA BANCA



Prof.º, Dr.º José Henrique Maia Campos de Oliveira
MEMBRO TITULAR



Dr.º Edgar Ernesto Gonzalez Kozlova
MEMBRO TITULAR

AGREDECIMENTOS

Primeiramente, aos meus pais, Aurélio e Malvina, por todo o apoio incondicional e compreensão.

Aos meus irmãos, Daniel e Marcelo, por todo o apoio e ajuda quando eu precisei.

Ao meu orientador, Prof^o. Dr^o. Daniel Santos Mansur, pelo convite para fazer parte do laboratório, ajuda em planejar e discutir experimentos e resultados, e pelas piadas.

A Dr^a Constanza Espada, Msc. Adara Áurea e Msc Daniel Patrício, por toda a ajuda a planejar, acompanhar e discutir os resultados dos experimentos.

A todos que fazem ou fizeram parte do laboratório, por sempre estarem disponíveis e terem paciência para ajudar com qualquer coisa.

Ao Dr^o Edgar Kozlova, pela ajuda em analisar os dados e por ter aceitado ser da minha banca.

Ao Dr^o José Henrique de Oliveira, por ter aceitado o convite para ser da minha banca

Aos meus amigos da graduação, Flávia e Camila, que sempre estiveram disponíveis para me ajudar e contar piadas sem graça.

Aos amigos que fiz na Simbiosis, em especial a Ana Schenkel.

A todos os meus amigos, por sempre ajudarem em qualquer coisa.

A CAPES, por ter concedido primeiro a bolsa de Graduação Sanduíche/EUA e depois pela bolsa de Iniciação Científica.

E a todos que de alguma forma ajudaram na realização desse trabalho.

RESUMO

Com a popularização de técnicas capazes de gerar dados em larga escala, é cada vez mais comum a existência de dados não analisados disponíveis em bancos de dados. O transcriptoma é uma forma de analisar a expressão gênica global em uma amostra. Essa técnica é amplamente utilizada para analisar os genes diferencialmente transcritos durante uma infecção. O vírus da Dengue (DV) pertence à família *Flaviviridae* e infecta por volta de 390 milhões de pessoas a cada ano. A replicação de DV é restringida pelos interferons do tipo um (IFN-I), mas os mecanismos que levam a essa inibição da replicação viral não são totalmente entendidos. Combinando proteômica quantitativa e precipitação de RNA definimos 64 proteínas que interagem com DV 1 e 4 UTR's em células HEK tratadas com IFN-I. Nesse trabalho exploramos a expressão desses genes em transcriptomas de sangue total de pacientes Vietnamitas (GSE25001) e Tailandeses (GSE51808) disponíveis no *Gene Expression Omnibus*. Os pacientes foram estratificados de acordo com os sintomas que apresentavam, sendo eles: febre da dengue clássica (DF), dengue hemorrágica (DSS), convalescentes e controle saudável (HC). Desses genes, selecionamos as proteínas ITLN1, NME1-NME2, TRUB1 e PSME1 para estudar seu perfil de expressão em resposta a infecção e sua função pela literatura, e escolhemos a SHMT1 e LSMA14A para um estudo em células A549. SHMT1 (serinametiltransferase 1) é uma enzima responsável por transformar serina e tetrahidrofolato em glicina e 5,10-metilenotetrahidrofolato no citoplasma. LSMA14A foi mostrada ser um sensor para infecções por vírus com genoma de RNA ou DNA. ITLN1, NME1-NME2, PSME1, SHMT1 E LSM14A são diferencialmente expressas entre HC e as duas condições infectadas (DF e DSS) enquanto TRUB1 apresentou diferença somente entre DSS e HC. ITLN1, NME1-NME2 e TRUB1 parecem estar suprimidos durante a infecção. A seguir testamos se a infecção por DV-4 era suficiente para induzir a expressão de SHMT1 e LSM14A *in vitro*. LSM14A, mas não SHMT1, foi induzido nessas condições. Em resumo, foram encontradas 25 proteínas que interagem com DV-4 e estavam diferencialmente

expressas, dessas somente LSM14A foi induzida quando testada em células A549.

Palavras-chave: *Big data*; Dengue; Interferon; SHMT1; LSM14A.

ABSTRACT

With the popularization of techniques that generate data in a large scale, there are many unanalyzed data available in databases. The transcriptome is a technique to analyze gene expression profile in a sample. This method is widely used to analyze differentially transcribed genes in an infection. *Dengue virus* (DV) belongs to *Flaviviridae* family and infects around 390 million people every year. DV replication is restricted by type one interferons (IFN-I), but the mechanisms that lead to inhibition of viral replication are not fully understood. Combining SILAC (stable isotope labeling by/with amino acids in cell culture) quantitative proteomics and RNA pulldowns, we defined 64 proteins that interacted with DV 1 and 4 UTRs in IFN-I treated HEK cells. In this study, we explored the expression of those genes in whole blood transcriptome from Vietnamese (GSE25001) and Thai (GSE51808) patients with dengue fever (DF), dengue shock syndrome (DSS), convalescent and healthy controls (HC), available in Gene Expression Omnibus (GEO). From these genes differentially expressed, was selected the following proteins ITLN1, NME1-NME2, TRUB1 e PSME1 to study the expression profile in response to an infection and its function through the literature, and chose SHMT1 e LSM14A to study in A549 cells. SHMT1 (serine hydroxymethyltransferase 1) is an enzyme responsible to catalyzes the reversible conversion of serine and tetrahydrofolate to glycine and 5,10-methylenetetrahydrofolate in the cytoplasm. LSM14A was shown to be a sensor for RNA or DNA during viral infection. ITLN1, NME1-NME2, PSME1, SHMT1 E LSM14A were differentially expressed between HC and both infected conditions (DF and DSS), while TRUB1 showed difference between HC – DSS. ITLN1, NME1-NME2 e TRUB1 appears to be suppressed during an infection. Next, was tested whether DV-4 infection was sufficient to induce the expression of SHMT1 and LSM14A in vitro. LSM14A, but not SHMT1, was induced in these conditions. In summary, was found 25 proteins that interacts with DV-4 in the antiviral state and are differentially expressed, from these proteins, only LSM14A was induced when tested A549 cells.

Keywords: Big data; Dengue; Interferon; SHMT1; LSM14A

Lista de Figuras

Figura 1- Diagrama de Venn representando os genes diferencialmente expressos entre as condições dos pacientes do Vietnã.....	33
Figura 2- Diagrama de Venn representando os genes diferencialmente expressos entre as condições dos pacientes do Tailândia.....	34
Figura 3 - Diagrama de Venn mostrando os transcritos compartilhados no pulldown e no transcriptoma dos residentes do Vietnã.....	35
Figura 4 – Análise dos transcritos HNRNPAB (A), HNRNPA1 (B), SRSF10 (C), VARS (D), PUM2 (E) e TARBP2 (F) dos residentes do Vietnã e Tailândia. A normalização foi realizada pelo número de reads. Teste t relativo aos pacientes saudáveis em relação aos infectados DF e DSS (** $p < 0,001$))......	37
Figura 5- Análise dos transcritos LIN18B (A), PYM1 (B), YARS (C), ADAR (D), DDX6 (E) e MSI2 (F) dos residentes do Vietnã e Tailândia. A normalização foi realizada pelo número de reads. Teste t relativo aos pacientes saudáveis em relação aos infectados DF e DSS (** $p < 0,001$))......	39
Figura 6- Análise dos transcritos APMAP (A), EWSR1 (B), DNAJC1 (C), RCC2 (D), CNOT4 (E), SPAG5 (F) e TXLNA (G) dos residentes do Vietnã e Tailândia. A normalização realizada pelo número de reads. Teste t relativo aos pacientes saudáveis em relação aos infectados DF e DSS(** $p < 0,001$, ** $p = 0,0012$))......	41
Figura 7- Análise dos transcritos ITLN1 (A), NME1-NME2 (B), TRUB1 (C),PSME1 (D),SHMT1 (E) e LSM14A (F) dos residentes do Vietnã e Tailândia. A normalização foi realizada pelo número de reads. Teste t relativo aos pacientes saudáveis (** $p < 0,001$))......	43
Figura 8- Expressão relativa do gene SHMT1 de células A549 infectadas com Dengue vírus nos tempos de 12 e 24 horas após a infecção. NI: células A549 não infectadas; VSV inat: células A549 infectadas com VSV vírus inativado por 45 minutos em luz Ultravioleta. O gráfico de barras é representativo de um experimento. Cada condição teve um cDNA. O gene de controle foi o 18S e o seu CT de amplificação foi 8,43.	45

Figura 9 - Expressão relativa do gene SHMT1 de células A549 infectadas com Dengue vírus nos tempos de 12 e 24 horas após a infecção. NI: células A549 não infectadas; VSV inat: células A549 infectadas com VSV vírus inativado por 45 minutos em luz Ultravioleta. O gráfico de barras é representativo de um experimento..... 45

Lista de Tabelas

Tabela 1 - Extração de RNA total pelo kit RNeasy (Qiagen) e posterior mensuração da quantidade e qualidade pelo equipamento NanoDrop (Thermo).	29
Tabela 2 - Descrição dos dados da coorte analisada no transcriptoma de pacientes infectados com Dengue residentes no Vietnã.....	32

Lista de Abreviaturas

µg - Micrograma

µL - Microlitro

A549 – Células epiteliais de carcinoma de pulmão humano

CO₂ – Gás Carbônico

CONV – Convalescente

CT - Unidade de crescimento e terminação

DH – Dengue Normal

DMEM - Dulbecco's modified Eagle medium

DNA – Ácido desoxirribonucleico

DSS – Dengue Hemorrágica

DV – Dengue vírus

GEO – Gene Expression Browser

HC – Controle Saudável

HD – Hard driver

miRNA – micro Ácido ribonucleico

mL - Mililitro

mRNA – Ácido ribonucleico mensageiro

NCBI – National Center for Biotechnology Information

NIH – National Institute of Health

PRR – Receptor de Reconhecimento de Padrão

qPCR – Reação em cadeia da polimerase quantitativo

RNA – Ácido ribonucleico

RT – Transcrição reversa

SFB – Soro fetal bovino

TLR – Toll Like Receptor

Sumário

1. INTRODUÇÃO.....	21
1.1 Dengue Vírus (DV).....	23
2. OBJETIVOS	25
2.1 Objetivo Geral	25
2.2 Objetivos Específicos.....	25
3. METODOLOGIA.....	27
3.1 Normalização dos Transcriptomas	27
3.2 Expressão gênica por qPCR	28
3.2.1 Extração de RNA Total	29
4. RESULTADOS	31
4.1 Proteínas que interagem com Dengue.....	31
4.2 Análise dos Transcriptomas	31
4.2.1 Descrição dos pacientes.....	31
4.3 Expressão dos genes	32
4.4 Análise dos genes compartilhados entre os Transcriptomas e o pulldown	34
4.4.1 Análise dos transcritos compartilhados entre os transcriptomas e o pulldown	35
4.5 Análise da expressão relativa dos genes SHMT1 e LSM14A em células A549 infectadas com Dengue vírus.....	44
4.5.1 qPCR.....	44
5. DISCUSSÃO.....	47
6. CONCLUSÃO.....	51
REFERÊNCIAS	52
APÊNDICE A – Código de programação utilizado para a normalização	57

ANEXO A – Proteínas identificadas no pulldown	63
---	----

1. INTRODUÇÃO

Atualmente uma grande quantidade de dados de genômica, transcriptômica, proteômica e metabolômica tem sido gerados por cientistas em diversos centros de pesquisa ao redor do mundo. A revolução do “*big data*” (expressão em inglês para a grande quantidade de dados gerada) está pautada em “três Vs”: volume de dados, velocidade de processamento e variabilidade das fontes de dados (SCHULTZE, 2015). Estima-se que hoje existam mais de 2500 máquinas especializadas na geração desses dados, espalhadas por mais de 1000 centros de pesquisa em 55 países (STEPHENS *et al*, 2015). Embora o avanço tecnológico tenha permitido a geração de um grande volume de dados, a análise, o armazenamento e processamento ainda são um desafio. Estratégias para solucionar esses problemas são constantemente desenvolvidas, no entanto, tornam-se rapidamente obsoletas devido à velocidade que novos dados são gerados (STEPHENS *et al*, 2015).

Para armazenar essa grande quantidade de dados foram criados centros de arquivamento. O mais conhecido é o Sequence Read Archive (SRA) administrado pelo Center for Biotechnology Information do National Health Institute National (NIH/NCBI) nos Estados Unidos. Atualmente esse centro armazena mais de 5 petabases de sequências. Para isso, são necessários aproximadamente 20 petabytes de espaço, o que corresponde a 20 mil terabytes ou 20 mil HDs de 1 terabyte cada (STEPHENS *et al*, 2015). Se a geração de dados continuar como está hoje, dobrando a cada sete meses, nos próximos anos podemos atingir a quantidade de exabases. Porém, algumas estimativas mais conservadoras acreditam que a quantidade de dados gerados irá diminuir e iremos atingir essa quantidade de informação entre 2020 e 2025 (STEPHENS *et al*, 2015).

Os maiores responsáveis pelo *big data* são os grandes projetos de sequenciamento, como o 1000 *Genomes*, que tem como objetivo sequenciar 1000 genomas completos de humanos (STEPHENS *et al*, 2015). Existem ainda projetos mais ousados, como os da Inglaterra e Arábia Saudita que planejam sequenciar 100 mil genomas de seus cidadãos. Além desses países, China e Estados Unidos planejam sequenciar 1 milhão de genomas

humanos. Na Islândia, um terço da população já doou sangue para um futuro sequenciamento (EISENSTEIN, 2015).

A geração de *big data* não se restringe apenas aos sequenciamentos, hoje em dia existem muitas técnicas que analisam os transcritos (transcriptoma), metabólitos (metabólica) e várias outras estruturas presentes na célula (ADAMS, 2008). O corpo humano é composto por diversos tipos celulares e nem sempre o mesmo gene é transcrito em diferentes células. Uma forma de analisar isso é pelo transcriptoma, quando podemos avaliar diferentes genes em uma célula (ADAMS, 2008). Essa técnica tem sido muito utilizada por imunologistas para analisar a resposta dos transcritos envolvidos com o sistema imune perante a infecção por diferentes patógenos, como vírus por exemplo. (ADAMS, 2008).

A primeira resposta do sistema imunológico contra uma infecção viral é o reconhecimento das partículas virais pelo sistema imune inato (TAKEUCHI; AKIRA, 2010). Esse reconhecimento acontece pelas estruturas conhecidas como Receptores de Reconhecimento de Padrão (PRR) (TAKEUCHI; AKIRA, 2010). Um dos PRRs envolvidos no reconhecimento do RNA viral são os receptores endossomais da família do tipo Toll (TLR) e os receptores citosólicos do tipo RIG-I e MDA5 (TAKEUCHI; AKIRA, 2010. BARBALAT *et al.*, 2011). Esses receptores levam a ativação de proteínas adaptadoras que resultam no acionamento das quinases TBK1 e IKK β , levando a fosforilação do *Interferon Regulatory Factor 3* (IRF3) e do fator nuclear kappa B (NF- κ B), os quais induzem a transcrição dos genes estimulados por interferon (ISGs), com isso, combatendo a infecção (TAKEUCHI; AKIRA, 2010. BARBALAT *et al.*, 2011).

O reconhecimento do DNA viral ainda é um desafio para os sensores de DNA, pois existe pouca diferença entre o DNA viral e o celular (CROW *et al.*, 2015. MANSUR; SMITH; FERGUNSON, 2014). Porém, alguns sensores conseguem diferenciar algumas características de DNA viral, como sequências não metiladas de citosina-fosfato-guanina (CpG) e regiões com grandes quantidades de Adenina-Timina (AT). Alguns desses receptores são os da família do tipo Toll, que conseguem fazer esse reconhecimento por meio de CpG (TAKESHITA *et al.*, 2001). Além dos TLRs, outros receptores

servem como sensores de infecção por DNA virais, como a RNA polimerase III, que se liga a regiões com grandes quantidades de AT (CROW *et al.*, 2015. TAKESHITA *et al.*, 2001. ABLASSER *et al.*, 2009).

1.1 Dengue Vírus (DV)

Os vírus são classificados em sete grupos divididos pelo tipo de ácido nucléico que eles carregam (BALTIMORE, 1971). Um dos grupos é o de RNA de fita simples senso positivo. Nesse grupo encontramos a família *Flaviviridae* e os vírus que compõem essa família são os vírus da Dengue (DV), Febre Amarela e outros (BALTIMORE, 1971). Estima-se que o DV seja responsável pela infecção de 390 milhões de indivíduos anualmente (BHATT *et al.*, 2013). A infecção por esse vírus pode ocasionar Febre (DF) e Dengue Hemorrágica (DSS) (SIMMONS *et al.*, 2012). A DH/DSS é caracterizada por um grande vazamento vascular sistêmico, trombocitopenia e algumas manifestações hemorrágicas (SIMMONS *et al.*, 2012). A replicação do DV ocorre no citoplasma quando o RNA viral é liberado e assim se transformando em um mRNA que será traduzido pela maquinaria de replicação da própria célula (SCREATON *et al.* 2015). Com isso, será gerada uma poliproteína que depois será clivada em proteínas virais, sendo uma parte estrutural e outra não estrutural (SCREATON *et al.* 2015). Após isso, o RNA viral será replicado e empacotado, para ser liberado no meio extracelular (BALTIMORE, 1971. SCREATON *et al.* 2015).

Este trabalho se justifica devido a necessidade de utilizar dados de transcriptoma depositados no *Gene Expression Browser* (GEO) para descobrir novos transcritos que podem influenciar na infecção viral. Atualmente, já existe uma grande quantidade de transcritos descritos como relevantes na resposta antiviral do hospedeiro, porém os mecanismos envolvidos em algumas doenças ainda não são completamente entendidos. Ainda, como diversos vírus possuem vias alternativas para infecção, o entendimento desses transcritos pode levar à descoberta de novas vias de resposta a infecção. As proteínas identificadas são pouco estudadas e seus papéis na infecção

precisam ser esclarecidos. O vírus da Dengue é um dos principais arbovirus e sua infecção em humanos não é completamente entendida, por isso esse vírus foi escolhido como modelo de infecção.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Análise do perfil de expressão de genes por transcriptoma de pacientes com Dengue Clássica e Hemorrágica e quais proteínas interagem com *Dengue virus* pela técnica de proteômica.

2.2 Objetivos Específicos

- a) Analisar proteínas que interagem com Dengue.
- b) Analisar genes diferencialmente expressos com o intuito de descobrir novos sensores para infecção por Dengue.
- c) Analisar a expressão do gene LSM14A e SHMT1 em células de linhagem do tipo A549, infectadas por DV, pela técnica de RT-qPCR.

3. METODOLOGIA

3.1 Normalização dos Transcriptomas

Foram encontrados dois transcriptomas no *Gene expression Browser* de sangue total de pacientes infectados por Dengue. Os dados com número de acesso GSE25001, são de pacientes infectados com sorotipo 1 e/ou 2 de Dengue. As amostras foram coletadas no *Hospital for Tropical Disease*, na cidade de *Ho Chi Minh*, no Vietnã. As condições dos pacientes foram de DF (Dengue febre) ou DH/DSS (Dengue hemorrágica). As amostras do transcriptoma com número de acesso GSE51808 foram coletadas em Bangkok, Tailândia, no hospital *Siriraj*. Foram coletadas amostras de sangue de pacientes saudáveis (HC), com febre (DF), dengue hemorrágica (DSS) e convalescente. Para a normalização dos dados foi utilizado o software R. A normalização foi feita por pelo número de *reads* de cada gene. Os pacotes utilizados foram Biobase, GEOquery, limma, hgu95av2cdf, hgu95av2cdf e gplots. O código de programação utilizado está disponível no apêndice A.

Quando o gene de interesse apresentou mais de uma sonda, primeiramente foi analisado a sequência da sonda e se todas transcreviam a proteína completa. Se a sequência não estava disponível no transcriptoma, foi realizada a média aritmética entre as sondas.

Após a normalização, os pacientes saudáveis da Tailândia foram selecionados e comparados com os pacientes com infecção do Vietnã. A análise estatística foi realizada utilizando o Teste t de student, as amostras continham variâncias desiguais e $p < 0,05$ para amostras estatisticamente diferentes.

As funções das proteínas foram acessadas no banco de dados do software Uniprot.

3.2 Expressão gênica por qPCR

Para avaliar a expressão dos genes LSM14A e SHMT1, foram utilizadas células da linhagem A549 (ATCC CRL-185 – GIARD et. al., 1973). Essas células são derivadas de tecidos epiteliais do pulmão, extraídas de um carcinoma. As células foram cultivadas em meio DMEN-F12 (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*; Thermo) suplementado com L-glutamina (2 mM – Thermo), penicilina (200 µg/mL – Thermo), estreptomicina (200 µg/mL – Thermo) e 10% de soro fetal bovino (SFB – Thermo). Foram semeadas 3×10^5 células por poço, em uma placa contendo 6 poços. Para cada poço infectado havia um poço de controle. As células foram mantidas em 1 ml de meio DMEN-F12, em estufa úmida a 37°C e CO₂ 5%.

Para a infecção por DV foi utilizado a multiplicidade de infecção (MOI) de 1. Para o procedimento de infecção, primeiramente, o meio de cultura foi retirado e as células foram lavadas uma vez com salina à 37°C. Em seguida, as células foram incubadas com meio de cultura contendo o vírus. Para as células que foram utilizadas como controle, foi utilizada a mesma quantidade de meio, porém sem o vírus. As células foram incubadas por 1 h e 30 min em estufa úmida. Após esse período o sobrenadante foi removido e as células foram lavadas com salina e em seguida incubadas em 0,7 ml de meio de cultura por poço. O RNA total das células foi extraído em dois tempos de coleta diferentes 12 e 24 h. Para a extração foram adotados os seguintes procedimentos: após a retirada do meio de cultura as células foram lavadas e tripsinizadas; os sobrenadantes e as células retirados dos poços infectados foram centrifugados a 3000 rotações por minuto (rpm) por 5 minutos na temperatura de 4 °C e 2000 rpm por 5 minutos em temperatura ambiente, respectivamente e em seguida foram colocados em microtubos de 1,5 ml. Após a centrifugação, o sobrenadante das células foi retirado e adicionado tampão de lise RTL do kit *RNeasy* (Qiagen) para extração do RNA total. A extração foi realizada de acordo com o protocolo fornecido pelo fabricante (tabela 1).

Para a obtenção do cDNA necessário para a reação de qPCR, foi realizada a reação de transcrição reversa do RNA extraído das células. Foram utilizados 850ng do mRNA extraído das células. O cDNA foi gerado utilizando o kit *RT-PCR High*

Capacity Reverse Transcriptase (Thermo) seguindo o protocolo fornecido pelo fabricante. Por fim, o cDNA foi diluído em uma razão de 1:2 em água nuclease free (Thermo).

Na reação de qPCR foi utilizado o *GoTaq® qPCR Master Mix* (Promega), seguindo o protocolo descrito pelo fabricante, com volume final de 10 µL. Para fim de comparação, foi utilizado como controle endógeno o gene 18s. Para calcular a expressão relativa foi usada a fórmula $2^{-\Delta\Delta Ct}$, onde: $-\Delta\Delta Ct = -[(Ct \text{ gene alvo} - Ct \text{ endógeno}) \text{ amostra analisada}] - [(Ct \text{ gene alvo} - Ct \text{ endógeno}) \text{ amostra normalizadora}]$. As mudanças na expressão de mRNA foram mostradas como expressão relativa ao controle. Os valores foram expressos como a média da duplicata técnica.

3.2.1 Extração de RNA Total

A extração de RNA foi realizada e foram obtidos RNAs com a razão 260/280 acima de 2. A quantidade de RNA foi a necessária para a realização dos experimentos.

Tabela 1- Extração de RNA total pelo kit RNeasy (Qiagen) e posterior mensuração da quantidade e qualidade pelo equipamento NanoDrop (Thermo).

Amostras	ng/ul	260/280	260/230
NI12 1908	61,73	2,09	0,51
DV4 12 1908	108,59	2,08	2,2
DV4 24 1908	79,04	2,14	0,21
VSVI 12 1908	82,76	2,07	0,64

3.3 Gene Ontology

A análise de *Gene Ontology* foi realizada através da plataforma *Gene Ontology Consortium*, acessado pelo link <http://www.geneontology.org/page/go-enrichment-analysis>.

4. RESULTADOS

4.1 Proteínas que interagem com Dengue

Em um experimento anterior em nosso laboratório, células HEK foram tratadas com Interferon tipo I, depois transfectadas com uma construção contendo o gene repórter (renilla) precedido pelos 66 primeiros nucleotídeos da proteína do capsídeo de Dengue 1 e 4 flanqueado pelas porções 5' UTR e 3' UTR do vírus. Após esse procedimento foi feito um *pulldown* para identificar as proteínas que interagiram com essa região. O resultado mostrou 64 proteínas interagindo com o RNA do vírus (Anexo A).

4.2 Análise dos Transcriptomas

4.2.1 Descrição dos pacientes

O transcriptoma dos pacientes do Vietnã é composto por 209 amostras, sendo dividido em duas condições: Dengue Febre (DF) e Dengue Hemorrágica (DSS) (Tabela 2). Do total de pacientes analisados, 127 eram homens e 79 mulheres, sendo que três pacientes não tiveram o seu sexo identificado. Do total de pacientes, na condição DF, 81 eram homens e 51 mulheres. Na DSS 46 eram homens e 28 mulheres. A mediana da idade para os pacientes com a condição DF foi de 11 anos, com uma variação entre 2 e 29 anos. Já para o outro grupo, a mediana foi 10, com idades entre 2 e 30 anos. Foram identificados os sorotipos 1 e 2 nesses pacientes.

O grupo de indivíduos que apresentou febre estava em sua maioria infectado com Dengue sorotipo 1 (100 indivíduos). Trinta pacientes apresentaram infecção pelo sorotipo 2 e dois apresentaram infecção por ambos os sorotipos (1 e 2). O sorotipo 1 também foi mais presente nos pacientes com choque (56) enquanto apenas 15 pacientes apresentaram infecção por Dengue do sorotipo 2 e nenhum indivíduo apresentou infecção

por mais de um sorotipo. A mediana dos dias que os pacientes ficaram doentes foi de 5 dias para DF (0-10) e 5,5 para DSS (2-12). Nas duas condições alguns pacientes ainda estavam em tratamento, 18 para DSS e 13 para DF (Tabela 3).

Tabela 2 - Descrição dos dados da coorte analisada no transcriptoma de pacientes infectados com Dengue residentes no Vietnã.

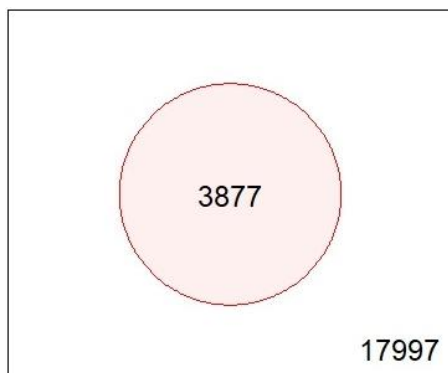
	DF	DSS
Gênero	81 H/51 M (132)	46 H/28 M (74)
Idade	11 (2-29)	10 (2-30)
Sorotipo	1 (100), 2 (30) e 1-2 (2)	1 (56) e 2 (15)
Quantidade de dias doente	5,5 (0-10)	5 (2-12)

O transcriptoma dos residentes da Tailândia não disponibilizou os dados da coorte.

4.3 Expressão dos genes

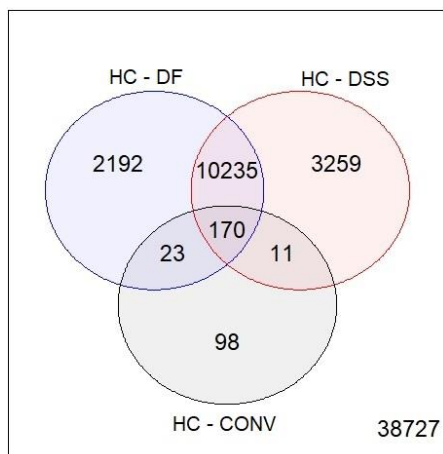
Através da análise do transcriptoma dos residentes no Vietnã foi possível identificar 21874 sondas. Dessas sondas, foram encontrados 3877 genes que estavam diferencialmente expressos, quando comparado as outras condições dos pacientes (DF e DSS) e 17997 genes que não apresentaram diferença significativa nos níveis de expressão independente da condição dos pacientes (Figura 1).

Figura 1- Diagrama de Venn representando os genes diferencialmente expressos entre as condições dos pacientes do Vietnã.



No transcriptoma dos residentes na Tailândia, foram analisadas 54715 sondas. Os pacientes foram divididos em 4 grupos: Dengue Febre (DF), Dengue Hemorrágica (DSS), Convalescente (CONV) e Controle Saudável (HC). 38727 sondas não foram diferencialmente expressas quando analisadas nas diferentes condições. 12620 sondas foram diferencialmente expressas quando pacientes saudáveis foram comparados a pacientes que apresentaram apenas febre. Quando comparados com pacientes que tiveram choque, 13675 sondas apresentaram diferença significativa. Comparando DF e DSS encontramos 10235 sondas que apresentaram diferença na expressão. Utilizando os dados dos pacientes convalescentes e saudáveis, foram encontradas somente 302 sondas com diferença significativa. Comparando os dados dos pacientes convalescente com DF e DSS, o número de sondas diferencialmente expressas foi de 23 e 11, respectivamente. Utilizando os dados de todas as condições, encontramos 170 sondas que apresentaram diferença significativa entre as condições dos pacientes (Figura 2).

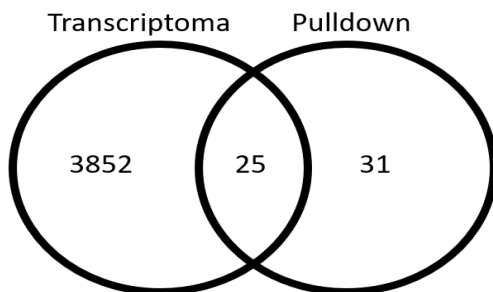
Figura 2- Diagrama de Venn representando os genes diferencialmente expressos entre as condições dos pacientes do Tailândia.



4.4 Análise dos genes compartilhados entre os Transcriptomas e o pulldown

Comparando os dados obtidos no transcriptoma dos residentes do Vietnã com o resultado obtido no pulldown, foram encontradas 25 proteínas que interagem com dengue no estado antiviral e estão diferencialmente expressos no transcriptoma.

Figura 3 -Diagrama de Venn mostrando os transcritos compartilhados no pulldown e no transcriptoma dos residentes do Vietnã.

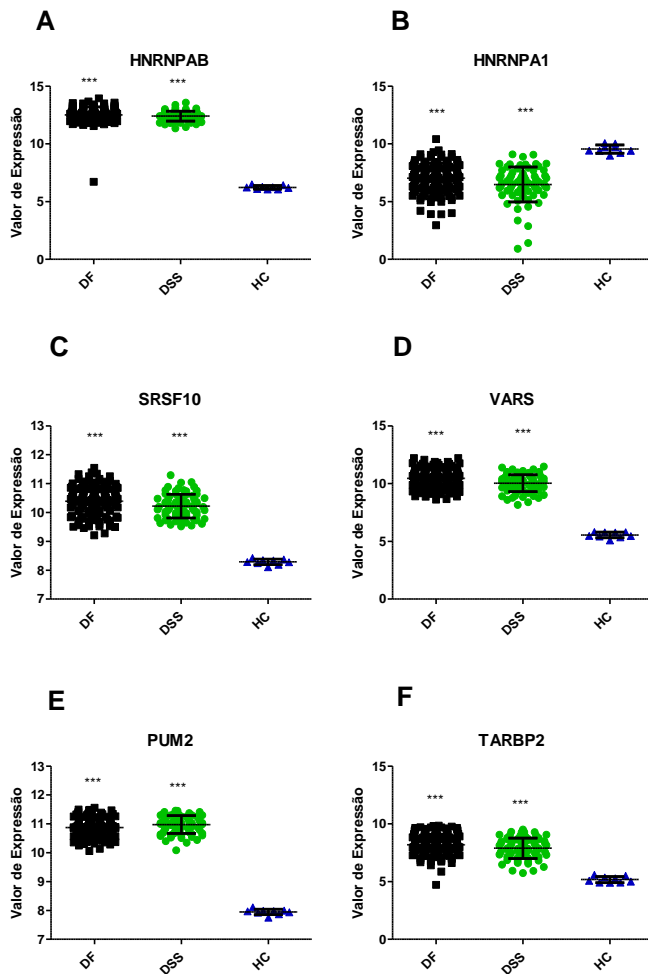


4.4.1 Análise dos transcritos compartilhados entre os transcriptomas e o *pulldown*

As proteínas a seguir foram detectadas pelo ensaio de *pulldown* e seus transcritos estavam presentes nos transcriptomas analisados. Todas as proteínas descritas abaixo apresentam, como esperado, alguma função relacionada ao processamento de RNA. As figuras foram divididas pela sua função. A *Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A/B* (Figura 4A) tem a função de se ligar em fita simples de RNA com grande afinidade por regiões ricas em Guanina e Uracila e se liga também a Apolipoproteína B. A seguir temos a *Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1* (Figura 4B) que está envolvida no empacotamento do pré-mRNA em partículas de ribonucleoproteínas heterogêneas além de poder participar na replicação do Vírus da Hepatite C. A *Serine/Arginine-rich splicing factor 10* (Figura 4C) que age como um repressor no splicing do pré-mRNA, além de atuar em outras proteínas interferindo ou reprimindo o splicing. A *Valine-tRNA ligase* (Figura 4D) tem a função de ligar aminoácidos com os nucleotídeos contidos no tRNA. É considerada uma das primeiras proteínas a aparecerem na evolução. A *Pumilio homolog 2* (Figura 4E), tem como uma de suas funções se ligar a sequências específicas de 3'-UTR de alguns mRNAs causando a repressão dessa estrutura. Além disso, foi mostrado que essa proteína é importante para identificação de infecções virais. A proteína *RISC loading complex subunit TARBP2* (Figura 4F) tem como função auxiliar na formação do complexo de silenciamento induzido para o RNA.

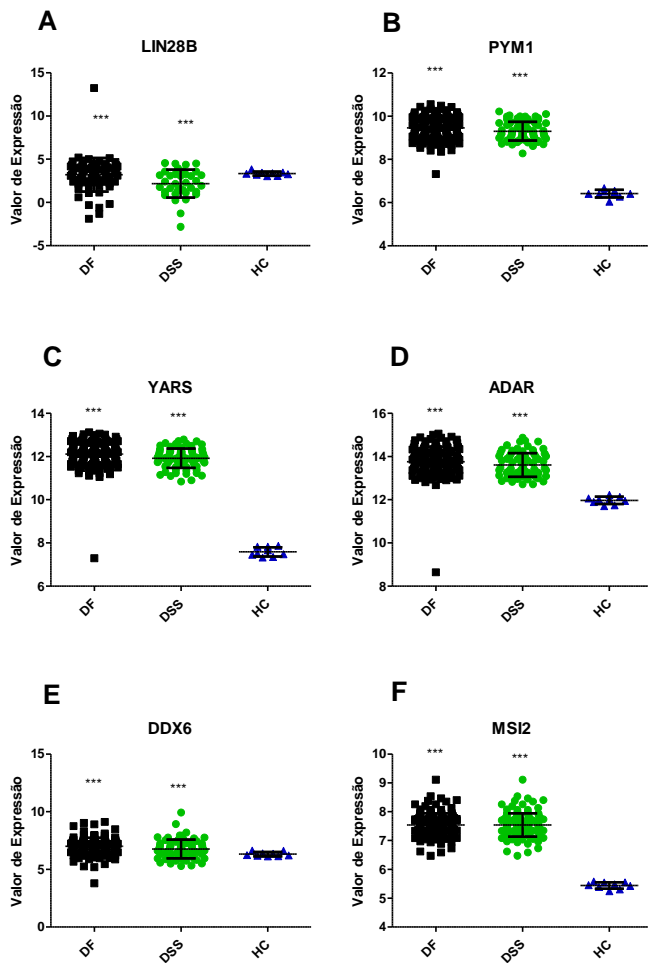
Na análise dos transcritos realizada entre os pacientes saudáveis e os infectados, foram encontradas diferenças significativas para todas as proteínas avaliadas. (Figura 4).

Figura 4 – Análise dos transcritos HNRNPAB (A), HNRNPA1 (B), SRSF10 (C), VARS (D), PUM2 (E) e TARBP2 (F) dos residentes do Vietnã e Tailândia. A normalização foi realizada pelo número de reads. Teste t relativo aos pacientes saudáveis em relação aos infectados DF e DSS (***) $p < 0,001$.



A proteína *lin 28 homolog B* (Figura 5A) é conhecida por reprimir a biogênese de micros RNAs, sequestrando-os do núcleo e prevenindo que aconteça o processamento para o miRNA maduro. Em seguida temos a *Partner of Y14 and magoé* (Figura 5B) um regulador chave para o complexo de junção exon. Esse complexo é extremamente necessário para o processamento pós-tradução do mRNA no citoplasma. A proteína *Tyrosine tRNA ligase* (Figura 5C) tem como função catalisar a ligação de tirosina ao RNA transportador. A *Double-strand RNA specific adenosine deaminase* (Figura 5D) tem como função catalisar a desaminação hidrolítica de adenosina para iosina em RNA. Isso pode afetar a expressão gênica. *AATP-dependent RNA helicase*(Figura 5E) tem como função o decapeamento do mRNA e o bloqueio da autofagia em condições ricas em nutrientes. A proteína *RNA-binding protein Musashi homolog 2* (Figura 5F) é conhecida pela sua função de regulação da expressão alguns mRNAs no nível da tradução. Todas as proteínas descritas acima apresentaram diferença estatística quando comparado os pacientes saudáveis com os infectados (figura 5).

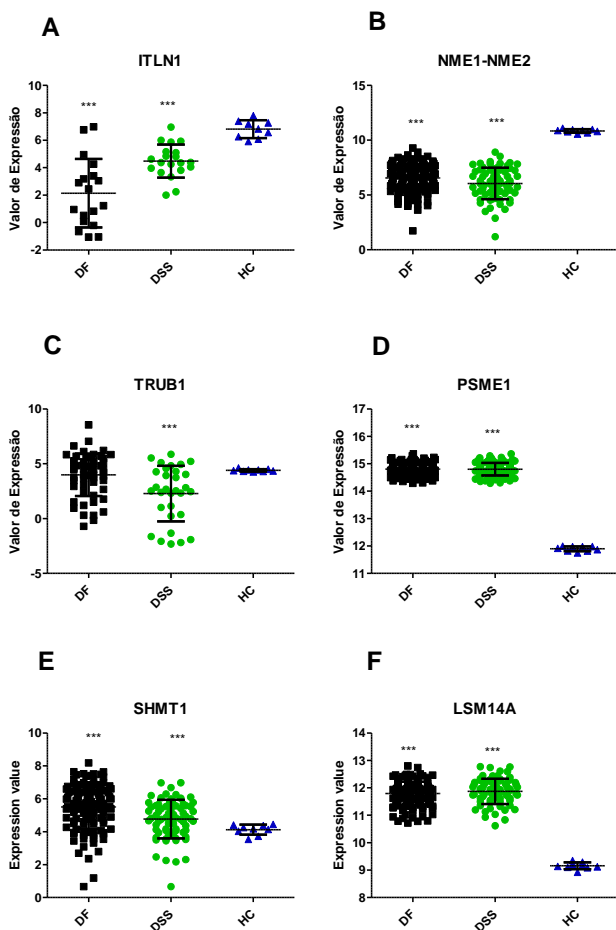
Figura 5- Análise dos transcritos LIN28B (A), PYM1 (B), YARS (C), ADAR (D), DDX6 (E) e MSI2 (F) dos residentes do Vietnã e Tailândia. A normalização foi realizada pelo número de reads. Teste t relativo aos pacientes saudáveis em relação aos infectados DF e DSS (***) p < 0,001).



A proteína associada à membrana plasmática de adipócitos (Figura 6A) mostra uma grande atividade enzimática na catálise em reações químicas com beta-naftilo e acetato de fenilo. Além de poder ter funções na diferenciação dos adipócitos. A *RNA-binding protein EWS* (Figura 6B), é importante por atuar como um repressor de transcrição e pode afetar a expressão gênica interferindo na RNA polimerase. A proteína *DnaJ homolog subfamily C member 21* (Figura 6C) é conhecida por participar da biogênese do RNA ribossomal, ajudando na maturação da porção 60S. A proteína RCC2 (Figura 6D) é conhecida por ser requerida para completar a mitose e citocinese, além de servir como fator de troca de nucleotídeos. A proteína *CCR4-NOT transcription complex subunit 4* (Figura 6E) é conhecida pela função envolvida na ativação da cascata de JAK/STAT. A proteína *Sperm associated antigen 5* (Figura 6F) tem por função ajudar na segregação normal dos cromossomos na mitose e na progressão para anáfase. A proteína *Alpha-taxilin* (Figura 6G) é envolvida no tráfico intracelular de vesículas e na exocitose de células neuroendócrinas. Todas as proteínas descritas acima apresentaram diferença estatística entre os infectados (DF e DSS) e os pacientes saudáveis (figura 6).

A *Nucleoside diphosphate kinase* (Figura 7A) é uma proteína transcrita por dois genes vizinhos. A importância dessa proteína para o humano ainda não foi esclarecida. A Intelectina-1 (Figura 7B), é conhecida por reconhecer carboidratos de microrganismos de maneira depende por cálcio, também se liga à glicanas de bactérias gram-positivas e negativas como *Streptococcus pneumoniae* e *Yersina pestis*. Imagina-se que a função da proteína *tRNA pseudouridine synthase 1* (Figura 7C) seja realizar a síntese de pseudouridina a partir da uracila do RNA de transferência. A proteína *LSM homolog A* (Figura 7D) é conhecida pela função essencial na formação dos corpos de processamento, além disso, também atua como sensor para infecção viral. Essa proteína não estava no grupo das 25 que eram compartilhadas entre o transcriptoma e o *pulldown* mas foi escolhida por ter um valor de expressão alto e já ser um sensor descrito na literatura. A proteína *Serine hidroxymethyltransferase 1* (Figura 7E) é responsável por fazer a conversão de serina em glicina no citoplasma da célula. Essa foi a única proteína que teve duas sondas entre as 25 compartilhadas entre o transcriptoma e o *pulldown*. A proteína *Proteasome activator complex subunit 1* (Figura 7F) é conhecida pela sua função no imunoproteassomo sendo necessário para o eficiente processamento do antígeno. As proteínas NME1-NME2, ITLN1 e TRUB1 apresentaram as médias dos pacientes saudáveis maior que as médias dos infectados, sendo que o padrão na análise anterior era o contrário. Além disso, a TRUB1 não apresentou diferença estatística entre DF e HC, todas as outras proteínas apresentaram o mesmo padrão das figuras anteriores. PSME1 foi a proteína que apresentou maior média em todas as condições em comparação com as proteínas analisadas (figura 7).

Figura 7- Análise dos transcritos ITLN1 (A), NME1-NME2 (B), TRUB1 (C), PSME1 (D), SHMT1 (E) e LSM14A (F) dos residentes do Vietnã e Tailândia. A normalização foi realizada pelo número de reads. Teste t relativo aos pacientes saudáveis (***) $p < 0,001$.



4.4.2 Análise *Gene Ontology*

Os símbolos das 25 proteínas foram inseridos no site e em seguida selecionada a opção de processos biológicos. Foram encontradas três proteínas que atuam no processamento de pre-miRNA (ADAR, LIN28B e TARBP2). Quatro proteínas (ADAR, LIN28B, PUM2 e TARBP2) são relatadas como envolvidas na produção de miRNAs responsáveis pelo silenciamento de genes e na fragmentação de RNA dupla fita. Além dessas quatro, a SHMT1 é conhecida por participar da regulação negativa do processo de tradução. Oito proteínas (ADAR, LIN28B, ELAVL1, HNRNPA1, SRSF1, TRUB1, PUM2 e TARBP2) participam do processamento de RNA nas células. Foram encontradas 15 proteínas (ADAR, LIN28B, ELAVL1, HNRNPA1, SRSF1, TRUB1, PUM2, TARBP2, EWRS1, PYM1, YARS, DNAJC2, CNOT4 e DDX6) participando no processo metabólico de RNA. Cinco proteínas (ADAR, SRSF1, PUM2, TARBP2 e DDX6) participam da montagem do complexo ribonucleoproteína. Por fim, oito proteínas (TRUB1, ELAVL1, HNRNPA1, SRSF1, PYM1, ADAR, CNOT4 e DDX6) estão envolvidas no processo metabólico de mRNA.

4.5 Análise da expressão relativa dos genes SHMT1 e LSM14A em células A549 infectadas com Dengue vírus

4.5.1 qPCR

A técnica de PCR quantitativa (qPCR) foi utilizada para avaliar a expressão dos genes SHMT1 e LSM14A em células A549 infectadas com Dengue vírus nos tempos 12 e 24 horas após infecção. Para o gene SHMT1 não houve diferença no perfil de expressão gênica das células infectadas em relação às células não infectadas independentemente do tempo avaliado (Figura 8). Já o gene LSM14A apresentou um aumento de aproximadamente 50% (1,56) na expressão gênica quando comparado ao controle não infectado no tempo de 24 horas após a infecção com Dengue. O oposto foi observado no tempo de 12 horas após a infecção onde houve uma redução na expressão desse gene (0,56). As células infectadas com o vírus VSV

inativado apresentaram um aumento de 253% (3,53) com relação aos níveis de expressão gênica de células não infectadas (Figura 9).

Figura 8- Expressão relativa do gene SHMT1 de células A549 infectadas com Dengue vírus nos tempos de 12 e 24 horas após a infecção. NI: células A549 não infectadas; VSV inat: células A549 infectadas com VSV vírus inativado por 45 minutos em luz Ultravioleta. O gráfico de barras é representativo de um experimento. Cada condição teve um cDNA. O gene de controle foi o 18S e o seu CT de amplificação foi 8,43.

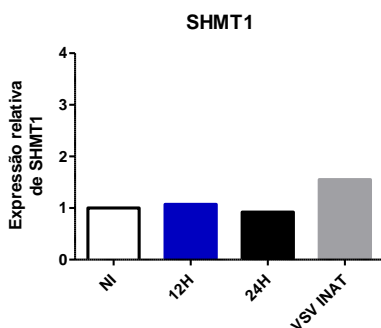
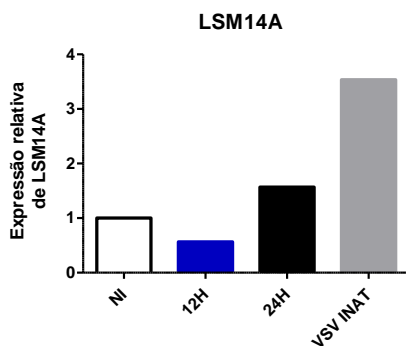


Figura 9 - Expressão relativa do gene SHMT1 de células A549 infectadas com Dengue vírus nos tempos de 12 e 24 horas após a infecção. NI: células A549 não infectadas; VSV inat: células A549 infectadas com VSV vírus inativado por 45 minutos em luz Ultravioleta. O gráfico de barras é representativo de um experimento.



5. DISCUSSÃO

Utilizando dados obtidos por um *pulldown*, foram identificadas 64 proteínas que interagem com o RNA de Dengue. Aproveitando dados de transcriptoma disponíveis no GEO, foi possível identificar dois transcriptomas de pacientes do Vietnã e Tailândia. Esses dados foram reanalisados e foram encontradas 3877 sondas que estavam diferencialmente expressas em sangue de pacientes infectados com o vírus da Dengue em comparação com pacientes saudáveis. Comparando os resultados do *pulldown* com o transcriptoma, foram encontrados 25 transcritos que eram compartilhados entre esses ensaios. Após isso, foram analisadas as funções e a expressão dos transcritos. Foram escolhidos 2 (SHMT1 e LSM14A) para uma análise pela técnica de PCR quantitativo e 4 (ITLN1, NME1-NME2, TRUB1 e PSME1) foram só analisados pelos dados obtidos pelos transcriptomas.

Analisando as funções das 25 proteínas compartilhadas entre o transcriptoma e o *pulldown*, podemos ver que 11 dessas proteínas têm alguma função envolvida com o RNA. Devido a transfecção da célula por RNA, poderíamos esperar que ao analisar as funções encontraríamos mais proteínas relacionadas ao processamento de RNA. Após essa primeira análise, algumas proteínas chamaram mais a atenção por conta do seu perfil de resposta, como a ITLN1, NME1-NME2, TRUB1 e PSME1.

O grupo dos pacientes saudáveis que expressaram a proteína ITLN1 tiveram uma média maior que a dos pacientes infectados. Essa proteína também é conhecida como Omentina e está associada com riscos de problemas coronários e de diabetes (JAMSHIDI *et al*, 2017. HEDER *et al*, 2017.). Além disso, essa proteína é conhecida por aumentar sua concentração em Síndrome da Insuficiência Respiratória Aguda e suprime a inflamação em tecidos pulmonares (QI *et al*, 2016). Essa diferença pode ter sido causada por conta de o equipamento não conseguir detectar o valor de expressão, devido a isso, muitos números ficaram como NA (*Not available*). Para entender melhor o que está causando essa diferença em relação às outras proteínas, precisa-se de mais estudos.

A proteína NME1-NME2 (NM23-LV) apresentou o mesmo padrão que a ITLN1, os pacientes saudáveis apresentaram com

uma média de expressão maior que os infectados. A NME1-NME2 é a junção de duas proteínas vizinhas, a NME1 e NME2, que também podem ser transcritas separadamente (VALENTIJN; KOSTER; VERSTEEG, 2006.). Esses autores também observaram que a proteína é encontrada em pequenas quantidades no rim e nos pulmões em comparação com outros tecidos (VALENTIJN; KOSTER; VERSTEEG, 2006.). Diferente da ITLN1, a NME1-NME 2 não apresentou nenhum valor de expressão como NA. Devido à falta de dados na literatura sobre essa proteína, não é possível dizer qual seria a causa dessa diferença.

A proteína TRUB1 na condição DF não apresentou diferença estatística em relação ao controle saudável. Todas as outras proteínas apresentaram significância. A literatura não apresenta nenhum fato que possa explicar isso, o que temos são poucos artigos explicando a sua função de catálise de mRNAs humanos (SAFRA, 2017).

A proteína PSME1, também conhecida como PA28, é extremamente necessária para a resposta imune da célula, pois ele participa na apresentação de antígeno (FERRINGTON, 2012). Além disso, foi observado em outro trabalho, que quando ocorre uma infecção pelo vírus da Hepatite C, a proteína e o vírus interagem (MORIISHI *et al*, 2003). O que chamou a atenção, foi a expressão extremamente elevada em comparação com os outros genes. Nenhum outro gene teve uma média tão alta para DF, DSS e HC. Isso vai de encontro a o que há na literatura sobre essa proteína, uma indução bem elevada na infecção (FERRINGTON, 2012. MORIISHI *et al*, 2003).

A proteína SHMT1 é muito importante para célula, pois tem papel no metabolismo de folato. Qualquer alteração nesse metabolismo influencia em vários processos dentro da célula (EICHLER *et al*, 1981. HERBIG, 2002). Estudos mostram que a alterações na sequência dessa proteína estão associadas a um elevado risco de câncer. Além disso, a SHMT1 se liga ao RNA dentro da célula (EICHLER *et al*, 1981. HERBIG, 2002). Porém, não existe na literatura nenhuma evidência que essa proteína tem alguma resposta contra infecção (EICHLER *et al*, 1981. HERBIG, 2002). Para poder entender melhor esse resultado, passamos para um experimento *in vitro*, a hipótese era que o gene seria induzindo, entretanto não foi o que encontramos

(figura 28). Mais estudos precisam ser feitos para entender o papel dessa proteína na infecção.

LSM14A é uma proteína já conhecida como sensor para infecção viral (LI, *et al*, 2012). Nesse trabalho os autores viram que LSM14A se liga em ácidos nucleicos sintéticos ou virais, além disso, ela é uma proteína que atua nas primeiras fases da infecção viral induzindo a produção de Interferon beta (LI, *et al*, 2012). Essa proteína, não estava entre as 25 que são compartilhadas entre os dois experimentos, porém devido ao que encontramos na literatura e no resultado ter apresentado uma expressão alta (figura 9), ela foi escolhida para ser estudada com mais detalhes. Na figura 9 podemos ver que só no tempo de coleta 24 horas após a infecção a proteína foi induzida. No tempo de 12 horas a expressão teve um decréscimo em relação ao controle negativo. Era esperado que o gene fosse induzido pela infecção por Dengue, mostrando que ele pode ter um papel importante em infecções virais.

6. CONCLUSÃO

Em um experimento anterior em nosso laboratório, foram encontradas 64 proteínas que interagem com o RNA de Dengue. Desse total, 25 estavam diferencialmente expressas nos pacientes do Vietnã.

No transcriptoma dos pacientes do Vietnã foram encontrados 3877 genes que foram diferencialmente expressos entre a condição DF e DSS. No estudo dos pacientes da Tailândia, 2192 genes foram diferencialmente expressos entre DF e HC, e 3259 apresentaram diferença entre as condições DSS e HC.

As proteínas TRUB1, ITLN1 e NME1-NME2 mostraram um padrão diferente nas análises e podem ser alvos para estudos mais detalhados.

A proteína SHMT1 não teve sua transcrição aumentada quando a célula foi infectada com o vírus da Dengue, enquanto a LSM14A teve o resultado contrário, foi mais expressa. Porém mais estudos são necessários para que possa entender as funções dessas proteínas na célula durante a infecção viral.

REFERÊNCIAS

ABLASSER, Andrea; BAUERNFEIND, Franz; HARTMANN, Gunther. RIG-I-dependent sensing of poly(dA-dT) through the induction of an RNA polymerase III-transcribed RNA intermediate. **Nature Immunology**, [s.l.], v. 10, n. 10, p.1065-1072, 2009. Springer Nature.

ADAMS, Jill U. Transcriptome: Connecting the Genome to Gene Function. **Nature Education**, Si, v. 1, n. 195, 2005.

AIZER, Adva.; KALO, Alon.; KAFRI, Pinhas.; *et al.* Quantifying mRNA targeting to P-bodies in living human cells reveals their dual role in mRNA decay and storage. **Journal Of Cell Science**, [s.l.], v. 127, n. 20, p.4443-4456, 2014. The Company of Biologists.

ANANTHARAMAN, Vivek; ARAVIND, L. Novel conserved domains in proteins with predicted roles in eukaryotic cell-cycle regulation, decapping and RNA stability. **Motif. BMC Genomics**, [s.l.], v. 5, n. 45, p.5-45, 2004. Springer Nature.

BALTIMORE, David. Expression of animal virus genomes. **Bacteriological Reviews**, [s.l.], v. 3, n. 35, p.235-241, 1971.

BARBALAT, Roman; EWALD, Sarah E.; MOUCHESS, Maria L. Nucleic Acid Recognition by the Innate Immune System. **Annual Review Of Immunology**, [s.l.], v. 29, n. 1, p.185-214, 2011. Annual Reviews.

BHATT, Samir; GETHING, Peter W.; BRADY, Oliver J. *et al.* The global distribution and burden of dengue. **Nature**, [s.l.], v. 496, n. 7446, p.504-507, 2013. Springer Nature.

BIDGOOD, Susanna; MERCER, Jason. Cloak and Dagger: Alternative Immune Evasion and Modulation Strategies of Poxviruses. **Viruses**, [s.l.], v. 7, n. 8, p.4800-4825, 2015. MDPI AG.

CROW, Marni S.; JAVITT, Aaron; CRISTEA, Ileana M. A Proteomics Perspective on Viral DNA Sensors in Host Defense

and Viral Immune Evasion Mechanisms. **Journal Of Molecular Biology**, [s.l.], v. 427, n. 11, p.1995-2012, 2015. Elsevier BV.

DECKER, Carolyn J.; PARKER, Roy. P-Bodies and Stress Granules: Possible Roles in the Control of Translation and mRNA Degradation. **Cold Spring Harbor Perspectives In Biology**, [s.l.], v. 4, n. 9, p.12286-12286, 2012. Cold Spring Harbor Laboratory Press.

DUCKER, Gregory S.; RABINOWITZ, Joshua D. One-Carbon Metabolism in Health and Disease. **Cell Metabolism**, [s.l.], p.1-16, 2016. Elsevier BV.

EICHLER, Hans-georg; HUBBARD, Ron; SNELL, Keith. The role of serine hydroxymethyltransferase in cell proliferation: DNA synthesis from serine following mitogenic stimulation of lymphocytes. **Bioscience Reports**, [s.l.], v. 2, n. 1, p.101-106, 1981

EULALIO, Ana; BEHM-ANSMANT, Isabelle; IZAURRALDE, Elisa. P bodies: at the crossroads of post-transcriptional pathways. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, [s.l.], v. 8, n. 1, p.9-22, 2007. Springer Nature.

EISENSTEIN, Michael. Big data: The power of petabytes. **Nature**, vol. 527, no. 7576, 2015.

FERRINGTON, Deborah A. and GREGERSON, Dale S. Immunoproteasomes. **Progress in Molecular Biology and Translational Science The Proteasomal System in Aging and Disease**, p. 75–112, 2012.

GARROW, Timothy A.; BRENNER, Alfred A.; WHITEHEAD, Michael.; *et al.* Cloning of Human cDNAs Encoding Mitochondrial and Cytosolic Serine Hydroxymethyltransferases and Chromosomal Localizatio. **The Journal Of Biological Chemistry**, [s.l.], v. 268, n. 16, p.11910-11916, jun. 1993.

GIARD, Donald J.; AARONSON, Stuart A.; TODARO, George J. In Vitro Cultivation of Human Tumors: Establishment of Cell Lines Derived From a Series of Solid Tumor. **J Natl Cancer Inst**, [s.l.], v. 51, n. 5, p.1417-1423, nov. 1973.

GRAHAM, Frank L.; RUSSELL, William C.; SMILEY, James R.; *et al.* Characteristics of a Human Cell Line Transformed by DNA from Human Adenovirus Type 5. **Journal Of General Virology**, [s.l.], v. 36, n. 1, p.59-72, 1977. Microbiology Society.

HERBIG, Ketherine; CHIANG, En-Pei.; LEE, Ling-Ru.; HILLS, Jessica.; SHANE, Barry.; STROVER, Patrick J. Cytoplasmic Serine Hydroxymethyltransferase Mediates Competition between Folate-dependent Deoxyribonucleotide and S-Adenosylmethionine Biosyntheses. **Journal Of Biological Chemistry**, [s.l.], v. 277, n. 41, p.38381-38389, 2002. American Society for Biochemistry & Molecular Biology (ASBMB).

HERDER, Christian; KANNENBERG, Julia M; NIERSMANN, Corinna; *et al.* Independent and opposite associations of serum levels of omentin-1 and adiponectin with increases of glycaemia and incident type 2 diabetes in an older population: KORA F4/FF4 study. **European Journal of Endocrinology**, vol. 177, no. 4, p. 277–286, 2017.

HOANG, Long T.; LYNN, David J.; HENN, Matt.; *et al.* The Early Whole-Blood Transcriptional Signature of Dengue Virus and Features Associated with Progression to Dengue Shock Syndrome in Vietnamese Children and Young Adults. **Journal Of Virology**, [s.l.], v. 84, n. 24, p.12982-12994, 2010. American Society for Microbiology.

HOWE, Doug; COSTANZO, Maria; FEY, Petra; *et al.* Big data: The future of biocuration. **Nature**, vol. 455, no. 7209, p. 47–50, 2008.

JAMSHIDI, Javad; GHANBARI, Mehرداد; ASNAASHARI, Ali; *et al.* Omentin Val109Asp polymorphism and risk of coronary artery disease. **Asian Cardiovascular and Thoracic Annals**, vol. 25, no. 3, p. 199–203, 2017.

LI, Ying; CHEN, Rui; ZHOU, Qian; *et al.* LSm14A is a processing body-associated sensor of viral nucleic acids that initiates cellular antiviral response in the early phase of viral infection. **Proceedings Of The National Academy Of Sciences**, [s.l.], v. 109, n. 29, p.11770-11775, 2012. Proceedings of the National Academy of Sciences.

LIU, Tian-tian; YANG, Qing; LI, Mi;. LSm14A Plays a Critical Role in Antiviral Immune Responses by Regulating MITA Level in a Cell-Specific Manner. **The Journal Of Immunology**, [s.l.], v. 196, n. 12, p.5101-5111, 2016. The American Association of Immunologists.

MANSUR, Daniel S.; SMITH, Geoffrey L. and FERGUSON, Brian J. Intracellular sensing of viral DNA by the innate immune system. **Microbes and Infection**, vol. 16, no. 12, p. 1002–1012, 2014.

MORIISHI, Kohji.; OKABAYASHI, Tamaki.; NAKAI, Kousuke.; *et al.* Proteasome Activator PA28 -Dependent Nuclear Retention and Degradation of Hepatitis C Virus Core Protein. **Journal of Virology**, vol. 77, no. 19, p. 10237–10249, 2003.

QI, Di; TANG, Xumao; HE, Jing; *et al.* Omentin protects against LPS-induced ARDS through suppressing pulmonary inflammation and promoting endothelial barrier via an Akt/eNOS-dependent mechanism. **Cell Death and Disease**, vol. 7, no. 9, 2016.

RASCHKE, William.; BAIRD, Sarah.; RALPH, Peter.; *et al.* Functional macrophage cell lines transformed by abelson leukemia virus. **Cell**, [s.l.], v. 15, n. 1, p.261-267, 1978. Elsevier BV.

SAFRA, Modi; NIR, Ronit; FAROUQ, Daneyal; *et al.* TRUB1 is the predominant pseudouridine synthase acting on mammalian mRNA via a predictable and conserved code. **Genome Research**, vol. 27, no. 3, p. 393–406, 2017.

SCHULTZE, Joachim L. Teaching 'big data' analysis to young immunologists. **Nature Immunology**, vol. 16, no. 9, p. 902–905, 2015.

SCREATON, Gavin; MONGKOLSAPAYA, Juthathip; YACOUB, Sophie. New insights into the immunopathology and control of dengue virus infection. **Nat Rev Immunol**, [s.l.], v. 15, n. 12, p.745-759, 2015. Nature Publishing Group.

SIMMONS, Cameron P.; FARRAR, Jeremy J.; CHAU, Nguyen Van Vinh; *et al.* Dengue. **New England Journal of Medicine**, vol. 366, no. 15, p. 1423–1432, 2012.

STEPHENS, Zachary D.; LEE, Skylar Y.; FAGHRI, Faraz; *et al.* Big Data: Astronomical or Genomical? **PLOS Biology**, vol. 13, no. 7, 2015.

STOVER, Patrick J. One-Carbon Metabolism-Genome Interactions in Folate-Associated Pathologies. **Journal Of Nutrition**, [s.l.], v. 139, n. 12, p.2402-2405, 2009. American Society for Nutrition.

TAKESHITA, Fumihiko.; LEIFER, Cynthia. A.; GURSEL, Ihsan.; *et al.* Cutting Edge: Role of Toll-Like Receptor 9 in CpG DNA-Induced Activation of Human Cells. **The Journal Of Immunology**, [s.l.], v. 167, n. 7, p.3555-3558, 2001. The American Association of Immunologists.

THANDAPANI, Palaniraja; O'CONNOR, Timothy R.; BAILEY, Timothy I.; *et al.* Defining the RGG/RG Motif. **Molecular Cell**, [s.l.], v. 50, n. 5, p.613-623, 2013. Elsevier BV.

TAKEUCHI, Osamu; ALIRA, Shizuo. Pattern Recognition Receptors and Inflammations. *Cell* [s.l.], v.140, n.6, p 805-820, 2010.

TANAKA, Kimio; OGAWA, Kenji; TAKAGI, Masatoshi.; *et al.* RAP55, a Cytoplasmic mRNP Component, Represses Translation in Xenopus Oocytes. **Journal Of Biological Chemistry**, [s.l.], v. 281, n. 52, p.40096-40106, 2006. American Society for Biochemistry & Molecular Biology (ASBMB).

VALENTIJN, Linda J.; KOSTER, Jan and VERSTEEG, Rogier. Read-through transcript from NM23-H1 into the neighboring NM23-H2 gene encodes a novel protein, NM23-LV. **Genomics**, vol. 87, no. 4, p. 483–489, 2006.

YANG, Wei-Hong.; YU, Jiang Hong.; GULICK, Tod.; *et al.* RNA-associated protein 55 (RAP55) localizes to mRNA processing bodies and stress granules. **Rna**, [s.l.], v. 12, n. 4, p.547-554, 2006. Cold Spring Harbor Laboratory Press.

APÊNDICE A – Código de programação utilizado para a normalização

```
### install on R using bioconductor.
source("https://bioconductor.org/biocLite.R")
biocLite("Biobase")
biocLite("GEOquery")
biocLite("limma")
biocLite("hgu95av2cdf")
biocLite("hgu95av2")  ## soon will no work anymore
###
# Once in R
# load libraries.
library(Biobase)
library(GEOquery)
library(limma)      ## Differential expression analysis with
limma
library(hgu95av2cdf)
library(hgu95av2)
library(gplots)

# load from GSE25001
# GSE25001 <- getGEO('GSE25001', destdir=".") ## this failed
for some reason

# download soft file from
https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE25001
```

```

gset<- getGEO("GSE25001", GSEMatrix =TRUE,
AnnotGPL=TRUE) # load file with annotations and Matrix = true.

if (length(gset) > 1) idx<- grep("GPL6104", attr(gset, "names"))
else idx<- 1 #set names for attributes.

gset<- gset[[idx]] # extract the good stuff into a new gset.

fvarLabels(gset) <- make.names(fvarLabels(gset)) # make proper
column names to match toptable .

gsms<-
"2221211221111211111111122222212211222122112222221222
2221222221111222122122222222222211122111112222222222
211122221112222121122111111111122222222222222222111
12222221122221221112222222221122221122222222221122
11" # Select Samples for.

sml<- c() #make empty vector.

for (i in 1:nchar(gsms)) { sml[i] <- substr(gsms,i,i) } #fill empty
vector with value names.

sel<- which(sml != "X") # eliminate samples marked as "X".

sml<- sml[sel] # replace all data with only interesting data.

gset<- gset[ ,sel] # replace main data frame with only interesting
data.

ex <- exprs(gset) # log2 transform

qx<- as.numeric(quantile(ex, c(0., 0.25, 0.5, 0.75, 0.99, 1.0),
na.rm=T)) # quatiles

#get the logC for expression values
LogC<- (qx[5] > 100) ||
      (qx[6]-qx[1] > 50 &&qx[2] > 0) ||
      (qx[2] > 0 &&qx[2] < 1 &&qx[4] > 1 &&qx[4] < 2)

if (LogC) { ex[which(ex <= 0)] <- NaN
exprs(gset) <- log2(ex) }

```

```
# set up the data and proceed with analysis
sml<- paste("G", sml, sep="") # set group names
fl<- as.factor(sml) # set group names
gset$description<- fl # set group names
design <- model.matrix(~ description + 0, gset) #make the design
matrix.
colnames(design) <- levels(fl)
fit <- lmFit(gset, design)
cont.matrix<- makeContrasts(G2-G1, levels=design) #makes G2 -
G0 matrix.
fit2 <- contrasts.fit(fit, cont.matrix) #make contrasts matrix.
fit2 <- eBayes(fit2, 0.01) #make the bayes analysis for the fits of
the linear models.

## #### ### ###

#####Write table#####
write.table(gset$characteristics_ch1, file="expres_age.txt")
write.table(gset$characteristics_ch1.2,
file="expres_defervesc.txt")
write.table(gset$characteristics_ch1.3, file="expres_illness.txt")

results <- decideTests(fit2,method="global",p=0.2) #from limma to
obtain values for dif. expressed genes with p=0.1 IC=90%
vennDiagram(results, circle.col=c("red")) # venn diagram of
diferencialy expressed genes.
```

```
v <- voom(gset, design, plot=TRUE)

# load from GSE51808
# GSE51808 <- getGEO('GSE51808', destdir=".") ## this failed
for some reason

# download soft file from
https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE51808
gset<- getGEO("GSE51808", GSEMatrix =TRUE,
AnnotGPL=TRUE) # load file with annotations and Matrix = true.

if (length(gset) > 1) idx<- grep("GPL6104", attr(gset, "names"))
else idx<- 1 #set names for attributes.

gset<- gset[[idx]] # extract the good stuff into a new gset.

fvarLabels(gset) <- make.names(fvarLabels(gset)) # make proper
column names to match toptable .

gsms<-
"0000101001011100001011001000333333333333333333333333334444
44444" # Select Samples for.

sml<- c() #make empty vector.

for (i in 1:nchar(gsms)) { sml[i] <- substr(gsms,i,i) } #fill empty
vector with value names.

sel<- which(sml != "X") # eliminate samples marked as "X".

sml<- sml[sel] # replace all data with only interesting data.

gset<- gset[ ,sel] # replace main data frame with only interesting
data.

ex <- exprs(gset) # log2 transform

qx<- as.numeric(quantile(ex, c(0., 0.25, 0.5, 0.75, 0.99, 1.0),
na.rm=T)) # quatiles

#get the logC for expression values

LogC<- (qx[5] > 100) ||
```

```

(qx[6]-qx[1] > 50 &&qx[2] > 0) ||
(qx[2] > 0 &&qx[2] < 1 &&qx[4] > 1 &&qx[4] < 2)
if (LogC) { ex[which(ex <= 0)] <- NaN
exprs(gset) <- log2(ex) }

# set up the data and proceed with analysis
sml<- paste("GG", sml, sep="") # set group names
fl<- as.factor(sml) # set group names
gset$description<- fl # set group names
design <- model.matrix(~ description + 0, gset) #make the design
matrix.

colnames(design) <- levels(fl)
contr.matrix<- makeContrasts(
  G0vsG4 = GG0 - GG4,
  G1vsG4 = GG1 - GG4,
  G3vsG4 = GG3 - GG4,
  levels = colnames(design) )

# Depois continua com a analise:

v <- voom(gset, design, plot=TRUE)

vfit<- lmFit(v, design) # usa uma regressao linear para gerar um
modelo de expressao linear.

```

```
vfit<- contrasts.fit(vfit, contrasts=contr.matrix) # usa a matriz de
constrastes para comparar as expressoes
efit<- eBayes(vfit) # test statisticousandoprobabilidadebayes.
tfit<- treat(vfit, lfc=0) # organiza os dados
dt<- decideTests(tfit) # faz um resumo dos dados
summary(dt) # visualisa o resultado em uma tabela

vennDiagram(dt[,1:2], circle.col=c("turquoise", "salmon")) #
diagrama de ven
```

ANEXO A – Proteínas identificadas no *pulldown*

B5BUB5	Autoantigen La (Fragment) OS=Homo sapiens GN=SSB PE=2 SV=1 - [B5BUB5_HUMAN]
B4DN60	cDNA FLJ52703, highly similar to Asparaginyl-tRNA synthetase, cytoplasmic (EC6.1.1.22) OS=Homo sapiens PE=2 SV=1 - [B4DN60_HUMAN]
A8K8K1	cDNA FLJ76936, highly similar to Homo sapiens RNA terminal phosphate cyclase domain 1 (RTCD1), mRNA OS=Homo sapiens PE=2 SV=1 - [A8K8K1_HUMAN]
E9PH62	Double-stranded RNA-binding protein Staufen homolog 2 OS=Homo sapiens GN=STAU2 PE=1 SV=1 - [E9PH62_HUMAN]
O75569	Interferon-inducible double-stranded RNA-dependent protein kinase activator A OS=Homo sapiens GN=PRKRA PE=1 SV=1 - [PRKRA_HUMAN]
A0A024R1Y2	ATP citrate lyase, isoform CRA_a OS=Homo sapiens GN=ACLY PE=4 SV=1 - [A0A024R1Y2_HUMAN]
Q15633	RISC-loading complex subunit TARBP2 OS=Homo sapiens GN=TARBP2 PE=1 SV=3 - [TRBP2_HUMAN]
Q8N1G4	Leucine-rich repeat-containing protein 47 OS=Homo sapiens GN=LRR47 PE=1 SV=1 - [LRC47_HUMAN]
P27694	Replication protein A 70 kDa DNA-binding subunit OS=Homo sapiens GN=RPA1 PE=1 SV=2 - [RFA1_HUMAN]
B5MC59	Replication protein A 14 kDa subunit OS=Homo sapiens GN=RPA3 PE=1 SV=1 - [B5MC59_HUMAN]
Q15717	ELAV-like protein 1 OS=Homo sapiens GN=ELAVL1 PE=1 SV=2 - [ELAV1_HUMAN]
B3KXX5	Structural maintenance of chromosomes protein OS=Homo sapiens PE=2 SV=1 -

	[B3KXX5_HUMAN]
Q9BSM5	Putative uncharacterized protein (Fragment) OS=Homo sapiens PE=2 SV=1 - [Q9BSM5_HUMAN]
P40222	Alpha-taxilin OS=Homo sapiens GN=TXLNA PE=1 SV=3 - [TXLNA_HUMAN]
Q9Y295	Developmentally-regulated GTP-binding protein 1 OS=Homo sapiens GN=DRG1 PE=1 SV=1 - [DRG1_HUMAN]
B4E091	cDNA FLJ55438, highly similar to Splicing factor 3 subunit 1 OS=Homo sapiens PE=2 SV=1 - [B4E091_HUMAN]
A6NKE1	Trafficking protein particle complex subunit 3 OS=Homo sapiens GN=TRAPPC3 PE=1 SV=1 - [A6NKE1_HUMAN]
Q6ZN17	Protein lin-28 homolog B OS=Homo sapiens GN=LIN28B PE=1 SV=1 - [LN28B_HUMAN]
P26640	Valine--tRNA ligase OS=Homo sapiens GN=VAR5 PE=1 SV=4 - [SYVC_HUMAN]
K7EMZ9	Protein LSM14 homolog A (Fragment) OS=Homo sapiens GN=LSM14A PE=1 SV=1 - [K7EMZ9_HUMAN]
B7Z570	cDNA FLJ53078, highly similar to Splicing factor, arginine/serine-rich 1 OS=Homo sapiens PE=2 SV=1 - [B7Z570_HUMAN]
B4DTA2	cDNA FLJ60148, highly similar to Homo sapiens heterogeneous nuclear ribonucleoprotein D-like (HNRPDL), transcript variant 2, mRNA OS=Homo sapiens PE=2 SV=1 - [B4DTA2_HUMAN]
A5PLK7	RCC2 protein (Fragment) OS=Homo sapiens GN=RCC2 PE=2 SV=1 - [A5PLK7_HUMAN]
Q59EC0	Adenosine deaminase, RNA-specific isoform ADAR-a variant (Fragment) OS=Homo sapiens PE=2 SV=1 - [Q59EC0_HUMAN]
P52294	Importin subunit alpha-5 OS=Homo sapiens GN=KPNA1 PE=1 SV=3 - [IMA5_HUMAN]
P54577	Tyrosine--tRNA ligase, cytoplasmic OS=Homo sapiens GN=YARS PE=1 SV=4 -

	[SYYC_HUMAN]
Q496C9	D-tyrosyl-tRNA(Tyr) deacylase OS=Homo sapiens GN=DTD1 PE=2 SV=1 - [Q496C9_HUMAN]
A0A024RAV4	Cold shock domain protein A, isoform CRA_b OS=Homo sapiens GN=CSDA PE=4 SV=1 - [A0A024RAV4_HUMAN]
Q08J23	tRNA (cytosine(34)-C(5))-methyltransferase OS=Homo sapiens GN=NSUN2 PE=1 SV=2 - [NSUN2_HUMAN]
D6R9P3	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A/B OS=Homo sapiens GN=HNRNPAB PE=1 SV=1 - [D6R9P3_HUMAN]
H7BY36	RNA-binding protein EWS (Fragment) OS=Homo sapiens GN=EWSR1 PE=1 SV=1 - [H7BY36_HUMAN]
H3BQF7	IST1 homolog (Fragment) OS=Homo sapiens GN=IST1 PE=1 SV=1 - [H3BQF7_HUMAN]
H0Y512	Adipocyte plasma membrane-associated protein (Fragment) OS=Homo sapiens GN=APMAP PE=1 SV=1 - [H0Y512_HUMAN]
C9JGH7	Origin recognition complex subunit 4 (Fragment) OS=Homo sapiens GN=ORC4 PE=1 SV=1 - [C9JGH7_HUMAN]
Q08AR5	DNAJC2 protein OS=Homo sapiens GN=DNAJC2 PE=2 SV=1 - [Q08AR5_HUMAN]
Q09161	Nuclear cap-binding protein subunit 1 OS=Homo sapiens GN=NCBP1 PE=1 SV=1 - [NCBP1_HUMAN]
A8K984	Structural maintenance of chromosomes protein OS=Homo sapiens PE=2 SV=1 - [A8K984_HUMAN]
A0A024R4E5	High density lipoprotein binding protein (Vigilin), isoform CRA_a OS=Homo sapiens GN=HDLBP PE=4 SV=1 - [A0A024R4E5_HUMAN]
D3DXC9	Serine hydroxymethyltransferase OS=Homo sapiens GN=SHMT1 PE=3 SV=1 - [D3DXC9_HUMAN]

Q9Y490	Talin-1 OS=Homo sapiens GN=TLN1 PE=1 SV=3 - [TLN1_HUMAN]
B4DJ49	cDNA FLJ60581, highly similar to Rho/Rac guanine nucleotide exchange factor 2 OS=Homo sapiens PE=2 SV=1 - [B4DJ49_HUMAN]
Q52LJ0	Protein FAM98B OS=Homo sapiens GN=FAM98B PE=1 SV=1 - [FA98B_HUMAN]
Q9UPY3	Endoribonuclease Dicer OS=Homo sapiens GN=DICER1 PE=1 SV=3 - [DICER_HUMAN]
P67809	Nuclease-sensitive element-binding protein 1 OS=Homo sapiens GN=YBX1 PE=1 SV=3 - [YBOX1_HUMAN]
P15531	Nucleoside diphosphate kinase A OS=Homo sapiens GN=NME1 PE=1 SV=1 - [NDKA_HUMAN]
B4DHS5	cDNA FLJ54678, highly similar to N(2),N(2)-dimethylguanosine tRNA methyltransferase (EC 2.1.1.32) OS=Homo sapiens PE=2 SV=1 - [B4DHS5_HUMAN]
H0YLU2	Proteasome activator complex subunit 1 (Fragment) OS=Homo sapiens GN=PSME1 PE=1 SV=1 - [H0YLU2_HUMAN]
Q2NLD4	PURA protein (Fragment) OS=Homo sapiens GN=PURA PE=2 SV=1 - [Q2NLD4_HUMAN]
A8K8N3	cDNA FLJ78740, highly similar to Homo sapiens sperm associated antigen 5 (SPAG5), mRNA OS=Homo sapiens PE=2 SV=1 - [A8K8N3_HUMAN]
Q8WXX5	DnaJ homolog subfamily C member 9 OS=Homo sapiens GN=DNAJC9 PE=1 SV=1 - [DNJC9_HUMAN]
A6NLN1	Polypyrimidine tract binding protein 1, isoform CRA_b OS=Homo sapiens GN=PTBP1 PE=1 SV=4 - [A6NLN1_HUMAN]
P13010	X-ray repair cross-complementing protein 5 OS=Homo sapiens GN=XRCC5 PE=1 SV=3 - [XRCC5_HUMAN]
Q8WWH5	Probable tRNA pseudouridine synthase 1 OS=Homo sapiens GN=TRUB1 PE=1 SV=1 -

	[TRUB1_HUMAN]
B2R858	cDNA, FLJ93750, Homo sapiens DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 6 (DDX6), mRNA OS=Homo sapiens PE=2 SV=1 - [B2R858_HUMAN]
B7ZL34	PUM2 protein OS=Homo sapiens GN=PUM2 PE=2 SV=1 - [B7ZL34_HUMAN]
Q96I24	Far upstream element-binding protein 3 OS=Homo sapiens GN=FUBP3 PE=1 SV=2 - [FUBP3_HUMAN]
B3KQ99	cDNA FLJ90012 fis, clone HEMBA1000462, highly similar to CCR4-NOT transcription complex subunit 4 (EC 6.3.2.-) OS=Homo sapiens PE=2 SV=1 - [B3KQ99_HUMAN]
Q96M27	Protein PRRC1 OS=Homo sapiens GN=PRRC1 PE=1 SV=1 - [PRRC1_HUMAN]
P13674	Prolyl 4-hydroxylase subunit alpha-1 OS=Homo sapiens GN=P4HA1 PE=1 SV=2 - [P4HA1_HUMAN]
B4DHE8	Protein turtle homolog B OS=Homo sapiens GN=IGSF9B PE=2 SV=1 - [B4DHE8_HUMAN]
A0A024RDV8	TSC22 domain family, member 1, isoform CRA_a OS=Homo sapiens GN=TSC22D1 PE=4 SV=1 - [A0A024RDV8_HUMAN]
Q9BRP8	Partner of Y14 and mago OS=Homo sapiens GN=WIBG PE=1 SV=1 - [WIBG_HUMAN]
O76070	Gamma-synuclein OS=Homo sapiens GN=SNCG PE=1 SV=2 - [SYUG_HUMAN]
Q9Y3Z3	Deoxynucleoside triphosphate triphosphohydrolase SAMHD1 OS=Homo sapiens GN=SAMHD1 PE=1 SV=2 - [SAMH1_HUMAN]