

UNIVERSIDAD DE COSTA RICA  
SISTEMA DE ESTUDIOS DE POSGRADO

MODIFICACIONES PROTEICAS INDUCIDAS POR *BRUCELLA ABORTUS*  
2308W EN COMPARTIMENTOS INTRACELULARES TEMPRANOS DE  
MACRÓFAGOS RAW 264.7

Tesis sometida a la consideración de la Comisión del Programa de Estudios de  
Posgrado en Microbiología, Parasitología, Química Clínica e Inmunología para  
optar por el grado y título de Maestría Académica en Microbiología con énfasis en  
Bacteriología

HEBER VIANNEY MONGE ARIAS

Ciudad Universitaria Rodrigo Facio, Costa Rica

2019

## *Dedicatoria y agradecimientos*

A mi padre (Q.E.P.D.), madre y hermanos: Sebas, Mary y Le, por ellos soy lo que soy y merecen toda la dedicatoria de este trabajo.

Mis agradecimientos más profundos a Esteban por la guía excepcional brindada y a Chac por sus consejos y confianza. A César por el apoyo técnico y profesional incomparable. A los compañeros del CIET y Laboratorio de Bacteriología Médica, por estar siempre como apoyo incondicional y brindar su compañerismo día a día.

A mis seres queridos por los ánimos, confianza y alentarme siempre a no rendirme: Andre, Isa, Johnny, Marlon, Casti, Dei, Gaby, Mariel, Ariel, Mario, Neto y German. La carga fue mucho más liviana durante todos estos años gracias a ustedes.

Sin todos los mencionados anteriormente este trabajo no habría podido realizarlo.

“Esta tesis fue aceptada por la Comisión del Programa de Estudios de Posgrado en Microbiología, Parasitología, Química Clínica e Inmunología de la Universidad de Costa Rica, como requisito parcial para optar al grado y título de Maestría Académica en Microbiología con énfasis en Bacteriología.”

---

*PhD.* Bruno Lomonte Viglioti  
**Decano o Representante del Decano  
Sistema de Estudios de Posgrado**

---

*PhD.* Esteban Chaves Olarte  
**Director de Tesis**

---

*PhD.* Carlos Chacón Díaz  
**Asesor**

---

*PhD.* César Rodríguez Sánchez  
**Asesor**

---

*PhD.* Mónica Prado Porras  
**Representante del Director del  
Programa de Posgrado en Microbiología, Parasitología, Química Clínica e  
Inmunología**

---

Heber Vianney Monge Arias  
**Candidato**

## Tabla de Contenidos

|   |      |
|---|------|
| Resumen.....                                | vi   |
| Abstract.....                               | vii  |
| Lista de Tablas.....                        | viii |
| Lista de Figuras.....                       | ix   |
| Lista de Abreviaturas .....                 | x    |
| INTRODUCCIÓN .....                          | 1    |
| Brucelosis.....                             | 1    |
| Género <i>Brucella</i> .....                | 2    |
| Tráfico endosomal constitutivo .....        | 4    |
| Patogénesis.....                            | 5    |
| Sistema de secreción tipo IV VirB .....     | 8    |
| Proteínas efectoras VirB-dependientes ..... | 10   |
| HIPÓTESIS .....                             | 13   |
| SINOPSIS DEL TRABAJO.....                   | 13   |
| Objetivo general .....                      | 13   |
| Objetivos específicos.....                  | 14   |
| JUSTIFICACIÓN .....                         | 14   |
| MATERIALES Y MÉTODOS.....                   | 15   |
| Cepas bacterianas.....                      | 15   |
| Cultivos celulares e infecciones.....       | 15   |
| Aislamiento y enriquecimiento de BCVs ..... | 16   |
| Extracción de proteínas .....               | 17   |
| Liofilización .....                         | 19   |
| Análisis inmunoquímico .....                | 19   |
| Microscopía de inmunofluorescencia .....    | 20   |
| Obtención de péptidos trípticos .....       | 20   |
| HPLC-MS/MS .....                            | 21   |
| Análisis bioinformático .....               | 23   |

|   |    |
|---|----|
| RESULTADOS.....   | 24 |
| La optimización del protocolo de fraccionamiento celular permitió el<br>enriquecimiento de BCVs .....                 | 24 |
| Las BCVs presentan perfiles inmunorreactivos diferentes de manera VirB-<br>dependiente.....                           | 25 |
| El abordaje comparativo permitió detectar proteínas relevantes asociadas al<br>tránsito intracelular de las BCVs..... | 30 |
| DISCUSIÓN .....   | 44 |
| CONCLUSIONES .....  | 57 |
| REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....   | 60 |
| Anexos .....  | 72 |

## RESUMEN

*Brucella abortus* es un patógeno intracelular bacteriano causante de la brucelosis bovina, una zoonosis desatendida de gran importancia mundial. Una vez entra a la célula hospedera *B. abortus* transita en un compartimento llamado vacuola contenedora de *Brucella* (BCV). Esta bacteria redirige el tránsito intracelular de la BCV en tiempos tempranos de infección y evade la fusión de esta con el lisosoma gracias a la actividad del sistema de secreción tipo IV (SST4) VirB, lo que le permite replicarse en un compartimento similar al retículo endoplásmico (RE). La habilidad de replicarse en este compartimento es fundamental para la patogénesis de *Brucella* spp. Aún no se conocen los determinantes moleculares tempranos que permiten la redirección del tráfico intracelular de manera VirB-dependiente. No obstante, en otros patógenos intracelulares formadores de vacuolas modificadas, como *Legionella pneumophila*, estudios proteómicos de caracterización de dichos compartimentos purificados permitieron elucidar mecanismos moleculares de la patogénesis respectiva. En este trabajo, se caracterizaron bioquímicamente, inmunoquímicamente y proteómicamente BCVs de macrófagos murinos RAW 264.7 infectados por 6 h con *B. abortus* 2308W (tipo salvaje) y una mutante isogénica disfuncional en la actividad del SST4 VirB ( $\Delta virB10$ ). Con la metodología de fraccionamiento subcelular se logró enriquecer en un 86 % las BCVs. En ellas se logró evidenciar la presencia de marcadores sub-celulares ya reportados en esta etapa de tránsito intracelular, así como la presencia aumentada de componentes inmunorreactivos en 2308W como lo fue el lipopolisacárido de *Brucella* (*Br*-LPS). Fue también posible ubicar proteínas exclusivas y enriquecidas tanto de *Mus musculus* como de *B. abortus* en BCVs de 2308W. Dentro de las 255 proteínas presentes únicamente en las BCVs de 2308W, destacaron 5 de *B. abortus*: GroEL, EF-Tu, Nuol, SodC y GlyS; las cuales podrían jugar un papel modulador de la respuesta en la célula hospedero. GroEL es una chaperona de choque térmico, EF-Tu un factor de elongación de la transcripción, Nuol es importante para la generación de energía, SodC es una enzima protectora contra el estrés oxidativo y GlyS cataliza la carga de glicina al ARN<sub>t</sub> respectivo. También se encontró enriquecidas en una proporción mayor de 2 veces las proteínas de *M. musculus* UACA, UGGT1, ACOD y ATL2 en las BCVs derivadas de la cepa silvestre. UACA es mediadora de la señalización de NF- $\kappa$ B; UGGT1 es una proteína residente del RE encargada de glicosilaciones postraduccionales; ACOD es fundamental para la generación de ácido itacónico en macrófagos activados con inmunomoduladores; y ATL2 es una GTPasa responsable de la remodelación estructural del RE. Se recomienda investigar el papel del *Br*-LPS, elucidar las posibles vías de señalización en que podrían estar influyendo las proteínas eucariotas identificadas y si las proteínas procariotas mencionadas podrían tener un impacto en la redirección del tránsito intracelular y replicación de *B. abortus*.

## ABSTRACT

*Brucella abortus* is a bacterial intracellular pathogen that causes bovine brucellosis, a neglected zoonosis of great global importance. Once within the host cell, *B. abortus* travels on a compartment called *Brucella* containing vacuole (BCV). At the onset of the infection, this bacterium redirects the intracellular trafficking of the BCV and avoids its fusion with the lysosome due to the activity of the type IV secretion system (T4SS) VirB, allowing it to replicate on an endoplasmic reticulum (ER)-like compartment. The ability to replicate in this compartment is essential for the pathogenesis of *Brucella* spp. The early molecular determinants that allow the redirection of intracellular trafficking in a VirB-dependent manner are not yet known. However, in other modified vacuole intracellular pathogens, as *Legionella pneumophila*, proteomic studies of characterization of said purified compartments allowed elucidating molecular mechanisms of the respective pathogenesis. In this work, RAW 264.7 murine macrophages were infected for 6 h with *B. abortus* 2308W (wild type) and an isogenic mutant dysfunctional in the activity of T4SS VirB ( $\Delta virB10$ ). BCVs were isolated and enriched, then biochemically, proteomically and immunochemically characterized. With the subcellular fractionation methodology, BCVs were enriched by 86%. It was possible to demonstrate the presence of sub-cellular markers already reported in this stage of the BCVs intracellular trafficking, as well as the increased presence of immunoreactive components in 2308W BCVs such as *Brucella* lipopolysaccharide (*Br*-LPS). It was also possible to locate exclusive and enriched proteins from both *Mus musculus* and *B. abortus* in 2308W BCVs. Among the 255 proteins present only in 2308W BCVs, 5 of *B. abortus* stood out: GroEL, EF-Tu, Nuol, SodC, and GlyS; which could play a role modulating the response within the host cell. GroEL is a thermal shock chaperone, EF-Tu is a transcription elongation factor, Nuol is important for energy generation, SodC is a protective enzyme against oxidative stress and GlyS catalyzes the glycine load to the respective tRNA. The proteins of *M. musculus* UACA, UGGT1, ACOD, and ATL2 were also enriched in a proportion greater than 2-fold in the 2308W BCVs. UACA is a mediator of NF- $\kappa$ B signaling; UGGT1 is an ER-resident protein responsible for post-translational glycosylations; ACOD is essential for the generation of itaconic acid in macrophages activated with immunomodulators; and ATL2 is a GTPase responsible for the structural remodeling of the ER. In the future, it is recommended to investigate the role of *Br*-LPS, elucidate the possible signaling pathways that the identified eukaryotic proteins could be influencing, and if the mentioned prokaryotic proteins could have an impact on the redirection of intracellular transit and replication of *B. abortus*.

## LISTA DE TABLAS

**Tabla 1.** Determinantes moleculares y funcionalidad de los compartimentos endosomales.

**Tabla 2.** Cepas bacterianas utilizadas.

**Tabla 3.** Parámetros de obtención de datos MS y MS/MS.

**Tabla 4.** Lista de proteínas diferencialmente abundantes en BCVs de *B. abortus* 2308W y *B. abortus virB10* determinadas por cuantificación libre de marcaje.



## LISTA DE FIGURAS

**Figura 1.** Modelo del tráfico intracelular de *Brucella*.

**Figura 2.** Enriquecimiento de BCVs derivadas de macrófagos RAW 264.7 en etapas tempranas de infección (6 h).

**Figura 3.** Caracterización bioquímica e inmunológica de las BCVs purificadas.

**Figura 4.** Valores de proteínas detectadas mediante HPLC-MS/MS en lisados de BCVs purificadas a las 6 h.p.i. de macrófagos RAW 264.7 y su distribución entre los grupos analizados.

**Figura 5.** Proteómica comparativa de lisados de BCVs purificadas a las 6 h.p.i. a partir de macrófagos murinos RAW 264.7 infectados con la cepa de *B. abortus* 2308W o *virB10*.

**Figura 6.** Anotación BlastKOALA de vías KEGG de las proteínas detectadas exclusivamente en las BCVs a las 6 h.p.i. derivadas de macrófagos RAW 264.7 infectados con (A) 2308W o (B) *virB10*.

**Figura 7.** Anotación BlastKOALA de vías KEGG de las proteínas diferenciales resultantes del análisis cuantitativo libre de marcaje.

**Figura 8.** Modelo conceptual representativo de BCVs obtenidas a las 6 h.p.i a partir de macrófagos infectados con *B. abortus* 2308W.

## LISTA DE ABREVIATURAS

|               |   |
|---------------|---|
| <b>Br-LPS</b> | Lipopolisacárido de <i>Brucella</i> .   |
| <b>BCV</b>    | Del inglés <i>Brucella</i> -containing vacuole.                                   |
| <b>GTP</b>    | Del inglés guanosine triphosphate.  |
| <b>EEA1</b>   | Del inglés early endosome antigen-1.  |
| <b>LAMP-1</b> | Del inglés lysosomal associated membrane protein-1.                               |
| <b>RE</b>     | Retículo endoplásmico.  |
| <b>ERES</b>   | Del inglés endoplasmic reticulum exit sites.                                      |
| <b>CNX</b>    | Calnexina.  |
| <b>CALR</b>   | Calreticulina.  |
| <b>COPII</b>  | Del inglés coat complex protein-II.   |
| <b>GAPDH</b>  | Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa.  |
| <b>ERGIC</b>  | Del inglés endoplasmic reticulum–Golgi intermediate compartment.                  |
| <b>rBCV</b>   | Del inglés replicative <i>Brucella</i> -containing vacuole.                       |
| <b>SST4</b>   | Sistema de secreción tipo IV.   |
| <b>VirB</b>   | Del inglés virulence B.   |
| <b>VjbR</b>   | Del inglés vacuolar jacking <i>Brucella</i> regulator.                            |
| <b>Vce</b>    | Del inglés VjbR-co-regulated effector.  |
| <b>RicA</b>   | Del inglés Rab2 interacting conserved protein A.                                  |
| <b>UPR</b>    | Del inglés unfolded protein response.   |
| <b>MMP-9</b>  | Del inglés matrix metalloproteinase-9.  |
| <b>TIR</b>    | Del inglés Toll/interleukin-1 receptor.   |
| <b>TLR</b>    | Del inglés Toll-like receptor.  |
| <b>Bsp</b>    | Del inglés <i>Brucella</i> secreted protein.                                      |
| <b>COG</b>    | Del inglés conserved oligomeric Golgi.  |
| <b>SepA</b>   | Del inglés secreted effector protein A.   |
| <b>HPLC</b>   | Del inglés high performance liquid chromatography.                                |
| <b>MS</b>     | Del inglés mass spectrometry.   |
| <b>SPN</b>    | Sobrenadante post-nuclear.  |
| <b>ILB</b>    | Del inglés isotonic lysis buffer.   |
| <b>PL</b>     | Post-lisis.   |
| <b>BCVP</b>   | BCVs purificadas en la 11 <sup>a</sup> fracción del gradiente de fraccionamiento. |
| <b>PGFC</b>   | Pellet del gradiente de fraccionamiento celular.                                  |
| <b>ROS</b>    | Del inglés, reactive oxygen species.  |



**Autorización para digitalización y comunicación pública de Trabajos Finales de Graduación del Sistema de Estudios de Posgrado en el Repositorio Institucional de la Universidad de Costa Rica.**

Yo, Heber Vianney Monge Arias, con cédula de identidad 7-1569-0234, en mi condición de autor del TFG titulado Modificaciones proteicas inducidas por Brucella abortus 2308w en compartimentos tempranos de masticagos RAW 264.7.

Autorizo a la Universidad de Costa Rica para digitalizar y hacer divulgación pública de forma gratuita de dicho TFG a través del Repositorio Institucional u otro medio electrónico, para ser puesto a disposición del público según lo que establezca el Sistema de Estudios de Posgrado. SI  NO \*

\*En caso de la negativa favor indicar el tiempo de restricción: 2 año (s):

Este Trabajo Final de Graduación será publicado en formato PDF, o en el formato que en el momento se establezca, de tal forma que el acceso al mismo sea libre, con el fin de permitir la consulta e impresión, pero no su modificación.

Manifiesto que mi Trabajo Final de Graduación fue debidamente subido al sistema digital Kerwá y su contenido corresponde al documento original que sirvió para la obtención de mi título, y que su información no infringe ni violenta ningún derecho a terceros. El TFG además cuenta con el visto bueno de mi Director (a) de Tesis o Tutor (a) y cumplió con lo establecido en la revisión del Formato por parte del Sistema de Estudios de Posgrado.

**INFORMACIÓN DEL ESTUDIANTE:**

Nombre Completo: Heber Vianney Monge Arias

Número de Carné: B79429 Número de cédula: 7-1569-0234

Correo Electrónico: heber.monge@ucr.ac.cr

Fecha: 13 de enero de 2020 Número de teléfono: 8799-2370

Nombre del Director (a) de Tesis o Tutor (a): Esteban Chaves Olarte

**FIRMA ESTUDIANTE**

Nota: El presente documento constituye una declaración jurada, cuyos alcances aseguran a la Universidad, que su contenido sea tomado como cierto. Su importancia radica en que permite abreviar procedimientos administrativos, y al mismo tiempo genera una responsabilidad legal para que quien declare contrario a la verdad de lo que manifiesta, puede como consecuencia, enfrentar un proceso penal por delito de perjurio, tipificado en el artículo 318 de nuestro Código Penal. Lo anterior implica que el estudiante se vea forzado a realizar su mayor esfuerzo para que no sólo incluya información veraz en la Licencia de Publicación, sino que también realice diligentemente la gestión de subir el documento correcto en la plataforma digital Kerwá.

## INTRODUCCIÓN

### **Brucelosis**

La brucelosis es una de las enfermedades bacterianas zoonóticas infecciosas más comunes alrededor del mundo. Es responsable de altas pérdidas económicas en la industria animal y además, al ser una enfermedad zoonótica, supone un riesgo serio para la salud humana (1). A pesar de que se dice que está erradicada en países de ingreso alto, aún se logran detectar más de 500 000 casos anuales de brucelosis humana en países de ingreso medio y bajo (2).

El agente etiológico de la brucelosis son bacterias del género *Brucella*. En sus hospederos primarios, la brucelosis tiene tropismo por órganos reproductores, desarrollando manifestaciones clínicas como abortos, disminución en la producción de leche en las hembras, infertilidad e infecciones genitales (3).

El humano se considera un hospedero accidental que desarrolla síntomas como fiebre ondulante, sudoración, debilitamiento, linfadenopatías e incluso complicaciones severas como meningoencefalitis, espondilitis, artritis y endocarditis (4, 5). Este cuadro clínico se considera difuso y genera confusión con otras enfermedades, lo cual dificulta el diagnóstico y facilita subrepresentación de las estadísticas epidemiológicas.

El contacto directo e indirecto con animales infectados o sus productos derivados, principalmente leche cruda y sus quesos, suponen un gran riesgo de infección para el ser humano (2). Es también sabido que el personal de fincas, veterinarios y

trabajadores de laboratorio son poblaciones con riesgo a infectarse debido a su labor cercana con animales infectados y con la bacteria (4).

### **Género *Brucella***

Las bacterias del género *Brucella* spp. son cocobacilos Gram-negativos que pertenecen a la clase  $\alpha$ -2 Proteobacterias, que incluye bacterias que coevolucionaron con sus hospederos animales o vegetales de manera simbiótica, como *Sinorhizobium meliloti* (simbionte de plantas), patogénica como ocurre con *Agrobacterium tumefaciens*, *Rickettsia* spp. y *Bartonella* spp., o agentes de vida libre como *Ochrobactrum* spp. (6).

Las brucelas son patógenos intracelulares de mamíferos y de crecimiento extracelular facultativo, por lo que su nicho preferido es el ambiente intracelular de las células hospedero (7, 8) en donde alcanzan niveles extensivos de replicación y diseminación. En los animales preñados, los trofoblastos y el feto son los sitios de mayor repleción y una fuente importante para infectar nuevos hospederos durante los abortos (3).

Actualmente se reconocen diez especies de brucelas dentro del género, la mayoría de ellas definidas de acuerdo con su preferencia por un tipo de hospedero (9). *Brucella abortus* afecta primariamente al ganado bovino, pero también es virulenta para humanos. Las personas generalmente se infectan al consumir productos lácteos no pasteurizados de vacas infectadas, o bien por contacto con excreciones animales (fetos, animales recién nacidos y excreciones resultantes del parto) (10).

Las brucelas han sido consideradas organismos para la guerra bacteriológica debido a sus dosis infecciosas bajas (10-100 bacterias), su capacidad de persistencia en el ambiente extracelular, su rápida transmisión a través de diferentes rutas como aerosoles, y además, su complicado tratamiento con antibióticos (2).

A diferencia de muchas bacterias patógenas, las brucelas no poseen los factores típicos de virulencia como: un lipopolisacárido endotóxico, exotoxinas, inductores de apoptosis, citolisinas, cápsulas, fimbrias, flagelos, plásmidos, fagos lisogénicos ni variaciones antigénicas; sino que su virulencia está dictada por determinantes moleculares que permiten la evasión, resistencia de la muerte intracelular y la replicación en fagocitos profesionales y no profesionales (3, 5).

Con base en la composición de su lipopolisacárido (*Br*-LPS), las especies de este género se clasifican en “lisas” o “rugosas” de acuerdo a la presencia de la porción terminal de azúcares de dicha estructura, denominada antígeno O (11). Las bacterias lisas, que sí poseen el antígeno, normalmente están asociadas a mayor virulencia y patogenicidad para humanos e incluyen *B. melitensis*, *B. abortus*, *B. neotomae*, y *B. suis* (8). Por otro lado *B. canis* presenta menor virulencia y patogenicidad para humanos con un fenotipo similar a los mutantes rugosos (12, 13) que poseen un lipopolisacárido de cadena O corta. Sin embargo, especies como *B. ovis* poseen naturalmente un LPS rugoso, son altamente virulentas para sus hospederos animales, pero no son zoonóticas (14).

### Tráfico endosomal constitutivo

En células animales, la endocitosis se refiere al proceso por el cual se internalizan fluidos, solutos, macromoléculas, componentes de membrana plasmática y partículas a través de la invaginación de la membrana celular y la formación de vesículas o vacuolas intracelulares a través de fisión membranal (15). Al clasificar, procesar, reciclar, almacenar, activar, silenciar y degradar los componentes y receptores entrantes, los endosomas son responsables de la regulación y el ajuste de numerosas vías en la célula (15).

La mayoría de la carga internalizada durante la endocitosis es reciclada de vuelta a la membrana plasmática vía endosomas tempranos (ETe), lo cual implica que los procesos de transporte hacia endosomas tardíos (ETa), y seguidamente a lisosomas, son una vía alternativa limitada estrictamente a cierto tipo de solutos y partículas ingeridas por la célula (15). La mayoría de las partículas de gran tamaño (como bacterias y virus) son dirigidas hacia los ETa para su posterior degradación en lisosomas.

**Tabla 1.** Determinantes moleculares y funcionalidad de los compartimentos endosomales\*.

| Compartimento | Determinantes moleculares asociados | Función  | pH      |
|---------------|-------------------------------------|--|---------|
| ETe           | EEA1, Rab5, Rab4, Rab11, Arf1/COPI. | Reciben las partículas endocitadas en la periferia citoplásmica. Clasifican las partículas para su posterior tránsito. | 6.8-6.1 |
| ETa           | Rab7, LAMP-1, hidrolasas ácidas.    | Transportan carga para degradación en lisosomas. Transportan nuevas  | 6.0-4.8 |

|          |                 |            |  |      |
|----------|-----------------|------------|--|------|
| Lisosoma | LAMP-1, ácidas. | hidrolasas | Organela degradativa de material extra o intracelular. | ~4.5 |
|----------|-----------------|------------|--|------|

\*Adaptado de (15).

La asociación de proteínas membranales del citosol o desde otros compartimentos a los endosomas definen sus atributos funcionales. Las principales moléculas que coordinan los estados de anclaje, transporte y movilización de organelas y compartimentos dentro de la célula hospedera son las GTPasas Rab, haciéndolas candidatas perfectos para determinar la especificidad e identidad del transporte vesicular (16). En la tabla 1 se describen los principales determinantes moleculares y la funcionalidad de los compartimentos en cuestión.

### **Patogénesis**

Tanto en los hospederos primarios como en los accidentales, una vez que *Brucella* sp. penetra el epitelio intestinal, respiratorio, conjuntival o reproductivo, es transportada, libre, o dentro de fagocitos hacia los ganglios linfáticos cercanos en donde se disemina de manera sistémica (17).

De esta forma, el patógeno puede alcanzar sitios anatómicos importantes para su persistencia como la médula ósea, ganglios linfáticos y bazo, dentro de los cuales sobrevive intracelularmente y se replica eficientemente en monocitos/macrófagos (5, 18). Esta capacidad de establecer un ciclo de vida intracelular es esencial dentro de la patogénesis y persistencia de la brucelosis.

Las células M, macrófagos, células dendríticas y neutrófilos ingieren a la bacteria por fagocitosis. En los neutrófilos las bacterias no se replican, resisten la acción



bactericida e inducen la muerte prematura de estos leucocitos a través de la liberación del *Br*-LPS dentro de las vacuolas (19).

Una vez en el interior de los macrófagos y células dendríticas la mayoría de las brucelas transitan desde los ETe hacia ETa en un compartimento llamado BCV (20).

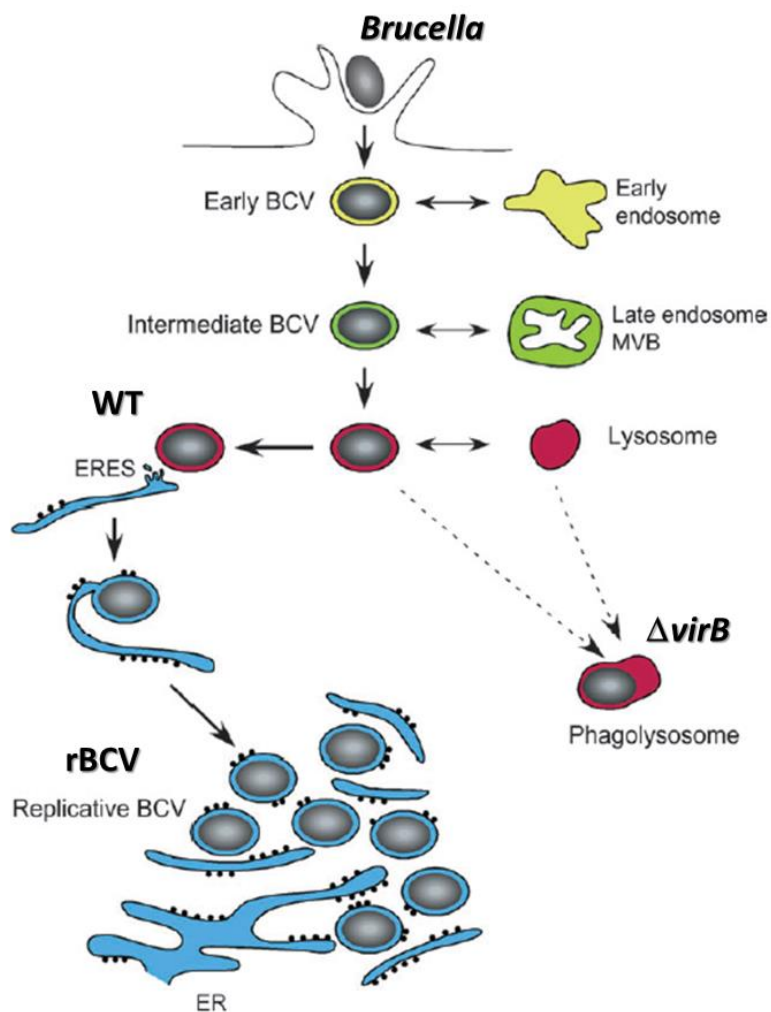
En la etapa temprana del tránsito intracelular hay un reclutamiento de diferentes marcadores celulares en las BCVs como la GTPasa Rab5 y la proteína de anclaje antígeno endosomal temprano 1 (EEA1), luego son enriquecidas con colesterol y flotilina-1, una proteína involucrada en balsas lipídicas y su señalización con la maduración fagosomal e interacción con la vía endocítica (6).

Las BCVs adquieren transitoriamente durante su maduración la glicoproteína lisosomal asociada a membrana-1 (LAMP-1) y la GTPasa monomérica Rab7, características de ETa, para posteriormente dirigirse hacia el RE. La mayoría de las células de *Brucella* (70-85%) que son internalizadas no logran el tránsito hacia RE y son llevadas a fagolisosomas donde son destruidas (20, 21).

Alrededor de un 15-30% de las bacterias en BCVs redirigen su tráfico intracelular evitando la ruta hacia el lisosoma y permaneciendo en compartimentos endocíticos (6, 22, 23). Posteriormente, la BCV modifica su composición mediante la pérdida de LAMP-1, interactúa con los sitios de salida del RE (ERES) adquiriendo proteínas marcadoras de RE como calnexina (CNX) y calreticulina (CALR), e iniciando el establecimiento de la BCV replicativa (rBCV) (24–27) (Fig. 1). Esta pérdida y adquisición de marcadores lisosomales y de RE en la BCV,

respectivamente, son características distintivas de la invasión intracelular por *Brucella*.

El proceso de fusión con el RE se da gracias a una íntima interacción con los ERES en un proceso que depende de la GTPasa Sar1 y la consecuente formación de vesículas de transporte COPII-dependientes (24). Durante este proceso se reclutan la GTPasa Rab2 y GAPDH en la BCV (25) que regulan el tráfico entre el RE y el ERGIC y que son requeridos para la biogénesis de la rBCV.



**Figura 1.** Modelo del tráfico intracelular de *Brucella*. (22)

Por otro lado, en fagocitos no profesionales, *Brucella* se adhiere a las células e induce su internalización mediante fagocitosis dependiente del reclutamiento de filamentos de actina, la activación de GTPasas monoméricas, particularmente Cdc42, y la transducción de señales mediada por segundos mensajeros (28). Estas GTPasas regulan la polimerización de actina y son manipuladas por la bacteria para inducir la penetración a células no fagocíticas (28, 29).

Para lograr establecer este ciclo de vida intracelular, *Brucella* requiere de una serie de determinantes moleculares que actúan de manera importante en cada etapa del ciclo. Entre estos factores de virulencia se encuentran los  $\beta$ -1,2-glucanos cíclicos, el *Br*-LPS, el sistema de secreción tipo IV (SST4) VirB, entre otros (30).

### **Sistema de secreción tipo IV VirB**

Los SST4 pertenecen a una familia de complejos multiproteicos bacterianos transmembranales. Estos sistemas están presentes en bacterias intracelulares - Gram-negativas patógenas y atraviesan sus membranas para formar un aparato translocador de macromoléculas. Esta maquinaria propicia dentro del hospedero un ambiente que favorece la sobrevivencia, multiplicación bacteriana y, aunado, la evasión del sistema inmune (31).

Las bacterias del género *Brucella* poseen el SST4 VirB, codificado por el operón *virB*, el cual expresa un complejo de 11 proteínas altamente conservadas (VirB1-VirB11) (32). VirB es un sistema fundamental para la sobrevivencia intracelular de *Brucella* spp. y se asocia con la maduración de las BCVs; ya que las mutantes en el SST4 VirB son incapaces de alcanzar su nicho replicativo al impedirse la fusión de las BCVs con el RE (Fig. 1).

La expresión sincronizada del SST4 es el resultado de varias proteínas que actúan como reguladores de la transcripción del mismo en respuesta a diversas señales, principalmente la acidificación de la BCV (32). Su función radica en la exclusión de marcadores fagolisosomales de la BCV temprana para finalizar con la maduración de la misma hasta la rBCV, en donde los niveles de expresión genética de *virB* descienden (21, 22, 24), sin embargo, no se conocen cuáles determinantes moleculares juegan un papel decisivo en esta etapa.

Algunos de los factores de transcripción que participan en la regulación del operón *virB* son IHF, HutC, Hfq, MdrA, BlxR, VjbR, entre otros (33–38). La proteína IHF interactúa directamente con el promotor de *virB* e induce un cambio estructural en el ADN que posiblemente favorece la interacción con otros factores de transcripción (38). Uno de estos otros factores de transcripción que se unen directamente tras la acción de IHF es HutC; un regulador de la familia GntR que relaciona la expresión del operón *virB* con el catabolismo de histidina. Además, MdrA es un regulador de la familia de factores de transcripción MarR, que regula genes de virulencia, genes implicados en el catabolismo de compuestos aromáticos y genes de respuesta a estrés (39). Finalmente, BlxR y VjbR son dos reguladores de “*quorum sensing*” de la familia LuxR.

A pesar del importante papel de VirB en la vida intracelular de las bacterias del género *Brucella*, la expresión del mismo tanto *ex vivo* como *in vitro* es puntual, es decir, su expresión no es constitutiva y está regulada por señales ambientales específicas (23, 38, 40). Mientras que en caldos de cultivos su expresión es altamente dependiente de la fase de la curva de crecimiento en la que se

encuentre la bacteria y el pH del medio (40–42), en modelos celulares *ex vivo* la transcripción del operón *virB* alcanza un punto máximo a las 5 horas de haber ingresado la bacteria al interior de la célula, se liberan los efectores necesarios para la modulación del tráfico celular y tiempo después la expresión del sistema VirB es rápidamente reprimida y se da entonces el comienzo de la replicación intracelular bacteriana (38).

### **Proteínas efectoras VirB-dependientes**

Lo anterior ha llevado a postular que el SST4 secreta proteínas que regulan e interfieren con los procesos de tránsito intracelular al propiciar la interacción con el RE y la sobrevivencia en fagocitos profesionales y no profesionales (21, 43–46). Estudios recientes con distintas metodologías bioinformáticas y experimentales han logrado encontrar alrededor de 15 moléculas efectoras secretadas por VirB al citosol de la célula hospedera (47, 48).

Los miembros del regulón VjbR: efector VirB-co-regulado C (VirB-co-regulated effector C, VceC) y VceA fueron los primeros en descubrirse y son translocados dentro de macrófagos por el SST4 (49). La proteína VceC interacciona con BiP/Grp78, induce estrés en el RE, reorganiza las estructuras en esta organela e induce una respuesta proinflamatoria en la célula hospedera (50).

Otra proteína efectora llamada RicA (Rab2 interacting conserved protein A) interacciona con Rab2, una GTPasa pequeña que es reclutada a las BCVs y que media el tráfico vesicular de Golgi-a-RE, y es secretada de manera VirB-dependiente (51), ya que dicha traslocación no fue detectada en infecciones con mutantes *virB*.

Marchesini *et al.*, identificaron 4 proteínas que requieren de un SST4 VirB funcional para ser translocadas al citoplasma de las células hospederas infectadas con *B. abortus* (Accesión NCBI: [359391](#)): BPE043, BPE005, BPE275 y BPE123 (52). Sin embargo, los resultados no lograron elucidar el papel molecular de estas proteínas en la patogénesis.

Posteriormente en otros estudios se determinó que la proteína BPE123 tiene como función la activación  $\alpha$ -enolasa de la célula hospedera a través de cambios conformacionales y/o funcionales, contribuyendo al estilo de vida intracelular de *B. abortus* (53); y que BPE005 promueve deposición de colágeno y la regulación negativa de la metaloproteinasa de matriz-9 (MMP-9), a través de la transformación del factor de crecimiento  $\beta$ 1 en células hepáticas estrelladas (54).

En otros estudios recientes se determinó que la proteína TcpB/BtpA induce la vía de respuesta a proteínas desdobladas (UPR) apoyando la replicación intracelular (55) y la degradación de caspasas inflamatorias en macrófagos, lo que subvierte la activación del inflamasoma y finalmente atenúa la piroptosis y la inflamación (56).

BtpA, nombrado como Btp1 por Salcedo y colaboradores, fue encontrado gracias al análisis de secuencias del genoma de *B. abortus* 2308W en búsqueda de candidatos interferentes con el desarrollo de células dendríticas (46). Se encontró que en el extremo C-terminal de esta proteína existe un dominio con alta similitud de secuencia con la familia de dominios de receptores Toll/interleucina 1 (TIR), ya que se ha demostrado que muchas bacterias patógenas poseen proteínas con estos dominios que contribuyen a su patogénesis (47, 57). En este estudio se logró determinar que BtpA controla la maduración y funcionalidad de

células dendríticas infectadas con *B. abortus*, favoreciendo el establecimiento de una infección crónica (46).

BtpB fue el segundo efector de *Brucella* encontrado que contiene un dominio TIR, y tiene un rol importante en la modulación en la respuesta inmune innata durante la infección al actuar como inhibidor de la señalización de receptores tipo Toll (TLR) e interfiriendo con la activación de las células dendríticas (58).

Por otro lado, las proteínas efectoras BspA, BspB y BspF del SST4 median la inhibición de la secreción de proteínas por parte de la célula hospedera, actuando coordinadamente para promover la patogénesis de *Brucella* (59). Se reportó recientemente que BspB contribuye a la biogénesis de la rBCV a través de la interacción con el complejo de anclaje oligomérico conservado de Golgi (COG) (60), uno de los mayores coordinadores del tráfico vesicular del Golgi, para así remodelar el tráfico membranal y promover la proliferación bacteriana.

Adicionalmente, la proteína efectora SepA fue identificada por el grupo de Döhmer y colaboradores, al estar codificada en una región transmitida lateralmente y ser confirmada como un substrato del SST4 VirB (61). Participa en las etapas tempranas de la supervivencia intracelular y no tiene homología detectable con otras proteínas conocidas. Los resultados evidenciaron que mutantes  $\Delta sepA$  muestran un defecto en la exclusión de LAMP-1 y que fueron inactivadas más eficientemente en etapas tempranas del ciclo de vida intracelular en comparación con la cepa silvestre (61).

Luego de más de una década de investigación de muchos grupos de trabajo, ni el mecanismo completo de acción del SST4 VirB, ni el de sus efectores se ha

definido (9). Se conoce que las cepas mutantes en este sistema o la mayoría de sus efectores tienen impedimentos particulares en el establecimiento del nicho replicativo en el RE (21). No obstante, no se conocen los marcadores determinantes del redireccionamiento de la BCV hacia el RE en etapas tempranas (6 h) de la infección intracelular.

Es importante lograr elucidar los marcadores celulares eucariotas y procariotas particulares que son necesarios en tiempos tempranos para el establecimiento posterior de la rBCV, aunque se conoce que depende de VirB, los mecanismos que rigen la biogénesis de este compartimento siguen siendo elusivos. Los estudios de caracterización proteómica de vacuolas y membranas modificadas por patógenos purificadas proveen bases importantes y fundamentales dirigidas al abordaje de nuevas investigaciones en mecanismos específicos de bacterias patógenas que modulan el tráfico intracelular y generan compartimentos como paso esencial en sus etapas de patogénesis (62), específicamente en *B. abortus*.

## **HIPÓTESIS**

En momentos tempranos de la infección, *Brucella abortus* modifica los perfiles proteicos de la BCV mediante la acción de su aparato VirB.

## **SINOPSIS DEL TRABAJO**

### **Objetivo general**

Para demostrar dicha premisa, este trabajo tiene por objetivo determinar las modificaciones proteicas de la BCV asociadas al aparato VirB en el inicio de la infección en macrófagos.



**Objetivos específicos**

- 1) Diseñar una estrategia para purificar BCVs de macrófagos infectados con *B. abortus*.
- 2) Determinar modificaciones cualitativas y cuantitativas de proteínas de la célula y de la bacteria en BCVs dependientes de la secreción de VirB al inicio de la infección de macrófagos.
- 3) Proponer un modelo conceptual que ilustre cómo *B. abortus* 2308W modifica la composición proteica de las BCVs a tiempos tempranos.

**JUSTIFICACIÓN**

A pesar de los esfuerzos realizados por diversos grupos de investigación y los avances en experimentación actuales, se desconocen la mayoría de los componentes de las BCVs. En este proyecto pretendemos profundizar en la comprensión de la composición de las BCVs, el conocimiento de la evasión de la ruta endocítica de las brucelas, las interacciones entre la célula hospedero y las brucelas y aclarar algunos aspectos mecanísticos que usan las bacterias intracelulares.

El abordaje experimental del proyecto permitirá el enriquecimiento de las proteínas de la BCV para luego poder identificarlas y plantear nuevas rutas experimentales para hallar a los elementos moleculares que participan en la ruta que siguen las BCVs hacia el retículo endoplasmático.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Cepas bacterianas

Las cepas bacterianas que se utilizaron en este estudio fueron: *B. abortus* 2308W (tipo salvaje virulenta) (63), una cepa isogénica, atenuada, *B. abortus* 2308W  $\Delta virB10$  (41) y *B. abortus* 2308W-RFP (64) (Tabla 2). Estas bacterias se crecieron en caldo tripticasa de soya (CTS) hasta llegar a fase de crecimiento exponencial siguiendo métodos ya descritos (65).

**Tabla 2.** Cepas bacterianas utilizadas.

| <i>B. abortus</i> | Características  | Referencia                             |
|-------------------|--|--|
| 2308W             | Cepa de referencia <i>B. abortus</i> 2308 Wisconsin. Salvaje, altamente virulenta.   | (63)                                   |
| <i>virB10</i>     | <i>B. abortus</i> 2308W con delección polar del marco de lectura del gen <i>virB10</i> . SST4 no funcional, no se replica en macrófagos. | (41)                                   |
| 2308W-RFP         | 2308W con expresión constitutiva de la proteína roja fluorescente (RFP) de <i>Discosoma</i> .  | Jean-Jacques Letesson (Namur, Bélgica) |

### Cultivos celulares e infecciones

Macrófagos murinos RAW 264.7 fueron cultivados como se describió anteriormente (65). Todas las infecciones de macrófagos con las cepas de *B. abortus* se realizaron a una MOI de 1000:1 utilizando ensayos de protección de gentamicina (65) como se detalla a continuación.

Los macrófagos cultivados en medio Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) suplementado con antibióticos (penicilina 10 000  $\mu\text{g/mL}$  y estreptomycinina

10 000 U/mL) y 10% de suero fetal bovino fueron llevados a una confluencia de un 80-90% en placas de 6 pozos. Posteriormente se removió el medio, se inocularon los macrófagos con la solución bacteriana respectiva preparada en medio DMEM de infección (DMEM, 10 % suero fetal bovino), se centrifugaron las placas a 1 600 rpm para fomentar el contacto e internalización de *B. abortus* y se incubó 45 min a 37°C con una atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub>.

Seguidamente se removió la solución de DMEM de infección y se agregó medio de eliminación de bacterias extracelulares (DMEM de infección, gentamicina 100 µg/mL), se incubó bajo las mismas condiciones anteriores por 30 min. Luego de la incubación se sustituyó este medio por medio de mantenimiento de infección (DMEM de infección, gentamicina 5 µg/mL). Las mediciones posteriores se realizaron a las 6 horas post infección (h.p.i.).

### **Aislamiento y enriquecimiento de BCVs**

Para aislar BCVs, macrófagos infectados durante 6 h se lisaron, fraccionaron y los fagosomas se enriquecieron al seguir protocolos descritos previamente. Primero, las BCVs se aislaron en un sobrenadante post nuclear (SPN) según la metodología de Chaves-Olarte *et al.* (65) y luego, se enriquecieron por un gradiente discontinuo de sacarosa de acuerdo con la metodología descrita por Desjardins *et al.* (66), con algunas modificaciones descritas a continuación.

Brevemente, para lisar las células infectadas y mantener las BCVs íntegras, el precipitado del raspado de células infectadas se resuspendió en un amortiguador de lisis isotónico (ILB; sacarosa 250 mM, Hepes 20 mM, EGTA 0.5 mM y cóctel de

inhibidores de proteasas, pH 7.4) (67) y se pasó manualmente a través de una aguja de tuberculina (26G x 1') en una jeringa de 5 mL durante 25 veces para lisar primero las membranas plasmáticas, pero no los núcleos de la célula. Los amortiguadores se mantuvieron en frío y el procedimiento se realizó sobre hielo. Luego, se añadió 25 U/mL de Benzonasa (Sigma-Aldrich), enzima que degrada ácidos nucleicos, y se incubó durante 30 minutos a 37°C para eliminar restos de ácidos nucleicos. Esta solución se cargó en un primer gradiente de sacarosa 0.8 M (65), para obtener el SPN mediante centrifugación.

El SPN se llevó al 40% de sacarosa añadiendo el mismo volumen de solución de sacarosa al 62% (todas las soluciones de sacarosa serán preparadas por % peso/peso en Imidazol 3 mM, pH 7.4) y se cargó en un gradiente escalonado de sacarosa discontinuo (66) para enriquecer las BCVs mediante ultracentrifugación (1 h, 100 000 x g).

Para rastrear mediante inmunofluorescencia la purificación y el enriquecimiento de las BCVs, las células se infectaron con la cepa 2308W-RFP durante 6 h. El recuento bacteriano se calculó como el promedio con variación de las UFC/mL crecidas en agar tripticasa soya (ATS) directamente de las distintas fracciones resultantes del proceso de enriquecimiento. Dichas fracciones también se evaluaron mediante microscopía de inmunofluorescencia como se describe más adelante.

### **Extracción de proteínas**

Para los análisis posteriores se infectaron 3 placas de 6 pozos con macrófagos murinos RAW 264.7 con las cepas *B. abortus* 2308W o *virB10*, de la manera

descrita anteriormente, con el fin de obtener muestras de proteínas procedentes de bacterias intracelulares, proteínas luminales (del lumen de la vacuola) y de membrana provenientes de las BCVs a las 6 horas post-infección (h.p.i.).

Las fracciones celulares enriquecidas con las BCVs se diluyeron 1:4 en ILB, para disminuir la concentración de sacarosa, y se centrifugaron a  $16\ 873 \times g$  durante 15 minutos en un rotor de ángulo fijo (Eppendorf, FA-42-18-11) en una centrifuga Eppendorf 5418 con el fin de sedimentar las BCVs. El sedimento se resuspendió en Triton X-100 (0,1% peso/volumen en PBS), para solubilizar las proteínas de membrana y luminales de las BCVs, y las proteínas de las BCVs se extrajeron mediante centrifugación (mismas condiciones previas) en el sobrenadante resultante, también separando las brucelas intracelulares (BI) en esta centrifugación (25).

Para lisar las brucelas intracelulares resultantes y recuperar sus proteínas, el sedimento obtenido del lisado de las BCVs se resuspendió en SDS al 2% p/v, se incubó a  $100\ ^\circ\text{C}$  durante 15 min, se centrifugó (mismas condiciones previas) y se aislaron las proteínas de las BI en este sobrenadante (65).

Los lisados de las BCVs procedentes de macrófagos RAW 264.7 infectados con la cepa 2308W y *virB10* fueron procesados con columnas Pierce Detergent Removal Spin Column (Thermo Scientific) para remover remanentes de Tritón X-100 y se cuantificó la concentración de proteínas para su posterior análisis proteómico por HPLC-MS/MS. Se procesaron muestras procedentes de 3 experimentos independientes de purificación de BCVs de macrófagos infectados con 2308W o *virB10* durante 6 h.p.i. Además, se prepararon lisados de caldos crecidos hasta

fase exponencial de las cepas bacterianas 2308W y *virB10* y de macrófagos murinos RAW 264.7 sin infectar (65) para los controles de SDS-PAGE y WB.

### **Liofilización**

Se asignó 3 réplicas biológicas, i.e. muestras de 3 experimentos independientes, para su posterior análisis proteómico. Muestras de 10 µg de proteínas totales destinadas a HPLC-MS/MS fueron liofilizadas por 24 h en un BenchTop Pro with Omnitronics (SP Scientific) previo a su envío al Laboratorio de Proteómica de la facilidad CellNanOS en la Universidad de Osnabrück, Osnabrück, Alemania.

### **Análisis inmunoquímico**

Se realizó SDS-PAGE y Western blot (WB) de las muestras de lisados de las BCVs y BI procedentes de la infección a macrófagos RAW 264.7 con 2308W o *virB10* como se describió previamente (65) con el fin de analizar la composición proteica de las muestras procedentes de la purificación. El contenido proteico total de las muestras se visualizó con azul brillante de Coomassie R-250.

Los anticuerpos primarios utilizados para WB fueron:  $\alpha$ -LAMP-1 de conejo (abcam, ab24170),  $\alpha$ -CNX de conejo (abcam, ab10286),  $\alpha$ -CALR de conejo (abcam, ab2907),  $\alpha$ -actina (ACTA1; Sigma A2066) y  $\alpha$ -Omp19 de ratón (purificado y validado por nuestro equipo de investigación).

Se usó suero completo de vacas positivas para *B. abortus* y ratones inmunizados contra *B. abortus* como anticuerpos primarios con el fin de detectar posibles moléculas inmunorreactivas en las BCVs. Además, se utilizó los anticuerpos

primarios M84 ( $\alpha$ -*Br*-LPS de ratón) y YST9 ( $\alpha$ -*Br*-LPS HRP-conjugado) (68) para detectar el *Br*-LPS en los lisados de las BCVs.

Los anticuerpos primarios se detectaron mediante quimioluminiscencia utilizando con anticuerpos HRP-conjugados (Invitrogen) contra las respectivas especies animales utilizando el sustrato Super Signal West Pico Plus (Thermo Scientific). Las respectivas membranas fueron visualizadas en un ChemiDoc XRS (Bio-Rad).

### **Microscopía de inmunofluorescencia**

Se realizó microscopía de inmunofluorescencia directamente sobre las BCVs enriquecidas, para determinar la compartimentalización de las brucelas en las distintas etapas del protocolo de purificación. Se usó un suero de vaca  $\alpha$ -*Brucella* como anticuerpo primario (validado por nuestro equipo de investigación) y se visualizó con un anticuerpo secundario  $\alpha$ -vaca conjugado con isotiocianato de fluoresceína verde (FITC; Invitrogen), como se describió previamente (65). Las imágenes se obtuvieron en un microscopio de inmunofluorescencia ECLIPSE 80i (Nikon) equipado con un lente objetivo CFI Plan Fluor 100XS Oil (Nikon) y cubos de filtros G2-A (Nikon), B2-A (Nikon) y UV-1A (Nikon). Las imágenes fueron capturadas con una cámara DS-Qi1Mc.

### **Obtención de péptidos trípticos**

Un total de 10  $\mu$ g de proteína fueron disueltos en 10  $\mu$ L de Tris-HCl 10 mM pH 8.5 con 6 M urea. Los residuos de cisteína fueron reducidos agregando 1  $\mu$ L de 10mM DTT (en 10 mM Tris-HCL, 6 M urea pH 8.5) por 30 min a 37°C y se agregó 1  $\mu$ L

de iodoacetamida 100 mM en el mismo buffer (30 min a temperatura ambiente) como agente alquilante.

La digestión inició agregando 1  $\mu$ L de mezcla de proteasas al 1 mg/mL (Lys-C/Trypsin, Promega V5071) y se incubó por 4 h a 37 °C. Subsecuentemente, la muestra se diluyó con 67  $\mu$ L de Tris-HCl (pH 8.5) y se incubó por 12 h más. Se removieron las partículas por centrifugación y el sobrenadante con los péptidos se transfirió a viales de HPLC.

### **HPLC-MS/MS**

Los siguientes pasos cromatográficos fueron llevados a cabo en un equipo UltiMate 3000 nano-HPLC (ThermoFisher): Los primeros 8  $\mu$ L de las muestras fueron desalinizados y concentrados utilizando una precolumna C18 PepMap (ThermoFisher, 5  $\mu$ m, 100A con dimensión de 300  $\mu$ m (I.D.) x 5 mm de largo). El solvente correspondiente fue agua suplementada con 0.1% ácido trifluoroacético (TFA) (solución A) a una tasa de flujo de 25  $\mu$ L/min.

La columna cargada y lavada fue cambiada a la línea de nano flujo (25 nL/min), en donde una columna EASY-Spray C18 (ThermoFisher, PepMap RSLC C18, 2  $\mu$ m 100A con dimensión de 75  $\mu$ m (I.D.) x 500 mm) se montó en la salida. Los péptidos fueron eluidos mediante cromatografía líquida en fase reversa utilizando un gradiente ascendente de acetonitrilo (ACN). Se inició con 100% de la solución A y se finalizó con 80% de la solución B (80% ACN, 20% agua y 0.1% TFA) continuamente por 160 min. La ionización por electro spray (ESI) se realizó a 1500 V (ESI Spray Source, ThermoFisher).



Un espectrómetro de masas Q Exactive Orbitrap (ThermoFisher) se utilizó para capturar datos de fragmentación por disociación colisional de alta energía (HCD) bajo las siguientes condiciones:

**Tabla 3.** Parámetros de obtención de datos MS y MS/MS.

| Parámetro                                     | MS           | Selección de precursor MS | MS/MS   |
|---|--------------|---------------------------|---------|
| Resolución                                    | 70 000       |                           | 17 500  |
| Control automático de ganancia (AGC) objetivo | 3e6          | 5e2                       | 1e5     |
| Umbral de intensidad (IT) máximo              | 50 ms        |                           | 80 ms   |
| Rango MS                                      | 375-1800 m/z |                           |         |
| Conteo de bucles                              |              |                           | 10      |
| Energía de colisión normalizada (NCE)         |              |                           | 27      |
| Ancho de aislamiento                          |              |                           | 1.4 m/z |
| Carga   |              | 2-5                       |         |

Los datos colectados fueron cargados en el software PEAKS Studio X (Bioinformatics Solutions Inc., Canada). Los péptidos fueron identificados utilizando un abordaje *de novo* y las correspondientes proteínas utilizando las bases de datos del proteoma de [Mus musculus](#) UP000000589 y [Brucella abortus 2308](#) UP000002719 (UniProt) fusionadas en un archivo FASTA.

Para dicha búsqueda la tolerancia MS fue ajustada a 15 ppm, la tolerancia MS/MS a 0.2 Da. Se estableció como modificación postraducciona fija la carbamidometilación de cisteínas (+ 57.05 Da) y como modificación variable la oxidación de metioninas (+ 15.99 Da).

Para el análisis libre de marcaje la lista de proteínas resultante fue filtrada de acuerdo con los siguientes parámetros: a) características peptídicas con una puntuación de calidad  $\geq 10$ , intensidad media  $\geq 1 \times 10^6$  y detección en 2 o más muestras por grupo, y b) proteínas con una tasa de descubrimientos falsos (FDR)  $\leq 1\%$ , cambio en proporción  $\geq 2$  o  $\leq 1/2$ , utilizando el método de significancia PEAKSQ y conteniendo al menos 1 péptido único.

### **Análisis bioinformático**

Se exportaron las listas generadas por el software PEAKS Studio X con el fin de realizar comparaciones entre las proteínas detectadas en las BCVs células infectadas con *B. abortus* 2308W y *virB10*. Las listas fueron ordenadas y comparadas con el software Excel del paquete de Microsoft® Office para determinar las proteínas de cada grupo (2308W o *virB10*) que estuvieran presentes en al menos 2 de 3 las réplicas biológicas analizadas y ausentes en las 3 réplicas del grupo contrario (proteínas exclusivas).

La función anticipada de las proteínas de las listas fue asignada mediante anotación funcional con la herramienta bioinformática de uso libre disponible en línea [BlastKOALA](#) (69).

## RESULTADOS

### **La optimización del protocolo de fraccionamiento celular permitió el enriquecimiento de BCVs**

Se implementó un protocolo de aislamiento de BCVs de macrófagos murinos RAW 264.7 en etapas tempranas de infección (6 h), con el fin de enriquecer estos compartimentos y realizar análisis posteriores de caracterización a distintos niveles.

Mediante la técnica de ensayo de protección con gentamicina, se infectó macrófagos murinos y a las 6 h.p.i. se lisaron mecánicamente los mismos para recuperar el contenido intracelular. El lisado se sometió a un primer gradiente de sucrosa para remover organelas pesadas de la célula hospedero, obtener un sobrenadante post-nuclear y posteriormente, éste mismo se fraccionó en un gradiente discontinuo de sucrosa con el fin de enriquecer las BCVs (Fig. 2A).

Para evaluar la presencia de las bacterias y su concentración durante el procedimiento de purificación en las etapas post-lisis, sobrenadante post-nuclear y en el fraccionamiento celular, se determinó las UFC/mL y el porcentaje de bacterias 2308W-RFP recuperadas en el interior de un compartimiento derivado de la célula hospedero (Fig. 2B).

Combinando estas estrategias fue posible evidenciar el enriquecimiento progresivo de las BCVs en cada fase del protocolo (Fig. 2). Se analizó la densidad poblacional bacteriana en cada fracción del gradiente de fraccionamiento celular luego de la ultracentrifugación. En la fracciones 1-10, fue posible encontrar el 2 % de bacterias totales, en la fracción número 11 (interfase superior de sucrosa al

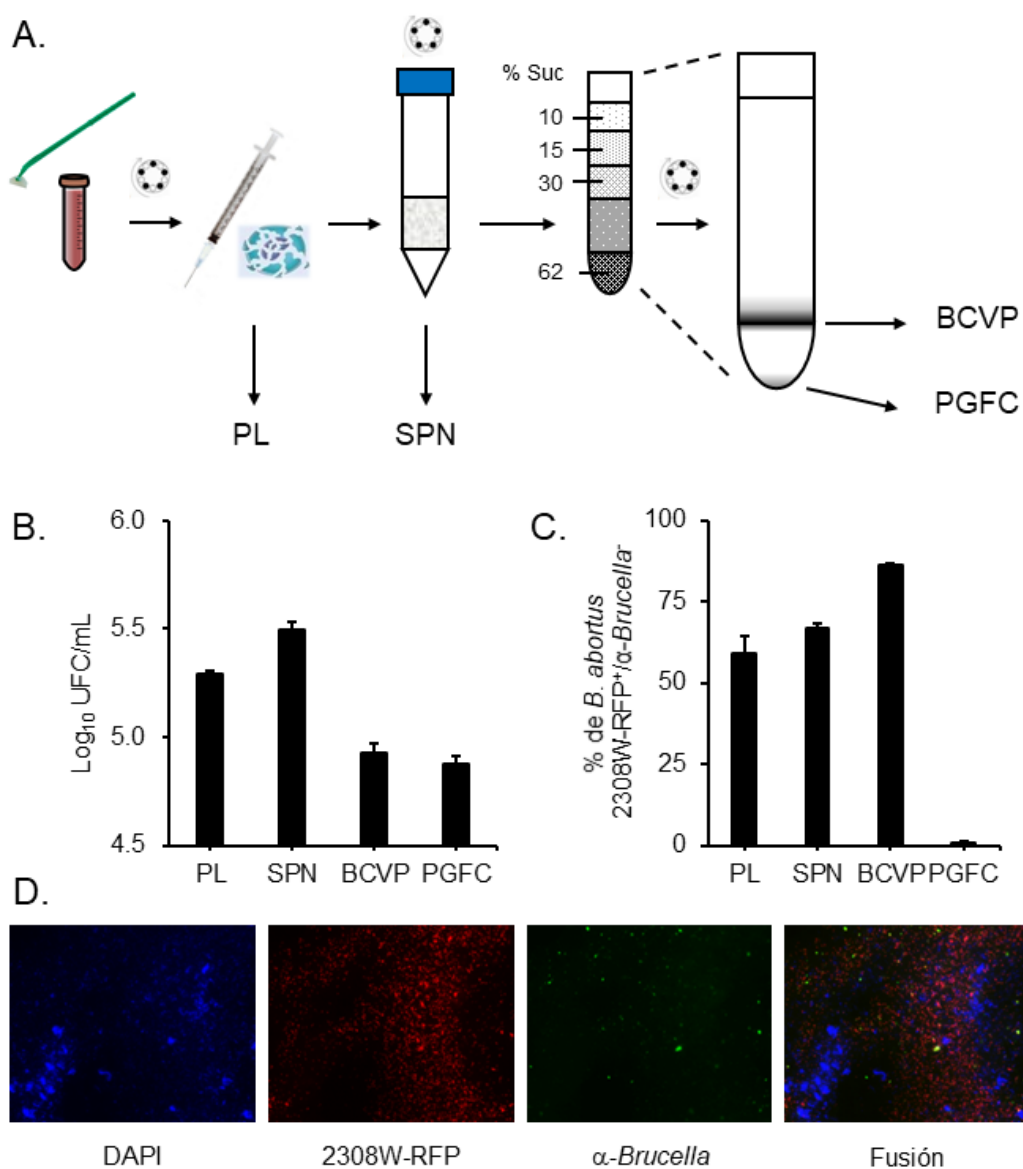
62%) se encontró el 63 % de bacterias totales (Fig. 2A, BCVP), mientras que, en el precipitado se detectó el 35% restante (Fig. 2A, PGFC).

Con el fin de analizar la compartimentalización de dichas bacterias se utilizó inmunofluorescencia con un anticuerpo bovino  $\alpha$ -*Brucella* contra las bacterias 2308W-RFP en la muestra. Bajo esta lógica, si el anticuerpo interacciona con la bacteria, entonces esta estaba accesible y afuera por lo que se visualiza amarilla al colocalizar ambas fluorescencias roja y verde; mientras que, si el anticuerpo no interacciona con la bacteria veríamos únicamente las brucelas rojas fluorescentes, indicando la presencia de una membrana alrededor de ellas (BCV).

Mediante esta estrategia se logró detectar en la fracción 11 un 86% de las brucelas compartimentalizadas en las BCVs (Fig. 2C-D). Mientras que, en el precipitado del gradiente de fraccionamiento celular, el 99% de las bacterias estaban afuera de las vacuolas ya que prácticamente todas fueron accesibles al anticuerpo  $\alpha$ -*Brucella* (Fig. 2C).

### **Las BCVs presentan perfiles inmunorreactivos diferentes de manera VirB-dependiente**

Las BCVs enriquecidas se lisaron con Tritón al 0.1% y las bacterias remanentes con SDS 2% (Fig. 3A). Se realizó caracterización bioquímica e inmunoquímica de los compartimentos intracelulares contenedores de brucelas mediante WB con el fin de determinar si incluyen marcadores celulares de tráfico intracelular, citoesqueleto y bacterianos.

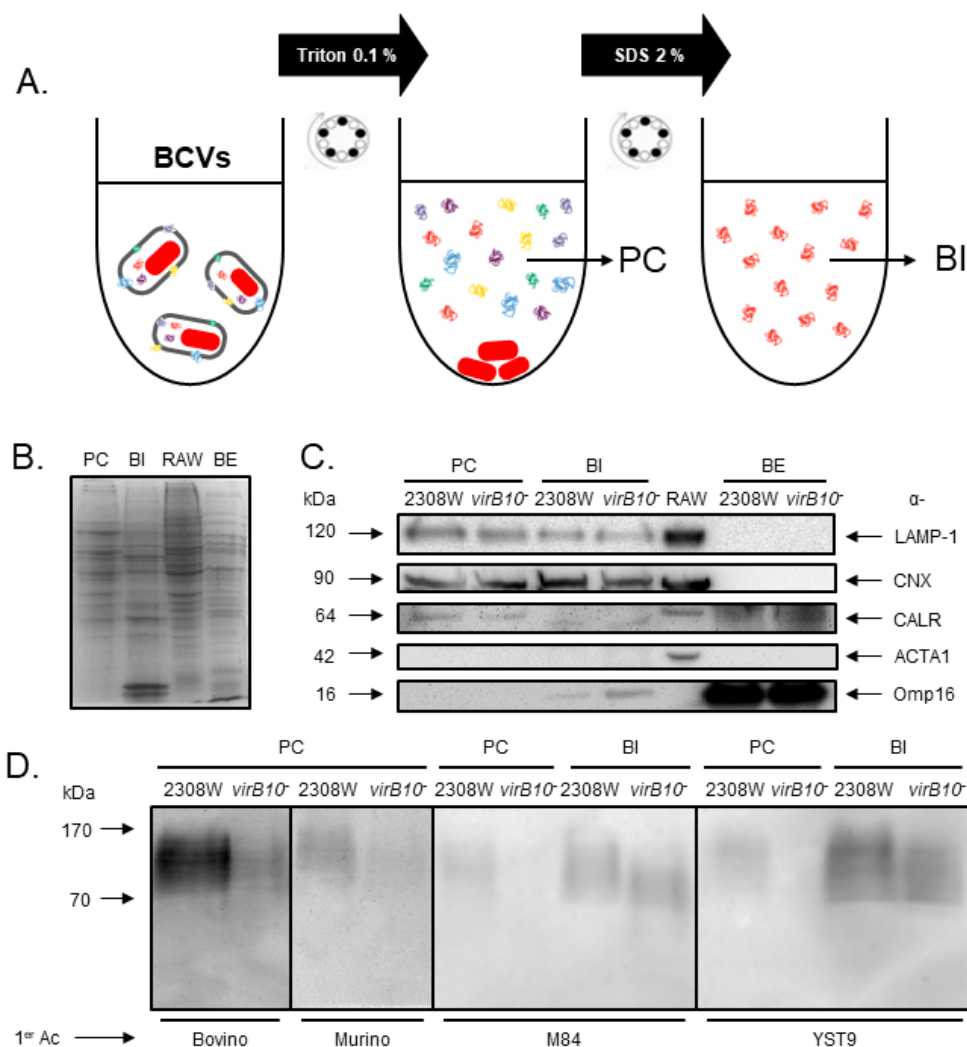


**Figura 2.** Enriquecimiento de BCVs derivadas de macrófagos RAW 264.7 en etapas tempranas de infección (6 h). (A) Los macrófagos se infectaron con la cepa 2308W-RFP (MOI = 1000), se lisaron a las 6 horas post infección (h.p.i.) y se purificaron las BCVs mediante el protocolo descrito. (B) Para determinar la densidad poblacional bacteriana en cada paso de la purificación de BCVs, se realizaron recuentos en platos de ATS y se determinó el promedio con variación de las UFC/mL. (C) Con el fin de evaluar la compartimentalización de las bacterias durante el protocolo, las muestras fueron visualizadas mediante inmunofluorescencia utilizando un anticuerpo primario α-*Brucella* bovino en combinación con un anticuerpo α-bovino conjugado con FITC verde. El % de compartimentalización se determinó mediante la proporción de bacterias rojas no accesibles al anticuerpo (2308W-RFP<sup>+</sup>/α-*Brucella*<sup>-</sup>) y bacterias totales (2308W-RFP<sup>+</sup> + 2308W-RFP<sup>+</sup>/α-*Brucella*<sup>+</sup>). (D) Imágenes de inmunofluorescencia de las BCVP. PL: post-lisis; SPN: sobrenadante post-nuclear; BCVP: BCVs purificadas en la 11<sup>va</sup> fracción del gradiente de fraccionamiento; PGFC: precipitado del gradiente de fraccionamiento celular.

El patrón electroforético de las muestras de proteínas de compartimento y de brucelas intracelulares fue diferente, indicando que la composición proteica varía en los pozos cargados con proteínas solubles en la lisis de BCVs con Tritón X-100 y subsecuentemente con SDS (Fig. 3A-B). El bandeo de las proteínas solubles en Tritón X-100 y en SDS se observó distinto al de los controles de células RAW y bacterias extracelulares, respectivamente (Fig. 3B).

Mediante western blot de las diferentes fracciones se evidenció la presencia de LAMP-1, calnexina y calreticulina en las muestras de proteínas de compartimentos y de bacterias intracelulares provenientes de BCVs derivadas de macrófagos infectados con las cepas 2308W o *virB10*, evidenciando la posible contaminación de las fracciones que contienen las BCVs con otros compartimentos intracelulares como el RE, ya que componentes de esta organela se observaron en muestras de ambas cepas, sugiriendo que su presencia es independiente de la actividad biológica del SST4.

No se evidenció presencia de actina en ninguna muestra distinta a la del lisado control de células no infectadas lo que sugiere que nuestro procedimiento es capaz de excluir proteínas citoplasmáticas. Fue posible observar bandas tenues indicadoras de la presencia de la proteína de membrana externa bacteriana Omp16 en las muestras de bacterias intracelulares. Curiosamente, se encontró mayor cantidad de esta proteína en las BCVs derivadas de la cepa *virB10* (Fig. 3C).



**Figura 3.** Caracterización bioquímica e inmunológica de las BCVs purificadas. Macrófagos RAW 264.7 fueron infectados (MOI = 1000) con la cepa 2308W y la mutante isogénica *virB10*<sup>-</sup> y las BCVs se purificaron a las 6 h.p.i. (A) Con el fin de solubilizar primero las proteínas membranales y lumenales de los compartimentos (PC), las BCVs se lisaron con Tritón X-100 (0.1%) y luego, las brucelas intracelulares (BI) resultantes, con SDS (2%). (B) Tinción con azul de Coomassie del gel de SDS-PAGE de las PC y BI de BCVs de 2308W. Todos los pozos fueron cargados con 15 µg de proteína. Lisados de macrófagos no infectados (RAW) y de 2308W extracelulares crecidas en CTS (BE) fueron usados como controles. (C) Detección por Western blot de marcadores subcelulares de las PC y BI de lisados de las BCVs de 2308W y *virB10*<sup>-</sup>. Anticuerpos primarios contra marcadores sub-celulares y bacterianos fueron utilizados para evaluar la composición de las muestras: α-LAMP1, α-CNX, α-CALR, α-ACTA1 y α-Omp16. Lisados de macrófagos no infectados (RAW) y de 2308W y *virB10*<sup>-</sup> extracelulares crecidas en CTS (BE) fueron usados como controles. (D) Prueba inmunogénica de las PC y BI de lisados de las BCVs de 2308W y *virB10*<sup>-</sup>. Para detectar componentes inmunorreactivos en las muestras, las membranas fueron expuestas a sueros bovinos y murinos provenientes de animales inmunizados contra 2308W. Adicionalmente, se utilizaron los anticuerpos α-Br-LPS M84 y YST9, para evidenciar la presencia de LPS. Los anticuerpos utilizados en B y C fueron revelados con anticuerpos secundarios HRP-conjugados contra las especies animales respectivas. Todos los pozos de C y D fueron cargados con 20 µg de proteína.

Se utilizaron sueros de vacas positivas para *B. abortus* y de ratones inmunizados con *B. abortus* para analizar si existían componentes inmunogénicos para estos animales en las muestras de proteínas de compartimentos y bacterias intracelulares.

Se encontró un patrón inmunorreactivo presente en los lisados de proteínas de compartimentos y brucelas intracelulares compatible con el patrón de migración electroforética de LPS (70). Esta señal fue más fuerte en las proteínas del compartimento derivadas de la cepa 2308W con respecto a las BCVs derivadas de *virB10* (Fig. 3D).

Con el objetivo de verificar si este patrón inmunorreactivo en efecto corresponde a LPS se procedió a utilizar los anticuerpos monoclonales contra la cadena O de esta molécula: M84 y YST9 (Fig. 3D). En este caso se observó que, de igual manera, hubo una mayor cantidad de señal de *Br*-LPS presente en las muestras de proteínas de BCVs derivadas de la cepa 2308W en comparación con *virB10*.

En las muestras de proteínas de brucelas intracelulares provenientes de ambas cepas 2308W y *virB10*, se observó una intensidad de la señal de M84 y YST9 similar (Fig. 3D), evidenciando la presencia uniforme de este componente estructural en las cepas bacterianas respectivas. Por lo tanto, se concluye que la presencia diferencial de LPS en las BCVs podría responder a un comportamiento biológico que varía entre la cepa 2308W y la *virB10*.

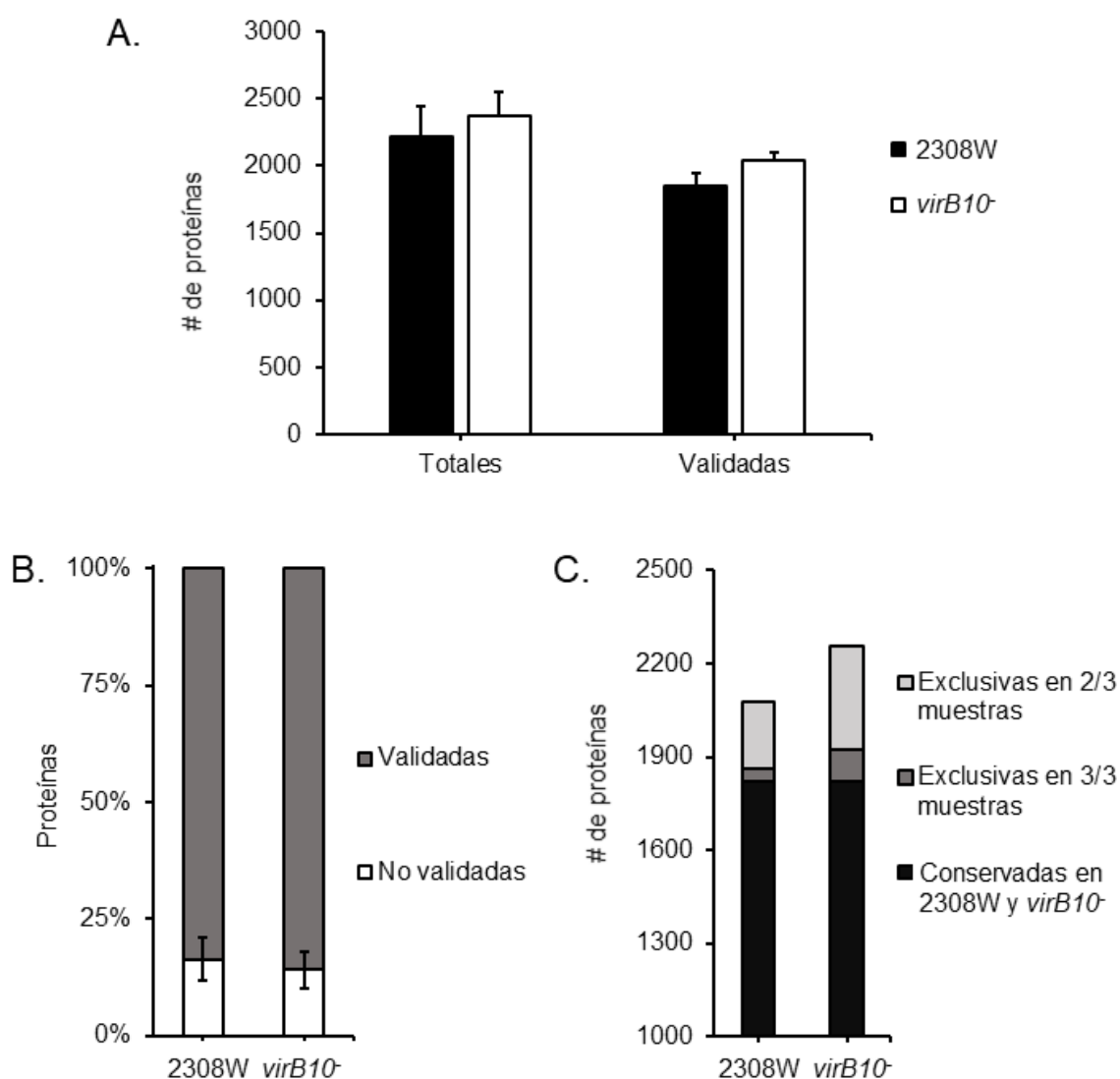


### **El abordaje comparativo permitió detectar proteínas relevantes asociadas al tránsito intracelular de las BCVs**

Las muestras de compartimentos contenedores de las cepas *B. abortus* 2308W o *virB10* (Fig. 3A, PC) fueron sometidas a HPLC-MS/MS con el fin de identificar de las proteínas presentes y su respectiva cuantificación mediante la técnica libre de marcaje.

Se utilizó las BCVs de *B. abortus virB10* como control, ya que esta es una cepa deficiente en el SST4 y no posee la capacidad de redirigir el tránsito intracelular hacia el RE, ni de establecer la rBCV para promover la replicación bacteriana. Por lo tanto, las proteínas diferenciales entre ambos compartimentos dan poder de discriminatorio para el análisis y relevancia biológica importante, teniendo en cuenta que la presencia de determinadas proteínas exclusivamente encontradas en las vacuolas derivadas de la cepa 2308W deberían favorecer el establecimiento de una rBCV, mientras que las presentes de forma exclusiva en compartimentos derivados de la cepa *virB10* podrían corresponder a un patógeno que no logra evadir la ruta lisosomal.

Se detectó un promedio de 2 220 y 2 375 proteínas en las 3 réplicas independientes de BCVs de 2308W y *virB10*, respectivamente (Fig. 4A). El 83.6 y 85.9% (2308W y *virB10*, respectivamente) de estas proteínas estuvieron presentes en todas o en 2 de 3 réplicas (Fig. 4B) y por lo tanto las definimos como el grupo de proteínas que tienen un alto grado de confianza de encontrarse en dichos compartimentos.

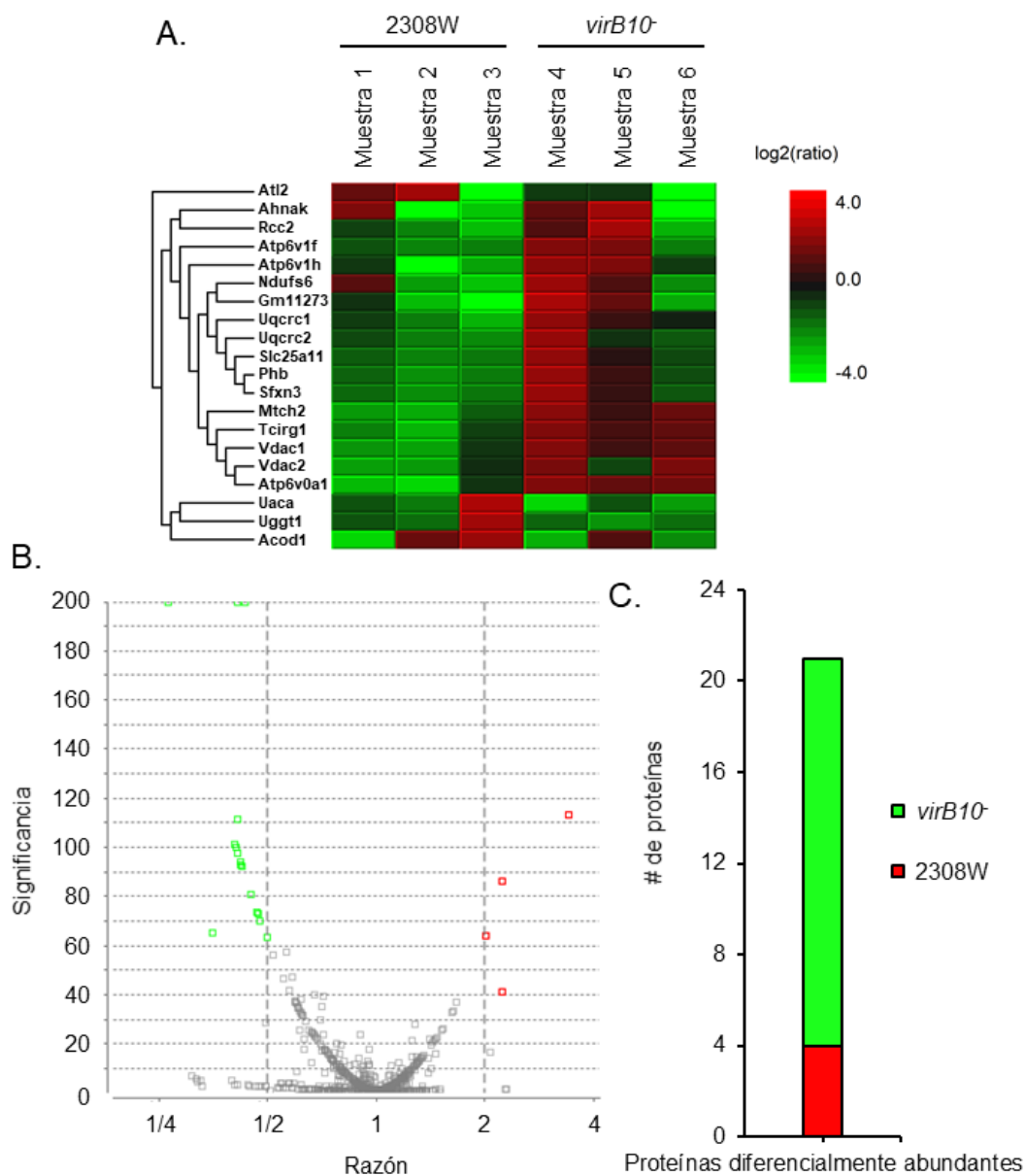


**Figura 4.** Valores de proteínas detectadas mediante HPLC-MS/MS en lisados de BCVs purificadas a las 6 h.p.i. de macrófagos RAW 264.7 y su distribución entre los grupos analizados. Se exportaron las listas completas de proteínas de 3 réplicas biológicas por grupo (2308W y *virB10*<sup>-</sup>) y se compararon para detectar proteínas conservadas y exclusivas de cada grupo con base en su identificador UniProtID. (A) Valores absolutos promedio de proteínas totales y validadas presentes en al menos 2 de 3 réplicas en cada grupo (proteínas validadas). (B) Porcentaje de proteínas validadas y no validadas entre réplicas de los grupos (intragrupales). (C) Número de proteínas conservadas (presentes tanto en 2308W y *virB10*<sup>-</sup>) y exclusivas (presentes únicamente en 2308W o *virB10*<sup>-</sup>) entre grupos. Se compararon las proteínas validadas (B) para determinar cuáles eran conservadas y exclusivas entre los 2 grupos (intergrupales).

Estas listas de proteínas se compararon entre las cepas para determinar cuáles componentes caracterizan exclusivamente los compartimentos contenedores de la cepa 2308W o *virB10* y, seguidamente, cuál es la importancia biológica de las mismas.

Como se observa en la figura 4C, 1 821 proteínas se encontraron compartidas en ambos grupos, mientras que 255 fueron detectadas exclusivamente en las muestras de 2308W (Anexo A1) y 434 exclusivas de *virB10* (Anexo A2). Las proteínas exclusivas de cada grupo se dividieron de acuerdo con su presencia en 3/3 o 2/3 réplicas, siendo las proteínas presentes en 3/3 muestras candidatos más robustos para determinar diferencias más reproducibles a través de los experimentos.

Se identificaron 40 proteínas exclusivas para el grupo 2308W presentes en todas las réplicas biológicas. Dentro de estas se destacó la presencia de proteínas del hospedero con actividad GTPasa como GNG12, NRAS, IGTP y ARF4. También se ubicaron proteínas eucariotas de transporte y tráfico vesicular como TMED2, GBF1, RAB11FIP5, SNX1 y SEC23B. También es importante mencionar que se encontraron proteínas localizadas sub-celularmente en el RE, como lo son IGTP, GBF1, SEC23B, STIM1 y DERL2. LSP1, UNC93B1, CD40, LY96 y TLR3, que fueron encontradas en las BCVs derivadas de 2308W relacionadas con la regulación de respuesta inmune, respuestas asociada a la unión con LPS y a la regulación proinflamatoria. Interesantemente, en este grupo de moléculas exclusivas se encontró la proteína GDI1 que actúa como inhibidor de disociación de GDP, importante en la transducción de señales de GTPasas Rab.



**Figura 5.** Proteómica comparativa de lisados de BCVs purificadas a las 6 h.p.i. a partir de macrófagos murinos RAW 264.7 infectados con la cepa de *B. abortus* 2308W o *virB10*<sup>-</sup>. (A) Heatmap de perfil proteico. El color de cada celda representa el log<sub>2</sub>(proporción) del área promedio en las diferentes muestras. La abundancia relativa es representada como un heatmap de las proteínas representativas en cada grupo proteico. Las proteínas representativas son agrupadas si exhiben una tendencia de expresión en las diferentes muestras. El dendrograma fue generado utilizando el algoritmo de agrupamiento jerárquico aglomerado con una medición de la similitud de la distancia Euclidiana del log<sub>2</sub>(proporción) de la abundancia de cada muestra relativo a la abundancia promedio. (B) Gráfico volcán para mostrar las diferencias en la abundancia relativa de proteínas en A. Las líneas verticales discontinuas corresponden a los umbrales de cambio en la proporción para proteínas sobre- y sub-abundantes. El color verde representa a las proteínas de las BCVs 2308W sub-abundantes y el color rojo a las sobre-abundantes, con un nivel de significancia estadística para un FDR ≤ 1. (C) Números absolutos de proteínas diferencialmente abundantes. Mismo código de colores que en (B).

Se observó la presencia de 102 proteínas del hospedero exclusivas para el grupo *virB10* en todas las réplicas biológicas. Dentro de las más importantes implicadas en cubierta y tráfico vesicular se encontró LAMTOR1, PIP4P1, SCAMP3, SNAP91, MOB4, TMED4, SRGAP2, RAB22A, FLOT2, SNX8, HRAS, COPA, CHMP6, BNIP1, RAB34, CLN3, PIP5K1C, SLC9A6, y SAR1A. Adicionalmente, se encontró proteínas con actividad de ATPasa vacuolar como ATP6AP1, y de vías de señalización de respuesta inmune como CD180, CD72, ERBIN, H2-K1 y H2-T24. También se encontraron las proteínas MYO9B, ARHGAP30, ARHGEF11 y KALRN, que son factores activadores de intercambio de GDP por GTP en GTPasas de la familia Rho, no encontrados en las BCVs de 2308W.

Con respecto a las proteínas procariotas se encontraron en dos o más muestras, las proteínas GroEL, EF-Tu, Nuol, SodC y GlyS fueron exclusivamente detectadas las BCVs de 2308W; mientras que en BCVs derivadas de *virB10* se hallaron PtsP, y las proteínas hipotéticas BAB2\_0547 y BAB2\_0299.

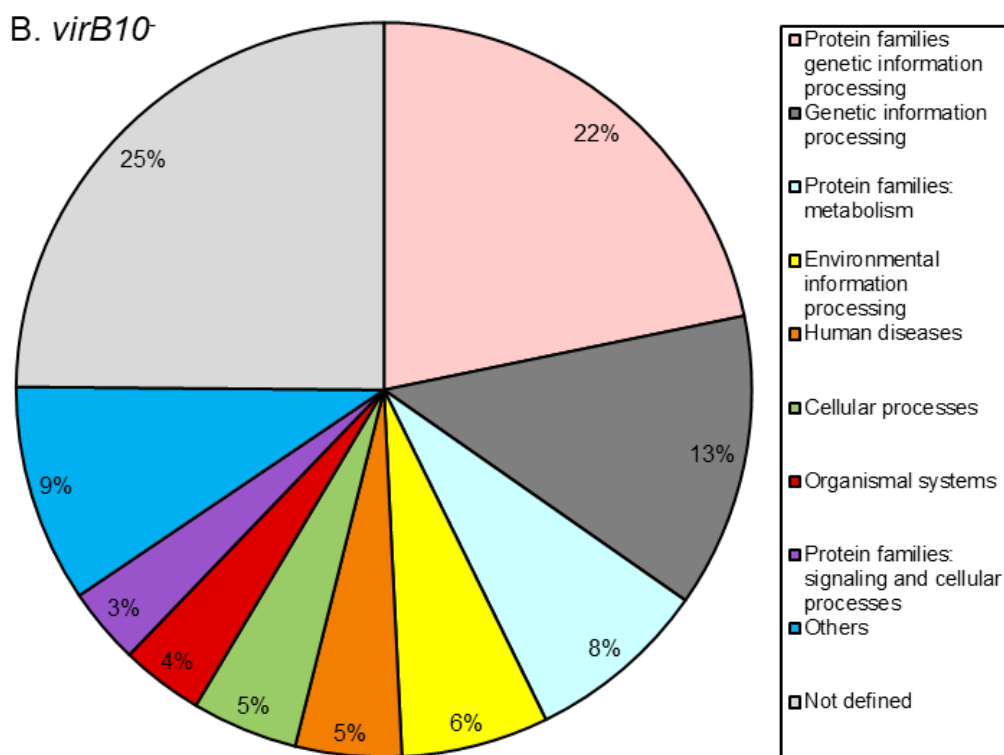
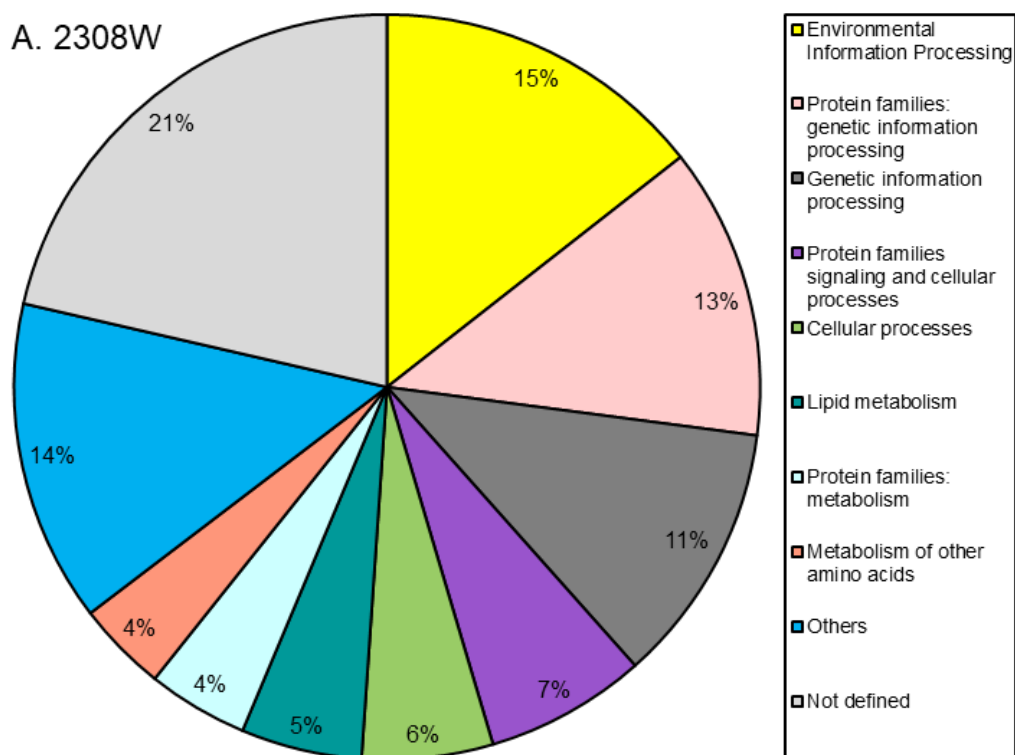
Se realizó proteómica comparativa por metodología cuantitativa libre de marcaje con los resultados de los análisis HPLC-MS/MS a las muestras de BCVs 2308W y *virB10*. Se logró detectar cambios en la abundancia relativa con significancia estadística a través del análisis indicado (Fig. 5). Del total, 21 proteínas fueron expresadas diferencialmente entre los grupos utilizando los parámetros de filtración indicados anteriormente en la metodología y el análisis estadístico PEAKSQ. Como se muestra en la Tabla 4 las proteínas eucariotas UACA, UGGT1, ACOD1 y ATL2 fueron detectadas como sobre-expresadas en las muestras de BCVs 2308W (Fig. 5B-C, color rojo). Por el contrario, en BCVs de

*virB10* se encontraron enriquecidas en abundancia relativa las proteínas eucariotas: GM11273, ATP6V1H, ATP6V0A1, RCC2, TCIRG1, VDAC1, VDAC2, UQCRC1, PHB, SFXN3, NDUFS6, SLC25A11, ATP6V1F, ATP6V1F, UQCRC2, MTCH2 Y AHNAK (Fig. 5B-C, color verde).

Con el fin de explicar y categorizar la funcionalidad biológica de las proteínas diferencialmente expresadas, las detectadas exclusivamente en 2308W y en *virB10* fueron anotadas funcionalmente.

En las BCVs 2308W se observó una mayor proporción de proteínas relacionadas con vías metabólicas de procesamiento de la información ambiental (33/229 totales, correspondientes al 15%), familias de proteínas de procesamiento de información genética (13%) y de procesamiento de información genética (11%) (Fig. 6A), entre otras.

Se encontró proteínas destacadas con registros KEGG correspondientes a vías de transducción de señales MAPK, Ras y fosfolipasa D en la categoría de procesamiento de información ambiental. Los registros más destacados de la categoría de familias de proteínas de procesamiento de información genética correspondieron a proteínas de vías de tráfico membranal, biogénesis mitocondrial y de cromosoma y sus proteínas asociadas. Para la categoría de procesamiento de información genética se evidenció mayoritariamente la presencia de proteínas pertenecientes a vías de procesamiento proteico en retículo endoplásmico, de ribosoma y de transporte de ARN.



**Figura 6.** Anotación BlastKOALA de vías KEGG de las proteínas detectadas exclusivamente en las BCVs a las 6 h.p.i. derivadas de macrófagos RAW 264.7 infectados con (A) 2308W o (B) *virB10*.

Por otro lado, en las BCVs de *B. abortus virB10* se observó un mayor número de proteínas involucradas en vías de familias de proteínas de procesamiento de información genética (84/386 totales, correspondiente al 22%), procesamiento de información genética (13%) y de metabolismo (8%) (Fig. 6B), entre otras.

Los registros KEGG que se destacaron en las vías de familias de proteínas de procesamiento de información genética fueron de tráfico membranal, de cromosoma y sus proteínas asociadas y de biogénesis mitocondrial. Para la categoría de procesamiento de información genética hubo presencia mayoritaria de entradas pertenecientes a vías de ribosomas, transporte de ARN y proteosoma. De metabolismo se encontraron entradas relacionadas con enzimas, fosfatasa y sus proteínas asociadas y peptidasas.

Cabe destacar que existió un número amplio de proteínas que no se encuentran aún definidas en la base de datos KEGG: 49 y 96 para 2308W y *virB10*, respectivamente, hasta este punto y con esta estrategia es desconocida la información biológica que podrían brindar dichas proteínas no categorizadas en las bases de datos.



**Tabla 4.** Lista de proteínas diferencialmente abundantes en BCVs de *B. abortus* 2308W y *B. abortus virB10* determinadas por cuantificación libre de marcaje\*.

| # Accesoión                                  | Nombres de proteínas   | Nombres de genes | Definición KO   | Anotación GO   | Gene ontology  | Significancia   | Razón (2308W/ <i>virB10</i> ) | 2308W                  |                      | <i>virB10</i>          |                      |                      |
|--|--|------------------|---|--|--|---|-------------------------------|------------------------|----------------------|------------------------|----------------------|----------------------|
|  |  |                  |   |  |  |   |                               | Promedio de intensidad | D.E.                 | Promedio de intensidad | D.E.                 |                      |
| <b>Sobre-abundantes en 2308W (Razón ≥ 2)</b> |  |                  |   |  |  |   |                               |                        |                      |                        |                      |                      |
| A0A1L1SVG0                                   | Uveal autoantigen with coiled-coil domains and ankyrin repeats | <i>Uaca</i>      | N.D.  | N.D.   | Apoptotic signaling pathway [GO:0097190]; regulation of NIK/NF-kappaB signaling [GO:1901222]   | 113.48  | 3.42                          | 2.56x10 <sup>7</sup>   | 2.42x10 <sup>7</sup> | 7.48x10 <sup>6</sup>   | 5.74x10 <sup>6</sup> |                      |
| G3UZU8                                       | UDP-glucose:glycoprotein glucosyltransferase 1                 | <i>Uggt1</i>     | HUGT; UDP-glucose:glycoprotein glucosyltransferase [EC:2.4.1.-] | Recognizes glycoproteins with minor folding defects. Reglucosylates single N-glycans near the misfolded part of the protein, thus providing quality control for protein folding in the endoplasmic reticulum. Reglucosylated proteins are recognized by calreticulin for recycling to the endoplasmic reticulum and refolding or degradation; Belongs to the glucosyltransferase 8 family. | UDP-glucose:glycoprotein glucosyltransferase activity [GO:0003980]; protein glycosylation [GO:0006486]   | 86.44   | 2.22                          | 2.06x10 <sup>8</sup>   | 1.65x10 <sup>8</sup> | 9.26x10 <sup>7</sup>   | 2.15x10 <sup>7</sup> |                      |
| A0A0R4J027                                   | Cis-aconitate decarboxylase                                    | <i>Acod1</i>     | IRG1; aconitate decarboxylase [EC:4.1.1.6]                      | N.D.   | Aconitate decarboxylase activity [GO:0047613]; defense response [GO:0006952]; positive regulation of antimicrobial humoral response [GO:0002760]; tolerance induction to lipopolysaccharide [GO:0072573]   | 63.76   | 2.02                          | 1.28x10 <sup>9</sup>   | 1.08x10 <sup>9</sup> | 6.33x10 <sup>8</sup>   | 4.51x10 <sup>8</sup> |                      |
| E9QND8                                       | Atlastin-2   | <i>Atl2</i>      | ATL; [EC:3.6.5.-]   | atlastin   | GTPase tethering membranes through formation of trans-homooligomers and mediating homotypic fusion of endoplasmic reticulum membranes. Functions in endoplasmic reticulum tubular network biogenesis; Belongs to the TRAFAC class dynamin-like GTPase superfamily. GB1/RHD3-type GTPase family. GB1 subfamily. | Integral component of membrane [GO:0016021]; GTP binding [GO:0005525]; GTPase activity [GO:0003924] | 41.20                         | 2.22                   | 1.68x10 <sup>7</sup> | 1.11x10 <sup>7</sup>   | 7.57x10 <sup>6</sup> | 4.37x10 <sup>6</sup> |

| Sub-abundantes en 2308W (Razón ≤ 0.5) |   |      |                 |  |  |   |        |      |                      |                      |                      |                      |
|---------------------------------------|---|------|-----------------|--|--|---|--------|------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|
| Q9D881                                | Cytochrome c oxidase subunit 5B mitochondrial       | 5B   | <i>Gm11273</i>  | COX5B; cytochrome c oxidase subunit 5b           | This protein is one of the nuclear-coded polypeptide chains of cytochrome c oxidase, the terminal oxidase in mitochondrial electron transport.   | Mitochondrial envelope [GO:0005740]; cytochrome-c oxidase activity [GO:0004129]   | 200.00 | 0.26 | 9.25x10 <sup>7</sup> | 1.05x10 <sup>8</sup> | 3.50x10 <sup>8</sup> | 3.01x10 <sup>8</sup> |
| A0A0A6YX18                            | V-type proton ATPase subunit H                      |      | <i>Atp6v1h</i>  | ATPeV1H; V-type H+-transporting ATPase subunit H | N.D.   | Integral component of membrane [GO:0016021]; vacuolar proton-transporting V-type ATPase, V0 domain [GO:0000220]; proton transmembrane transporter activity [GO:0015078]; ATP hydrolysis coupled proton transport [GO:0015991] | 200.00 | 0.41 | 1.25x10 <sup>7</sup> | 9.14x10 <sup>6</sup> | 3.03x10 <sup>7</sup> | 1.09x10 <sup>7</sup> |
| K3W4T3                                | V-type proton ATPase subunit a                      |      | <i>Atp6v0a1</i> | ATPeV0A; V-type H+-transporting ATPase subunit a | Required for assembly and activity of the vacuolar ATPase. Potential role in differential targeting and regulation of the enzyme for a specific organelle.   | Vacuolar proton-transporting V-type ATPase, V1 domain [GO:0000221]; proton-transporting activity, mechanism [GO:0046961]; ATP hydrolysis coupled proton transport [GO:0015991]  | 200.00 | 0.43 | 7.18x10 <sup>6</sup> | 4.71x10 <sup>6</sup> | 1.66x10 <sup>7</sup> | 2.32x10 <sup>6</sup> |
| A2AWQ2                                | Protein (Fragment)                                  | RCC2 | <i>Rcc2</i>     | N.D.   | Required for completion of mitosis and cytokinesis. May function as a guanine nucleotide exchange factor for the small GTPase RAC1.  | N.D.  | 111.58 | 0.42 | 2.36x10 <sup>7</sup> | 1.31x10 <sup>7</sup> | 5.68x10 <sup>7</sup> | 5.18x10 <sup>7</sup> |
| Q9JHF5                                | V-type proton ATPase subunit a                      |      | <i>Tcirg1</i>   | ATPeV0A; V-type H+-transporting ATPase subunit a | Essential component of the vacuolar proton pump (V-ATPase), a multimeric enzyme that catalyzes the translocation of protons across the membranes. Required for assembly and activity of the V-ATPase.                            | Integral component of membrane [GO:0016021]; late endosome [GO:0005770]; lysosome [GO:0005764]; phagocytic vesicle membrane [GO:0030670]; phagosome acidification [GO:0090383]  | 101.29 | 0.41 | 2.01x10 <sup>8</sup> | 1.20x10 <sup>8</sup> | 4.77x10 <sup>8</sup> | 1.11x10 <sup>8</sup> |
| F2Z471                                | Voltage-dependent anion-selective channel protein 1 |      | <i>Vdac1</i>    | VDAC1; voltage-dependent anion channel protein 1 | Forms a channel through the mitochondrial outer membrane and the plasma membrane. The channel at the outer mitochondrial membrane allows diffusion of small hydrophilic molecules; in the plasma membrane it is involved in cell | Integral component of membrane [GO:0016021]; mitochondrial outer membrane [GO:0005741]; voltage-gated anion channel activity [GO:0008308]   | 99.95  | 0.41 | 1.82x10 <sup>8</sup> | 9.96x10 <sup>7</sup> | 4.46x10 <sup>8</sup> | 1.37x10 <sup>8</sup> |

|            |   |                 |  |  |  |   |       |      |                      |                      |                      |                      |
|------------|---|-----------------|--|--|--|---|-------|------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|
|            |   |                 |  |  | volume regulation and apoptosis. It adopts an open conformation at low or zero membrane potential and a closed conformation at potentials above 30-40 mV. The open state has a weak anion selectivity whereas the closed state is cation-selective.  |   |       |      |                      |                      |                      |                      |
| G3UX26     | Voltage-dependent anion-selective channel protein 2                 | <i>Vdac2</i>    | VDAC2; voltage-dependent anion channel protein 2                                       |  | Forms a channel through the mitochondrial outer membrane that allows diffusion of small hydrophilic molecules. The channel adopts an open conformation at low or zero membrane potential and a closed conformation at potentials above 30-40 mV. The open state has a weak anion selectivity whereas the closed state is cation-selective. | Mitochondrial outer membrane [GO:0005741]; voltage-gated anion channel activity [GO:0008308]                              | 97.78 | 0.41 | 1.68x10 <sup>7</sup> | 9.68x10 <sup>6</sup> | 4.08x10 <sup>7</sup> | 1.33x10 <sup>7</sup> |
| A0A0A6YW82 | Cytochrome b-c1 complex mitochondrial (Fragment)                    | <i>Uqcrc1</i>   | QCR1; ubiquinol-cytochrome c reductase subunit 1                                       |  | N.D.   | Catalytic activity [GO:0003824]; metal ion binding [GO:0046872]   | 94.24 | 0.42 | 1.40x10 <sup>8</sup> | 7.65x10 <sup>7</sup> | 3.33x10 <sup>8</sup> | 1.55x10 <sup>8</sup> |
| Q5SQG5     | Prohibitin (Fragment)   | <i>Phb</i>      | PHB1; prohibitin 1   |  | Prohibitin inhibits DNA synthesis. It has a role in regulating proliferation. As yet it is unclear if the protein or the mRNA exhibits this effect. May play a role in regulating mitochondrial respiration activity and in aging.   | Membrane [GO:0016020]   | 93.05 | 0.42 | 7.01x10 <sup>7</sup> | 1.61x10 <sup>7</sup> | 1.66x10 <sup>8</sup> | 9.08x10 <sup>7</sup> |
| Q3U4F0     | Sideroflexin-3  | <i>Sfxn3</i>    | N.D.   |  | Potential iron transporter; Belongs to the sideroflexin family.  | Integral component of membrane [GO:0016021]; ion transmembrane transporter activity [GO:0015075]                          | 91.92 | 0.42 | 1.92x10 <sup>7</sup> | 3.63x10 <sup>6</sup> | 4.52x10 <sup>7</sup> | 2.68x10 <sup>7</sup> |
| A0A1Y7VM38 | NADH dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur protein 6 mitochondrial | <i>Ndufs6</i>   | NDUFS6; NADH dehydrogenase (ubiquinone) protein 6                                      |  | N.D.   | Mitochondrial respiratory chain complex I [GO:0005747]; mitochondrial electron transport, NADH to ubiquinone [GO:0006120] | 80.70 | 0.45 | 4.64x10 <sup>7</sup> | 4.20x10 <sup>7</sup> | 1.03x10 <sup>8</sup> | 7.56x10 <sup>7</sup> |
| Q5SX46     | Mitochondrial 2-oxoglutarate/malate carrier protein (Fragment)      | <i>Slc25a11</i> | SLC25A11; solute carrier family 25 (mitochondrial oxoglutarate transporter), member 11 |  | Catalyzes the transport of 2-oxoglutarate across the inner mitochondrial membrane in an electroneutral exchange for malate or other dicarboxylic acids, and plays an important role in several metabolic processes, including the malate-aspartate shuttle, the oxoglutarate/isocitrate shuttle, in gluconeogenesis from                   | Integral component of membrane [GO:0016021]   | 73.75 | 0.47 | 5.79x10 <sup>7</sup> | 1.06x10 <sup>7</sup> | 1.24x10 <sup>8</sup> | 6.56x10 <sup>7</sup> |

lactate, and in nitrogen metabolism. Maintains mitochondrial fusion and fission events, and the organization and morphology of cristae. Involved in the regulation of apoptosis.

|            |  |                |  |   |   |       |      |                      |                      |                      |                      |
|------------|--|----------------|--|---|---|-------|------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|
| A0A0N4SVE1 | V-type proton ATPase subunit F                             | <i>Atp6v1f</i> | ATPeV1F; V-type H+-transporting ATPase subunit F | N.D.  | Proton-transporting V-type ATPase, V1 domain [GO:0033180]; proton-transporting ATPase activity, mechanism [GO:0046961]; ATP hydrolysis coupled proton transport [GO:0015991]  | 73.13 | 0.47 | 3.03x10 <sup>6</sup> | 7.75x10 <sup>5</sup> | 6.46x10 <sup>6</sup> | 3.27x10 <sup>6</sup> |
| F7B2B4     | V-type proton ATPase subunit F (Fragment)                  | <i>Atp6v1f</i> | ATPeV1F; V-type H+-transporting ATPase subunit F | N.D.  | Proton-transporting V-type ATPase, V1 domain [GO:0033180]; proton-transporting ATPase activity, mechanism [GO:0046961]; ATP hydrolysis coupled proton transport [GO:0015991]  | 73.13 | 0.47 | 3.03x10 <sup>6</sup> | 7.75x10 <sup>5</sup> | 6.46x10 <sup>6</sup> | 3.27x10 <sup>6</sup> |
| A0A140LI98 | Cytochrome b-c1 complex subunit 2 mitochondrial (Fragment) | <i>Uqcrc2</i>  | QCR2; ubiquinol-cytochrome reductase subunit 2   | N.D.  | Catalytic activity [GO:0003824]; metal ion binding [GO:0046872]   | 70.05 | 0.48 | 9.93x10 <sup>7</sup> | 2.99x10 <sup>7</sup> | 2.08x10 <sup>8</sup> | 1.29x10 <sup>8</sup> |
| Q9D050     | Mitochondrial homolog 2 carrier                            | <i>Mtch2</i>   | MTCH; mitochondrial carrier                      | The substrate transported is not yet known. Induces mitochondrial depolarization. | Integral component of membrane [GO:0016021]; protein localization mitochondrion [GO:0070585]  | 65.24 | 0.35 | 1.59x10 <sup>7</sup> | 7.11x10 <sup>6</sup> | 4.49x10 <sup>7</sup> | 1.39x10 <sup>7</sup> |
| E9Q616     | AHNAK nucleoprotein (desmoyokin)                           | <i>Ahnak</i>   | N.D.   | AHNAK (desmoyokin) nucleoprotein  | Actin cytoskeleton [GO:0015629]; membrane raft [GO:0045121]; vesicle [GO:0031982]; S100 protein binding [GO:0044548]; structural molecule activity conferring elasticity [GO:0097493]; protein complex oligomerization [GO:0051259] | 63.45 | 0.50 | 1.02x10 <sup>9</sup> | 1.41x10 <sup>9</sup> | 2.01x10 <sup>9</sup> | 1.88x10 <sup>9</sup> |

N.D.: No determinado. D.E.: Desviación estándar.

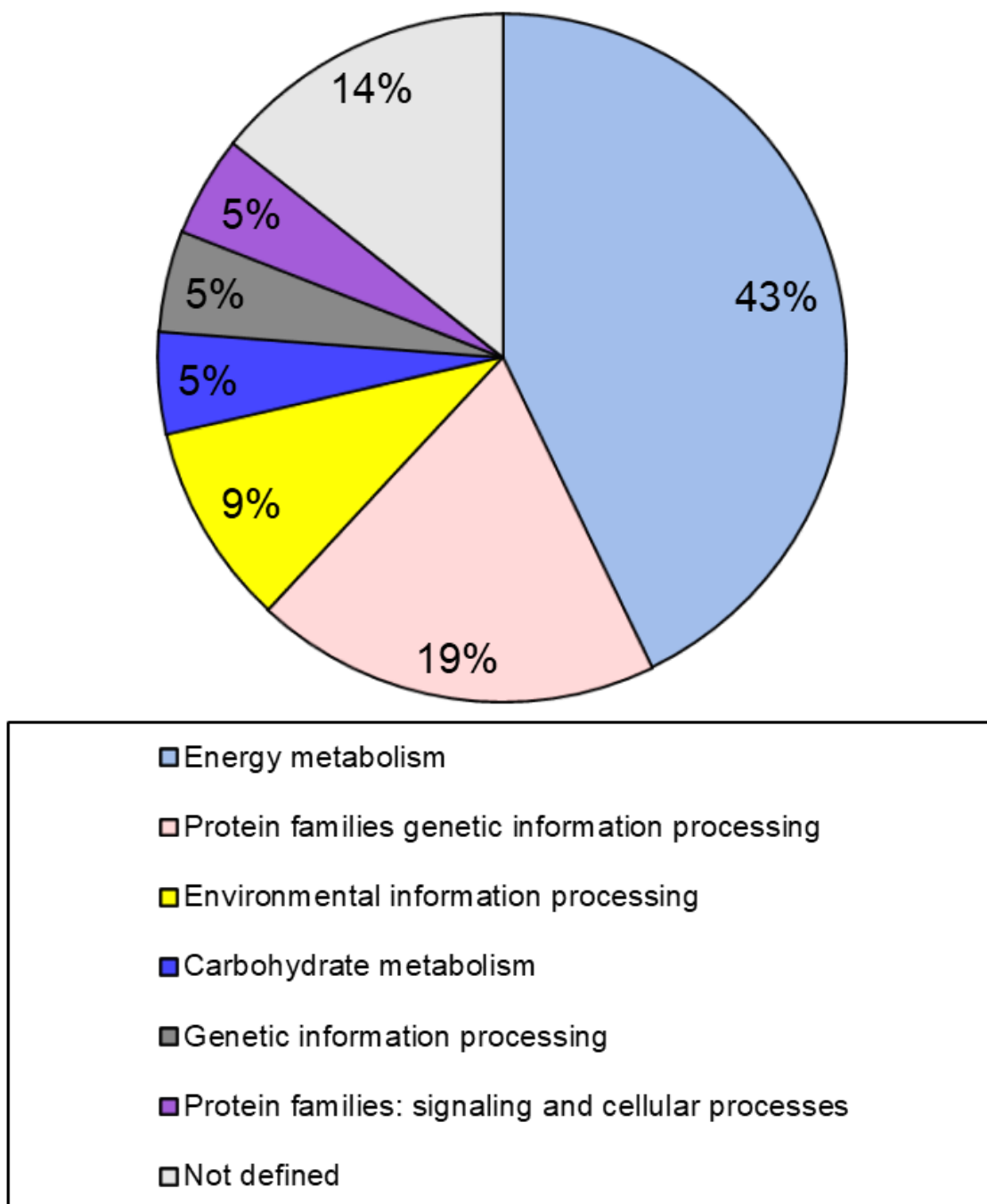
\*Todas las proteínas diferencialmente expresadas fueron de *Mus musculus*.

Las proteínas con razón  $\geq 2$  se encuentran mostradas en negrita.

Se determinó mediante el BlastKOALA que las proteínas diferencialmente expresadas UGGT1, ACOD1 y ATL2 están implicadas en vías metabólicas del procesamiento de proteínas en el retículo endoplásmico, metabolismo de carbohidratos y el tráfico membranal, respectivamente. Se halló que la mayoría de las proteínas filtradas por el análisis cuantitativo libre de marcaje están relacionadas con vías de metabolismo energético (9/21 totales, i.e. 43%), familias de proteínas de procesamiento de información genética (19%) y procesamiento de información ambiental (9%), entre otras (Fig. 7). Un 14% de las proteínas no tenía función definida en la base de datos de vías metabólicas KEGG.

En conjunto estos datos permiten caracterizar los compartimentos contenedores de intracelulares tempranos contenedores de *B. abortus* 2308W y *virB10*, diferencias que, en un principio, se basarían en la capacidad de la bacteria de secretar o no efectores a través de su SST4 para redirigir su tránsito e impedir la fusión con el lisosoma de la célula hospedera.

## Proteínas expresadas diferencialmente a las 6 h.p.i.



**Figura 7.** Anotación BlastKOALA de vías KEGG de las proteínas diferenciales resultantes del análisis cuantitativo libre de marcaje.

## DISCUSIÓN

La BCV es un compartimento complejo que continuamente está en interacción con variedad de vías y organelas dentro de la célula hospedera. Es de crucial importancia lograr determinar las modificaciones que sufre el compartimento en distintas etapas del tráfico intracelular, con el fin de entender la biología de la patogénesis de *Brucella* y cómo su sistema de secreción VirB modula la composición de este para evadir la ruta lisosomal y poder llevar a la bacteria al retículo endoplásmico.

Anteriormente, se han utilizado metodologías para la purificación de compartimentos conteniendo patógenos intracelulares (62). En todas ellas se usó el fraccionamiento sub-celular mediante ultracentrifugación, microscopía de inmunofluorescencia, inmunopurificación magnética, filtración, Western blot, y partículas recubiertas con factores de virulencia. Entre los logros recopilados en el estudio de Herweg y colaboradores (62) están: el enriquecimiento basado en efectores del SST4 Dot/Icm en *Legionella pneumophila*; el enriquecimiento basado en partículas recubiertas con trehalosa-6,6-dimicolato (TDM) en *Mycobacterium tuberculosis*; el aislamiento de inclusiones basada en filtración en *Chlamydia trachomatis*; el enriquecimiento basado en fraccionamiento sub-celular en *Simkania negevensis*; y el enriquecimiento de membranas modificadas por *Salmonella* basado en efectores del T3SS-SPI2 en *Salmonella enterica*.

En este estudio se implementó con éxito un protocolo de enriquecimiento de BCVs en etapas tempranas de infección de macrófagos murinos RAW 264.7. En el caso de *B. abortus* no se conocen blancos adecuados para ser utilizados en técnicas de

inmunopurificación, por lo que es requerido iniciar con la búsqueda y enriquecimiento de las vacuolas a través de procedimientos basados en fraccionamiento sub-celular (62).

La recuperación de BCVs alcanzó un 86% de bacterias compartimentalizadas en la interfase de sucrosa 62%, como lo indica la microscopía de inmunofluorescencia, sugiriendo que la presencia de una membrana circundante a la bacteria resulta en cambios en la flotación de la vacuola en el gradiente, esto evidenciado por la presencia de bacterias no compartimentalizadas en el precipitado. Sin embargo, en los resultados de Western blot fue posible evidenciar la presencia de LAMP-1 (proteína asociada a ETa y lisosomas), calnexina y calreticulina (proteínas de control de calidad de plegamiento proteico en RE) presentes en los lisados de BCVs derivadas de ambas cepas (Fig. 3, PC), marcadores que colocalizan por microscopía de fluorescencia confocal en esta etapa de tránsito intracelular de *B. abortus* 2308W, no así en la cepa *virB10* en donde se reporta colocalización únicamente con LAMP-1 (21, 22). En esta etapa la BCV interacciona con los ETa previo a la biogénesis de la rBCV, indicando que en este estudio las BCVs de la cepa 2308W presentan una maduración fagosomal normal en la vía endocítica y características adecuadas para su posterior análisis. Este método requiere de una destreza alta para su ejecución y del uso de una gran cantidad de material celular para obtener rendimientos visibles de BCVs.

Este abordaje presenta un reto tecnológico, las metodologías recopiladas por Herweg y colaboradores (62) explotan la información de años de investigación realizada por distintos grupos alrededor del mundo que poseen facilidades de alto



nivel, incomparables a las que se disponían en este estudio. Esto se refleja en que se detectaron 2 o 3 veces más proteínas en nuestras muestras en comparación con los números determinados en dichos estudios (62), evidenciando posible contaminación acarreada en las preparaciones de BCVs con otros compartimentos de la célula hospedero.

La búsqueda mediante Western blot de componentes inmunorreactivos permitió evidenciar la presencia de *Br*-LPS en los lisados de BCVs de la cepa 2308W y no de *virB10*<sup>-</sup> (Fig. 3). Se ha reportado que las bacterias liberan LPS a medida que crecen y se replican, a través de vesículas de membrana externa (OMVs, también conocidas como blebs) o cuando mueren (71), no así a través de un SST4, por lo tanto esta molécula no cumpliría con los requisitos de ser molécula efectora de VirB. Sin embargo, resulta interesante observar su presencia predominantemente en la cepa silvestre (Fig. 8). Tanto las brucelas lisas como rugosas liberan OMVs que brotan de la membrana externa bacteriana hacia la célula hospedera para ejercer efectos inmunomodulatorios y favorecer el establecimiento de la infección (72), este proceso resulta en una vesícula bacteriana que podría contener componentes periplásmicos, LPS y proteínas de membrana externa, de manera independiente de la secreción tipo IV de VirB. Sin embargo, no se detectaron componentes periplásmicos ni proteínas de membrana de externa de *B. abortus* en las BCVs.

Se realizó una comparación de las listas de proteínas resultantes de los análisis HPLC-MS/MS entre las cepas 2308W y *virB10*<sup>-</sup> con el fin de destacar las diferencias a nivel cualitativo y cuantitativo de los compartimentos intracelulares a

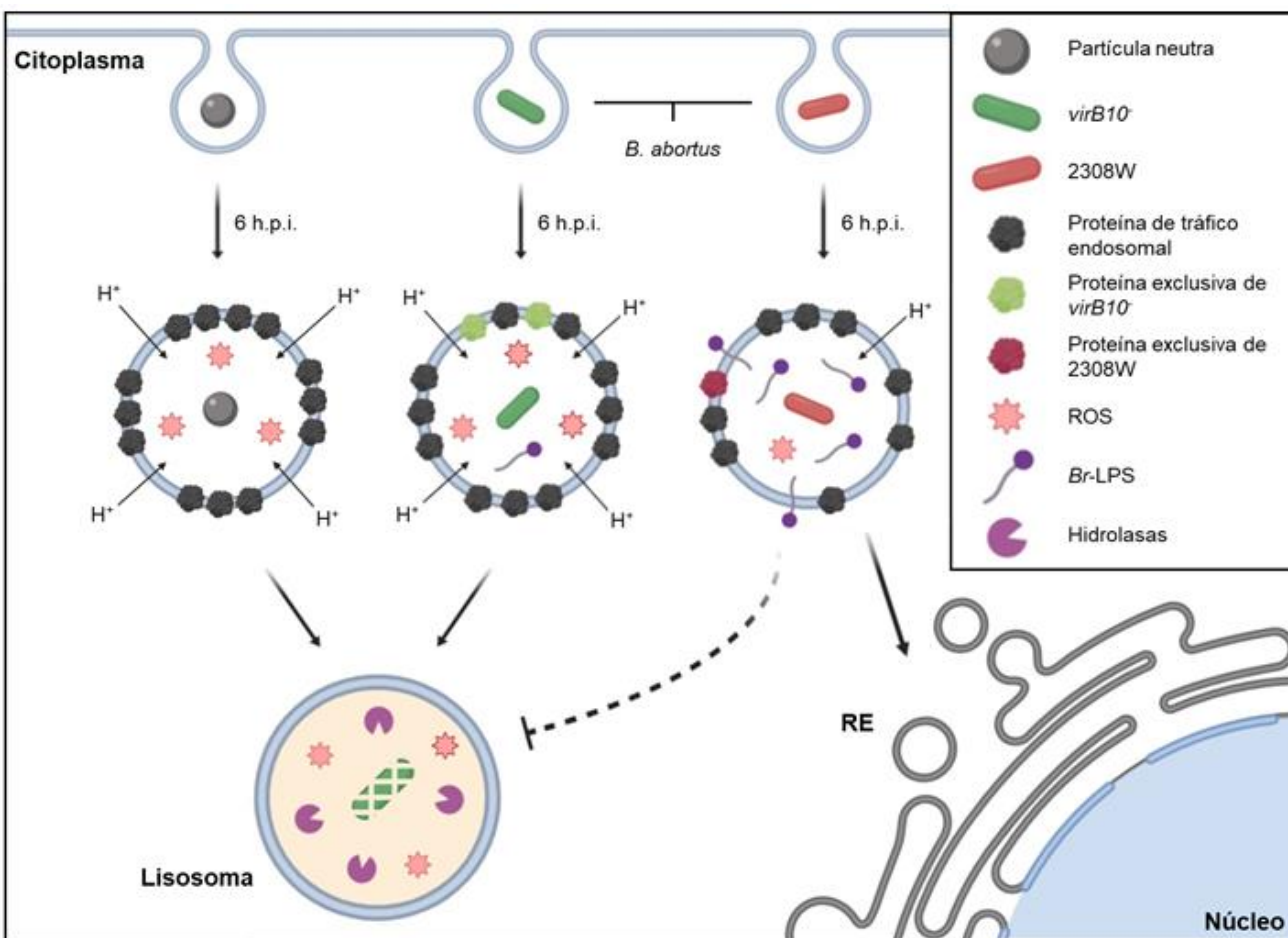
las 6 h.p.i. En otros estudios de proteómica comparativa se han detectado números entre 2 y 3 veces más bajos de proteínas totales en las preparaciones de compartimentos intracelulares contenedores de patógenos bacterianos como *L. pneumophila* (1150 proteínas de macrófagos hospederos) (73), *M. tuberculosis* (835 proteínas totales) (74), *C. trachomatis* (2231 proteínas de hospedero) (75) y *S. enterica* (552 proteínas de hospedero) (76). El hecho de que en el presente trabajo se hayan identificado números mayores de proteínas en los compartimientos que contienen a *B. abortus*, probablemente se deba a la metodología empleada para aislar los compartimentos y membranas de los patógenos anteriores, que se basan en metodologías de purificación más elaboradas y que hacen uso de determinantes moleculares previamente conocidos en dichos compartimientos, lo que permite una estrategia de inmunomagnetismo (62); estas técnicas no son aplicables a *B. abortus*, en donde aún no se conocen blancos específicos para dirigir estas estrategias. Precisamente el presente trabajo provee información fundamental para en subsiguientes estrategias de purificación, poder utilizar blancos específicos para obtener preparaciones más puras de los compartimientos.

Es importante destacar que las metodologías de los estudios anteriores (62) utilizan sistemas analíticos e instrumentos diferentes a los disponibles en este estudio, los cuales podrían implicar diferencias en la sensibilidad de la detección de péptidos, calidad de los resultados, puntuación de los péptidos, cuantificación de abundancia relativa y el manejo de los espectros de masas crudos.

En trabajos previos se han experimentado dificultades para sacar conclusiones cuando se detectan tantas proteínas del hospedero (75). En nuestro abordaje, sin embargo, fue posible filtrar proteínas conservadas y exclusivas de cada compartimento contenedor de 2308W o *virB10* de manera reproducible (Fig. 4C). Los resultados derivados de las BCVs de *virB10* permitieron realizar una estrategia de comparación con la finalidad de describir diferencialmente al compartimento contenedor de la cepa silvestre en función de la capacidad del SST4 VirB de secretar efectores. Esta estrategia diferencial permitió identificar grupos de proteínas exclusivos para cada una de las cepas relacionados con la presencia o no del sistema de secreción tipo IV VirB y realizar un modelo conceptual que ilustra cómo *B. abortus* 2308W modifica la composición proteica de las BCVs a tiempos tempranos (Fig. 8).

En general, se evidenció la presencia de menos proteínas totales y exclusivas detectadas en las muestras de 2308W, como se observa en la figura 8. Esto nos podría decir que la bacteria silvestre anticipadamente impide el reclutamiento de proteínas a la BCV permitiendo pasar de manera relativamente silente esta etapa del tránsito sin inducir una respuesta en la célula hospedera.

En el estudio de Herweg y colaboradores, se encontraron 56 proteínas conservadas entre vacuolas contendedoras de *Legionella*, *Salmonella*, *Simkania*, *Chlamydia* y *Mycobacterium* (62). De esas 56 proteínas, 30 se encontraron también en este estudio, 25 conservadas en *B. abortus* 2308W y *virB10*, y 5 exclusivas de *virB10* (Myosin-9, Myosin-Ic, ATPase family, AAA domain-containing 3A y Alpha-soluble NSF attachment protein). Este hallazgo comprueba



**Figura 8.** Modelo conceptual representativo de BCVs obtenidas a las 6 h.p.i a partir de macrófagos infectados con *B. abortus* 2308W y *virB10*.

que las proteínas detectadas en BCVs también se han encontrado en otros estudios, lo que valida nuestros resultados.

Llama la atención que las proteínas de *B. abortus* 2308W detectadas exclusivamente en cada compartimento sean tan poco numerosas (Anexos A1 y A2, *Brucella abortus* 2308W). Esto evidencia que la estrategia de remoción bacteriana por centrifugación fue exitosa, pero deja la interrogante de cómo tan pocos componentes son teóricamente capaces de impactar la ruta intracelular que sigue esta bacteria al secretarlos de manera VirB-dependiente o no (Fig. 8).

Se identificaron en más de dos muestras las proteínas procariotas GroEL, EF-Tu, Nuol, SodC y GlyS como exclusivas de las BCVs de 2308W (Anexo A1, Fig. 8).

GroEL es una proteína citoplasmática de choque térmico encargada del plegamiento correcto de polipéptidos dependiente de ATP, ampliamente conservada en procariotas y eucariotas (77). Una vez que las bacterias son fagocitadas por la célula hospedero se encuentran en un ambiente estresante debido a la acidificación fagosomal, explosión oxidativa y la fusión del fagosoma con el lisosoma. Estas situaciones inducen la expresión alta de las proteínas de choque térmico, como GroEL, que ayudan a hacerle frente al ambiente hostil y contribuir a la patogénesis (78).

EF-Tu es un factor de elongación de la transcripción que permite la unión dependiente de ATP del ARN de transferencia cargado al sitio A de los ribosomas durante la síntesis de proteínas (79).

Nuol es la subunidad 1 de la NADH-quinona oxidoreductasa, complejo proteico membranal encargado de mantener el balance NADH/NAD<sup>+</sup> al catalizar la transferencia de un protón desde el NADH a la quinona a través de una cadena de grupos de hierro-azufre (Fe/S) distribuida en sus subunidades (80). Esta maquinaria proteica es fundamental para el bombeo de protones y la generación de energía (81).

Como es bien sabido, los macrófagos producen ROS gracias a la maquinaria derivada de vesículas mitocondriales que se fusionan con el fagosoma como estrategia principal para limitar la replicación intracelular de *Brucella* spp. (82, 83) (Fig. 8). En respuesta a esto la bacteria genera proteínas como la SodC y la

catalasa que le confieren resistencia a los componentes brucelidas como el anión superóxido y el peróxido de hidrógeno, respectivamente (84), al neutralizar la molécula oxidante.

Sin embargo, aunque la opsonización de brucelas con IgG o la activación IFN- $\gamma$ -dependiente de macrófagos (potenciadores de producción de ROS) mejora la actividad brucelida, existen cepas virulentas que presentan resistencia y replicación neta en estas condiciones (84).

Estudios bioquímicos y genéticos han caracterizado componentes antioxidantes presentes en el arsenal de defensa de *B. abortus*, como lo es SodC, que actúan idealmente en estas condiciones de estallido oxidativo, de manera análoga a especies patógenas intracelulares de *Listeria*, *Salmonella* y *Mycobacterium* (85–88), en donde se reportó de manera similar la protección contra las ROS.

Por último, se encontró exclusivamente en las BCVs de 2308W la subunidad beta de la ligasa glicina-ARNt, GlyS. Esta enzima cataliza la carga del aminoácido glicina al ARNt a través de una aminoacilación (89). No se reporta en la literatura que GlyS pueda tener función relacionada con virulencia. Sin embargo, en *B. melitensis* se evidenció mediante ensayos moleculares, fenotípicos y estructurales que la Met-ARNt sintasa (MetRS) podría ser una candidato preliminar para el desarrollo de drogas contra la brucelosis (90). GlyS podría también ser un blanco de este tipo, debido a la función análoga que posee con MetRS. GlyS y EF-Tu, ambas, están relacionadas con procesos de síntesis de proteínas, sugiriendo la posibilidad de que la bacteria tenga una síntesis de proteínas incrementada en la BCV en este punto. Cabe destacar que esta interpretación está en contraposición

con lo reportado durante esta etapa de tránsito intracelular por Lamontagne *et al.*, que observaron una síntesis de proteínas disminuida (91); y por Deghelt *et al.*, que evidenciaron el arresto en el ciclo celular de *B. abortus* (92).

No se descarta que algunas de estas moléculas mencionadas anteriormente sean proteínas “*moonlighting*”: proteínas con papeles adicionales no descritos en literatura o por inferencia bioinformática, es decir, proteínas que en su cadena polipeptídica presentan al menos dos funciones bioquímicas evidenciadas (93). Se han descrito alrededor de 270 proteínas citosólicas *moonlight* que tienen función de citoquinas, chaperonas, componentes citosqueléticos, compactadores de ADN, adhesinas, andamios, entre otras (93, 94).

Por ejemplo, GroEL posee funciones adicionales de toxina en *Enterobacter aerogenes*; de unión a superficie celular y activación de vías en *Chlamydia pneumoniae*; de adhesina en *Legionella pneumophila*, *Haemophilus ducreyi*, *Lactobacillus johnsonii*, *Salmonella typhimurium*, *Clostridium difficile* y *Helicobacter pylori*; y en *Mycobacterium tuberculosis* de unión a CD43 y a ADN (94).

También para EF-Tu se han reportado funciones *moonlight* de unión a células humanas y mucinas en *L. johnsonii*; unión a fibronectina en *Mycoplasma pneumoniae*; unión a factor H y plasminógeno en *Pseudomonas aeruginosa*; de unión y corte de microtúbulos en *Homo sapiens* y *Oryctolagus cuniculus* (conejo); y unión a mucina en *Streptococcus gordonii* (94).

En *Saccharomyces cerevisiae* se demostró como función *moonlight* de SodC unión al ADN como factor de transcripción en respuesta al H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, regulando la

expresión de genes relacionados a la respuesta contra estrés oxidativo y reparación de ADN (94).

Como perspectiva futura estas proteínas podrían ser candidatos para la generación de mutantes y su evaluación de tráfico intracelular en modelos de cultivo celular con el fin de evidenciar si son posibles blancos para terapias dirigidas a afectar el tránsito y la replicación intracelular de *B. abortus*.

El resultado del análisis proteómico cuantitativo libre de marcaje de las BCVs procedentes de macrófagos infectados con la cepa mutante *B. abortus virB10*, evidenció la presencia de proteínas membranales de mitocondria, membranales de acidificación vacuolar, de fagosoma y de lisosoma, entre otras (Fig. 5B-C, verdes; Tabla 4, Sub-expresadas en 2308W), lo cual es esperable en un compartimento degradativo dirigido a fusión con lisosoma.

En correlación con la presencia de componentes mitocondriales enriquecidos en las BCVs de *B. abortus virB10*, las ROS son potentes agentes bactericidas en el arsenal de defensa de las células hospederas contra invasiones de patógenos intracelulares, y se ha reportado que son generados por maquinaria mitocondrial que es suministrada a compartimentos endolisosomales través de vesículas derivadas de mitocondrias (83, 95).

Con respecto al enriquecimiento observado en ATPasas vacuolares en los compartimentos contenedores de la cepa *virB10*, estas actúan como bombas proteicas impulsadas por ATP que permiten la acidificación del lumen del compartimento endosomal que las contiene, estableciendo un pH bajo adecuado



para la activación y el funcionamiento de enzimas líticas presentes en el lisosoma (96).

Por otro lado, se encontraron 4 proteínas diferencialmente sobre-expresadas en BCVs procedentes de 2308W (Fig. 5B-C, rojas; Tabla 4, Sobre-expresadas en 2308W): la proteína autoantígeno uveal con dominios en espiral y repeticiones de anquirina (UACA), la glicosiltransferasa glicoproteína:UDP-glucosa 1 (UGGT1), la descarboxilasa de cis-aconitato (ACOD1) y la Atlastina-2 (ATL2).

La proteína UACA, o también llamada Nucling, presenta una localización perinuclear/nuclear y citoplásmica, interacciona con APAF1 e induce su translocación al núcleo luego de señales proapoptóticas de estrés y, por otro lado, también interacciona con el factor nuclear- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) previniendo su entrada al núcleo, reduciéndose así la expresión de sus genes blanco (97).

NF- $\kappa$ B es un factor de transcripción que responde al estrés oxidativo, estímulos patogénicos como por ejemplo especies reactivas de oxígeno (ROS) inducen su activación, regulando así cientos de genes (98).

La proteína residente de RE UGGT1 es responsable del control de calidad de plegamiento proteico en esta organela y funciona al N-glicosilar proteínas mal dobladas, manteniéndolas en este compartimento hasta su corrección o transfiriéndolas a vías de degradación (99, 100).

Esta proteína funciona como un sensor en el ciclo de control mediado por las chaperonas calreticulina/calnexina y también impacta la presentación de antígenos mediada por el complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) clase I (101). Zhang *et al.* evidenciaron que fibroblastos embrionarios de ratón UGGT1-deficientes

mostraron una reducción en la expresión superficial del MHC-clase I, así como también una maduración y ensamblaje retardados, y una selección de péptidos afectada (101).

Como ya es conocido, *B. melitensis* induce una UPR a través de su efector TcpB que favorece su replicación intracelular en macrófagos murinos y la reestructuración del RE para un apropiado nicho intracelular (55). Un reporte reciente relacionado con el enterovirus A71 (EVA71) determinó que este virus de ARN cadena positiva utiliza la proteína UGGT1 para favorecer su replicación y virulencia a través de la inducción de la UPR por acumulación de proteínas virales mal o no plegadas (102). Incrementos en UGGT1 resultaron en una tasa de síntesis de ARN viral elevada, mientras que la patogenicidad disminuyó en ratones *Uggt1<sup>+/-</sup>* (102).

La proteína ACOD1, también llamada IRG1, es una enzima asociada a mitocondrias que vincula el metabolismo con la respuesta inmune celular, expresada altamente en macrófagos durante procesos inflamatorios y exposición al LPS (103, 104). Es responsable de la producción de ácido itacónico a través de la descarboxilación del cis-aconitato, un metabolito del ciclo de Krebs.

El ácido itacónico inhibe el crecimiento bacteriano al interactuar con la proteína isocitrato liasa, como se reportó anteriormente en *S. enterica* y *M. tuberculosis* (103), en donde el silenciamiento de *Irg1* produjo un detrimento en la actividad antimicrobiana de macrófagos ante infecciones bacterianas. También se observó que en macrófagos activados con LPS, IRG1 suprimió significativamente la producción proinflamatoria de TNF- $\alpha$ , IL-6 e IFN- $\beta$  inducida por TLRs (104).

Finalmente, la proteína integral de membrana Atlastina-2 es una GTPasa relacionada con dinamina que en eucariotas es la encargada de generar la red poligonal del RE participando en procesos de fusión membranal de túbulos de esta organela, junto con sus otras 2 proteínas relacionadas ATL1 y ATL3 (105). Interesantemente, esta proteína se encontró enriquecida en BCVs de 2308W (Fig. 8).

Células NIH-3T3 mutantes *knock-out* triples de *Atl1/2/3* mostraron deficiencia en la morfología del RE, fenotipo reversible al complementar con los genes silvestres y también con ortólogos de plantas y levaduras (RHD3 y Sey1p, respectivamente), a pesar de su divergencia en secuencia de aminoácidos (105), sugiriendo un papel redundante dentro de esta familia de proteínas.

Importante es destacar que la ausencia de ATL1/2/3 en estas células produjo un modesto incremento en el estrés del RE, activando la vía de UPR (105). Es posible que esta proteína esté reclutada en el compartimento en respuesta al estrés en el RE generado por la bacteria en su tránsito hacia esta organela o al proceso bacteriano de remodelación de este compartimento (Fig. 8).

## CONCLUSIONES

Se desarrolló un protocolo eficiente para el enriquecimiento de BCVs. No obstante, este aún se encuentra en etapa de validación y con perspectivas de mejora a futuro.

Las BCVs de la cepa de *B. abortus virB10* se caracterizaron por ser compartimentos degradativos y oxidativos, semejantes a los compartimentos endolisosomales dirigidos a la destrucción bacteriana.

Se evidenció la presencia aumentada de *Br*-LPS en las BCVs de 2308W en comparación con las vacuolas de *virB10*, sugiriendo un posible efecto biológico de esta molécula en la modulación del tráfico intracelular temprano de *B. abortus*.

La actividad del SST4 VirB disminuye el reclutamiento de proteínas normalmente encontradas en fagosomas degradativos y realiza ligeras modificaciones que permiten el establecimiento de un nicho replicativo dentro de la célula hospedera.

Tomando esto en conjunto se puede evidenciar que las BCVs de 2308W son compartimentos que ya poseen componentes de RE como CNX, CALR, UGGT1 y ATL2 en etapas de redirección de tráfico en la infección intracelular gracias a la acción del SST4. Estos componentes podrían permitir el remodelamiento estructural de la vacuola y del RE para efectuar una correcta fusión de compartimentos y fomentar la biogénesis de la rBCV (Fig. 8).

También es importante destacar que las proteínas UACA y ACOD1 podrían actuar como moduladores inmunes, afectando la señalización del NF- $\kappa$ B, TNF- $\alpha$ , IL-6 e IFN- $\beta$ , respectivamente. Como futuras perspectivas es necesario explorar estas

vías de señalización para entender cuál es el papel específico que podría tener el reclutamiento aumentado de estas proteínas en las BCVs.

Por otro lado, la metodología empleada permitió caracterizar las BCVs de *virB10* como compartimentos degradativos y oxidativos con características clásicas de un tráfico endolisosomal dirigido a la destrucción de la bacteria. A futuro es conveniente investigar la acidificación fagosomal en BCVs de ambas cepas utilizando microscopía fluorescente con sensores de pH vacuolar con el fin de determinar si los fagosomas tienen diferentes perfiles de acidificación.

Además, es necesario evaluar: 1) si otras mutantes deficientes en distintos componentes del SST4 VirB o la mutante en el regulador transcripcional VjbR (el cual controla la expresión de VirB) podrían presentar defectos en la liberación de OMVs que contribuyan a impedir el establecimiento del nicho replicativo en el RE; 2) si en inmunomicroscopía electrónica es posible evidenciar la ausencia de Br-LPS en las OMVs liberadas por cepas *virB*<sup>-</sup> y *vjbR*<sup>-</sup>; y 3) si la microinyección de Br-LPS a macrófagos infectados con cepas *virB*<sup>-</sup> y *vjbR*<sup>-</sup> podría restablecer el fenotipo silvestre logrando que las mismas transiten adecuadamente hasta el retículo endoplásmico. Estos estudios podrían arrojar resultados sobre cómo el SST4 influye en la liberación de OMVs desde la membrana externa de *B. abortus* y nos ayudarían a entender si en efecto, el LPS tienen algún papel en el tránsito intracelular de *B. abortus*.

Además, es conveniente a futuro realizar abordajes adicionales para la determinación de los cambios en la abundancia relativa de las proteínas identificadas. Existen metodologías con marcaje que permiten una cuantificación

más precisa de los péptidos en las muestras biológicas complejas, por ejemplo, el uso de marcaje isobárico para cuantificación absoluta y relativa (iTRAQ), marcaje de masas en tándem, marcaje de afinidad isobárica escindible, leucinas dimetiladas y marcaje de péptido isobárico (106).

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Zhang N, Huang D, Wu W, Liu J, Liang F, Zhou B, Guan P. 2018. Animal brucellosis control or eradication programs worldwide: A systematic review of experiences and lessons learned. *Prev Vet Med* 160:105–115.
2. El-Sayed A, Awad W. 2018. Brucellosis: Evolution and expected comeback. *Int J Vet Sci Med* 6:S31–S35.
3. Killham K, Prosser JI. 2012. The Prokaryotes, p. 119–144. *In* Dworkin, M, Falkow, S, Schleifer, K-H, Rosenberg, E, Stackebrandt, E (eds.), *Soil Microbiology, Ecology and Biochemistry*, 3rd ed. Springer NY, New York.
4. Franco MP, Mulder M, Gilman RH, Smits HL. 2007. Human brucellosis. *Lancet InfectDis* 7:775–786.
5. Ko J, Splitter G a. 2003. Molecular Host-Pathogen Interaction in Brucellosis: Current Understanding and Future Approaches to Vaccine Development for Mice and Humans. *Clin Microbiol Rev* 16:65–78.
6. von Bargen K, Gorvel JP, Salcedo SP. 2012. Internal affairs: Investigating the *Brucella* intracellular lifestyle. *FEMS Microbiol Rev* 36:533–562.
7. Moreno E, Cloeckert A, Moriyón I. 2002. *Brucella* evolution and taxonomy. *Vet Microbiol* 90:209–227.
8. Moreno E. 2002. Brucellosis in Central America. *Vet Microbiol* 90:31–38.
9. De Figueiredo P, Ficht TA, Rice-Ficht A, Rossetti CA, Adams LG. 2015. Pathogenesis and immunobiology of brucellosis: Review of *Brucella*-host interactions. *Am J Pathol* 185:1505–1517.
10. Centers for Disease Control and Prevention. 2019. Transmission | Brucellosis. <https://www.cdc.gov/brucellosis/transmission/index.html>.
11. Bowden RA, Verger JM, Grayon M, Limet JN, Dubray G. 1993. Simultaneous expression of smooth and rough phase properties related to lipopolysaccharide in a strain of *Brucella melitensis*. *J Med Microbiol* 39:363–370.
12. Moreno E, Speth SL, Jones LM, Berman DT. 1981. Immunochemical characterization of *Brucella* lipopolysaccharide and polysaccharides. *Infect*

- an *Immun* 31:214–222.
13. Moreno E, Jones LM, Berman DT. 1984. Immunochemical characterization of rough *Brucella* lipopolysaccharides. *Infect Immun* 43:779–782.
  14. Soler-Lloréns P, Gil-Ramírez Y, Zabalza-Baranguá A, Iriarte M, Conde-Álvarez R, Zúñiga-Ripa A, San Román B, Zygmunt MS, Vizcaíno N, Cloeckaert A, Grilló MJ, Moriyón I, López-Goñi I. 2014. Mutants in the lipopolysaccharide of *Brucella ovis* are attenuated and protect against *B. ovis* infection in mice. *Vet Res* 45:1–11.
  15. Huotari J, Helenius A. 2011. Endosome maturation. *EMBO J* 30:3481–3500.
  16. Zerial M, McBride H. 2001. Rab proteins as membrane organizers. *Nat Rev Mol Cell Biol*.
  17. Edmonds MD, Cloeckaert A, Booth NJ, Fulton WT, Hagius SD, Walker J V., Elzer PH. 2001. Attenuation of a *Brucella abortus* mutant lacking a major 25 kDa outer membrane protein in cattle. *Am J Vet Res* 62:1461–1466.
  18. Smartino LE, Enright FM. 1993. Pathogenesis of Abortion of Bovine Brucellosis. *Comp Immun Microbiol Infect* 16:95–101.
  19. Barquero-Calvo E, Mora-Cartín R, Arce-Gorvel V, de Diego JL, Chacón-Díaz C, Chaves-Olarte E, Guzmán-Verri C, Buret AG, Gorvel JP, Moreno E. 2015. *Brucella abortus* Induces the Premature Death of Human Neutrophils through the Action of Its Lipopolysaccharide. *PLoS Pathog* 11:1–29.
  20. Gorvel JP, Moreno E. 2002. *Brucella* intracellular life: From invasion to intracellular replication. *Vet Microbiol* 90:281–297.
  21. Celli J, de Chastellier C, Franchini D-M, Pizarro-Cerda J, Moreno E, Gorvel J-P. 2003. *Brucella* Evades Macrophage Killing via VirB-dependent Sustained Interactions with the Endoplasmic Reticulum . *J Exp Med* 198:545–556.
  22. Starr T, Ng TW, Wehrly TD, Knodler LA, Celli J. 2008. *Brucella* intracellular replication requires trafficking through the late endosomal/lysosomal compartment. *Traffic* 9:678–694.
  23. Boschioli ML, Ouahrani-Bettache S, Foulongne V, Michaux-Charachon S,



- Bourg G, Allardet-Servent A, Cazevieille C, Lavigne J-P, Liautard JP, Ramuz M. 2002. Type IV secretion and *Brucella* virulence. *Vet Microbiol* 90:341–348.
24. Celli J, Salcedo SP, Gorvel J-P. 2005. *Brucella* coopts the small GTPase Sar1 for intracellular replication. *Proc Natl Acad Sci* 102:1673–1678.
  25. Fugier E, Salcedo SP, De Chastellier C, Pophillat M, Muller A, Arce-Gorvel V, Fourquet P, Gorvel JP. 2009. The glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase and the small GTPase rab 2 are crucial for *Brucella* replication. *PLoS Pathog* 5.
  26. Qin QM, Pei J, Ancona V, Shaw BD, Ficht TA, De Figueiredo P. 2008. RNAi screen of endoplasmic reticulum-associated host factors reveals a role for IRE1 $\alpha$  in supporting *Brucella* replication. *PLoS Pathog* 4.
  27. Starr T, Child R, Wehrly TD, Hansen B, Hwang S, López-Otin C, Virgin HW, Celli J. 2012. Selective subversion of autophagy complexes facilitates completion of the *Brucella* intracellular cycle. *Cell Host Microbe* 11:33–45.
  28. Guzmán-Verri C, Chaves-Olarte E, Von Eichel-Streiber C, López-Goñi I, Thelestam M, Arvidson S, Gorvel JP, Moreno E. 2001. GTPases of the Rho subfamily are required for *Brucella abortus* internalization in nonprofessional phagocytes: Direct activation of Cdc42. *J Biol Chem* 276:44435–44443.
  29. Chaves-Olarte E, Guzmán-Verri C, Méresse S, Desjardins M, Pizarro-Cerdá J, Badilla J, Gorvel JP, Moreno E. 2002. Activation of Rho and Rab GTPases dissociates *Brucella abortus* internalization from intracellular trafficking. *Cell Microbiol* 4:663–675.
  30. Delrue RM, Deschamps C, Léonard S, Nijskens C, Danese I, Schaus JM, Bonnot S, Ferooz J, Tibor A, De Bolle X, Letesson JJ. 2005. A quorum-sensing regulator controls expression of both the type IV secretion system and the flagellar apparatus of *Brucella melitensis*. *Cell Microbiol* 7:1151–1161.
  31. Hartigh AB, Sun Y, Sondervan D, Heuvelmans N, Reinders MO, Ficht TA. 2004. Differential Requirements for VirB1 and VirB2 during *Brucella abortus*

- infection. *Society* 72:5143–5149.
32. Boschioli ML, Ouahrani-Bettache S, Foulongne V, Michaux-Charachon S, Bourg G, Allardet-Servent A, Cazevieille C, Liautard JP, Ramuz M, O'Callaghan D. 2002. The *Brucella suis* virB operon is induced intracellularly in macrophages. *Proc Natl Acad Sci* 99:1544–1549.
  33. Arocena GM, Sieira R, Comerci DJ, Ugalde RA. 2010. Identification of the quorum-sensing target DNA sequence and N-acyl homoserine lactone responsiveness of the *Brucella abortus* virB promoter. *J Bacteriol* 192:3434–3440.
  34. Sieira R, Arocena GM, Bukata L, Comerci DJ, Ugalde RA. 2010. Metabolic control of virulence genes in *Brucella abortus*: HutC coordinates virB expression and the histidine utilization pathway by direct binding to both promoters. *J Bacteriol* 192:217–224.
  35. Caswell CC, Gaines JM, Roop RM. 2012. The RNA chaperone Hfq independently coordinates expression of the VirB type IV secretion system and the LuxR-type regulator BabR in *Brucella abortus* 2308. *J Bacteriol* 194:3–14.
  36. Haine V, Sinon A, Van Steen F, Rousseau S, Dozot M, Lestrade P, Lambert C, Letesson J-J, De Bolle X. 2005. Systematic Targeted Mutagenesis of *Brucella melitensis* 16M Reveals a Major Role for GntR Regulators in the Control of Virulence. *Am Soc Microbiol* 73:5578–5586.
  37. Dozot M, Boigegrain RA, Delrue RM, Hallez R, Ouahrani-Bettache S, Danese I, Letesson JJ, De Bolle X, Köhler S. 2006. The stringent response mediator Rsh is required for *Brucella melitensis* and *Brucella suis* virulence, and for expression of the type IV secretion system virB. *Cell Microbiol* 8:1791–1802.
  38. Sieira R, Comerci DJ, Pietrasanta LI, Ugalde RA. 2004. Integration host factor is involved in transcriptional regulation of the *Brucella abortus* virB operon. *Mol Microbiol* 54:808–822.
  39. Wilkinson SP, Grove A. 2006. Ligand-responsive transcriptional regulation by

- members of the MarR family of winged helix proteins. *Curr Issues Mol Biol* 8:51–62.
40. Altamirano-Silva PEC-O. 2018. *Brucella abortus* Senses the Intracellular Environment through the BvrR/BvrS Two-Component System, Which Allows *B. abortus* To Adapt to Its Replicative Niche 86:1–15.
  41. Sieira R, Comerci DJ, Sanchez DO, Ugalde RA. 2000. A homologue of an operon required for DNA transfer in *Agrobacterium* is required in *Brucella abortus* for virulence and intracellular multiplication. *J Bacteriol* 182:4849–4855.
  42. Martínez-Núñez C, Altamirano-Silva P, Alvarado-Guillén F, Moreno E, Guzmán-Verri C, Chaves-Olarte E. 2010. The two-component system BvrR/BvrS regulates the expression of the type IV secretion system VirB in *Brucella abortus*. *J Bacteriol* 192:5603–5608.
  43. Comerci DJ, Martínez-Lorenzo MJ, Sieira R, Gorvel JP, Ugalde RA. 2001. Essential role of the virB machinery in the maturation of the *Brucella abortus*-containing vacuole. *Cell Microbiol* 3:159–168.
  44. Lee JJ, Kim DG, Kim DH, Simborio HL, Min W, Lee HJ, Her M, Jung SC, Watarai M, Kim S. 2013. Interplay between clathrin and Rab5 Controls the early phagocytic trafficking and intracellular survival of *Brucella abortus* within HeLa cells. *J Biol Chem* 288:28049–28057.
  45. Rambow-Larsen AA, Petersen EM, Gourley CR, Splitter GA. 2009. *Brucella* regulators: self-control in a hostile environment. *Trends Microbiol* 17:371–377.
  46. Salcedo SP, Marchesini MI, Lelouard H, Fugier E, Jolly G, Balor S, Muller A, Lapaque N, Demaria O, Alexopoulou L, Comerci DJ, Ugalde RA, Pierre P, Gorvel JP. 2008. *Brucella* control of dendritic cell maturation is dependent on the TIR-containing protein Btp1. *PLoS Pathog* 4.
  47. Ke Y, Wang Y, Li W, Chen Z. 2015. Type IV secretion system of *Brucella* spp. and its effectors. *Front Cell Infect Microbiol* 5:1–10.
  48. Li P, Tian M, Hu H, Yin Y, Guan X, Ding C, Wang S, Yu S. 2019. Label-free

- based comparative proteomic analysis of secretory proteins of rough *Brucella* mutants. *J Proteomics* 195:66–75.
49. De Jong MF, Sun YH, Den Hartigh AB, Van Dijl JM, Tsolis RM. 2008. Identification of VceA and VceC, two members of the VjbR regulon that are translocated into macrophages by the *Brucella* type IV secretion system. *Mol Microbiol* 70:1378–1396.
  50. de Jong MF, Starr T, Winter MG, den Hartigh AB, Child R, Knodler LA, van Dijl JM, Celli J TR. 2013. Sensing of Bacterial Type IV Secretion via the Unfolded Protein. *MBio* 4:1–10.
  51. De Barsy M, Jamet A, Filopon D, Nicolas C, Laloux G, Rual JF, Muller A, Twizere JC, Nkengfac B, Vandenhoute J, Hill DE, Salcedo SP, Gorvel JP, Letesson JJ, De Bolle X. 2011. Identification of a *Brucella* spp. secreted effector specifically interacting with human small GTPase Rab2. *Cell Microbiol* 13:1044–1058.
  52. Marchesini MI, Herrmann CK, Salcedo SP, Gorvel JP, Comerci DJ. 2011. In search of *Brucella abortus* type iv secretion substrates: Screening and identification of four proteins translocated into host cells through virB system. *Cell Microbiol* 13:1261–1274.
  53. Marchesini MI, Morrone Seijo SM, Guaimas FF, Comerci DJ. 2016. A T4SS Effector Targets Host Cell Alpha-Enolase Contributing to *Brucella abortus* Intracellular Lifestyle. *Front Cell Infect Microbiol* 6:1–14.
  54. Benitez PCA, Serantes DR, Herrmann CK, Viglietti AIP, Vanzulli S, Giambartolomei GH, Comerci DJ, Delpino MV. 2016. The effector protein BPE005 from *Brucella abortus* induces collagen deposition and matrix metalloproteinase 9 downmodulation via transforming growth factor  $\beta$ 1 in hepatic stellate cells. *Infect Immun* 84:598–606.
  55. Smith JA, Khan M, Magnani DD, Harms JS, Durward M, Radhakrishnan GK, Liu YP, Splitter GA. 2013. *Brucella* Induces an Unfolded Protein Response via TcpB That Supports Intracellular Replication in Macrophages. *PLoS Pathog* 9:1–12.

56. Jakka P, Namani S, Murugan S, Rai N, Radhakrishnan G. 2017. The Brucella effector protein TcpB induces degradation of inflammatory caspases and thereby subverts Non-canonical inflammasome activation in macrophages. *J Biol Chem* 292:20613–20627.
57. Rana RR, Zhang M, Spear AM, Atkins HS, Byrne B. 2013. Bacterial TIR-containing proteins and host innate immune system evasion. *Med Microbiol Immunol* 202:1–10.
58. Salcedo SP, Marchesini MI, Degos C, Terwagne M, Von Bargen K, Lepidi H, Herrmann CK, Santos Lacerda TL, Imbert PRC, Pierre P, Alexopoulou L, Letesson J-J, Comerci DJ, Gorvel J-P. 2013. BtpB, a novel Brucella TIR-containing effector protein with immune modulatory functions. *Front Cell Infect Microbiol* 3:1–13.
59. Myeni S, Child R, Ng TW, Kupko JJ, Wehrly TD, Porcella SF, Knodler LA, Celli J. 2013. Brucella Modulates Secretory Trafficking via Multiple Type IV Secretion Effector Proteins. *PLoS Pathog* 9.
60. Miller CN, Smith EP, Cundiff JA, Knodler LA, Bailey Blackburn J, Lupashin V, Celli J. 2017. A Brucella Type IV Effector Targets the COG Tethering Complex to Remodel Host Secretory Traffic and Promote Intracellular Replication. *Cell Host Microbe* 22:317-329.e7.
61. Döhmer PH, Valguarnera E, Czibener C, Ugalde JE. 2014. Identification of a type IV secretion substrate of Brucella abortus that participates in the early stages of intracellular survival. *Cell Microbiol* 16:396–410.
62. Herweg J-A, Hansmeier N, Otto A, Geffken AC, Subbarayal P, Prusty BK, Becher D, Hensel M, Schaible UE, Rudel T, Hilbi H. 2015. Purification and proteomics of pathogen-modified vacuoles and membranes. *Front Cell Infect Microbiol* 5.
63. Jones LM, Montgomery V, Wilson JB. 1965. Characteristics of Carbon Dioxide-Independent Cultures of Brucella Abortus Isolated from Cattle Vaccinated with Strain 19. *J Infect Dis* 115:312–320.
64. Chacón-Díaz C, Muñoz-Rodríguez M, Barquero-Calvo E, Guzmán-Verri C,

- Chaves-Olarte E, Grilló MJ, Moreno E. 2011. The use of green fluorescent protein as a marker for *Brucella* vaccines. *Vaccine* 29:577–582.
65. Chaves-Olarte E, Altamirano-Silva P, Guzmán-Verri C, Moreno E. 2014. Purification of Intracellular Bacteria: Isolation of Viable *Brucella abortus* from Host Cells, p. 245–260. *In* *Host-Bacteria Interactions: Methods and Protocols*, Methods in Molecular Biology.
  66. Desjardins M, Huber LA, Parton RG, Griffiths G. 1994. Biogenesis of phagolysosomes proceeds through a sequential series of interactions with the endocytic apparatus. *J Cell Biol* 124:677–688.
  67. Mills SD, Brett Finlay B. 1998. Isolation and characterization of *Salmonella typhimurium* and *Yersinia pseudotuberculosis*-containing phagosomes from infected mouse macrophages: *Y. pseudotuberculosis* traffics to terminal lysosomes where they are degraded. *Eur J Cell Biol* 77:35–47.
  68. Stiller JM, Nielsen KH. 1983. Affinity purification of bovine antibodies to *Brucella abortus* lipopolysaccharide. *J Clin Microbiol* 17:323–326.
  69. Kanehisa M, Sato Y, Morishima K. 2016. BlastKOALA and GhostKOALA: KEGG Tools for Functional Characterization of Genome and Metagenome Sequences. *J Mol Biol* 428:726–731.
  70. Conde-Álvarez R, Arce-Gorvel V, Iriarte M, Manček-Keber M, Barquero-Calvo E, Palacios-Chaves L, Chacón-Díaz C, Chaves-Olarte E, Martirosyan A, von Bargen K, Grilló MJ, Jerala R, Brandenburg K, Llobet E, Bengoechea JA, Moreno E, Moriyón I, Gorvel JP. 2012. The lipopolysaccharide core of *Brucella abortus* acts as a shield against innate immunity recognition. *PLoS Pathog* 8.
  71. Monie TP. 2017. Integrated Innate Immunity—Combining Activation and Effector Functions. *Innate Immune Syst* 121–169.
  72. Pollak CN, Delpino MV, Fossati CA, Baldi PC. 2012. Outer Membrane Vesicles from *Brucella abortus* Promote Bacterial Internalization by Human Monocytes and Modulate Their Innate Immune Response. *PLoS One* 7:e50214.

73. Hoffmann C, Finsel I, Otto A, Pfaffinger G, Rothmeier E, Hecker M, Becher D, Hilbi H. 2014. Functional analysis of novel Rab GTPases identified in the proteome of purified Legionella-containing vacuoles from macrophages. *Cell Microbiol.*
74. Geffken AC, Patin EC, Schaible UE. 2015. Isolation of bead phagosomes to study virulence function of *M. Tuberculosis* cell wall lipids. *Methods Mol Biol.*
75. Subbarayal P, Karunakaran K, Winkler AC, Rother M, Gonzalez E, Meyer TF, Rudel T. 2015. EphrinA2 Receptor (EphA2) Is an Invasion and Intracellular Signaling Receptor for *Chlamydia trachomatis*. *PLoS Pathog.*
76. Vorwerk S, Krieger V, Deiwick J, Hensel M, Hansmeier N. 2015. Proteomes of host cell membranes modified by intracellular activities of *Salmonella enterica*. *Mol Cell Proteomics.*
77. Hayer-Hartl M, Bracher A, Hartl FU. 2016. The GroEL-GroES Chaperonin Machine: A Nano-Cage for Protein Folding. *Trends Biochem Sci* 41:62–76.
78. Neckers L, Tatu U. 2008. Molecular Chaperones in Pathogen Virulence: Emerging New Targets for Therapy. *Cell Host Microbe* 4:519–527.
79. Prezioso SM, Brown NE, Goldberg JB. 2017. Elfamycins: inhibitors of elongation factor-Tu. *Mol Microbiol* 106:22–34.
80. Sinha PK, Nakamaru-Ogiso E, Torres-Bacete J, Sato M, Castro-Guerrero N, Ohnishi T, Matsuno-Yagi A, Yagi T. 2012. Electron transfer in subunit Nuol (TYKY) of *Escherichia coli* NADH:Quinone oxidoreductase (NDH-1). *J Biol Chem* 287:17363–17373.
81. Brandt U. 2006. Energy Converting NADH: Quinone Oxidoreductase (Complex I). *Annu Rev Biochem* 75:69–92.
82. Jiang X, Leonard B, Benson R, Baldwin CL. 1993. Macrophage Control of *Brucella abortus*: Role of Reactive Oxygen Intermediates and Nitric Oxide. *Cell Immunol* 151:309–319.
83. Abuaita BH, Schultz TL, O’Riordan MX. 2018. Mitochondria-Derived Vesicles Deliver Antimicrobial Reactive Oxygen Species to Control Phagosome-Localized *Staphylococcus aureus*. *Cell Host Microbe* 24:625-636.e5.

84. Gee JM, Valderas MW, Kovach ME, Grippe VK, Robertson GT, Ng WL, Richardson JM, Winkler ME, Roop RM. 2005. The *Brucella abortus* Cu,Zn superoxide dismutase is required for optimal resistance to oxidative killing by murine macrophages and wild-type virulence in experimentally infected mice. *Infect Immun* 73:2873–2880.
85. Flannagan RS, Cosío G, Grinstein S. 2009. Antimicrobial mechanisms of phagocytes and bacterial evasion strategies. *Nat Rev Microbiol* 7:355–366.
86. Archambaud C, Nahori MA, Pizarro-Cerda J, Cossart P, Dussurget O. 2006. Control of *Listeria* superoxide dismutase by phosphorylation. *J Biol Chem* 281:31812–31822.
87. De Groote MA, Ochsner UA, Shiloh MU, Nathan C, McCord JM, Dinauer MC, Libby SJ, Vazquez-Torres A, Xu Y, Fang FC. 1997. Periplasmic superoxide dismutase protects *Salmonella* from products of phagocyte NADPH-oxidase and nitric oxide synthase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:13997–4001.
88. Piddington DL, Fang FC, Laessig T, Cooper AM, Orme IM, Buchmeier NA. 2001. Cu,Zn superoxide dismutase of *Mycobacterium tuberculosis* contributes to survival in activated macrophages that are generating an oxidative burst. *Infect Immun* 69:4980–7.
89. Shepherd J, Ibba M. 2015. Bacterial transfer RNAs. *FEMS Microbiol Rev* 39:280–300.
90. Ojo KK, Ranade RM, Zhang Z, Dranow DM, Myers JB, Choi R, Nakazawa Hewitt S, Edwards TE, Davies DR, Lorimer D, Boyle SM, Barrett LK, Buckner FS, Fan E, Van Voorhis WC. 2016. *Brucella melitensis* Methionyl-tRNA-Synthetase (MetRS), a Potential Drug Target for Brucellosis. *PLoS One* 11:e0160350.
91. Lamontagne J, Forest A, Marazzo E, Denis F, Butler H, Michaud JF, Boucher L, Pedro I, Villeneuve A, Sitnikov D, Trudel K, Nassif N, Boudjelti D, Tomaki F, Chaves-Olarte E, Guzmán-Verri C, Brunet S, Côté-Martin A, Hunter J, Moreno E, Paramithiotis E. 2009. Intracellular adaptation of



- brucella abortus. *J Proteome Res* 8:1594–1609.
92. Deghelt M, Mullier C, Sternon JF, Francis N, Laloux G, Dotreppe D, Van Der Henst C, Jacobs-Wagner C, Letesson JJ, De Bolle X. 2014. G1-arrested newborn cells are the predominant infectious form of the pathogen *Brucella abortus*. *Nat Commun* 5:1–12.
  93. Jeffery CJ. 2015. Why study moonlighting proteins? *Front Genet* 6.
  94. Mani M, Chen C, Amblee V, Liu H, Mathur T, Zwicke G, Zabad S, Patel B, Thakkar J, Jeffery CJ. 2015. MoonProt: A database for proteins that are known to moonlight. *Nucleic Acids Res* 43:D277–D282.
  95. Meyer A, Laverny G, Bernardi L, Charles AL, Alsaleh G, Pottecher J, Sibia J, Geny B. 2018. Mitochondria: An organelle of bacterial origin controlling inflammation. *Front Immunol* 9:1–8.
  96. Cipriano DJ, Wang Y, Bond S, Hinton A, Jefferies KC, Qi J, Forgac M. 2008. Function, structure and regulation of the vacuolar ATPases. *Biochim Biophys Acta - Bioenerg* 1777:599–604.
  97. Moravcikova E, Krepela E, Prochazka J, Rousalova I, Cermak J, Benkova K. 2012. Down-regulated expression of apoptosis-associated genes AIP1 and UACA in non-small cell lung carcinoma. *Int J Oncol* 40:2111–2121.
  98. Lim S, Hwang S, Yu JH, Lim JW, Kim H. 2017. Lycopene inhibits regulator of calcineurin 1-mediated apoptosis by reducing oxidative stress and down-regulating Nuclein in neuronal cells. *Mol Nutr Food Res* 61:1–10.
  99. Korotkov K V., Kumaraswamy E, Zhou Y, Hatfield DL, Gladyshev VN. 2001. Association between the 15-kDa Selenoprotein and UDP-glucose:Glycoprotein Glucosyltransferase in the Endoplasmic Reticulum of Mammalian Cells. *J Biol Chem* 276:15330–15336.
  100. Pearse BR, Tamura T, Sunryd JC, Grabowski GA, Kaufman RJ, Hebert DN. 2010. The role of UDP-Glc:glycoprotein glucosyltransferase 1 in the maturation of an obligate substrate prosaposin. *J Cell Biol* 189:829–841.
  101. Zhang W, Wearsch PA, Zhu Y, Leonhardt RM, Cresswell P. 2011. A role for UDP-glucose glycoprotein glucosyltransferase in expression and quality

- control of MHC class I molecules. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108:4956–4961.
102. Huang P-N, Jheng J-R, Arnold JJ, Wang J-R, Cameron CE, Shih S-R. 2017. UGGT1 enhances enterovirus 71 pathogenicity by promoting viral RNA synthesis and viral replication. *PLOS Pathog* 13:e1006375.
  103. Michelucci A, Cordes T, Ghelfi J, Pailot A, Reiling N, Goldmann O, Binz T, Wegner A, Tallam A, Rausell A, Buttini M, Linster CL, Medina E, Balling R, Hiller K. 2013. Immune-responsive gene 1 protein links metabolism to immunity by catalyzing itaconic acid production. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110:7820–7825.
  104. Li Y, Zhang P, Wang C, Han C, Meng J, Liu X, Xu S, Li N, Wang Q, Shi X, Cao X. 2013. Immune Responsive Gene 1 (IRG1) promotes endotoxin tolerance by increasing A20 expression in macrophages through reactive oxygen species. *J Biol Chem* 288:16225–16234.
  105. Zhao G, Zhu P-P, Renvoisé B, Maldonado-Báez L, Park SH, Blackstone C. 2016. Mammalian knock out cells reveal prominent roles for atlastin GTPases in ER network morphology. *Exp Cell Res* 349:32–44.
  106. Treumann A, Thiede B. 2010. Isobaric protein and peptide quantification: Perspectives and issues. *Expert Rev Proteomics* 7:647–653.

## ANEXOS

Anexo A1. Lista de proteínas detectadas como exclusivas de las BCVs de *B. abortus* 2308W.

| # de<br>accesión<br>UniProt   | Nombres de proteínas  | Nombres<br>de genes  | Longitud<br>(aa's) | Gene ontology   | Definición KO   | Muestras<br>de<br>2308W | Promedio<br>de<br>intensidad | D.E.      |
|-------------------------------|---|----------------------|--------------------|---|---|-------------------------|------------------------------|-----------|
| <i>Brucella abortus</i> 2308W |   |                      |                    |   |   |                         |                              |           |
| Q2YIJ3                        | 60 kDa chaperonin (GroEL protein) (Protein Cpn60)   | groL groEL BAB2_0189 | 546                | cytoplasm [GO:0005737]; ATP binding [GO:0005524]; unfolded protein binding [GO:0051082]; protein refolding [GO:0042026]   | groEL; chaperonin GroEL   | 3/3                     | 13173333                     | 7948593   |
| Q2YM08                        | Elongation factor Tu (EF-Tu)  | tuf1 BAB1_1257       | 391                | cytoplasm [GO:0005737]; GTP binding [GO:0005525]; GTPase activity [GO:0003924]; translation elongation factor activity [GO:0003746]   | tuf; elongation factor Tu   | 3/3                     | 11046667                     | 7133199   |
| Q2YNF5                        | NADH-quinone oxidoreductase subunit I (EC 7.1.1.-) (NADH dehydrogenase I subunit I) (NDH-1 subunit I) | nuoI BAB1_0830       | 163                | plasma membrane [GO:0005886]; 4 iron, 4 sulfur cluster binding [GO:0051539]; iron ion binding [GO:0005506]; NADH dehydrogenase (quinone) activity [GO:0050136]; quinone binding [GO:0048038]  | nuoI; NADH-quinone oxidoreductase subunit I [EC:7.1.1.2]                  | 2/3                     | 47800000                     | 33658283  |
| Q2YKV9                        | Superoxide dismutase [Cu-Zn] (EC 1.15.1.1)  | sodC BAB2_0535       | 173                | metal ion binding [GO:0046872]; superoxide dismutase activity [GO:0004784]  | SOD1; superoxide dismutase, Cu-Zn family [EC:1.15.1.1]                    | 2/3                     | 26150000                     | 5868986   |
| Q2YME2                        | Glycine--tRNA ligase beta subunit (EC 6.1.1.14) (Glycyl-tRNA synthetase beta subunit) (GlyRS)         | glyS BAB1_0433       | 777                | cytoplasm [GO:0005737]; arginine-tRNA ligase activity [GO:0004814]; ATP binding [GO:0005524]; glycine-tRNA ligase activity [GO:0004820]; arginyl-tRNA aminoacylation [GO:0006420]; glycyl-tRNA aminoacylation [GO:0006426]  | glyS; glycyl-tRNA synthetase beta chain [EC:6.1.1.14]                     | 2/3                     | 23720000                     | 24579032  |
| <i>Mus musculus</i>           |   |                      |                    |   |   |                         |                              |           |
| Q5SQB5                        | Nucleophosmin   | Npm1                 | 285                | N.D.  | NPM1; nucleophosmin 1   | 3/3                     | 53133333                     | 391017050 |
| Q9DAY9                        | Nucleophosmin   | Npm1                 | 257                | centrosome [GO:0005813]; cytoplasm [GO:0005737]; nucleus [GO:0005634]; NF-kappaB binding [GO:0051059]; unfolded protein binding [GO:0051082]; cell aging [GO:0007569]; centrosome cycle [GO:0007098]; negative regulation of cell population proliferation [GO:0008285] | NPM1; nucleophosmin 1   | 3/3                     | 53133333                     | 391017050 |
| B1AXY1                        | DnaJ homolog subfamily A member 1 (Fragment)  | Dnaja1               | 278                | heat shock protein binding [GO:0031072]; metal ion binding [GO:0046872]; unfolded protein binding [GO:0051082]; protein folding [GO:0006457]  | DNAJA1; DnaJ homolog subfamily A member 1                                 | 3/3                     | 41366667                     | 359480644 |
| A0A0G2JFP4                    | Ferric-chelate reductase 1  | Frrs1                | 592                | integral component of membrane [GO:0016021]; oxidation-reduction process [GO:0055114]   | N.D.  | 3/3                     | 81533333                     | 53109823  |
| Q8BPI2                        | Transmembrane emp24 domain-containing protein 2 (Fragment)  | Tmed2                | 112                | integral component of membrane [GO:0016021]   | TMED2; p24 family protein beta-1  | 3/3                     | 81333333                     | 56053932  |
| A2AT70                        | Titin (Fragment)  | Ttn                  | 3409               | N.D.  | TTN; titin [EC:2.7.11.1]  | 3/3                     | 80366667                     | 22416363  |
| Q5NC80                        | Nucleoside diphosphate kinase (EC 2.7.4.6) (Fragment)   | Nme1                 | 127                | ATP binding [GO:0005524]; nucleoside diphosphate kinase activity [GO:0004550]; CTP biosynthetic process [GO:0006241]; GTP biosynthetic process [GO:0006183]; UTP biosynthetic process [GO:0006228]  | ndk; nucleoside-diphosphate kinase [EC:2.7.4.6]                           | 3/3                     | 77000000                     | 24000000  |
| A0A1L1SR8                     | 39S ribosomal protein L4, mitochondrial (Fragment)  | Mrp14                | 219                | ribosome [GO:0005840]; structural constituent of ribosome [GO:0003735]; translation [GO:0006412]  | RP-L4; large subunit ribosomal protein L4                                 | 3/3                     | 50266667                     | 40700041  |
| A0A0N4SVT3                    | Guanine nucleotide-binding protein subunit gamma (Fragment)   | Gng12                | 65                 | heterotrimeric G-protein complex [GO:0005834]; GTPase activity [GO:0003924]; G protein-coupled receptor signaling pathway [GO:0007186]  | GNG12; guanine nucleotide-binding protein G(I)/G(S)/G(O) subunit gamma-12 | 3/3                     | 43666667                     | 39814110  |
| H3BJ51                        | All-trans-retinol 13,14-reductase   | Retsat               | 548                | N.D.  | RETSAT; all-trans-retinol 13,14-reductase [EC:1.3.99.23]                  | 3/3                     | 43163333                     | 57962816  |

|            |   |                   |      |   |  |     |          |          |
|------------|---|-------------------|------|---|--|-----|----------|----------|
| D3Z7P2     | Transmembrane protein 109 (Fragment)  | Tmem109           | 73   | cellular response to gamma radiation [GO:0071480]; negative regulation of cell death [GO:0060548]   | N.D.   | 3/3 | 41633333 | 20826025 |
| A0A1W2P7Z1 | GDP-fucose protein O-fucosyltransferase 2 (Fragment)  | Pofut2            | 209  | transferase activity, transferring glycosyl groups [GO:0016757]; fucose metabolic process [GO:0006004]  | POFUT; peptide-O-fucosyltransferase [EC:2.4.1.221]                                   | 3/3 | 38323333 | 38009494 |
| Q3UE92     | X-prolyl aminopeptidase (Aminopeptidase P) 1, soluble, isoform CRA_b (Xaa-Pro aminopeptidase 1)             | Xpnpep1 mCG_20868 | 666  | cytosol [GO:0005829]; manganese ion binding [GO:0030145]; metalloaminopeptidase activity [GO:0070006]; protein homodimerization activity [GO:0042803]; bradykinin catabolic process [GO:0010815]  | pepP; Xaa-Pro aminopeptidase [EC:3.4.11.9]   | 3/3 | 36990000 | 32891006 |
| S4R1I3     | Xaa-Pro aminopeptidase 1  | Xpnpep1           | 635  | metal ion binding [GO:0046872]; metalloaminopeptidase activity [GO:0070006]   | pepP; Xaa-Pro aminopeptidase [EC:3.4.11.9]   | 3/3 | 26956667 | 20428182 |
| Q8C4C9     | DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily B, member 12, isoform CRA_d (DnaJ homolog subfamily B member 12)            | Dnajb12 mCG_11302 | 378  | integral component of membrane [GO:0016021]   | DNAJB12; DnaJ homolog subfamily B member 12  | 3/3 | 25463333 | 17119989 |
| F7C5U2     | Scavenger receptor class B member 1 (Fragment)  | Scarb1            | 176  | integral component of membrane [GO:0016021]   | SCARB1; scavenger receptor class B, member 1   | 3/3 | 23300000 | 2088061  |
| A0A087WRC0 | Tripeptidyl-peptidase 2   | Tpp2              | 883  | serine-type endopeptidase activity [GO:0004252]; tripeptidyl-peptidase activity [GO:0008240]  | TPP2; tripeptidyl-peptidase II [EC:3.4.14.10]  | 3/3 | 21460000 | 10115671 |
| A0A1Y7VNC1 | Glutathione transferase zeta 1 (Maleylacetoacetate isomerase), isoform CRA_b (Maleylacetoacetate isomerase) | Gstz1 mCG_17472   | 161  | cytoplasm [GO:0005737]; isomerase activity [GO:0016853]; transferase activity [GO:0016740]; aromatic amino acid family metabolic process [GO:0009072]   | maIA; maleylacetoacetate isomerase [EC:5.2.1.2]                                      | 3/3 | 21166667 | 7136059  |
| A2AGJ9     | Solute carrier family 12 member 6   | Slc12a6           | 946  | integral component of plasma membrane [GO:0005887]; potassium:chloride symporter activity [GO:0015379]; cellular hypotonic salinity response [GO:0071477]   | SLC12A4_5_6; solute carrier family 12 (potassium/chloride transporter), member 4/5/6 | 3/3 | 20276667 | 12837626 |
| Q3TET3     | Annexin   | Anxa3             | 180  | calcium ion binding [GO:0005509]; calcium-dependent phospholipid binding [GO:0005544]; phospholipase inhibitor activity [GO:0004859]  | ANXA3; annexin A3  | 3/3 | 19840000 | 11689431 |
| Q3TQP6     | Malic enzyme  | Me1 Mod1          | 552  | malate dehydrogenase (decarboxylating) (NAD+) activity [GO:0004471]; metal ion binding [GO:0046872]; NAD binding [GO:0051287]   | E1.1.1.40; malate dehydrogenase (oxaloacetate-decarboxylating)(NADP+) [EC:1.1.1.40]  | 3/3 | 19800000 | 11316802 |
| F6SMJ7     | GTP-binding protein 8 (Fragment)  | Gtpbp8            | 147  | GTP binding [GO:0005525]  |  | 3/3 | 19320000 | 13820174 |
| A0A1Y7VNM3 | Cathepsin L1 (Fragment)   | Ctsl              | 205  | cysteine-type peptidase activity [GO:0008234]   | CTSL; cathepsin L [EC:3.4.22.15]   | 3/3 | 18066667 | 8209953  |
| A0A0A6YW53 | Mitogen-activated protein kinase kinase kinase kinase 4   | Map4k4            | 1288 | cytoplasm [GO:0005737]; focal adhesion [GO:0005925]; ATP binding [GO:0005524]; creatine kinase activity [GO:0004111]; microtubule binding [GO:0008017]; protein serine/threonine kinase activity [GO:0004674]; intracellular signal transduction [GO:0035556]; negative regulation of apoptotic process [GO:0043066]; negative regulation of insulin secretion involved in cellular response to glucose stimulus [GO:0061179]; negative regulation of neuron projection regeneration [GO:0070571]; positive regulation of cell migration [GO:0030335]; regulation of JNK cascade [GO:0046328] | N.D.   | 3/3 | 17953333 | 11949332 |
| A0A0A6YWM8 | Mitogen-activated protein kinase kinase kinase kinase 4   | Map4k4            | 1272 | ATP binding [GO:0005524]; protein kinase activity [GO:0004672]  | MAP4K4; mitogen-activated protein kinase kinase kinase kinase 4 [EC:2.7.11.1]        | 3/3 | 17953333 | 11949332 |
| A0A0A6YWR8 | Mitogen-activated protein kinase kinase kinase kinase 4   | Map4k4            | 1234 | ATP binding [GO:0005524]; protein kinase activity [GO:0004672]  | MAP4K4; mitogen-activated protein kinase kinase kinase kinase 4 [EC:2.7.11.1]        | 3/3 | 17953333 | 11949332 |
| B2RUE8     | Map4k4 protein (Mitogen-activated protein kinase kinase kinase kinase 4)                                    | Map4k4            | 1221 | ATP binding [GO:0005524]; protein kinase activity [GO:0004672]  | MAP4K4; mitogen-activated protein kinase kinase kinase kinase 4 [EC:2.7.11.1]        | 3/3 | 17953333 | 11949332 |
| B7ZNR9     | Map4k4 protein (Mitogen-activated protein kinase kinase kinase kinase 4)                                    | Map4k4            | 1208 | ATP binding [GO:0005524]; protein kinase activity [GO:0004672]  | MAP4K4; mitogen-activated protein kinase kinase kinase                               | 3/3 | 17953333 | 11949332 |

|            |  |  |      |   |  |     |                        |           |  |  |
|------------|--|--|------|---|--|-----|------------------------|-----------|--|--|
|            |  |  |      |   |  |     | kinase 4 [EC:2.7.11.1] |           |  |  |
| E9PVG7     | Mitogen-activated protein kinase kinase kinase kinase 4                                      | Map4k4                                       | 1288 | ATP binding [GO:0005524]; protein kinase activity [GO:0004672]  | N.D.   | 3/3 | 17953333               | 11949332  |  |  |
| F8VPL5     | Mitogen-activated protein kinase kinase kinase kinase 4                                      | Map4k4                                       | 1238 | ATP binding [GO:0005524]; protein kinase activity [GO:0004672]  | MAP4K4; mitogen-activated protein kinase kinase kinase 4 [EC:2.7.11.1] | 3/3 | 17953333               | 11949332  |  |  |
| Q3TU25     | Probable ATP-dependent RNA helicase DDX17  | Ddx17  | 418  | ATP binding [GO:0005524]; helicase activity [GO:0004386]; nucleic acid binding [GO:0003676]   | DDX17; ATP-dependent RNA helicase DDX17 [EC:3.6.4.13]                  | 3/3 | 14303333               | 9064879   |  |  |
| B2KF50     | UHRF1 (ICBP90)-binding protein 1   | Uhrf1bp1                                     | 1429 | histone deacetylase binding [GO:0042826]; identical protein binding [GO:0042802]  |  | 3/3 | 13286667               | 4377046   |  |  |
| Q8CA44     | Distal membrane-arm assembly complex protein 2 (RIKEN cDNA 2310004L02, isoform CRA_a)        | Dmac2<br>2310004L02Rik<br>Atp5sl<br>mCG_7653 | 257  | N.D.  | N.D.   | 3/3 | 11536667               | 13423086  |  |  |
| D3Z1V4     | Phosphatidylethanolamine-binding protein 1   | Pebp1  | 209  | N.D.  | N.D.   | 3/3 | 8366667                | 4047892   |  |  |
| A0A0R4J190 | ADP-ribosyl cyclase/cyclic ADP-ribose hydrolase 2  | Bst1   | 311  | extrinsic component of membrane [GO:0019898]; integrin complex [GO:0008305]; uropod [GO:0001931]; ADP-ribosyl cyclase activity [GO:0061811]; cyclic ADP-ribose hydrolase [GO:0061812]; NAD+ nucleosidase activity [GO:0003953]; positive regulation of cell population proliferation [GO:0008284]; regulation of actin cytoskeleton organization [GO:0032956]; regulation of calcium-mediated signaling [GO:0050848]; regulation of cell-matrix adhesion [GO:0001952]; regulation of inflammatory response [GO:0050727]; regulation of neutrophil chemotaxis [GO:0090022]; regulation of peptidyl-tyrosine phosphorylation [GO:0050730] | BST1; ADP-ribosyl cyclase 2 [EC:3.2.2.6 2.4.99.20]                     | 3/3 | 3973333                | 723901    |  |  |
| D3YUN2     | Suppressor of tumorigenicity 7 protein   | St7  | 503  | integral component of membrane [GO:0016021]   | N.D.   | 3/3 | 3826667                | 900074    |  |  |
| A0A2I3BQS7 | Epimerase family protein SDR39U1 (Fragment)  | Sdr39u1                                      | 139  | N.D.  | uncharacterized protein  | 3/3 | 3030000                | 1833385   |  |  |
| Z4YK11     | SH3 domain-containing protein 21   | Sh3d21                                       | 665  | N.D.  | N.D.   | 2/3 | 323500000              | 399515314 |  |  |
| F6XQM2     | Pleckstrin homology domain-containing family O member 1 (Fragment)                           | Plekho1                                      | 365  | N.D.  | N.D.   | 2/3 | 109100000              | 267286363 |  |  |
| E9Q2A6     | Protein-tyrosine kinase 2-beta   | Ptk2b  | 967  | cytoskeleton [GO:0005856]; extrinsic component of cytoplasmic side of plasma membrane [GO:0031234]; focal adhesion [GO:0005925]; ATP binding [GO:0005524]; non-membrane spanning protein tyrosine kinase activity [GO:0004715]; regulation of actin cytoskeleton reorganization [GO:2000249]; regulation of angiogenesis [GO:0045765]; regulation of bone mineralization [GO:0030500]; regulation of cell adhesion [GO:0030155]; regulation of cell population proliferation [GO:0042127]; regulation of leukocyte chemotaxis [GO:0002688]; signal complex assembly [GO:0007172]; signal transduction [GO:0007165]                      | PTK2B; focal adhesion kinase 2 [EC:2.7.10.2]                           | 2/3 | 189250000              | 251376461 |  |  |
| Q3UDE9     | Protein-tyrosine kinase 2-beta   | Ptk2b  | 1005 | cytoskeleton [GO:0005856]; extrinsic component of cytoplasmic side of plasma membrane [GO:0031234]; focal adhesion [GO:0005925]; ATP binding [GO:0005524]; non-membrane spanning protein tyrosine kinase activity [GO:0004715]; regulation of actin cytoskeleton reorganization [GO:2000249]; regulation of angiogenesis [GO:0045765]; regulation of bone mineralization [GO:0030500]; regulation of cell adhesion [GO:0030155]; regulation of cell population proliferation [GO:0042127]; regulation of leukocyte chemotaxis [GO:0002688]; signal complex assembly [GO:0007172]; signal transduction [GO:0007165]                      | PTK2B; focal adhesion kinase 2 [EC:2.7.10.2]                           | 2/3 | 189250000              | 251376461 |  |  |
| F6WA09     | 14-3-3 protein epsilon (Fragment)  | Ywhae  | 154  | protein domain specific binding [GO:0019904]  | YWHAE; 14-3-3 protein epsilon  | 2/3 | 176000000              | 49497475  |  |  |
| A0A0R4J1N9 | Transcription factor A, mitochondrial (Transcription factor A, mitochondrial, isoform CRA_c) | Tfam mCG_17822                               | 199  | nucleus [GO:0005634]; DNA binding [GO:0003677]  | TFAM; transcription factor A, mitochondrial                            | 2/3 | 130500000              | 144956890 |  |  |
| A0A1Y7VIZ6 | Mitochondrial import inner membrane translocase subunit Tim9                                 | Timm9  | 61   | mitochondrion [GO:0005739]; metal ion binding [GO:0046872]; protein transport [GO:0015031]  | TIM9; mitochondrial import inner membrane translocase subunit TIM9     | 2/3 | 130000000              | 32526912  |  |  |
| A0A1Y7VL11 | Mitochondrial import inner membrane translocase subunit Tim9                                 | Timm9  | 46   | mitochondrion [GO:0005739]; metal ion binding [GO:0046872]; protein transport [GO:0015031]  | TIM9; mitochondrial import inner membrane translocase subunit TIM9     | 2/3 | 130000000              | 32526912  |  |  |
| E9QAY6     | MICOS complex subunit MIC60 (Mitofilin)  | Immt   | 470  | integral component of membrane [GO:0016021]; mitochondrial inner membrane [GO:0005743]  | IMMT; mitofilin  | 2/3 | 115000000              | 18384776  |  |  |
| A2A6J4     | Lymphocyte-specific protein 1  | Lsp1   | 322  | actin binding [GO:0003779]; signal transduction [GO:0007165]  | LSP1; lymphocyte-specific protein 1                                    | 2/3 | 105535000              | 146321606 |  |  |
| A0A1L1SUU4 | Secretory carrier-associated membrane protein (Secretory                                     | Scamp2                                       | 200  | integral component of membrane [GO:0016021]; protein transport [GO:0015031]   | SCAMP; secretory carrier-associated                                    | 2/3 | 105000000              | 2828427   |  |  |

| carrier membrane protein (Fragment) |   |                   |      | membrane protein  |   |     |          |          |
|-------------------------------------|---|-------------------|------|---|---|-----|----------|----------|
| H3BKY1                              | Glycosylated lysosomal membrane protein   | Glmp0610031J06Rik | 319  | integral component of membrane [GO:0016021]   | N.D.  | 2/3 | 98850000 | 8697413  |
| E9Q8P6                              | Protein unc-93 homolog B1   | Unc93b1           | 422  | integral component of membrane [GO:0016021]   | N.D.  | 2/3 | 96200000 | 53457273 |
| A0A1D5RLH3                          | Very-long-chain enoyl-CoA reductase (Fragment)  | Tecr              | 92   | integral component of membrane [GO:0016021]   | TER; very-long-chain enoyl-CoA reductase [EC:1.3.1.93]                                      | 2/3 | 82500000 | 6646804  |
| A0A0R4J1Y6                          | A-kinase anchor protein SPHKAP (Fragment)   | Sphkap            | 1400 | N.D.  | N.D.  | 2/3 | 81800000 | 61094026 |
| A0A0G2JE25                          | GTPase NRas (Fragment)  | Nras              | 150  | membrane [GO:0016020]; GTP binding [GO:0005525]; GTPase activity [GO:0003924]; signal transduction [GO:0007165]   | NRAS; GTPase NRas   | 2/3 | 76100000 | 45113413 |
| Q91VK2                              | Eef1d protein (Elongation factor 1-delta) (MCG22130, isoform CRA_b)   | Eef1d mCG_22130   | 276  | eukaryotic translation elongation factor 1 complex [GO:0005853]; translation elongation factor activity [GO:0003746]  | EEF1D; elongation factor 1-delta  | 2/3 | 76050000 | 74882608 |
| F6ZSB7                              | D-3-phosphoglycerate dehydrogenase (Fragment)   | Phgdh             | 149  | NAD binding [GO:0051287]; oxidoreductase activity, acting on the CH-OH group of donors, NAD or NADP as acceptor [GO:0016616]  | serA; D-3-phosphoglycerate dehydrogenase / 2-oxoglutarate reductase [EC:1.1.1.95 1.1.1.399] | 2/3 | 68650000 | 49992449 |
| A2AD32                              | Protein 4.1 (Fragment)  | Epb41 Epb4.1      | 715  | cytoskeleton [GO:0005856]; cytoskeletal protein binding [GO:0008092]; cortical actin cytoskeleton organization [GO:0030866]   | EPB41; erythrocyte membrane protein band 4.1  | 2/3 | 67600000 | 81175858 |
| E9Q133                              | T-complex protein 1 subunit gamma   | Cct3              | 507  | cytoplasm [GO:0005737]; ATP binding [GO:0005524]; unfolded protein binding [GO:0051082]; protein folding [GO:0006457]   | CCT3; T-complex protein 1 subunit gamma   | 2/3 | 65550000 | 52962298 |
| A0A140LIT2                          | 7-dehydrocholesterol reductase  | Dhcr7             | 474  | integral component of membrane [GO:0016021]; oxidoreductase activity, acting on the CH-CH group of donors, NAD or NADP as acceptor [GO:0016628]   | DHCR7; 7-dehydrocholesterol reductase [EC:1.3.1.21]   | 2/3 | 62100000 | 9050967  |
| A2A6G4                              | LIM and SH3 domain protein 1 (Fragment)   | Lasp1             | 47   | N.D.  | N.D.  | 2/3 | 61950000 | 52538034 |
| A2A6G5                              | LIM and SH3 domain protein 1 (Fragment)   | Lasp1             | 69   | N.D.  | N.D.  | 2/3 | 61950000 | 52538034 |
| A2A6G6                              | LIM and SH3 domain protein 1 (Fragment)   | Lasp1             | 89   | N.D.  | N.D.  | 2/3 | 61950000 | 52538034 |
| A2A6G7                              | LIM and SH3 domain protein 1 (Fragment)   | Lasp1             | 99   | N.D.  | N.D.  | 2/3 | 61950000 | 52538034 |
| A2A6G8                              | LIM and SH3 domain protein 1 (Fragment)   | Lasp1             | 103  | N.D.  | N.D.  | 2/3 | 61950000 | 52538034 |
| E9Q0N6                              | LIM and SH3 domain protein 1 (Fragment)   | Lasp1             | 70   | N.D.  | N.D.  | 2/3 | 61950000 | 52538034 |
| D3Z4J2                              | Katanin p60 ATPase-containing subunit A-like 2 (Katanin p60 subunit A-like 2) (EC 5.6.1.1) (p60 katanin-like 2) | Katnal2 KATNAL2   | 495  | cytoplasm [GO:0005737]; microtubule [GO:0005874]; spindle pole [GO:0000922]; ATP binding [GO:0005524]; isomerase activity [GO:0016853]; microtubule binding [GO:0008017]; microtubule severing [GO:0051013] | KATNA1; katanin p60 ATPase-containing subunit A1 [EC:5.6.1.1]                               | 2/3 | 55900000 | 2687006  |
| D6RGM7                              | Katanin p60 ATPase-containing subunit A-like 2  | Katnal2           | 372  | ATP binding [GO:0005524]  | KATNA1; katanin p60 ATPase-containing subunit A1 [EC:5.6.1.1]                               | 2/3 | 55900000 | 2687006  |
| D3Z1B4                              | Acid sphingomyelinase-like phosphodiesterase 3a (Fragment)  | Smpdl3a           | 104  | N.D.  | SMPDL3; sphingomyelin phosphodiesterase acid-like 3 [EC:3.1.4.-]                            | 2/3 | 55200000 | 55012908 |
| D3YX08                              | Transmembrane protein 109   | Tmem109           | 115  | integral component of membrane [GO:0016021]; cellular response to gamma radiation [GO:0071480]; negative regulation of cell death [GO:0060548]  | N.D.  | 2/3 | 53450000 | 5444722  |
| D3Z0I8                              | Transmembrane protein 109 (Fragment)  | Tmem109           | 213  | integral component of membrane [GO:0016021]; cellular response to gamma radiation [GO:0071480]; negative regulation of cell death [GO:0060548]  | N.D.  | 2/3 | 53450000 | 5444722  |
| D3Z3Z2                              | Transmembrane protein 109 (Fragment)  | Tmem109           | 93   | cellular response to gamma radiation [GO:0071480]; negative regulation of cell death [GO:0060548]   | N.D.  | 2/3 | 53450000 | 5444722  |
| A0A286YCZO                          | Retinal dehydrogenase 1 (Fragment)  | Aldh1a1           | 138  | oxidoreductase activity [GO:0016491]  | ALDH1A1; retinal dehydrogenase [EC:1.2.1.36]  | 2/3 | 52100000 | 30264170 |
| A0A286YD6                           | Retinal dehydrogenase 1 (Fragment)  | Aldh1a1           | 128  | oxidoreductase activity [GO:0016491]  | ALDH1A1; retinal dehydrogenase [EC:1.2.1.36]  | 2/3 | 52100000 | 30264170 |
| D6RJA9                              | Radical S-adenosyl methionine domain-containing protein 2   | Rsad2             | 187  | catalytic activity [GO:0003824]; iron-sulfur cluster binding [GO:0051536]   | RSAD2; radical S-adenosyl methionine domain-containing protein 2                            | 2/3 | 49690000 | 62946646 |
| A2A5L7                              | Tumor necrosis factor receptor superfamily member 5 (Fragment)  | Cd40              | 121  | N.D.  | TNFRSF5; tumor necrosis factor receptor superfamily member 5                                | 2/3 | 49000000 | 12162237 |
| Q05A75                              | H-2 class I histocompatibility antigen, TLA(B) alpha chain (Histocompatibility 2, T region locus 3) (MCG132399) | H2-T3 mCG_132399  | 384  | integral component of membrane [GO:0016021]   | MHC1; major histocompatibility complex, class I   | 2/3 | 48250000 | 2757716  |
| Q9DCE9                              | Interferon gamma-induced GTPase   | Igtp              | 423  | cytosol [GO:0005829]; endoplasmic reticulum membrane [GO:0005789]; GTP binding [GO:0005525]; GTPase activity [GO:0003924]; cellular response to interferon-beta   | IRGM; immunity-related GTPase family M protein [EC:3.6.5.-]                                 | 2/3 | 47120000 | 63611326 |

|            |   |                 |      |   |  |     |   |          |  |
|------------|---|-----------------|------|---|--|-----|---|----------|--|
|            |   |                 |      |   |  |     | [GO:0035458]; defense response [GO:0006952] |          |  |
| Q6A099     | Golgi-specific brefeldin A-resistance factor 1 (MKIAA0248 protein) (Fragment) | Gbf1 mKIAA0248  | 1803 | cell leading edge [GO:0031252]; cis-Golgi network [GO:0005801]; cytosol [GO:0005829]; endoplasmic reticulum lumen [GO:0005788]; endoplasmic reticulum-Golgi intermediate compartment [GO:0005793]; Golgi apparatus [GO:0005794]; Golgi membrane [GO:0000139]; Golgi stack [GO:0005795]; mitochondrion [GO:0005739]; peroxisome [GO:0005777]; trans-Golgi network [GO:0005802]; ARF guanyl-nucleotide exchange factor activity [GO:0005086]; phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate binding [GO:0005547]; phosphatidylinositol-3,5-bisphosphate binding [GO:0080025]; cell activation involved in immune response [GO:0002263]; cellular response to virus [GO:0098586]; COPI coating of Golgi vesicle [GO:0048205]; endoplasmic reticulum-Golgi intermediate compartment organization [GO:0097111]; establishment of monopolar cell polarity [GO:0061162]; Golgi disassembly [GO:0090166]; Golgi organization [GO:0007030]; Golgi to endosome transport [GO:0006895]; neutrophil chemotaxis [GO:0030593]; protein localization to endoplasmic reticulum exit site [GO:0070973]; protein localization to endoplasmic reticulum tubular network [GO:1903420]; protein localization to Golgi apparatus [GO:0034067]; reactive oxygen species biosynthetic process [GO:1903409]; regulation of ARF protein signal transduction [GO:0032012]; regulation of mitotic cell cycle [GO:0007346]; regulation of protein localization to cell surface [GO:2000008]; retrograde transport, endosome to Golgi [GO:0042147]; retrograde vesicle-mediated transport, Golgi to endoplasmic reticulum [GO:0006890] | GBF1; golgi-specific brefeldin A-resistance guanine nucleotide exchange factor 1 | 2/3 | 46350000                                    | 353553   |  |
| Q6DFZ1     | Golgi-specific brefeldin A-resistance factor 1                                | Gbf1            | 1861 | cell leading edge [GO:0031252]; cis-Golgi network [GO:0005801]; cytosol [GO:0005829]; endoplasmic reticulum lumen [GO:0005788]; endoplasmic reticulum-Golgi intermediate compartment [GO:0005793]; Golgi apparatus [GO:0005794]; Golgi membrane [GO:0000139]; Golgi stack [GO:0005795]; mitochondrion [GO:0005739]; peroxisome [GO:0005777]; trans-Golgi network [GO:0005802]; ARF guanyl-nucleotide exchange factor activity [GO:0005086]; phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate binding [GO:0005547]; phosphatidylinositol-3,5-bisphosphate binding [GO:0080025]; cell activation involved in immune response [GO:0002263]; cellular response to virus [GO:0098586]; COPI coating of Golgi vesicle [GO:0048205]; endoplasmic reticulum-Golgi intermediate compartment organization [GO:0097111]; establishment of monopolar cell polarity [GO:0061162]; Golgi disassembly [GO:0090166]; Golgi organization [GO:0007030]; Golgi to endosome transport [GO:0006895]; neutrophil chemotaxis [GO:0030593]; protein localization to endoplasmic reticulum exit site [GO:0070973]; protein localization to endoplasmic reticulum tubular network [GO:1903420]; protein localization to Golgi apparatus [GO:0034067]; reactive oxygen species biosynthetic process [GO:1903409]; regulation of ARF protein signal transduction [GO:0032012]; regulation of mitotic cell cycle [GO:0007346]; regulation of protein localization to cell surface [GO:2000008]; retrograde transport, endosome to Golgi [GO:0042147]; retrograde vesicle-mediated transport, Golgi to endoplasmic reticulum [GO:0006890] | GBF1; golgi-specific brefeldin A-resistance guanine nucleotide exchange factor 1 | 2/3 | 46350000                                    | 353553   |  |
| A0A0G2JDW7 | 40S ribosomal protein S27 (Fragment)  | Rps27           | 82   | ribosome [GO:0005840]; metal ion binding [GO:0046872]; structural constituent of ribosome [GO:0003735]; translation [GO:0006412]  | RP-S27e; small subunit ribosomal protein S27e                                    | 2/3 | 43500000                                    | 1979899  |  |
| A0A0G2JEX7 | 40S ribosomal protein S27   | Rps27 mCG_22228 | 52   | ribosome [GO:0005840]; metal ion binding [GO:0046872]; structural constituent of ribosome [GO:0003735]; translation [GO:0006412]  | RP-S27e; small subunit ribosomal protein S27e                                    | 2/3 | 43500000                                    | 1979899  |  |
| Q9D9Q3     | RIKEN cDNA 1700034123 gene  | 1700034123Rik   | 184  | integral component of mitochondrial outer membrane [GO:0031307]; mitochondrion [GO:0005739]; autophagy of mitochondrion [GO:0000422]  | N.D.   | 2/3 | 41800000                                    | 2687006  |  |
| A0A140T8J8 | Nuclear pore complex protein Nup98-Nup96                                      | Nup98           | 1187 | nuclear pore [GO:0005643]; structural constituent of nuclear pore [GO:0017056]  | NUP98; nuclear pore complex protein Nup98-Nup96                                  | 2/3 | 40950000                                    | 32880465 |  |
| A0A1B0GRA7 | Nuclear pore complex protein Nup98-Nup96                                      | Nup98           | 984  | nuclear pore [GO:0005643]; structural constituent of nuclear pore [GO:0017056]  | NUP98; nuclear pore complex protein Nup98-Nup96                                  | 2/3 | 40950000                                    | 32880465 |  |
| A0A1B0GRB5 | Nuclear pore complex protein Nup98-Nup96                                      | Nup98           | 967  | nuclear pore [GO:0005643]; structural constituent of nuclear pore [GO:0017056]  | NUP98; nuclear pore complex protein Nup98-Nup96                                  | 2/3 | 40950000                                    | 32880465 |  |
| B2RQL0     | Nuclear pore complex protein Nup98-Nup96 (Nup98 protein)                      | Nup98           | 1170 | nuclear pore [GO:0005643]; structural constituent of nuclear pore [GO:0017056]  | NUP98; nuclear pore complex protein Nup98-Nup96                                  | 2/3 | 40950000                                    | 32880465 |  |
| E9QAS4     | Chromodomain-helicase-DNA-binding protein 4                                   | Chd4            | 1902 | nucleus [GO:0005634]; ATP binding [GO:0005524]; metal ion binding [GO:0046872]  | CHD4; chromodomain-helicase-DNA-binding protein 4 [EC:3.6.4.12]                  | 2/3 | 40750000                                    | 52962298 |  |
| E9QAS5     | Chromodomain-helicase-DNA-binding protein 4                                   | Chd4            | 1922 | nucleus [GO:0005634]; ATP binding [GO:0005524]; metal ion binding [GO:0046872]  | CHD4; chromodomain-helicase-DNA-binding protein 4 [EC:3.6.4.12]                  | 2/3 | 40750000                                    | 52962298 |  |
| D3YV25     | ADP-ribosylation factor 3 (Fragment)  | Arf3            | 49   | GTP binding [GO:0005525]  | ARF3; ADP-ribosylation factor 3  | 2/3 | 40500000                                    | 17819091 |  |
| E9Q2C2     | ADP-ribosylation factor 4   | Arf4            | 64   | integral component of membrane [GO:0016021]; GTP binding [GO:0005525]   | ARF4; ADP-ribosylation factor 4  | 2/3 | 40500000                                    | 17819091 |  |
| E9Q6W2     | Cytochrome c oxidase assembly factor 3 homolog, mitochondrial                 | Coa3 Ccdc56     | 90   | N.D.  | CCDC56; cytochrome c oxidase assembly factor 3, animal type                      | 2/3 | 40370000                                    | 43741625 |  |
| D3YUG4     | Acyl-protein thioesterase 1 (Fragment)  | Lypla1          | 142  | hydrolase activity [GO:0016787]   | LYPLA1; lysophospholipase I [EC:3.1.1.5]   | 2/3 | 39500000                                    | 13576450 |  |
| A2AL49     | Alkylglycerone-phosphate synthase (Alkyl-DHAP synthase) (EC 2.5.1.26)         | Agps            | 508  | peroxisome [GO:0005777]; alkylglycerone-phosphate synthase activity [GO:0008609]; FAD binding [GO:0071949]; oxidoreductase activity [GO:0016491]; ether lipid biosynthetic process [GO:0008611]   | AGPS; alkylidihydroxyacetonephosphate synthase [EC:2.5.1.26]                     | 2/3 | 39400000                                    | 17394827 |  |

|            |   |                 |      |  |  |     |          |          |
|------------|---|-----------------|------|--|--|-----|----------|----------|
| H3BKN2     | Alkylglycerone-phosphate synthase (Alkyl-DHAP synthase) (EC 2.5.1.26) | Agps            | 568  | peroxisome [GO:0005777]; alkylglycerone-phosphate synthase activity [GO:0008609]; FAD binding [GO:0071949]; oxidoreductase activity [GO:0016491]; ether lipid biosynthetic process [GO:0008611]  | AGPS; alkylidihydroxyacetonephosphate synthase [EC:2.5.1.26]                         | 2/3 | 39400000 | 17394827 |
| A0A1D5RLV1 | Protein 4.1 (Fragment)  | Epb41           | 476  | cytoskeleton [GO:0005856]; integral component of membrane [GO:0016021]; cytoskeletal protein binding [GO:0008092]; cortical actin cytoskeleton organization [GO:0030866]   | EPB41; erythrocyte membrane protein band 4.1   | 2/3 | 39300000 | 23900209 |
| A0A087WSL8 | Nucleolar protein 58 (Fragment)                                       | Nop58           | 191  | N.D.   | NOP58; nucleolar protein 58  | 2/3 | 38980000 | 51222815 |
| A0A1B0GSZ9 | 39S ribosomal protein L23, mitochondrial                              | Mrpl23          | 172  | ribosome [GO:0005840]; structural constituent of ribosome [GO:0003735]; translation [GO:0006412]   | RP-L23; large subunit ribosomal protein L23  | 2/3 | 38000000 | 10606602 |
| A0A0A0MQ80 | ATPase family protein 2 homolog                                       | Spata5          | 892  | ATP binding [GO:0005524]   | AFG2; AAA family ATPase  | 2/3 | 36950000 | 29486353 |
| A0A0G2JFY0 | ATPase family protein 2 homolog                                       | Spata5          | 842  | ATP binding [GO:0005524]   | AFG2; AAA family ATPase  | 2/3 | 36950000 | 29486353 |
| D3Z0U5     | Katanin p60 ATPase-containing subunit A-like 2                        | Katnal2         | 277  | ATP binding [GO:0005524]   | KATNA1; katanin p60 ATPase-containing subunit A1 [EC:5.6.1.1]                        | 2/3 | 36950000 | 29486353 |
| A0A338P786 | Ubiquitin-conjugating enzyme E2 L3 (Fragment)                         | Ube2l3          | 146  | ATP binding [GO:0005524]; transferase activity [GO:0016740]  | UBE2L3; ubiquitin-conjugating enzyme E2 L3 [EC:2.3.2.23]                             | 2/3 | 35835000 | 47468078 |
| A0A140LIM8 | Serine--tRNA ligase, mitochondrial                                    | Sars2           | 154  | ATP binding [GO:0005524]; serine-tRNA ligase activity [GO:0004828]; seryl-tRNA aminoacylation [GO:0006434]   | SARS; seryl-tRNA synthetase [EC:6.1.1.11]  | 2/3 | 33550000 | 2616295  |
| B7ZCF4     | Lysosomal acid phosphatase (Fragment)                                 | Acp2            | 166  | N.D.   | ACP2; lysosomal acid phosphatase [EC:3.1.3.2]  | 2/3 | 33000000 | 3394113  |
| E9QLA5     | Inverted formin-2   | Inf2            | 1271 | perinuclear region of cytoplasm [GO:0048471]; actin binding [GO:0003779]; Rho GTPase binding [GO:0017048]; actin cytoskeleton organization [GO:0030036]; regulation of mitochondrial fission [GO:090140]   | N.D.   | 2/3 | 30400000 | 24465895 |
| Q6P6P5     | Predicted gene 21985 (Slc12a6 protein)                                | Gm21985 Slc12a6 | 1106 | integral component of plasma membrane [GO:0005887]; potassium:chloride symporter activity [GO:0015379]; cell volume homeostasis [GO:0006884]; cellular hypotonic salinity response [GO:0071477]; chemical synaptic transmission [GO:0007268]; chloride ion homeostasis [GO:0055064]; chloride transmembrane transport [GO:1902476]; potassium ion homeostasis [GO:0055075]; potassium ion import across plasma membrane [GO:1990573]   | SLC12A4_5_6; solute carrier family 12 (potassium/chloride transporter), member 4/5/6 | 2/3 | 30300000 | 10465180 |
| Q1MX40     | Protein kinase C (EC 2.7.11.13)                                       | Prkcd           | 571  | ATP binding [GO:0005524]; metal ion binding [GO:0046872]; protein kinase C activity [GO:0004697]; intracellular signal transduction [GO:0035556]   | PRKCD; novel protein kinase C delta type [EC:2.7.11.13]                              | 2/3 | 30120000 | 33629999 |
| A0A0N4SW73 | Rab11 family-interacting protein 5                                    | Rab11fip5       | 1318 | Rab GTPase binding [GO:0017137]  | RAB11FIP1_2_5; Rab11 family-interacting protein 1/2/5                                | 2/3 | 29960000 | 35270486 |
| G3UYH1     | Aldehyde dehydrogenase X, mitochondrial (Fragment)                    | Aldh1b1         | 131  | oxidoreductase activity [GO:0016491]   | ALDH; aldehyde dehydrogenase (NAD+) [EC:1.2.1.3]                                     | 2/3 | 29950000 | 4030509  |
| E9PWJ6     | NIF3-like protein 1   | Nif3l1          | 155  | N.D.   | N.D.   | 2/3 | 28650000 | 1202082  |
| Q6NZD2     | Sorting nexin-1   | Snx1            | 521  | cytosol [GO:0005829]; early endosome membrane [GO:0031901]; lysosome [GO:0005764]; retromer, tubulation complex [GO:0030905]; epidermal growth factor receptor binding [GO:0005154]; insulin receptor binding [GO:0005158]; leptin receptor binding [GO:1990460]; phosphatidylinositol binding [GO:0035091]; protein heterodimerization activity [GO:0046982]; protein homodimerization activity [GO:0042803]; transferrin receptor binding [GO:1990459]; early endosome to Golgi transport [GO:0034498]; intracellular protein transport [GO:0006886]; lamellipodium morphogenesis [GO:0072673]; positive regulation of protein catabolic process [GO:0045732]; receptor internalization [GO:0031623] | SNX1_2; sorting nexin-1/2  | 2/3 | 28600000 | 23051681 |
| Q8JZZ5     | Phosphatidylcholine transfer protein beta isoform (Pitpnb protein)    | Pitpnb          | 272  | phosphatidylcholine binding [GO:0031210]; phosphatidylcholine transporter activity [GO:0008525]; phosphatidylinositol binding [GO:0035091]; phosphatidylinositol transporter activity [GO:0008526]   | N.D.   | 2/3 | 28320000 | 26558931 |
| D3YY63     | Phosphatidylserine decarboxylase proenzyme, mitochondrial             | Pisd            | 262  | phosphatidylserine decarboxylase activity [GO:0004609]; phospholipid biosynthetic process [GO:0008654]   | psd; phosphatidylserine decarboxylase [EC:4.1.1.65]                                  | 2/3 | 27550000 | 9121677  |
| F7C386     | Phosphatidylserine decarboxylase proenzyme, mitochondrial (Fragment)  | Pisd            | 359  | phosphatidylserine decarboxylase activity [GO:0004609]; phospholipid biosynthetic process [GO:0008654]   | psd; phosphatidylserine decarboxylase [EC:4.1.1.65]                                  | 2/3 | 27550000 | 9121677  |
| A0A1W2P844 | GDP-fucose protein O-fucosyltransferase 2 (Fragment)                  | Pofut2          | 164  | transferase activity, transferring glycosyl groups [GO:0016757]; fucose metabolic process [GO:0060004]   | POFUT; peptide-O-fucosyltransferase [EC:2.4.1.221]                                   | 2/3 | 27435000 | 35447263 |
| A0A0J9YUD0 | Major facilitator superfamily domain-containing protein 10 (Fragment) | Mfsd10          | 141  | integral component of membrane [GO:0016021]  | N.D.   | 2/3 | 26650000 | 353553   |
| D3YWD5     | Major facilitator superfamily domain-containing protein 10 (Fragment) | Mfsd10          | 278  | integral component of membrane [GO:0016021]; transporter activity [GO:0005215]; transmembrane transport [GO:0055085]   | N.D.   | 2/3 | 26650000 | 353553   |
| E9QL13     | MCG8382, isoform CRA_c (RNA-binding protein 14)                       | Rbm14 mCG_8382  | 614  | RNA binding [GO:0003723]   | RBM14; RNA-binding protein 14  | 2/3 | 25750000 | 17182695 |



|            |  |                 |     |  |   |     |          |          |
|------------|--|-----------------|-----|--|---|-----|----------|----------|
| A2ANA0     | Protein transport protein SEC23 (Fragment)                                       | Sec23b          | 278 | COPII vesicle coat [GO:0030127]; cytosol [GO:0005829]; endoplasmic reticulum membrane [GO:0005789]; zinc ion binding [GO:0008270]; endoplasmic reticulum to Golgi vesicle-mediated transport [GO:0006888]; intracellular protein transport [GO:0006886]  | SEC23; protein transport protein SEC23                                  | 2/3 | 24350000 | 1343503  |
| A0A1B0GR78 | Stromal interaction molecule 1   | Stim1           | 540 | integral component of endoplasmic reticulum membrane [GO:0030176]; calcium channel regulator activity [GO:0005246]; activation of store-operated calcium channel activity [GO:0032237]   | STIM1; stromal interaction molecule 1                                   | 2/3 | 23900000 | 11172287 |
| A0A1B0GRA5 | Stromal interaction molecule 1   | Stim1           | 793 | integral component of endoplasmic reticulum membrane [GO:0030176]; calcium channel regulator activity [GO:0005246]; activation of store-operated calcium channel activity [GO:0032237]   | STIM1; stromal interaction molecule 1                                   | 2/3 | 23900000 | 11172287 |
| F6QFD1     | Phosphodiesterase (EC 3.1.4.-) (Fragment)  | Pde4d           | 754 | 3',5'-cyclic-nucleotide phosphodiesterase activity [GO:0004114]; metal ion binding [GO:0046872]; signal transduction [GO:0007165]  | PDE4; cAMP-specific phosphodiesterase 4 [EC:3.1.4.53]                   | 2/3 | 23550000 | 11808683 |
| A0A3B2W834 | Lon protease homolog, mitochondrial  | Lonp1           | 141 | N.D.   |   | 2/3 | 23350000 | 5444722  |
| D3Z359     | Serine/threonine-protein kinase 25 (Fragment)                                    | Stk25           | 234 | ATP binding [GO:0005524]; protein kinase activity [GO:0004672]   | STK24_25_MST4; serine/threonine-protein kinase 24/25/MST4 [EC:2.7.11.1] | 2/3 | 23050000 | 30052038 |
| G3UZX4     | Casein kinase II subunit beta (CK II beta)                                       | Csnk2b          | 257 | cytoplasm [GO:0005737]; PcG protein complex [GO:0031519]; plasma membrane [GO:0005886]; protein kinase CK2 complex [GO:0005956]; chromatin binding [GO:0003682]; identical protein binding [GO:0042802]; protein domain specific binding [GO:0019904]; protein kinase regulator activity [GO:0019887]; protein serine/threonine kinase activity [GO:0004674]; signaling receptor binding [GO:0005102]; transcription factor binding [GO:0008134]; adiponectin-activated signaling pathway [GO:0033211]; endothelial tube morphogenesis [GO:0061154]; negative regulation of blood vessel endothelial cell migration [GO:0043537]; peptidyl-threonine phosphorylation [GO:0018107]; positive regulation of activin receptor signaling pathway [GO:0032927]; positive regulation of pathway-restricted SMAD protein phosphorylation [GO:0010862] | CSNK2B; casein kinase II subunit beta                                   | 2/3 | 20745000 | 22280935 |
| F7B5B5     | Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein R  | Hnrnrp          | 531 | axon terminus [GO:0043679]; catalytic step 2 spliceosome [GO:0071013]; cytoplasm [GO:0005737]; dendrite [GO:0030425]; growth cone [GO:0030426]; nucleoplasm [GO:0005654]; nucleus [GO:0005634]; ribonucleoprotein complex [GO:1990904]; mRNA 3'-UTR binding [GO:0003730]; mRNA binding [GO:0003729]; RNA binding [GO:0003723]; mRNA destabilization [GO:0061157]; negative regulation of catalytic activity [GO:0043086]; positive regulation of mRNA catabolic process [GO:0061014]   | HNRNPR; heterogeneous nuclear ribonucleoprotein R                       | 2/3 | 20065000 | 26353870 |
| Q8VHM5     | Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein R  | Hnrnrp Hnrpr    | 632 | axon terminus [GO:0043679]; catalytic step 2 spliceosome [GO:0071013]; cytoplasm [GO:0005737]; dendrite [GO:0030425]; growth cone [GO:0030426]; nucleoplasm [GO:0005654]; nucleus [GO:0005634]; ribonucleoprotein complex [GO:1990904]; viral nucleocapsid [GO:0019013]; mRNA 3'-UTR binding [GO:0003730]; mRNA binding [GO:0003729]; RNA binding [GO:0003723]; circadian rhythm [GO:0007623]; mRNA destabilization [GO:0061157]; negative regulation of catalytic activity [GO:0043086]; positive regulation of mRNA catabolic process [GO:0061014]   | HNRNPR; heterogeneous nuclear ribonucleoprotein R                       | 2/3 | 20065000 | 26353870 |
| A0A0R4J2D3 | Transport and Golgi organization protein 1 homolog (Fragment)                    | Mia3            | 268 | N.D.   | N.D.  | 2/3 | 19250000 | 9545942  |
| D6RI86     | Rab GDP dissociation inhibitor alpha (Fragment)                                  | Gdi1            | 78  | GDP-dissociation inhibitor activity [GO:0005092]; small GTPase mediated signal transduction [GO:0007264]   | GDI1_2; Rab GDP dissociation inhibitor                                  | 2/3 | 19100000 | 12445079 |
| F7BC60     | Mitochondrial fission factor (Fragment)  | Mff             | 137 | integral component of membrane [GO:0016021]  | MF; mitochondrial fission factor  | 2/3 | 18750000 | 6858936  |
| A0A0N4SW34 | V-type proton ATPase subunit E 1 (Fragment)                                      | Atp6v1e1        | 87  | proton-transporting two-sector ATPase complex, catalytic domain [GO:0033178]; proton-transporting ATPase activity, rotational mechanism [GO:0046961]; ATP hydrolysis coupled proton transport [GO:0015991]   | ATPeV1E; V-type H+-transporting ATPase subunit E                        | 2/3 | 17400000 | 424264   |
| B7ZC40     | Glutaredoxin 2 (Thioltransferase), isoform CRA_a (Glutaredoxin-2, mitochondrial) | Glrx2 mCG_19762 | 170 | cell [GO:0005623]; electron transfer activity [GO:0009055]; protein disulfide oxidoreductase activity [GO:0015035]; transferase activity [GO:0016740]; cell redox homeostasis [GO:0045454]   | grxC; glutaredoxin 3  | 2/3 | 16300000 | 4808326  |
| E9Q4K2     | AFG1-like ATPase   | Afg11 Lace1     | 279 | ATP binding [GO:0005524]   | AFG1; peroxisome-assembly ATPase [EC:3.6.4.7]                           | 2/3 | 16255000 | 10670241 |
| S4R1B8     | Bridging integrator 2  | Bin2            | 478 | cytoplasm [GO:0005737]   | BIN2; bridging integrator 2   | 2/3 | 16255000 | 18306995 |
| D3YVP5     | Glutathione S-transferase Mu 7   | Gstm7           | 214 | glutathione transferase activity [GO:0004364]  | GST; glutathione S-transferase [EC:2.5.1.18]                            | 2/3 | 16230000 | 10139911 |
| D3YVP6     | Glutathione S-transferase Mu 7   | Gstm7           | 181 | glutathione transferase activity [GO:0004364]  | GST; glutathione S-transferase [EC:2.5.1.18]                            | 2/3 | 16230000 | 10139911 |
| F7BZA7     | Phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate 5-phosphatase 1 (Fragment)              | Inpp5d          | 124 | N.D.   | N.D.  | 2/3 | 16190000 | 12176379 |
| Q3U957     | Derlin   | Derl2           | 165 | endoplasmic reticulum membrane [GO:0005789]; integral component of membrane [GO:0016021]   | DERL2_3; Derlin-2/3   | 2/3 | 15950000 | 3889087  |
| A0A0A6YVZ8 | Mitogen-activated protein kinase kinase kinase kinase 4                          | Map4k4          | 404 | ATP binding [GO:0005524]; protein serine/threonine kinase activity [GO:0004674]  | MAP4K4; mitogen-activated protein                                       | 2/3 | 15580000 | 15867476 |

| (Fragment) |   |                 |      | kinase  | kinase   | kinase | kinase | 4   |          |          |
|------------|---|-----------------|------|---|--|--------|--------|-----|----------|----------|
|            |   |                 |      |   |  |        |        |     |          |          |
| B1ARC2     | Zinc transporter ZIP11 (Fragment)   | Slc39a11        | 200  | integral component of membrane [GO:0016021]; metal ion transmembrane transporter activity [GO:0046873]  | SLC39A11; solute carrier family 39 (zinc transporter), member 11 |        |        | 2/3 | 15050000 | 4737615  |
| D3Z2A5     | Medium-chain-specific acyl-CoA dehydrogenase, mitochondrial (Fragment)      | Acadm           | 144  | acyl-CoA dehydrogenase activity [GO:0003995]; flavin adenine dinucleotide binding [GO:0050660]  | ACADM; acyl-CoA dehydrogenase [EC:1.3.8.7]                       |        |        | 2/3 | 14950000 | 6434672  |
| D3Z786     | Mitochondrial pyruvate carrier (Fragment)                                   | Mpc1 Brp44l     | 78   | integral component of membrane [GO:0016021]; mitochondrial inner membrane [GO:0005743]; mitochondrial pyruvate transmembrane transport [GO:0006850]   | MPC1; mitochondrial pyruvate carrier 1                           |        |        | 2/3 | 14900000 | 1414214  |
| L7N480     | Family with sequence similarity 71, member E2                               | Fam71e2         | 754  | N.D.  | N.D.   |        |        | 2/3 | 14650000 | 4737615  |
| A0A0R4J1G9 | Metalloreductase STEAP3   | Steap3          | 488  | integral component of membrane [GO:0016021]; multivesicular body [GO:0005771]; protein secretion [GO:0009306]   | STEAP3; metalloreductase STEAP3 [EC:1.16.1.-]                    |        |        | 2/3 | 14455000 | 6569022  |
| B2RQ80     | Tnik protein (Traf2 and NCK-interacting protein kinase)                     | Tnik            | 1360 | apical plasma membrane [GO:0016324]; cytoskeleton [GO:0005856]; cytosol [GO:0005829]; glutamatergic synapse [GO:0098978]; nucleoplasm [GO:0005654]; postsynaptic density, intracellular component [GO:0099092]; presynapse [GO:0098793]; ATP binding [GO:0005524]; protein serine/threonine kinase activity [GO:0004674]; actin cytoskeleton reorganization [GO:0031632]; activation of JNK activity [GO:0007256]; microvillus assembly [GO:0030033]; protein autophosphorylation [GO:0046777]; protein localization to plasma membrane [GO:0072659]; regulation of dendrite morphogenesis [GO:0048814]   | TNIK; TRAF2 and NCK interacting kinase [EC:2.7.11.1]             |        |        | 2/3 | 14180000 | 13887577 |
| B9EKN8     | TRAF2 and NCK interacting kinase (Traf2 and NCK-interacting protein kinase) | Tnik            | 1352 | ATP binding [GO:0005524]; protein kinase activity [GO:0004672]  | TNIK; TRAF2 and NCK interacting kinase [EC:2.7.11.1]             |        |        | 2/3 | 14180000 | 13887577 |
| E0CXD6     | Traf2 and NCK-interacting protein kinase                                    | Tnik            | 1297 | ATP binding [GO:0005524]; protein kinase activity [GO:0004672]  | TNIK; TRAF2 and NCK interacting kinase [EC:2.7.11.1]             |        |        | 2/3 | 14180000 | 13887577 |
| E0CY98     | Traf2 and NCK-interacting protein kinase                                    | Tnik            | 1305 | ATP binding [GO:0005524]; protein kinase activity [GO:0004672]  | TNIK; TRAF2 and NCK interacting kinase [EC:2.7.11.1]             |        |        | 2/3 | 14180000 | 13887577 |
| E0CZD7     | Traf2 and NCK-interacting protein kinase                                    | Tnik            | 1276 | ATP binding [GO:0005524]; protein kinase activity [GO:0004672]  | TNIK; TRAF2 and NCK interacting kinase [EC:2.7.11.1]             |        |        | 2/3 | 14180000 | 13887577 |
| E0CZF8     | Traf2 and NCK-interacting protein kinase                                    | Tnik            | 1268 | ATP binding [GO:0005524]; protein kinase activity [GO:0004672]  | TNIK; TRAF2 and NCK interacting kinase [EC:2.7.11.1]             |        |        | 2/3 | 14180000 | 13887577 |
| E9PUL9     | Traf2 and NCK-interacting protein kinase                                    | Tnik            | 1331 | ATP binding [GO:0005524]; protein kinase activity [GO:0004672]  | TNIK; TRAF2 and NCK interacting kinase [EC:2.7.11.1]             |        |        | 2/3 | 14180000 | 13887577 |
| A0A3B2WBM3 | Elongin-B   | Elob            | 90   | elongin complex [GO:0070449]; VCB complex [GO:0030891]; transcription elongation from RNA polymerase II promoter [GO:0006368]   | ELOB; elongin-B  |        |        | 2/3 | 13950000 | 636396   |
| D3Z4X1     | 6-phosphogluconolactonase (6PGL) (EC 3.1.1.31)                              | Pgls mCG_10369  | 174  | 6-phosphogluconolactonase activity [GO:0017057]; carbohydrate metabolic process [GO:0005975]; pentose-phosphate shunt [GO:0006098]  | PGLS; 6-phosphogluconolactonase [EC:3.1.1.31]                    |        |        | 2/3 | 13875000 | 11773328 |
| E9PWC5     | MAGUK p55 subfamily member 6 (Fragment)                                     | Mpp6            | 315  | N.D.  | N.D.   |        |        | 2/3 | 13840000 | 8570134  |
| A2AKV9     | Solute carrier family 25 member 51 (Fragment)                               | Slc25a51 Mcart1 | 205  | integral component of membrane [GO:0016021]; transmembrane transporter activity [GO:0022857]  | N.D.   |        |        | 2/3 | 13695000 | 9482302  |
| A2AKW0     | Solute carrier family 25 member 51  | Slc25a51 Mcart1 | 315  | integral component of membrane [GO:0016021]; transmembrane transporter activity [GO:0022857]  | N.D.   |        |        | 2/3 | 13695000 | 9482302  |
| D3Z7M4     | Insulin-like growth factor I (Fragment)                                     | Igf1            | 135  | extracellular space [GO:0005615]; growth factor activity [GO:0008083]; hormone activity [GO:0005179]  | IGF1; insulin-like growth factor 1                               |        |        | 2/3 | 13220000 | 7325626  |
| E9PU89     | Insulin-like growth factor I  | Igf1            | 143  | extracellular space [GO:0005615]; growth factor activity [GO:0008083]; hormone activity [GO:0005179]  | IGF1; insulin-like growth factor 1                               |        |        | 2/3 | 13220000 | 7325626  |
| E9Q138     | Insulin-like growth factor I  | Igf1            | 137  | extracellular space [GO:0005615]; growth factor activity [GO:0008083]; hormone activity [GO:0005179]  | IGF1; insulin-like growth factor 1                               |        |        | 2/3 | 13220000 | 7325626  |
| Q4VJB9     | Insulin-like growth factor 1 isoform Eb (Insulin-like growth factor I)      | Igf1            | 159  | alpha-beta3 integrin-IGF-1-IGF1R complex [GO:0035867]; insulin-like growth factor ternary complex [GO:0042567]; growth factor activity [GO:0008083]; hormone activity [GO:0005179]; insulin receptor binding [GO:0005158]; insulin-like growth factor receptor binding [GO:0005159]; integrin binding [GO:0005178]; activation of MAPK activity [GO:0000187]; activation of protein kinase B activity [GO:0032148]; bone mineralization involved in bone maturation [GO:0035630]; cell activation [GO:0001775]; cellular response to amyloid-beta [GO:1904646]; ERK1 and ERK2 cascade [GO:0070371]; insulin-like growth factor receptor signaling pathway [GO:0048009]; muscle hypertrophy [GO:0014896]; myoblast differentiation [GO:0045445]; myoblast proliferation [GO:0051450]; myotube cell development [GO:0014904]; negative regulation of extrinsic apoptotic signaling pathway [GO:2001237]; negative regulation of gene expression [GO:0010629]; negative regulation of oocyte development [GO:0060283]; negative regulation of vascular associated smooth muscle cell apoptotic process [GO:1905460]; phosphatidylinositol 3-kinase signaling [GO:0014065]; positive regulation of activated T cell proliferation [GO:0042104]; positive regulation of calcineurin-NFAT signaling cascade [GO:0070886]; positive regulation of cell growth involved | IGF1; insulin-like growth factor 1                               |        |        | 2/3 | 13220000 | 7325626  |

|            |   |   |     |   |   |     |          |          |
|------------|---|---|-----|---|---|-----|----------|----------|
|            |   |   |     | in cardiac muscle cell development [GO:0061051]; positive regulation of epithelial cell proliferation [GO:0050679]; positive regulation of fibroblast proliferation [GO:0048146]; positive regulation of glucose import [GO:0046326]; positive regulation of glycogen biosynthetic process [GO:0045725]; positive regulation of glycolytic process [GO:0045821]; positive regulation of glycoprotein biosynthetic process [GO:0010560]; positive regulation of insulin-like growth factor receptor signaling pathway [GO:0043568]; positive regulation of mitotic nuclear division [GO:0045840]; positive regulation of osteoblast differentiation [GO:0045669]; positive regulation of phosphatidylinositol 3-kinase signaling [GO:0014068]; positive regulation of protein secretion [GO:0050714]; positive regulation of Ras protein signal transduction [GO:0046579]; positive regulation of smooth muscle cell migration [GO:0014911]; positive regulation of transcription by RNA polymerase II [GO:0045944]; positive regulation of transcription regulatory region DNA binding [GO:2000679]; positive regulation of trophectodermal cell proliferation [GO:1904075]; positive regulation of tyrosine phosphorylation of STAT protein [GO:0042531]; positive regulation of vascular smooth muscle cell proliferation [GO:1904707]; protein kinase B signaling [GO:0043491]; protein stabilization [GO:0050821]; proteoglycan biosynthetic process [GO:0030166]; regulation of multicellular organism growth [GO:0040014]; response to heat [GO:009408]; skeletal muscle satellite cell maintenance involved in skeletal muscle regeneration [GO:0014834] |   |     |          |          |
| Q8CAR0     | Insulin-like growth factor I  | Igf1  | 165 | extracellular space [GO:0005615]; growth factor activity [GO:0008083]; hormone activity [GO:0005179]  | IGF1; insulin-like growth factor 1                            | 2/3 | 13220000 | 7325626  |
| F6TQ59     | Endoplasmic reticulum metalloproteinase 1 (Fragment)  | Ermp1   | 417 | integral component of membrane [GO:0016021]   | N.D.  | 2/3 | 12850000 | 3323402  |
| Q3UDD3     | Polymerase delta-interacting protein 3  | Poldip3   | 391 | cell [GO:0005623]; RNA binding [GO:0003723]; mRNA export from nucleus [GO:0006406]  | POLDIP3; polymerase delta-interacting protein 3               | 2/3 | 12620000 | 15245222 |
| D3Z7N1     | Lipoyltransferase 1, mitochondrial (Fragment)   | Lipt1   | 198 | protein lipoylation [GO:0009249]  | LIPT1; lipoyltransferase 1                                    | 2/3 | 12505000 | 5084098  |
| D3Z0R8     | Tetratricopeptide repeat domain 7   | Ttc7  | 822 | N.D.  | TTC7; tetratricopeptide repeat protein 7                      | 2/3 | 11645000 | 14078496 |
| F8WHJ2     | GTP-binding protein 10  | Gtpbp10   | 287 | GTP binding [GO:0005525]  | N.D.  | 2/3 | 11350000 | 919239   |
| Q76I26     | Methyltransferase hypoxia-inducible domain-containing 1 (UbiE-YGHL1 fusion protein) (UbiE2-Hig1-4 fusion protein) | Methig1<br>LOC554292 UbiE-YGHL1(HIG1-4)<br>UbiE2-Hig1-4 | 264 | integral component of membrane [GO:0016021]; methyltransferase activity [GO:0008168]  | N.D.  | 2/3 | 11100000 | 2969848  |
| A0A2R8VHC4 | Nck-associated protein 1-like   | Nckap1l   | 298 | N.D.  | NCKAP1; NCK-associated protein 1                              | 2/3 | 10425000 | 2651650  |
| Q923C7     | C-type lectin domain family 4, member a2 (Clec4a2 protein) (MCG141420, isoform CRA_b)                             | Clec4a2 Clec5f6<br>mCG_141420                           | 262 | integral component of membrane [GO:0016021]; carbohydrate binding [GO:0030246]  | CLEC4A; C-type lectin domain family 4 member A                | 2/3 | 9540000  | 4327494  |
| A0A2R8VI37 | Cytohesin-4   | Cyth4   | 184 | ARF guanyl-nucleotide exchange factor activity [GO:0005086]; regulation of ARF protein signal transduction [GO:0032012]   | CYTH; cytohesin   | 2/3 | 9270000  | 6264966  |
| H3BJX3     | Cell surface glycoprotein CD200 receptor 4 (MCG1038158, isoform CRA_a)  | Cd200r4<br>mCG_1038158                                  | 224 | integral component of membrane [GO:0016021]; signaling receptor activity [GO:0038023]; regulation of neuroinflammatory response [GO:0150077]  | CD200R1; cell surface glycoprotein CD200 receptor 1           | 2/3 | 9010000  | 11016724 |
| F6Y363     | Predicted gene 6665   | Gm6665  | 85  | N.D.  | GST; glutathione S-transferase [EC:2.5.1.18]                  | 2/3 | 8925000  | 190919   |
| A0A2R8W6I7 | Predicted gene, 49510   | Gm49510   | 596 | cytoplasm [GO:0005737]; GTPase activator activity [GO:0005096]; signal transduction [GO:0007165]  | SH3BP1; SH3-domain binding protein 1                          | 2/3 | 8830000  | 2786001  |
| A2A5V2     | SH3 domain-binding protein 1  | Sh3bp1  | 584 | cytoplasm [GO:0005737]; GTPase activator activity [GO:0005096]; signal transduction [GO:0007165]  | SH3BP1; SH3-domain binding protein 1                          | 2/3 | 8830000  | 2786001  |
| A2A5V3     | SH3 domain-binding protein 1  | Sh3bp1  | 582 | cytoplasm [GO:0005737]; GTPase activator activity [GO:0005096]; signal transduction [GO:0007165]  | SH3BP1; SH3-domain binding protein 1                          | 2/3 | 8830000  | 2786001  |
| S4R2D3     | SH3 domain-binding protein 1  | Sh3bp1  | 587 | cytoplasm [GO:0005737]; GTPase activator activity [GO:0005096]; signal transduction [GO:0007165]  | SH3BP1; SH3-domain binding protein 1                          | 2/3 | 8830000  | 2786001  |
| Q8CBG6     | 6-phosphogluconolactonase (6PGL) (EC 3.1.1.31)  | Pgls  | 215 | 6-phosphogluconolactonase activity [GO:0017057]; carbohydrate metabolic process [GO:0005975]; pentose-phosphate shunt [GO:0006098]  | PGLS; 6-phosphogluconolactonase [EC:3.1.1.31]                 | 2/3 | 8610000  | 9461089  |
| E9Q364     | Serine/threonine-protein kinase TAO3 (Fragment)   | Taok3   | 109 | ATP binding [GO:0005524]; protein kinase activity [GO:0004672]  | TAO; thousand and one amino acid protein kinase [EC:2.7.11.1] | 2/3 | 8360000  | 3874945  |
| H3BKZ8     | Tafazzin family protein (Fragment)  | Taz TAZ   | 178 | cytoplasm [GO:0005737]; cytosol [GO:0005829]; membrane [GO:0016020]; mitochondrion [GO:0005739]; nucleus [GO:0005634]; 1-acylglycerophosphocholine O-acyltransferase activity [GO:0047184]; cardiac muscle contraction [GO:0060048]; cardiac muscle tissue development [GO:0048738]; cardiolipin acyl-chain remodeling [GO:0035965]; cardiolipin biosynthetic process [GO:0032049]; cristae formation [GO:0042407]; heart development [GO:0007507]; hemopoiesis [GO:0030097]; inner mitochondrial membrane organization [GO:0007007]; mitochondrial ATP synthesis coupled electron transport [GO:0042775]; mitochondrial respiratory chain complex I assembly [GO:0032981]; muscle contraction [GO:0006936]; phosphatidylglycerol metabolic process [GO:0046471]; positive regulation of ATP biosynthetic process [GO:2001171]; positive regulation of cardiolipin metabolic process [GO:1900210]; regulation of gene expression [GO:0010468]; skeletal muscle tissue   | TAZ; monolysocardiolipin acyltransferase [EC:2.3.1.-]         | 2/3 | 8310000  | 4369920  |

| development [GO:0007519] |  |                              |      |   |  |   |     |         |         |
|--------------------------|--|------------------------------|------|---|--|---|-----|---------|---------|
| A0A1W2P7X0               | Costars family protein ABRACL (Fragment)   | Abracl                       | 57   | N.D.  |  | N.D.  | 2/3 | 7720000 | 4214356 |
| E9QMV2                   | Costars family protein ABRACL  | Abracl<br>3110003A17Rik      | 81   | N.D.  |  | N.D.  | 2/3 | 7720000 | 4214356 |
| J3JS92                   | Tafazzin family protein  | Taz TAZ RP23-<br>436K3.6-020 | 248  | cytoplasm [GO:0005737]; cytosol [GO:0005829]; integral component of membrane [GO:0016021]; membrane [GO:0016020]; mitochondrion [GO:0005739]; nucleus [GO:0005634]; 1-acylglycerophosphocholine O-acyltransferase activity [GO:0047184]; cardiac muscle contraction [GO:0060048]; cardiac muscle tissue development [GO:0048738]; cardiolipln acyl-chain remodeling [GO:0035965]; cardiolipln biosynthetic process [GO:0032049]; cristae formation [GO:0042407]; heart development [GO:0007507]; hemopoiesis [GO:0030097]; inner mitochondrial membrane organization [GO:0007007]; mitochondrial ATP synthesis coupled electron transport [GO:0042775]; mitochondrial respiratory chain complex I assembly [GO:0032981]; muscle contraction [GO:0006936]; phosphatidylglycerol metabolic process [GO:0046471]; positive regulation of ATP biosynthetic process [GO:2001171]; positive regulation of cardiolipln metabolic process [GO:1900210]; regulation of gene expression [GO:0010468]; skeletal muscle tissue development [GO:0007519] |  | TAZ; monolysocardiolipln acyltransferase [EC:2.3.1.-] | 2/3 | 7505000 | 2481945 |
| D3YZ54                   | 2-hydroxyacyl-CoA lyase 1  | Hacl1                        | 554  | catalytic activity [GO:0003824]; magnesium ion binding [GO:0000287]; thiamine pyrophosphate binding [GO:0030976]  |  | HACL1; 2-hydroxyacyl-CoA lyase 1 [EC:4.1.-.-]         | 2/3 | 7250000 | 3804234 |
| F6S0R8                   | Saccharopine dehydrogenase-like oxidoreductase (Fragment)  | Scopdh                       | 170  | integral component of membrane [GO:0016021]   |  | N.D.  | 2/3 | 7005000 | 671751  |
| A0A0G2JG48               | Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit B (Fragment)  | Eif3b                        | 175  | eukaryotic translation initiation factor 3 complex [GO:0005852]; translation initiation factor activity [GO:0003743]; translation initiation factor binding [GO:0031369]  |  | EIF3B; translation initiation factor 3 subunit B      | 2/3 | 6820000 | 6194255 |
| E9Q3M3                   | Dynactin subunit 1   | Dctn1                        | 1264 | dynactin complex [GO:0005869]; dynein complex binding [GO:0070840]; transport along microtubule [GO:0010970]  |  | DCTN1; dynactin 1                                     | 2/3 | 6750000 | 3351686 |
| E9Q586                   | Dynactin subunit 1   | Dctn1                        | 1239 | dynactin complex [GO:0005869]; dynein complex binding [GO:0070840]; transport along microtubule [GO:0010970]  |  | DCTN1; dynactin 1                                     | 2/3 | 6750000 | 3351686 |
| Q6NV49                   | Phospholipase (EC 3.1.4.4)   | Plid2                        | 944  | N-acylphosphatidylethanolamine-specific phospholipase D activity [GO:0070290]; phosphatidylinositol binding [GO:0035091]; phospholipase D activity [GO:0004630]; inositol lipid-mediated signaling [GO:0048017]; lipid catabolic process [GO:0016042]; phosphatidic acid biosynthetic process [GO:0006654]  |  | PLD1_2; phospholipase D1/2 [EC:3.1.4.4]               | 2/3 | 6590000 | 494975  |
| D3YYN3                   | Exosome complex component RRP43 (Fragment)   | Exosc8                       | 130  | exosome (RNase complex) [GO:0000178]; RNA catabolic process [GO:0006401]; RNA processing [GO:0006396]   |  | RRP43; exosome complex component RRP43                | 2/3 | 6320000 | 537401  |
| F6SGT4                   | Exosome complex component RRP43 (Fragment)   | Exosc8                       | 114  | exosome (RNase complex) [GO:0000178]; RNA catabolic process [GO:0006401]; RNA processing [GO:0006396]   |  | RRP43; exosome complex component RRP43                | 2/3 | 6320000 | 537401  |
| A2AE89                   | Glutathione S-transferase Mu 1   | Gstm1                        | 244  | glutathione transferase activity [GO:0004364]   |  | GST; glutathione S-transferase [EC:2.5.1.18]          | 2/3 | 6295000 | 3910300 |
| A2AE91                   | Glutathione S-transferase, mu 4  | Gstm4                        | 184  | cytoplasm [GO:0005737]; cytosol [GO:0005829]; intercellular bridge [GO:0045171]; enzyme binding [GO:0019899]; glutathione binding [GO:0043295]; glutathione transferase activity [GO:0004364]; protein homodimerization activity [GO:0042803]; glutathione metabolic process [GO:0006749]; nitrobenzene metabolic process [GO:0018916]; xenobiotic catabolic process [GO:0042178]   |  | GST; glutathione S-transferase [EC:2.5.1.18]          | 2/3 | 6295000 | 3910300 |
| D3YX76                   | Glutathione S-transferase (EC 2.5.1.18)  | Gstm2                        | 184  | glutathione transferase activity [GO:0004364]   |  | GST; glutathione S-transferase [EC:2.5.1.18]          | 2/3 | 6295000 | 3910300 |
| D3YZ29                   | Glutathione S-transferase Mu 7 (Fragment)  | Gstm7                        | 119  | glutathione transferase activity [GO:0004364]   |  | GST; glutathione S-transferase [EC:2.5.1.18]          | 2/3 | 6295000 | 3910300 |
| E9QAC8                   | Glutathione S-transferase Mu 7 (Fragment)  | Gstm7                        | 193  | glutathione transferase activity [GO:0004364]   |  | GST; glutathione S-transferase [EC:2.5.1.18]          | 2/3 | 6295000 | 3910300 |
| Q8R516                   | Glutathione S-transferase mu 4 (Glutathione S-transferase, mu 4) (Glutathione transferase GSTM7-7) (EC 2.5.1.18) | Gstm4                        | 218  | cytoplasm [GO:0005737]; cytosol [GO:0005829]; intercellular bridge [GO:0045171]; enzyme binding [GO:0019899]; glutathione binding [GO:0043295]; glutathione transferase activity [GO:0004364]; protein homodimerization activity [GO:0042803]; glutathione metabolic process [GO:0006749]; nitrobenzene metabolic process [GO:0018916]; xenobiotic catabolic process [GO:0042178]   |  | GST; glutathione S-transferase [EC:2.5.1.18]          | 2/3 | 6295000 | 3910300 |
| H3BJ70                   | Protein argonaute-1 (Fragment)   | Ago1 Eif2c1                  | 553  | nucleic acid binding [GO:0003676]; gene silencing by RNA [GO:0031047]   |  | ELF2C; eukaryotic translation initiation factor 2C    | 2/3 | 5690000 | 2701148 |
| A0A087WNP6               | Protein CDV3   | Cdv3                         | 235  | N.D.  |  | N.D.  | 2/3 | 5580000 | 1781909 |
| A0A087WRM0               | Protein CDV3 (Fragment)  | Cdv3                         | 154  | N.D.  |  | N.D.  | 2/3 | 5580000 | 1781909 |
| A0A087WS49               | Protein CDV3   | Cdv3                         | 154  | N.D.  |  | N.D.  | 2/3 | 5580000 | 1781909 |

|            |   |             |      |   |  |     |         |         |
|------------|---|-------------|------|---|--|-----|---------|---------|
| D3YX34     | Dynactin subunit 1  | Dctn1       | 1142 | dynactin complex [GO:0005869]; dynein complex binding [GO:0070840]; transport along microtubule [GO:0010970]  | DCTN1; dynactin 1  | 2/3 | 5145000 | 1081873 |
| A0A2U3TZ82 | TRIO and F-actin-binding protein  | Triobp      | 627  | actin filament binding [GO:0051015]; regulation of actin cytoskeleton organization [GO:0032956]   | N.D.   | 2/3 | 4840000 | 1711198 |
| B1AUN3     | Eukaryotic translation initiation factor 2B, subunit 3                                      | Eif2b3      | 401  | cytoplasm [GO:0005737]; eukaryotic translation initiation factor 2B complex [GO:0005851]; guanyl-nucleotide exchange factor activity [GO:0005085]; nucleotidyltransferase activity [GO:0016779]; oligodendrocyte development [GO:0014003]; response to glucose [GO:0009749]; response to heat [GO:0009408]; response to peptide hormone [GO:0043434]; T cell receptor signaling pathway [GO:0050852]; translational initiation [GO:0006413]   | EIF2B3; translation initiation factor eIF-2B subunit gamma       | 2/3 | 4625000 | 403051  |
| A0A087WQ94 | Tensin 1 (Fragment)   | Tns1        | 1719 | cell-substrate junction [GO:0030055]; focal adhesion [GO:0005925]; actin binding [GO:0003779]; cell-substrate junction assembly [GO:0007044]; fibroblast migration [GO:0010761]   | TNS; tensin  | 2/3 | 4345000 | 3754737 |
| A0A087WQ50 | Tensin 1  | Tns1        | 1867 | cell-substrate junction [GO:0030055]; focal adhesion [GO:0005925]; actin binding [GO:0003779]; cell-substrate junction assembly [GO:0007044]; fibroblast migration [GO:0010761]; intracellular signal transduction [GO:0035556]   | TNS; tensin  | 2/3 | 4345000 | 3754737 |
| A0A1D5RM59 | Tensin 1  | Tns1        | 1880 | cell-substrate junction [GO:0030055]; focal adhesion [GO:0005925]; actin binding [GO:0003779]; cell-substrate junction assembly [GO:0007044]; fibroblast migration [GO:0010761]; intracellular signal transduction [GO:0035556]   | TNS; tensin  | 2/3 | 4345000 | 3754737 |
| A0A2R8VHQ0 | Tensin-2  | Tns2        | 1392 | metal ion binding [GO:0046872]; intracellular signal transduction [GO:0035556]  | TNS; tensin  | 2/3 | 4345000 | 3754737 |
| E9Q0S6     | Tensin 1  | Tns1        | 1888 | cell-substrate junction [GO:0030055]; focal adhesion [GO:0005925]; actin binding [GO:0003779]; cell-substrate junction assembly [GO:0007044]; fibroblast migration [GO:0010761]; intracellular signal transduction [GO:0035556]   | TNS; tensin  | 2/3 | 4345000 | 3754737 |
| A0A087WQZ9 | Lymphocyte antigen 96   | Ly96        | 142  | lipopolysaccharide binding [GO:0001530]; Toll-like receptor 4 binding [GO:0035662]; innate immune response [GO:0045087]   | LY96; lymphocyte antigen 96                                      | 2/3 | 4115000 | 827315  |
| A3KFX6     | Protein argonaute-3 (Fragment)  | Ago3 Eif2c3 | 161  | nucleic acid binding [GO:0003676]   | ELF2C; eukaryotic translation initiation factor 2C               | 2/3 | 4095000 | 1364716 |
| H3BK50     | Serine/threonine-protein phosphatase 2A 65 kDa regulatory subunit A beta isoform (Fragment) | Ppp2r1b     | 93   | N.D.  | N.D.   | 2/3 | 3865000 | 1944544 |
| A0A1L1SS34 | Anillin (Fragment)  | Anln        | 239  | N.D.  | ANLN; actin-binding protein anillin                              | 2/3 | 3785000 | 388909  |
| A0A087WQF7 | Zinc transporter ZIP10 (Fragment)   | Slc39a10    | 167  | N.D.  | SLC39A10; solute carrier family 39 (zinc transporter), member 10 | 2/3 | 3635000 | 1251579 |
| A0A087WRC8 | Zinc transporter ZIP10 (Fragment)   | Slc39a10    | 144  | N.D.  | SLC39A10; solute carrier family 39 (zinc transporter), member 10 | 2/3 | 3635000 | 1251579 |
| E0CYV5     | Traf2 and NCK-interacting protein kinase  | Tnik        | 227  | ATP binding [GO:0005524]; protein serine/threonine kinase activity [GO:0004674]   | TNIK; TRAF2 and NCK interacting kinase [EC:2.7.11.1]             | 2/3 | 3600000 | 1074802 |
| F7AMS7     | Misshapen-like kinase 1 (Fragment)  | Mink1       | 1198 | ATP binding [GO:0005524]; protein kinase activity [GO:0004672]  | MINK; misshapen/NIK-related kinase [EC:2.7.11.1]                 | 2/3 | 3600000 | 1074802 |
| D3Z4I4     | Long-chain-fatty-acid--CoA ligase 3 (Fragment)  | Acsl3       | 141  | integral component of membrane [GO:0016021]   | ACSL3; long-chain acyl-CoA synthetase [EC:6.2.1.3]               | 2/3 | 3495000 | 1590990 |
| A0A338P702 | Ubiquitin-conjugating enzyme E2 L3  | Ube2l3      | 114  | ATP binding [GO:0005524]; transferase activity [GO:0016740]   | UBE2L3; ubiquitin-conjugating enzyme E2 L3 [EC:2.3.2.23]         | 2/3 | 3465000 | 1689985 |
| A0A1L1SQS5 | Protein FAM76B (Fragment)   | Fam76b      | 74   | N.D.  | N.D.   | 2/3 | 3370000 | 848528  |
| A0A1B0GS40 | Toll-like receptor 3 (Fragment)   | Tlr3        | 306  | integral component of membrane [GO:0016021]; double-stranded RNA binding [GO:0003725]; transmembrane signaling receptor activity [GO:0004888]; defense response to virus [GO:0051607]; innate immune response [GO:0045087]; MyD88-independent toll-like receptor signaling pathway [GO:0002756]; positive regulation of chemokine production [GO:0032722]; positive regulation of inflammatory response [GO:0050729]; response to exogenous dsRNA [GO:0043330]; toll-like receptor 3 signaling pathway [GO:0034138]   | TLR3; toll-like receptor 3                                       | 2/3 | 3240000 | 975807  |
| G3UX11     | Protein ABHD16A   | Abhd16a     | 65   | N.D.  | N.D.   | 2/3 | 3205000 | 1534422 |
| A0A1L1SR14 | Anoctamin-10  | Ano10       | 176  | N.D.  | ANO10; anoctamin-10  | 2/3 | 3035000 | 1166726 |
| J3QK52     | Nucleolar complex protein 2 homolog   | Noc2l       | 750  | cytosol [GO:0005829]; nucleolus [GO:0005730]; nucleoplasm [GO:0005654]; histone binding [GO:0042393]; nucleosome binding [GO:0031491]; repressing transcription factor binding [GO:0070491]; transcription corepressor activity [GO:0003714]; cellular response to UV [GO:0034644]; chromatin assembly [GO:0031497]; negative regulation of B cell apoptotic process [GO:0002903]; negative regulation of histone acetylation [GO:0035067]; negative regulation of intrinsic apoptotic signaling pathway [GO:2001243]; negative regulation of transcription by RNA polymerase II [GO:0000122] | NOC2; nucleolar complex protein 2                                | 2/3 | 3000000 | 2262742 |

|        |   |                |     |   |  |  |     |         |         |
|--------|---|----------------|-----|---|--|--|-----|---------|---------|
| Q8BHX6 | Nucleolar complex protein 2 homolog                           | Noc2l AF155546 | 593 | N.D.  |  | NOC2; nucleolar complex protein 2  | 2/3 | 3000000 | 2262742 |
| D3Z226 | Mitochondrial sodium/calcium exchanger protein                | Slc8b1 Slc24a6 | 529 | integral component of membrane [GO:0016021]; transmembrane transport [GO:0055085] |  | SLC24A6; solute carrier family 24 (sodium/potassium/calcium exchanger), member 6 | 2/3 | 2575000 | 148492  |
| E9Q0X5 | Acidic leucine-rich nuclear phosphoprotein 32 family member E | Anp32e         | 219 | N.D.  |  | ANP32E; acidic leucine-rich nuclear phosphoprotein 32 family member E            | 2/3 | 1800000 | 862670  |

N.D.: No determinado. D.E.: Desviación estándar.

En letra grande y negrita se encuentran proteínas detectadas en 3/3 muestras.

Las proteínas se encuentran agrupadas por especie (*B. abortus* y *M. musculus*) y ordenadas descendientemente por promedio de intensidad.

## Anexo A2. Lista de proteínas detectadas como exclusivas de las BCVs de *B. abortus virB10*.

| # de<br>accesión<br>UniProt   | Nombres de proteínas  | Nombres<br>de genes            | Longitu<br>d (aa's) | Gene ontology  | Definición KO   | Muestr<br>as de<br>virB | Promedio<br>de<br>intensidad | D.E.      |
|-------------------------------|---|--------------------------------|---------------------|--|---|-------------------------|------------------------------|-----------|
| <i>Brucella abortus</i> 2308W |   |                                |                     |  |   |                         |                              |           |
| Q2YLN7                        | PEP-utilizing enzyme:Beta tubulin:GAF domain:Phosphoenolpyruvate-protein phosphotransferase (EC 2.7.3.9)                      | ptsP<br>BAB1_1873              | 756                 | phosphoenolpyruvate-protein phosphotransferase activity [GO:0008965]; phosphoenolpyruvate-dependent phosphorylation [GO:0016310]   | phosphotransferase activity [GO:0008965]; sugar phosphotransferase system [GO:0009401]; PTS-EI.PTSP; phosphotransferase system, enzyme I, PtsP [EC:2.7.3.9] | 2/3                     | 165000000                    | 82024387  |
| Q2YK09                        | Bacterial extracellular solute-binding protein, family 1  | BAB2_0547                      | 421                 | N.D.   | gtsA; glucose/mannose transport system substrate-binding protein  | 2/3                     | 38150000                     | 10960155  |
| Q2YJ18                        | Flagellar hook-length control protein:ATP/GTP-binding site motif A (P-loop):Peptidase family S16:ABC transporter:AAA ATPase   | BAB2_0299                      | 529                 | ATP binding [GO:0005524]; ATPase activity [GO:0016887]   | ABC.GGU.A; putative multiple sugar transport system ATP-binding protein [EC:3.6.3.17]   | 2/3                     | 9305000                      | 3104199   |
| <i>Mus musculus</i>           |   |                                |                     |  |   |                         |                              |           |
| J3QMF2                        | A disintegrin and metalloproteinase domain 17, isoform CRA_b (Disintegrin and metalloproteinase domain-containing protein 17) | Adam17<br>mCG_8913             | 94                  | integrin-mediated signaling pathway [GO:0007229]   | N.D.  | 3/3                     | 852000000                    | 317622417 |
| G3X956                        | Suppressor of Ty 16 (Suppressor of Ty 16 homolog ( <i>S. cerevisiae</i> ))  | Supt16<br>Supt16h<br>mCG_18713 | 1047                | FACT complex [GO:0035101]  | N.D.  | 3/3                     | 373966667                    | 328692871 |
| E0CYK6                        | HD domain-containing protein 2 (Fragment)   | Hddc2                          | 127                 | 5'-deoxynucleotidase activity [GO:0002953]   | putative hydrolases of HD superfamily   | 3/3                     | 362100000                    | 295785615 |
| A0A1B0GT56                    | Adenylate cyclase type 7 (Fragment)   | Adcy7                          | 428                 | integral component of membrane [GO:0016021]; plasma membrane [GO:0005886]; adenylate cyclase activity [GO:0004016]; cAMP biosynthetic process [GO:0006171]; intracellular signal transduction [GO:0035556] | ADCY7; adenylate cyclase 7 [EC:4.6.1.1]   | 3/3                     | 345200000                    | 489141820 |
| A2AAW9                        | Eukaryotic translation initiation factor 2 subunit 3, X-linked  | Eif2s3x                        | 344                 | GTP binding [GO:0005525]; GTPase activity [GO:0003924]   | EIF2S3; translation initiation factor 2 subunit 3   | 3/3                     | 247600000                    | 275000873 |
| Q9CQB4                        | Cytochrome b-c1 complex subunit 7   | Uqcrb<br>mCG_67985             | 111                 | mitochondrial respiratory chain complex III [GO:0005750]; mitochondrial electron transport, ubiquinol to cytochrome c [GO:0006122]   | QCR7; ubiquinol-cytochrome c reductase subunit 7  | 3/3                     | 247233333                    | 248593973 |
| F6VVY4                        | Tricarboxylate transport protein, mitochondrial (Fragment)  | Slc25a1                        | 197                 | integral component of membrane [GO:0016021]; transmembrane transporter activity [GO:0022857]   | SLC25A1; solute carrier family 25 (mitochondrial citrate transporter), member 1   | 3/3                     | 124833333                    | 72612556  |
| F6S5I0                        | Myosin phosphatase Rho-interacting protein (Fragment)   | Mprip                          | 848                 | N.D.   | N.D.  | 3/3                     | 94033333                     | 60928018  |
| F6XZM9                        | Myosin phosphatase Rho-interacting protein (Fragment)   | Mprip                          | 498                 | N.D.   | N.D.  | 3/3                     | 94033333                     | 60928018  |
| F6QFL0                        | MICOS complex subunit (Fragment)  | Chchd3                         | 89                  | MICOS complex [GO:0061617]   | CHCHD3; coiled-coil-helix-coiled-coil-helix domain-containing protein 3, mitochondrial  | 3/3                     | 90666667                     | 38394314  |
| A0A0G2JG95                    | Serine/threonine-protein phosphatase PGAM5, mitochondrial (Fragment)  | Pgam5                          | 179                 | N.D.   | PGAM5; serine/threonine-protein phosphatase PGAM5 [EC:3.1.3.16]   | 3/3                     | 90433333                     | 33329616  |
| A0A1Y7VMH3                    | Serine/threonine-protein kinase VRK1  | Vrk1                           | 413                 | ATP binding [GO:0005524]; protein serine/threonine kinase activity [GO:0004674]  | VRK; vaccinia related kinase [EC:2.7.11.1]  | 3/3                     | 86200000                     | 36466286  |

|            |  |                       |      |   |   |     |          |          |
|------------|--|-----------------------|------|---|---|-----|----------|----------|
| A0A1D5RLD1 | Unconventional myosin-IXb                            | Myo9b                 | 1963 | myosin complex [GO:0016459]; actin binding [GO:0003779]; ATP binding [GO:0005524]; GTPase activator activity [GO:0005096]; metal ion binding [GO:0046872]; motor activity [GO:0003774]; intracellular signal transduction [GO:0035556]  | MYO9; myosin IX                                       | 3/3 | 84166667 | 70472288 |
| E9PWZ6     | Unconventional myosin-IXb                            | Myo9b                 | 1975 | myosin complex [GO:0016459]; actin binding [GO:0003779]; ATP binding [GO:0005524]; GTPase activator activity [GO:0005096]; metal ion binding [GO:0046872]; motor activity [GO:0003774]; intracellular signal transduction [GO:0035556]  | MYO9; myosin IX                                       | 3/3 | 84166667 | 70472288 |
| E9PZW8     | Unconventional myosin-IXb                            | Myo9b                 | 2128 | actin filament [GO:0005884]; cell cortex [GO:0005938]; cytosol [GO:0005829]; myosin complex [GO:0016459]; perinuclear region of cytoplasm [GO:0048471]; actin binding [GO:0003779]; ADP binding [GO:0043531]; ATP binding [GO:0005524]; ATPase activity [GO:0016887]; calmodulin binding [GO:0005516]; GTPase activator activity [GO:0005096]; metal ion binding [GO:0046872]; microfilament motor activity [GO:0000146]; Rho GTPase binding [GO:0017048]; Roundabout binding [GO:0048495]; actin filament-based movement [GO:0030048]; intracellular signal transduction [GO:0035556]; regulation of Rho protein signal transduction [GO:0035023]; Roundabout signaling pathway [GO:0035385] | MYO9; myosin IX                                       | 3/3 | 84166667 | 70472288 |
| E9QKV6     | Unconventional myosin-IXb                            | Myo9b                 | 1961 | myosin complex [GO:0016459]; actin binding [GO:0003779]; ATP binding [GO:0005524]; GTPase activator activity [GO:0005096]; metal ion binding [GO:0046872]; motor activity [GO:0003774]; intracellular signal transduction [GO:0035556]  | MYO9; myosin IX                                       | 3/3 | 84166667 | 70472288 |
| D3Z1N4     | Protein polybromo-1                                  | Pbrm1                 | 1652 | RSC-type complex [GO:0016586]; chromatin binding [GO:0003682]; DNA binding [GO:0003677]; chromatin remodeling [GO:0006338]  | PBRM1; protein polybromo-1                            | 3/3 | 74600000 | 45947361 |
| D3Z1W6     | Protein polybromo-1                                  | Pbrm1                 | 1582 | RSC-type complex [GO:0016586]; chromatin binding [GO:0003682]; DNA binding [GO:0003677]; chromatin remodeling [GO:0006338]  | PBRM1; protein polybromo-1                            | 3/3 | 74600000 | 45947361 |
| E9Q4Y5     | Protein polybromo-1                                  | Pbrm1                 | 1689 | RSC-type complex [GO:0016586]; chromatin binding [GO:0003682]; DNA binding [GO:0003677]; chromatin remodeling [GO:0006338]  | PBRM1; protein polybromo-1                            | 3/3 | 74600000 | 45947361 |
| E9Q7L2     | Protein polybromo-1                                  | Pbrm1                 | 1597 | RSC-type complex [GO:0016586]; chromatin binding [GO:0003682]; DNA binding [GO:0003677]; chromatin remodeling [GO:0006338]  | PBRM1; protein polybromo-1                            | 3/3 | 74600000 | 45947361 |
| D6RI94     | Protein polybromo-1                                  | Pbrm1                 | 860  | RSC-type complex [GO:0016586]; chromatin remodeling [GO:0006338]  | PBRM1; protein polybromo-1                            | 3/3 | 73933333 | 44807291 |
| F6THL5     | Protein polybromo-1 (Fragment)                       | Pbrm1                 | 1085 | RSC-type complex [GO:0016586]; chromatin binding [GO:0003682]; chromatin remodeling [GO:0006338]  | PBRM1; protein polybromo-1                            | 3/3 | 73933333 | 44807291 |
| A0A0A6YX02 | Ragulator complex protein LAMTOR1                    | Lamtor1               | 142  | Ragulator complex [GO:0071986]; cellular response to amino acid stimulus [GO:0071230]; cholesterol homeostasis [GO:0042632]; endosomal transport [GO:0016197]; lysosome organization [GO:0007040]; positive regulation of MAPK cascade [GO:0043410]; positive regulation of TOR signaling [GO:0032008]; regulation of receptor recycling [GO:0001919]   | LAMTOR1; ragulator complex protein LAMTOR1            | 3/3 | 72166667 | 40905297 |
| J3QM80     | Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein F (Fragment) | Hnrnpf                | 232  | RNA binding [GO:0003723]  | HNRNPF_H; heterogeneous nuclear ribonucleoprotein F/H | 3/3 | 68333333 | 53100126 |
| J3QMT0     | Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein F (Fragment) | Hnrnpf                | 208  | RNA binding [GO:0003723]  | HNRNPF_H; heterogeneous nuclear ribonucleoprotein F/H | 3/3 | 68333333 | 53100126 |
| E9Q5Q0     | Ataxin-2-like protein (Fragment)                     | Atxn2l                | 863  | N.D.  | N.D.  | 3/3 | 67433333 | 38909425 |
| Q3TGG2     | Ataxin-2-like protein                                | Atxn2l                | 994  | N.D.  | N.D.  | 3/3 | 67433333 | 38909425 |
| A0A1Y7VKY1 | MCG116671 (Predicted pseudogene 11361)               | Gm11361<br>mCG_116671 | 152  | ribosome [GO:0005840]; RNA binding [GO:0003723]; structural constituent of ribosome [GO:0003735]; translation [GO:0006412]  | RP-S18e; small subunit ribosomal protein S18e         | 3/3 | 62533333 | 40390758 |
| F6YVP7     | Predicted gene 10260                                 | Gm10260<br>Gm17352    | 152  | cytosol [GO:0005829]; ribosome [GO:0005840]; RNA binding [GO:0003723]; structural constituent of ribosome [GO:0003735]; translation [GO:0006412]  | RP-S18e; small subunit ribosomal protein S18e         | 3/3 | 62533333 | 40390758 |
| S4R1N6     | 40S ribosomal protein S18                            | Rps18                 | 107  | ribosome [GO:0005840]; RNA binding [GO:0003723]; structural   | RP-S18e; small subunit                                | 3/3 | 62533333 | 40390758 |



|            |  |                       |      |  |   |                        |          |          |  |  |
|------------|--|-----------------------|------|--|---|------------------------|----------|----------|--|--|
|            |  |                       |      |  | constituent of ribosome [GO:0003735]; translation [GO:0006412]            | ribosomal protein S18e |          |          |  |  |
| A0A0N4SVE1 | V-type proton ATPase subunit F   | Atp6v1f               | 71   | proton-transporting V-type ATPase, V1 domain [GO:0033180]; proton-transporting ATPase activity, rotational mechanism [GO:0046961]; ATP hydrolysis coupled proton transport [GO:0015991]  | ATPeV1F; V-type H+-transporting ATPase subunit F                          | 3/3                    | 62163333 | 52702069 |  |  |
| F7B2B4     | V-type proton ATPase subunit F (Fragment)  | Atp6v1f               | 100  | proton-transporting V-type ATPase, V1 domain [GO:0033180]; proton-transporting ATPase activity, rotational mechanism [GO:0046961]; ATP hydrolysis coupled proton transport [GO:0015991]  | ATPeV1F; V-type H+-transporting ATPase subunit F                          | 3/3                    | 62163333 | 52702069 |  |  |
| F8WHW3     | Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate phosphatase (EC 3.1.3.78)                                    | 4-Pip4p1              | 277  | integral component of membrane [GO:0016021]; late endosome membrane [GO:0031902]; lysosomal membrane [GO:0005765]; phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 4-phosphatase activity [GO:0034597]; phosphatidylinositol dephosphorylation [GO:0046856]  | TMEM55; phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 4-phosphatase [EC:3.1.3.78] | 3/3                    | 61933333 | 28263463 |  |  |
| A0A1L1SVF9 | Serine beta-lactamase-like protein LACTB, mitochondrial  | Lactb                 | 356  | integral component of membrane [GO:0016021]  | LACTB; serine beta-lactamase-like protein LACTB, mitochondrial            | 3/3                    | 58966667 | 46147625 |  |  |
| F8WGD9     | 1-acyl-sn-glycerol-3-phosphate acyltransferase epsilon   | Agpat5                | 291  | transferase activity, transferring acyl groups [GO:0016746]  | AGPAT5; lysophosphatidate acyltransferase [EC:2.3.1.51]                   | 3/3                    | 55633333 | 18423988 |  |  |
| A0A0A6YVR9 | SURF1-like protein (Fragment)  | Surf1                 | 240  | integral component of membrane [GO:0016021]; mitochondrial inner membrane [GO:0005743]   | SURF1; surfet locus 1 family protein                                      | 3/3                    | 51423333 | 43053927 |  |  |
| E9QMX7     | Rho GTPase-activating protein 30   | Arhgap30              | 1093 | intracellular membrane-bounded organelle [GO:0043231]; signal transduction [GO:0007165]  | ARHGAP30; Rho GTPase-activating protein 30                                | 3/3                    | 47366667 | 26080133 |  |  |
| A0A0U1RPJ5 | NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 subunit C2   | Ndufc2                | 108  | integral component of membrane [GO:0016021]; mitochondrial inner membrane [GO:0005743]; respirasome [GO:0070469]; NADH dehydrogenase (ubiquinone) activity [GO:0008137]; mitochondrial electron transport, NADH to ubiquinone [GO:0006120]   | NDUFC2; NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 subunit C2                      | 3/3                    | 46690000 | 41678319 |  |  |
| D3YVJ7     | Aldo-keto reductase family 1, member B3 (aldose reductase) (Fragment)                              | Akr1b3                | 176  | oxidoreductase activity [GO:0016491]   | AKR1B; aldehyde reductase [EC:1.1.1.21]                                   | 3/3                    | 45770000 | 3288626  |  |  |
| A2A6T4     | Immature colon carcinoma transcript 1, isoform CRA_c (Peptidyl-tRNA hydrolase ICT1, mitochondrial) | Mirp158 lct1 mCG_6606 | 186  | translation release factor activity [GO:0003747]   | ICT1; peptidyl-tRNA hydrolase ICT1 [EC:3.1.1.29]                          | 3/3                    | 45200000 | 12150309 |  |  |
| E9Q855     | Secretory carrier-associated membrane protein (Secretory carrier membrane protein)                 | Scamp3                | 315  | integral component of membrane [GO:0016021]; protein transport [GO:0015031]  | SCAMP; secretory carrier-associated membrane protein                      | 3/3                    | 43733333 | 39555573 |  |  |
| Q3UXS0     | Secretory carrier-associated membrane protein (Secretory carrier membrane protein)                 | Scamp3                | 350  | integral component of membrane [GO:0016021]; intracellular membrane-bounded organelle [GO:0043231]; ubiquitin protein ligase binding [GO:0031625]; protein transport [GO:0015031]  | SCAMP; secretory carrier-associated membrane protein                      | 3/3                    | 43733333 | 39555573 |  |  |
| D3Z0L6     | Glycerol-3-phosphate dehydrogenase 1-like protein  | Gpd1l                 | 117  | glycerol-3-phosphate dehydrogenase [NAD+] activity [GO:0004367]; carbohydrate metabolic process [GO:0005975]   | GPD1; glycerol-3-phosphate dehydrogenase (NAD+) [EC:1.1.1.8]              | 3/3                    | 40700000 | 10844814 |  |  |
| D3YUG3     | 40S ribosomal protein S19 (Fragment)   | Rps19                 | 137  | ribosome [GO:0005840]; structural constituent of ribosome [GO:0003735]; translation [GO:0006412]   | RP-S19e; small subunit ribosomal protein S19e                             | 3/3                    | 39633333 | 27350015 |  |  |
| D3YUT3     | 40S ribosomal protein S19 (Fragment)   | Rps19                 | 133  | ribosome [GO:0005840]; structural constituent of ribosome [GO:0003735]; translation [GO:0006412]   | RP-S19e; small subunit ribosomal protein S19e                             | 3/3                    | 39633333 | 27350015 |  |  |
| D3Z5R8     | 40S ribosomal protein S19 (Fragment)   | Rps19                 | 176  | ribosome [GO:0005840]; structural constituent of ribosome [GO:0003735]; translation [GO:0006412]   | RP-S19e; small subunit ribosomal protein S19e                             | 3/3                    | 39633333 | 27350015 |  |  |
| A2AI52     | Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 8  | Usp8                  | 1091 | cytosol [GO:0005829]; dendritic spine [GO:0043197]; early endosome [GO:0005769]; extrinsic component of plasma membrane [GO:0019897]; glutamatergic synapse [GO:0098978]; midbody [GO:0030496]; postsynaptic density [GO:0014069]; thiol-dependent ubiquitin-specific protease activity [GO:0004843]; cellular response to dexamethasone stimulus [GO:0071549]; cellular response to nerve growth factor stimulus [GO:1990090]; endosome organization [GO:0007032]; mitotic cytokinesis [GO:0000281]; positive regulation of canonical Wnt signaling pathway [GO:0090263]; protein K48-linked deubiquitination [GO:0071108]; protein K63-linked deubiquitination [GO:0070536]; regulation of protein catabolic | USP8; ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 8 [EC:3.4.19.12]              | 3/3                    | 37540000 | 40267590 |  |  |

|            |   |                  |      |  |   |     |          |          |  |
|------------|---|------------------|------|--|---|-----|----------|----------|--|
|            |   |                  |      |  | process at postsynapse, modulating synaptic transmission [GO:009576]; regulation of protein localization [GO:0032880]; regulation of protein stability [GO:0031647]; ubiquitin-dependent protein catabolic process [GO:0006511] |     |          |          |  |
| Q5SUD5     | Protein SCO1 homolog, mitochondrial   | Sco1             | 289  | cell [GO:0005623]; cell redox homeostasis [GO:0045454]   | SCO1_2; protein SCO1/2  | 3/3 | 36966667 | 19860598 |  |
| A0A087WSI9 | Clathrin coat assembly protein AP180 (Fragment)   | Snap91           | 219  | clathrin-coated vesicle [GO:0030136]; 1-phosphatidylinositol binding [GO:0005545]; clathrin binding [GO:0030276]; clathrin coat assembly [GO:0048268]  | SNAP91; clathrin coat assembly protein AP180  | 3/3 | 36700000 | 15569522 |  |
| E9Q9A3     | Clathrin coat assembly protein AP180  | Snap91           | 838  | clathrin-coated vesicle [GO:0030136]; 1-phosphatidylinositol binding [GO:0005545]; clathrin binding [GO:0030276]; clathrin coat assembly [GO:0048268]; regulation of clathrin-dependent endocytosis [GO:2000369] | SNAP91; clathrin coat assembly protein AP180  | 3/3 | 36700000 | 15569522 |  |
| E9QLK9     | Clathrin coat assembly protein AP180  | Snap91           | 901  | clathrin-coated vesicle [GO:0030136]; 1-phosphatidylinositol binding [GO:0005545]; clathrin binding [GO:0030276]; clathrin coat assembly [GO:0048268]  | SNAP91; clathrin coat assembly protein AP180  | 3/3 | 36700000 | 15569522 |  |
| E9QQ05     | Clathrin coat assembly protein AP180  | Snap91           | 868  | clathrin-coated vesicle [GO:0030136]; 1-phosphatidylinositol binding [GO:0005545]; clathrin binding [GO:0030276]; clathrin coat assembly [GO:0048268]  | SNAP91; clathrin coat assembly protein AP180  | 3/3 | 36700000 | 15569522 |  |
| Q3TWS4     | Clathrin coat assembly protein AP180  | Snap91           | 582  | clathrin-coated vesicle [GO:0030136]; 1-phosphatidylinositol binding [GO:0005545]; clathrin binding [GO:0030276]; clathrin coat assembly [GO:0048268]  | SNAP91; clathrin coat assembly protein AP180  | 3/3 | 36700000 | 15569522 |  |
| D3YX99     | NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 beta subcomplex subunit 5, mitochondrial (Fragment)   | Ndufb5           | 172  | integral component of membrane [GO:0016021]  | NDUFB5; NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 beta subcomplex subunit 5   | 3/3 | 34360000 | 33819267 |  |
| F6Y6V5     | NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 beta subcomplex subunit 5, mitochondrial (Fragment)   | Ndufb5           | 135  | integral component of membrane [GO:0016021]  | NDUFB5; NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 beta subcomplex subunit 5   | 3/3 | 34360000 | 33819267 |  |
| A0A1B0GS58 | Glutaredoxin-3  | Glrx3            | 374  | cell [GO:0005623]; electron transfer activity [GO:0009055]; protein disulfide oxidoreductase activity [GO:0015035]; cell redox homeostasis [GO:0045454]  | N.D.  | 3/3 | 33320000 | 49186840 |  |
| Q8C4U8     | EGF-like repeat and discoidin I-like domain-containing protein 3 (EGF-like repeats and discoidin I-like domains 3, isoform CRA_a) | Edil3 mCG_142525 | 470  | calcium ion binding [GO:0005509]; integrin binding [GO:0005178]  | N.D.  | 3/3 | 32743333 | 37643348 |  |
| E9Q3Z4     | Hexokinase-3  | Hk3              | 867  | cell [GO:0005623]; ATP binding [GO:0005524]; glucose binding [GO:0005536]; hexokinase activity [GO:0004396]; cellular glucose homeostasis [GO:0001678]; glycolytic process [GO:0006096]                          | HK; hexokinase [EC:2.7.1.1]   | 3/3 | 31420000 | 19042615 |  |
| A0A1L1SVG0 | Uveal autoantigen with coiled-coil domains and ankyrin repeats  | Uaca             | 1411 | apoptotic signaling pathway [GO:0097190]; regulation of NIK/NF-kappaB signaling [GO:1901222]   | N.D.  | 3/3 | 30466667 | 19887266 |  |
| Q8C605     | ATP-dependent 6-phosphofructokinase (ATP-PFK) (Phosphofructokinase) (EC 2.7.1.11) (Phosphohexokinase)                             | Pfkp             | 784  | cytoplasm [GO:0005737]; 6-phosphofructokinase activity [GO:0003872]; ATP binding [GO:0005524]; metal ion binding [GO:0046872]; fructose 6-phosphate metabolic process [GO:0006002]                               | pfkA; 6-phosphofructokinase 1 [EC:2.7.1.11]   | 3/3 | 30466667 | 31032617 |  |
| D6RFN2     | Eukaryotic translation initiation factor 2A   | Eif2a            | 59   | N.D.   | N.D.  | 3/3 | 30066667 | 5204165  |  |
| D6RGA6     | Eukaryotic translation initiation factor 2A   | Eif2a            | 60   | N.D.   | N.D.  | 3/3 | 30066667 | 5204165  |  |
| E0CXA9     | MOB-like protein phocein  | Mob4             | 204  | N.D.   | N.D.  | 3/3 | 27323333 | 17806056 |  |
| D3YW25     | Ninjurin 1, isoform CRA_a (Ninjurin-1)  | Ninj1 mCG_15642  | 210  | integral component of membrane [GO:0016021]; cell adhesion [GO:0007155]; tissue regeneration [GO:0042246]  | N.D.  | 3/3 | 27200000 | 6802206  |  |
| D6RFN5     | Ninjurin-1  | Ninj1            | 110  | integral component of membrane [GO:0016021]; cell adhesion [GO:0007155]; tissue regeneration [GO:0042246]  | N.D.  | 3/3 | 27200000 | 6802206  |  |
| B1B1D8     | 39S ribosomal protein L2, mitochondrial   | Mrpl2            | 304  | ribosome [GO:0005840]; structural constituent of ribosome [GO:0003735]; translation [GO:0006412]   | RP-L2; large subunit ribosomal protein L2   | 3/3 | 27100000 | 14062717 |  |

|            |   |                  |      |  |   |     |          |          |
|------------|---|------------------|------|--|---|-----|----------|----------|
| A0A2I3BPT1 | Amyloid-beta A4 protein   | App              | 733  | integral component of membrane [GO:0016021]; heparin binding [GO:0008201]; serine-type endopeptidase inhibitor activity [GO:0004867]; transition metal ion binding [GO:0046914]; nervous system development [GO:0007399] | APP; amyloid beta A4 protein  | 3/3 | 25810000 | 17285002 |
| A0A2I3BQZ9 | Amyloid-beta A4 protein   | App              | 751  | integral component of membrane [GO:0016021]; heparin binding [GO:0008201]; serine-type endopeptidase inhibitor activity [GO:0004867]; transition metal ion binding [GO:0046914]; nervous system development [GO:0007399] | APP; amyloid beta A4 protein  | 3/3 | 25810000 | 17285002 |
| Q3TWF3     | Amyloid-beta A4 protein   | App              | 752  | integral component of membrane [GO:0016021]; heparin binding [GO:0008201]; serine-type endopeptidase inhibitor activity [GO:0004867]; transition metal ion binding [GO:0046914]; nervous system development [GO:0007399] | APP; amyloid beta A4 protein  | 3/3 | 25810000 | 17285002 |
| A0A1L1STY4 | Uveal autoantigen with coiled-coil domains and ankyrin repeats (Fragment)       | Uaca             | 1236 | apoptotic signaling pathway [GO:0097190]; regulation of NIK/NF-kappaB signaling [GO:1901222]   | N.D.  | 3/3 | 25460000 | 16573075 |
| A0A2I3BPS6 | Inactive ubiquitin thioesterase OTULINL   | Otulini          | 317  | N.D.   | N.D.  | 3/3 | 21526667 | 21809175 |
| A2AAN0     | Exocyst complex component 7 (Exocyst complex component Exo70)                   | Exoc7            | 684  | exocyst [GO:0000145]; exocytosis [GO:0006887]; protein transport [GO:0015031]  | EXOC7; exocyst complex component 7  | 3/3 | 21243333 | 19784606 |
| Q5SVW9     | Transmembrane emp24 domain-containing protein 4 (Fragment)                      | Tmed4            | 170  | integral component of membrane [GO:0016021]  | TMED4_9_11; p24 family protein alpha  | 3/3 | 20966667 | 6395571  |
| Q8C391     | Exocyst complex component 4   | Exoc4 Sec81      | 506  | exocyst [GO:0000145]; vesicle docking involved in exocytosis [GO:0006904]; vesicle tethering involved in exocytosis [GO:0090522]   | EXOC4; exocyst complex component 4  | 3/3 | 18273333 | 15961959 |
| Q9CXE1     | Exocyst complex component 4   | Exoc4 Sec81      | 522  | exocyst [GO:0000145]; vesicle docking involved in exocytosis [GO:0006904]; vesicle tethering involved in exocytosis [GO:0090522]   | EXOC4; exocyst complex component 4  | 3/3 | 18273333 | 15961959 |
| A0A087WNN1 | SLIT-ROBO Rho GTPase-activating protein 2                                       | Srgap2           | 858  | GTPase activator activity [GO:0005096]; signal transduction [GO:0007165]   | SRGAP; SLIT-ROBO Rho GTPase activating protein  | 3/3 | 17590000 | 10931070 |
| A2ARZ7     | RAB22A, member RAS oncogene family, isoform CRA_c (Ras-related protein Rab-22A) | Rab22a mCG_13765 | 187  | GTP binding [GO:0005525]; GTPase activity [GO:0003924]   | RAB22; Ras-related protein Rab-22   | 3/3 | 17433333 | 9727453  |
| Q5SS83     | Flotillin 2, isoform CRA_a (Flotillin-2)  | Flot2 mCG_10827  | 428  | N.D.   | FLOT; flotillin   | 3/3 | 17066667 | 1011599  |
| G3UYU4     | Flotillin-1   | Flot1            | 380  | N.D.   | FLOT; flotillin   | 3/3 | 16966667 | 3233162  |
| A0A338P6X4 | Trifunctional purine biosynthetic protein adenosine-3 (Fragment)                | Gart             | 199  | ATP binding [GO:0005524]; metal ion binding [GO:0046872]; phosphoribosylamine-glycine ligase activity [GO:0004637]; purine nucleobase biosynthetic process [GO:0009113]  | GART; phosphoribosylamine-glycine ligase / phosphoribosylglycinamide formyltransferase / phosphoribosylformylglycinamide cyclo-ligase [EC:6.3.4.13 2.1.2.2 6.3.3.1] | 3/3 | 13976667 | 10195079 |
| E9Q715     | Putative RNA-binding protein Luc7-like 2  | Luc7l2           | 272  | U1 snRNP [GO:0005685]; mRNA binding [GO:0003729]; mRNA splice site selection [GO:0006376]  | LUC7L2; RNA-binding protein Luc7-like 2   | 3/3 | 12256667 | 6028634  |
| Q05CX5     | Luc7l2 protein (Putative RNA-binding protein Luc7-like 2)                       | Luc7l2           | 339  | U1 snRNP [GO:0005685]; mRNA binding [GO:0003729]; mRNA splice site selection [GO:0006376]  | LUC7L2; RNA-binding protein Luc7-like 2   | 3/3 | 12256667 | 6028634  |
| A2AFK7     | Eukaryotic initiation factor 4A-III (Fragment)                                  | Eif4a3           | 299  | ATP binding [GO:0005524]; nucleic acid binding [GO:0003676]  | EIF4A3; ATP-dependent RNA helicase [EC:3.6.4.13]  | 3/3 | 11986667 | 3131538  |
| E9PWE9     | Tyrosine-protein kinase (EC 2.7.10.2)   | Syk              | 583  | cytoplasm [GO:0005737]; ATP binding [GO:0005524]; non-membrane spanning protein tyrosine kinase activity [GO:0004715]; intracellular signal transduction [GO:0035556]  | SYK; spleen tyrosine kinase [EC:2.7.10.2]   | 3/3 | 11840000 | 10399750 |
| A0A1D5RSL1 | Epidermal growth factor receptor substrate 15-like 1                            | Eps15l1          | 599  | calcium ion binding [GO:0005509]   | EPS15; epidermal growth factor receptor substrate 15  | 3/3 | 11243333 | 3814136  |
| E9PUF4     | RNA-binding protein 26  | Rbm26            | 983  | metal ion binding [GO:0046872]; RNA binding [GO:0003723]; mRNA processing [GO:0006397]   | RBM26; RNA-binding protein 26   | 3/3 | 11206667 | 6936284  |

|            |   |                          |      |  |   |     |          |           |
|------------|---|--------------------------|------|--|---|-----|----------|-----------|
| E9Q640     | RNA-binding protein 26  | Rbm26                    | 1001 | metal ion binding [GO:0046872]; RNA binding [GO:0003723]; mRNA processing [GO:0006397]   | RBM26; RNA-binding protein 26   | 3/3 | 11206667 | 6936284   |
| Q3U019     | Sorting nexin-8   | Snx8                     | 411  | cytosol [GO:0005829]; phosphatidylinositol binding [GO:0035091]; retrograde transport, endosome to Golgi [GO:0042147]  | SNX8; sorting nexin-8   | 3/3 | 10053333 | 10234243  |
| A0A0R4J1C2 | Calpain small subunit 1   | Capns1                   | 200  | calcium ion binding [GO:0005509]   | CAPNS1; calpain, small subunit 1  | 3/3 | 9320000  | 5892470   |
| A2AWJ3     | Dolichyl pyrophosphate phosphatase 1, isoform CRA_b (Dolichyldiphosphatase 1)         | Dolpp1<br>mCG_18292      | 195  | integral component of membrane [GO:0016021]; hydrolase activity [GO:0016787]   | E3.6.1.43;<br>dolichyldiphosphatase [EC:3.6.1.43]                                 | 3/3 | 9176667  | 4716294   |
| E9QPI5     | Sister chromatid cohesion protein homolog A   | Pds5a                    | 1332 | chromatin [GO:0000785]; nucleoplasm [GO:0005654]; plasma membrane [GO:0005886]; mitotic sister chromatid cohesion [GO:0007064]; negative regulation of DNA replication [GO:0008156]  | PDS5; sister chromatid cohesion protein PDS5                                      | 3/3 | 8543333  | 7803181   |
| A0A1B0GR35 | Alpha-soluble NSF attachment protein  | Napa                     | 68   | N.D.   | N.D.  | 3/3 | 8013333  | 3228627   |
| D6RDQ8     | Calcium/calmodulin-dependent protein kinase type II subunit delta                     | Camk2d                   | 147  | ATP binding [GO:0005524]; calmodulin-dependent protein kinase activity [GO:0004683]  | CAMK2; calcium/calmodulin-dependent protein kinase (CaM kinase) II [EC:2.7.11.17] | 3/3 | 7916667  | 3116638   |
| A0A2I3BQ50 | Acyl-CoA-binding domain-containing protein 5  | Acbd5                    | 520  | integral component of membrane [GO:0016021]; fatty-acyl-CoA binding [GO:0000062]; lipid binding [GO:0008289]; autophagy of peroxisome [GO:0030242]   | N.D.  | 3/3 | 7870000  | 5219952   |
| E9PYZ7     | RNA-binding protein 26  | Rbm26                    | 1009 | metal ion binding [GO:0046872]; RNA binding [GO:0003723]; mRNA processing [GO:0006397]   | RBM26; RNA-binding protein 26   | 3/3 | 7576667  | 1665333   |
| A0A087WPE4 | Elongin-C (Fragment)  | Eloc Tceb1               | 51   | ubiquitin-dependent protein catabolic process [GO:0006511]   | ELOC; elongin-C   | 3/3 | 7210000  | 4049901   |
| G3UYI4     | 26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 11                                       | Psm11                    | 113  | proteasome assembly [GO:0043248]   | PSMD11; 26S proteasome regulatory subunit N6                                      | 3/3 | 6856667  | 4026988   |
| E0CY88     | Cytochrome b5   | Cyb5a                    | 110  | integral component of membrane [GO:0016021]  | N.D.  | 3/3 | 6298333  | 6079417   |
| E9Q009     | CD180 antigen   | Cd180                    | 105  | N.D.   | N.D.  | 3/3 | 5080000  | 2714535   |
| F2Z425     | CD180 antigen   | Cd180                    | 86   | N.D.   | N.D.  | 3/3 | 5080000  | 2714535   |
| B1AT82     | MCG6846, isoform CRA_c (Phosphoribosyl pyrophosphate synthase-associated protein 1)   | Prpsap1<br>mCG_6846      | 385  | identical protein binding [GO:0042802]; magnesium ion binding [GO:0000287]; ribose phosphate diphosphokinase activity [GO:0004749]; nucleoside metabolic process [GO:0009116]; nucleotide biosynthetic process [GO:0009165]  | N.D.  | 3/3 | 4590333  | 5998985   |
| Q9DCW5     | Cytochrome c oxidase subunit 6A, mitochondrial (Cytochrome c oxidase polypeptide VIa) | Cox6a1<br>mCG_19235      | 112  | integral component of membrane [GO:0016021]; mitochondrial respiratory chain complex IV [GO:0005751]; cytochrome-c oxidase activity [GO:0004129]   | COX6A; cytochrome c oxidase subunit 6a  | 2/3 | 35450000 | 125157900 |
| B2RT14     | UDP-glucuronosyltransferase (EC 2.4.1.17)   | Ugt1a5<br>mCG_14318      | 529  | endoplasmic reticulum [GO:0005783]; integral component of membrane [GO:0016021]; intracellular membrane-bounded organelle [GO:0043231]; enzyme binding [GO:0019899]; glucuronosyltransferase activity [GO:0015020]; protein heterodimerization activity [GO:0046982]; protein homodimerization activity [GO:0042803]; UDP-glycosyltransferase activity [GO:0008194]; cellular glucuronidation [GO:0052695]; flavonoid glucuronidation [GO:0052696]; xenobiotic glucuronidation [GO:0052697]  | UGT; glucuronosyltransferase [EC:2.4.1.17]  | 2/3 | 33500000 | 284256926 |
| D3Z748     | UDP-glucuronosyltransferase (EC 2.4.1.17)   | Ugt1a8                   | 530  | integral component of membrane [GO:0016021]; intracellular membrane-bounded organelle [GO:0043231]; glucuronosyltransferase activity [GO:0015020]; UDP-glycosyltransferase activity [GO:0008194]; flavonoid glucuronidation [GO:0052696]; xenobiotic glucuronidation [GO:0052697]  | UGT; glucuronosyltransferase [EC:2.4.1.17]  | 2/3 | 32950000 | 276478751 |
| E9PXN7     | UDP-glucuronosyltransferase (EC 2.4.1.17)   | Ugt1a10                  | 530  | endoplasmic reticulum [GO:0005783]; integral component of membrane [GO:0016021]; intracellular membrane-bounded organelle [GO:0043231]; membrane [GO:0016020]; drug binding [GO:0008144]; enzyme binding [GO:0019899]; enzyme inhibitor activity [GO:0004857]; fatty acid binding [GO:0005504]; glucuronosyltransferase activity [GO:0015020]; protein heterodimerization activity [GO:0046982]; protein homodimerization activity [GO:0042803]; protein kinase C binding [GO:0005080]; steroid binding [GO:0005496]; UDP-glycosyltransferase activity [GO:0008194]; flavonoid glucuronidation [GO:0052696]; xenobiotic glucuronidation [GO:0052697] | UGT; glucuronosyltransferase [EC:2.4.1.17]  | 2/3 | 32850000 | 275064538 |
| Q3U687     | Interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 1B-like 2                   | Ifit1b2<br>2010002M12Rik | 466  | cytoplasm [GO:0005737]; cytosol [GO:0005829]; RNA binding [GO:0003723]; defense response to virus [GO:0051607]   | IFIT1; interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 1                | 2/3 | 30100000 | 213546248 |

|            |   |                                      |      |   |   |     |           |           |
|------------|---|--------------------------------------|------|---|---|-----|-----------|-----------|
| E9Q397     | Spectrin beta chain   | Sptb Spnb1                           | 2137 | spectrin [GO:0008091]; actin binding [GO:0003779]; structural constituent of cytoskeleton [GO:0005200]; actin filament capping [GO:0051693]   | SPTB; spectrin beta   | 2/3 | 298500000 | 205768073 |
| Q3UGX2     | Spectrin beta chain   | Sptb Spnb1<br>mCG_123942             | 2329 | cytosol [GO:0005829]; Golgi apparatus [GO:0005794]; protein-containing complex [GO:0032991]; spectrin [GO:0008091]; spectrin-associated cytoskeleton [GO:0014731]; actin filament binding [GO:0051015]; ankyrin binding [GO:0030506]; phospholipid binding [GO:0005543]; structural constituent of cytoskeleton [GO:0005200]; actin filament capping [GO:0051693]   | SPTB; spectrin beta   | 2/3 | 298500000 | 205768073 |
| E9Q1Z6     | Predicted gene 14548  | Gm14548                              | 680  | N.D.  | LILR; leukocyte immunoglobulin-like receptor                            | 2/3 | 285700000 | 383676139 |
| A0A338P6E8 | High mobility group protein HMG-I/HMG-Y   | Hmga1                                | 111  | chromatin [GO:0000785]; nucleus [GO:0005634]; DNA binding [GO:0003677]; regulation of transcription, DNA-templated [GO:0006355]   | HMGA1; high mobility group AT-hook protein 1                            | 2/3 | 285450000 | 398171828 |
| A0A384DV79 | High mobility group protein HMG-I/HMG-Y   | Hmga1                                | 95   | chromatin [GO:0000785]; nucleus [GO:0005634]; DNA binding [GO:0003677]; regulation of transcription, DNA-templated [GO:0006355]   | HMGA1; high mobility group AT-hook protein 1                            | 2/3 | 285450000 | 398171828 |
| Q3TE85     | High mobility group protein HMG-I/HMG-Y   | Hmga1                                | 106  | chromatin [GO:0000785]; nucleus [GO:0005634]; DNA binding [GO:0003677]; regulation of transcription, DNA-templated [GO:0006355]   | HMGA1; high mobility group AT-hook protein 1                            | 2/3 | 285450000 | 398171828 |
| E9PYB0     | AHNAK nucleoprotein 2 (Fragment)  | Ahnak2                               | 1738 | costamere [GO:0043034]; cytoplasm [GO:0005737]; cytoplasmic vesicle membrane [GO:0030659]; cytosol [GO:0005829]; plasma membrane [GO:0005886]; T-tubule [GO:0030315]; Z disc [GO:0030018]; regulation of RNA splicing [GO:0043484]  | N.D.  | 2/3 | 242500000 | 152027958 |
| A2AH85     | 116 kDa U5 small nuclear ribonucleoprotein component (Elongation factor Tu GTP binding domain containing 2) | Eftud2<br>mCG_49887                  | 972  | Cajal body [GO:0015030]; cytosol [GO:0005829]; nuclear speck [GO:0016607]; U2-type catalytic step 2 spliceosome [GO:0071007]; U4/U6 x U5 tri-snRNP complex [GO:0046540]; GTP binding [GO:0005525]; GTPase activity [GO:0003924]; translation elongation factor activity [GO:0003746]; cellular response to drug [GO:0035690]; response to cocaine [GO:0042220]  | EFTUD2; 116 kDa U5 small nuclear ribonucleoprotein component            | 2/3 | 242000000 | 18384776  |
| A0A1Y7VP01 | Peptidylprolyl isomerase (EC 5.2.1.8) (Fragment)  | Fkbp3                                | 149  | peptidyl-prolyl cis-trans isomerase activity [GO:0003755]   | FKBP3; FK506-binding protein 3 [EC:5.2.1.8]                             | 2/3 | 232000000 | 53740115  |
| A0A0R4J0H0 | Echinoderm microtubule-associated protein-like 4  | Eml4                                 | 876  | N.D.  | EML4; echinoderm microtubule-associated protein-like 4                  | 2/3 | 212000000 | 69296465  |
| F8WJ93     | Echinoderm microtubule-associated protein-like 4  | Eml4                                 | 988  | N.D.  | EML4; echinoderm microtubule-associated protein-like 4                  | 2/3 | 212000000 | 69296465  |
| A2A7Q5     | Prolyl 3-hydroxylase 1  | P3h1                                 | 748  | endoplasmic reticulum [GO:0005783]; iron ion binding [GO:0005506]; L-ascorbic acid binding [GO:0031418]; procollagen-proline 3-dioxygenase activity [GO:0019797]; bone development [GO:0060348]; collagen metabolic process [GO:0032963]; negative regulation of post-translational protein modification [GO:1901874]; protein folding [GO:0006457]; protein stabilization [GO:0050821]; regulation of protein secretion [GO:0050708]   | P3H1; procollagen-proline 3-dioxygenase 1 [EC:1.14.11.7]                | 2/3 | 209500000 | 113844192 |
| A6PW84     | Prolyl 3-hydroxylase 1  | P3h1                                 | 746  | iron ion binding [GO:0005506]; L-ascorbic acid binding [GO:0031418]; procollagen-proline 3-dioxygenase activity [GO:0019797]; collagen metabolic process [GO:0032963]   | P3H1; procollagen-proline 3-dioxygenase 1 [EC:1.14.11.7]                | 2/3 | 209500000 | 113844192 |
| D3Z2Z1     | CAP-Gly domain-containing linker protein 1  | Clip1                                | 1426 | N.D.  | CLIP1; CAP-Gly domain-containing linker protein 1                       | 2/3 | 194400000 | 164897301 |
| F8WIA1     | CAP-Gly domain-containing linker protein 1  | Clip1                                | 1437 | N.D.  | CLIP1; CAP-Gly domain-containing linker protein 1                       | 2/3 | 194400000 | 164897301 |
| Q80UE4     | Band 4.1-like protein 2 (Epb4.112 protein) (Protein 4.1G)   | Epb4112<br>EBP4.1L2<br>Epb4.112      | 794  | cytoskeleton [GO:0005856]; actin binding [GO:0003779]; structural molecule activity [GO:0005198]  | EPB41; erythrocyte membrane protein band 4.1                            | 2/3 | 188550000 | 132158257 |
| E9QKK1     | Centromere-associated protein E   | Cenpe                                | 2471 | condensed chromosome, centromeric region [GO:0000779]; cytosol [GO:0005829]; kinetochore [GO:0000776]; kinetochore microtubule [GO:0005828]; midbody [GO:0030496]; mitotic spindle midzone [GO:1990023]; nucleoplasm [GO:0005654]; ATP binding [GO:0005524]; kinetochore binding [GO:0043515]; microtubule binding [GO:0008017]; microtubule motor activity [GO:0003777]; kinetochore assembly [GO:0051382]; lateral attachment of mitotic spindle microtubules to kinetochore [GO:0099607]; microtubule plus-end directed mitotic chromosome migration [GO:0099606]; mitotic chromosome movement towards spindle pole [GO:0007079]; mitotic spindle organization [GO:0007052]; positive regulation of protein kinase activity [GO:0045860]; regulation of mitotic metaphase/anaphase transition [GO:0030071] | CENPE; centromeric protein E  | 2/3 | 182500000 | 113844192 |
| D3Z7Q3     | Guanine nucleotide-binding protein subunit gamma  | Gng5                                 | 67   | heterotrimeric G-protein complex [GO:0005834]; GTPase activity [GO:0003924]; G protein-coupled receptor signaling pathway [GO:0007186]  | GNG5; guanine nucleotide-binding protein G(i)/G(S)/G(O) subunit gamma-5 | 2/3 | 166750000 | 96520076  |
| Q3U422     | NADH dehydrogenase [ubiquinone] flavoprotein 3, mitochondrial (RIKEN cDNA 1500032D16, isoform CRA_a)        | Ndufv3<br>1500032D16Rik<br>mCG_14261 | 468  | mitochondrial respiratory chain complex I [GO:0005747]  | NDUFV3; NADH dehydrogenase (ubiquinone) flavoprotein 3                  | 2/3 | 158000000 | 8485281   |
| A0A087WRT2 | Actin-related protein 2/3 complex subunit 2 (Fragment)  | Arpc2                                | 26   | N.D.  | N.D.  | 2/3 | 151000000 | 21213203  |
| D3ZQL4     | MICOS complex subunit (Fragment)  | Chchd3                               | 192  | MICOS complex [GO:0061617]  | CHCHD3; coiled-coil-helix-coiled-coil                                   | 2/3 | 121500000 | 58689863  |

|            |   |                  |      |  |  |  |     |           |           |  |
|------------|---|------------------|------|--|--|--|-----|-----------|-----------|--|
|            |   |                  |      |  |  | helix domain-containing protein 3, mitochondrial |     |           |           |  |
| Q9D9P1     | MICOS complex subunit   | Chchd3           | 175  | MICOS complex [GO:0061617]; mitochondrion [GO:0005739]   | CHCHD3; coiled-coil-helix-coiled-coil-helix domain-containing protein 3, mitochondrial |  | 2/3 | 121500000 | 58689863  |  |
| S4R238     | MICOS complex subunit   | Chchd3           | 84   | MICOS complex [GO:0061617]   | CHCHD3; coiled-coil-helix-coiled-coil-helix domain-containing protein 3, mitochondrial |  | 2/3 | 121500000 | 58689863  |  |
| A0A286YCS6 | Adenylyl cyclase-associated protein   | Cap2             | 421  | actin binding [GO:0003779]; cell morphogenesis [GO:0000902]; cytoskeleton organization [GO:0007010]  | CAP1_2; adenylyl cyclase-associated protein  |  | 2/3 | 105900000 | 36910974  |  |
| D3YTR7     | Adenylyl cyclase-associated protein   | Cap2             | 364  | actin binding [GO:0003779]; cell morphogenesis [GO:0000902]; cytoskeleton organization [GO:0007010]  | CAP1_2; adenylyl cyclase-associated protein  |  | 2/3 | 105900000 | 36910974  |  |
| A0A1B0GT70 | Erlin-2 (Fragment)  | Erlin2           | 251  | endoplasmic reticulum [GO:0005783]; ubiquitin protein ligase binding [GO:0031625]; ubiquitin-dependent ERAD pathway [GO:0030433]   | N.D.   |  | 2/3 | 101750000 | 117733279 |  |
| A2AKU9     | ATP synthase subunit gamma  | Atp5c1           | 297  | proton-transporting ATP synthase complex, catalytic core F(1) [GO:0045261]; proton-transporting ATP synthase activity, rotational mechanism [GO:0046933]; ATP synthesis coupled proton transport [GO:0015986]  | ATPeF1G; F-type H <sup>+</sup> -transporting ATPase subunit gamma                      |  | 2/3 | 101750000 | 38537320  |  |
| D3Z3M7     | CAP-Gly domain-containing linker protein 1  | Clip1            | 1320 | N.D.   | CLIP1; CAP-Gly domain-containing linker protein 1                                      |  | 2/3 | 101400000 | 33375440  |  |
| F6RCU2     | CAP-Gly domain-containing linker protein 1 (Fragment)   | Clip1            | 1066 | N.D.   | CLIP1; CAP-Gly domain-containing linker protein 1                                      |  | 2/3 | 101400000 | 33375440  |  |
| A0A2I3BPY7 | Ankyrin   | Rai14            | 950  | N.D.   | N.D.   |  | 2/3 | 99715000  | 134753339 |  |
| J3QPBS     | Nucleoporin NDC1  | Ndc1 Tmem48      | 541  | integral component of membrane [GO:0016021]  | NDC1; nucleoporin NDC1   |  | 2/3 | 99350000  | 10818734  |  |
| D3YYF2     | Protein polybromo-1 (Fragment)  | Pbrm1            | 1460 | RSC-type complex [GO:0016586]; chromatin binding [GO:0003682]; DNA binding [GO:0003677]; chromatin remodeling [GO:0006338]   | PBRM1; protein polybromo-1   |  | 2/3 | 91300000  | 50487424  |  |
| F8VQD1     | Protein polybromo-1   | Pbrm1            | 1704 | nucleoplasm [GO:0005654]; RSC-type complex [GO:0016586]; chromatin binding [GO:0003682]; DNA binding [GO:0003677]; chromatin remodeling [GO:0006338]; negative regulation of cell population proliferation [GO:0008285]  | PBRM1; protein polybromo-1   |  | 2/3 | 91300000  | 50487424  |  |
| D6RFU9     | Synaptophysin-like protein  | Sypl             | 79   | membrane [GO:0016020]; synaptic vesicle [GO:0008021]   | N.D.   |  | 2/3 | 90400000  | 14990664  |  |
| E9QJS0     | 28S ribosomal protein S10, mitochondrial  | Mrps10           | 160  | mitochondrial small ribosomal subunit [GO:0005763]; structural constituent of ribosome [GO:0003735]; translation [GO:0006412]  | RP-S10; small subunit ribosomal protein S10  |  | 2/3 | 87900000  | 13576450  |  |
| G5E8U5     | 28S ribosomal protein S10, mitochondrial (Mitochondrial ribosomal protein S10, isoform CRA_c) | Mrps10 mCG_15571 | 201  | mitochondrial small ribosomal subunit [GO:0005763]; structural constituent of ribosome [GO:0003735]; translation [GO:0006412]  | RP-S10; small subunit ribosomal protein S10  |  | 2/3 | 87900000  | 13576450  |  |
| G5E8U8     | 28S ribosomal protein S10, mitochondrial (Mitochondrial ribosomal protein S10, isoform CRA_b) | Mrps10 mCG_15571 | 200  | mitochondrial small ribosomal subunit [GO:0005763]; structural constituent of ribosome [GO:0003735]; translation [GO:0006412]  | RP-S10; small subunit ribosomal protein S10  |  | 2/3 | 87900000  | 13576450  |  |
| Q3TBA3     | Antigen peptide transporter 1   | Tap1             | 696  | TAP complex [GO:0042825]; ATP binding [GO:0005524]; MHC protein binding [GO:0042287]; peptide antigen-transporting ATPase activity [GO:0015433]; TAP2 binding [GO:0046979]; antigen processing and presentation of exogenous peptide antigen via MHC class I, TAP-dependent [GO:0002479] | ABCB2; ATP-binding cassette, subfamily B (MDR/TAP), member 2                           |  | 2/3 | 85000000  | 98994949  |  |
| E9Q7L3     | Protein polybromo-1   | Pbrm1            | 1582 | RSC-type complex [GO:0016586]; chromatin binding [GO:0003682]; DNA binding [GO:0003677]; chromatin remodeling [GO:0006338]   | PBRM1; protein polybromo-1   |  | 2/3 | 84100000  | 60669762  |  |
| D3Z3R4     | Protein polybromo-1 (Fragment)  | Pbrm1            | 931  | RSC-type complex [GO:0016586]; chromatin remodeling [GO:0006338]   | PBRM1; protein polybromo-1   |  | 2/3 | 83100000  | 59255548  |  |
| A0A2I3BQ16 | Leucine-rich repeat and calponin homology domain-containing protein 1                         | Lrch1            | 682  | N.D.   | N.D.   |  | 2/3 | 82120000  | 110138952 |  |
| G3UY77     | Mitochondrial import receptor subunit TOM40 homolog (Fragment)                                | Tomm40           | 73   | mitochondrial outer membrane [GO:0005741]; protein transmembrane transporter activity [GO:0008320]; protein import into mitochondrial matrix [GO:0030150]  | TOM40; mitochondrial import receptor subunit TOM40                                     |  | 2/3 | 81800000  | 55437172  |  |
| Q3UH59     | Myosin-10   | Myh10            | 2013 | myosin complex [GO:0016459]; actin filament binding [GO:0051015]; ATP binding [GO:0005524]; motor activity [GO:0003774]  | MYH; myosin heavy chain  |  | 2/3 | 80000000  | 72124892  |  |
| Q5SV64     | Myosin-10   | Myh10            | 2007 | myosin complex [GO:0016459]; actin filament binding [GO:0051015]; ATP binding [GO:0005524]; motor activity [GO:0003774]  | MYH; myosin heavy chain  |  | 2/3 | 80000000  | 72124892  |  |
| A0A0N4SUW4 | CCA tRNA nucleotidyltransferase 1, mitochondrial (Fragment)                                   | Trnt1            | 134  | nucleotidyltransferase activity [GO:0016779]; RNA binding [GO:0003723]; RNA processing [GO:0006396]  | cca; tRNA nucleotidyltransferase (CCA-adding enzyme) [EC:2.7.7.72 3.1.3.-3.1.4.-]      |  | 2/3 | 79200000  | 69013622  |  |
| A0A3B2W7V8 | Tight junction protein ZO-2   | Tjp2             | 1258 | bicellular tight junction [GO:0005923]   | TJP2; tight junction protein 2   |  | 2/3 | 77375000  | 105535687 |  |

|            |   |                              |      |  |   |     |          |           |
|------------|---|------------------------------|------|--|---|-----|----------|-----------|
| A0A3B2WCN9 | Tight junction protein 2, isoform CRA_c (Tight junction protein ZO-2)                             | Tjp2<br>mCG_14589            | 1190 | bicellular tight junction [GO:0005923]   | TJP2; tight junction protein 2  | 2/3 | 77375000 | 105535687 |
| A2AU62     | RNA-binding protein Raly (Fragment)   | Raly                         | 298  | RNA binding [GO:0003723]   | RALY; heterogeneous nuclear ribonucleoprotein C-like 2                | 2/3 | 76950000 | 29344931  |
| A0A0R4J0P5 | Proline-serine-threonine phosphatase-interacting protein 1  | Pstpip1                      | 415  | identical protein binding [GO:0042802]   | PSTPIP1; proline-serine-threonine phosphatase interacting protein 1   | 2/3 | 75900000 | 19798990  |
| E9QAJ9     | Rho GTPase-activating protein 17  | Arhgap17                     | 818  | cytoplasm [GO:0005737]; GTPase activator activity [GO:0005096]; signal transduction [GO:0007165]   | ARHGAP17; Rho GTPase-activating protein 17                            | 2/3 | 73200000 | 61942554  |
| G3UWL8     | Phosphatidate cytidyltransferase, mitochondrial (Fragment)  | Tamm41<br>1500001M20Rik      | 221  | phosphatidate cytidyltransferase activity [GO:0004605]; cardiolipin biosynthetic process [GO:0032049]  | TAM41; mitochondrial translocator assembly and maintenance protein 41 | 2/3 | 72750000 | 19445436  |
| B2RQC7     | DIP2 disco-interacting protein 2 homolog B (Drosophila) (Disco-interacting protein 2 homolog B)   | Dip2b                        | 1340 | catalytic activity [GO:0003824]  | N.D.  | 2/3 | 72550000 | 51548084  |
| B7FAU7     | ATPase, H+ transporting, lysosomal accessory protein (V-type proton ATPase subunit S1) (Fragment) | Atp6ap1 RP23-<br>436K3.7-009 | 272  | proton-transporting V-type ATPase, V1 domain [GO:0033180]; proton-transporting ATP synthase activity, rotational mechanism [GO:0046933]; proton-transporting ATPase activity, rotational mechanism [GO:0046961]; ATP hydrolysis coupled proton transport [GO:0015991]  | ATPeVS1; V-type H+-transporting ATPase S1 subunit                     | 2/3 | 67350000 | 1202082   |
| A2A6E1     | CDK5 regulatory subunit-associated protein 3 (Fragment)   | Cdk5rap3                     | 124  | N.D.   | N.D.  | 2/3 | 64400000 | 16263456  |
| H9KV15     | Protein SON   | Son                          | 2343 | RNA binding [GO:0003723]; regulation of cell cycle [GO:0051726]; regulation of RNA splicing [GO:0043484]   | N.D.  | 2/3 | 63190000 | 77513045  |
| A0A0G2JDI9 | ATP-binding cassette sub-family D member 3  | Abcd3                        | 549  | integral component of membrane [GO:0016021]; peroxisome [GO:0005777]; ATP binding [GO:0005524]; ATPase activity, coupled to transmembrane movement of substances [GO:0042626]; protein homodimerization activity [GO:0042803]; long-chain fatty acid import into peroxisome [GO:0015910]   | ABCD3; ATP-binding cassette, subfamily D (ALD), member 3              | 2/3 | 56600000 | 11030866  |
| Q8BGK0     | NAD(P) transhydrogenase, mitochondrial  | Nnt                          | 835  | integral component of membrane [GO:0016021]; oxidoreductase activity [GO:0016491]  | NNT; H+-translocating NAD(P) transhydrogenase [EC:1.6.1.2 7.1.1.1]    | 2/3 | 55745000 | 66828662  |
| Q8C9V5     | NAD(P) transhydrogenase, mitochondrial  | Nnt                          | 721  | integral component of membrane [GO:0016021]; oxidoreductase activity [GO:0016491]  | NNT; H+-translocating NAD(P) transhydrogenase [EC:1.6.1.2 7.1.1.1]    | 2/3 | 55745000 | 66828662  |
| A0A1B0GSD8 | Erlin-2 (Fragment)  | Erlin2                       | 220  | endoplasmic reticulum [GO:0005783]; ubiquitin protein ligase binding [GO:0031625]; ubiquitin-dependent ERAD pathway [GO:0030433]   | N.D.  | 2/3 | 53500000 | 22344574  |
| C0H5X4     | GTPase HRas (Harvey rat sarcoma virus oncogene 1, isoform CRA_a) (Hras1 protein)                  | Hras Hras1<br>mCG_22575      | 119  | membrane [GO:0016020]; GTP binding [GO:0005525]; GTPase activity [GO:0003924]; signal transduction [GO:0007165]  | N.D.  | 2/3 | 53200000 | 46810469  |
| E9QNY8     | Sacsin  | Sacs                         | 4582 | N.D.   | SACS; saccin  | 2/3 | 50950000 | 42355696  |
| MOQWP2     | ER membrane protein complex subunit 8 (Fragment)  | Emc8                         | 143  | N.D.   | N.D.  | 2/3 | 48750000 | 7000357   |
| F6Z0X0     | 60S ribosomal protein L28 (Fragment)  | Rpl28                        | 85   | ribosome [GO:0005840]; structural constituent of ribosome [GO:0003735]; translation [GO:0006412]   | RP-L28e; large subunit ribosomal protein L28e                         | 2/3 | 48200000 | 13859293  |
| A2AP32     | NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 beta subcomplex subunit 6                                       | Ndufb6                       | 97   | mitochondrial respiratory chain complex I [GO:0005747]; mitochondrial electron transport, NADH to ubiquinone [GO:0006120]  | NDUFB6; NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 beta subcomplex subunit 6   | 2/3 | 46950000 | 25385133  |
| E9PYD5     | Transcription elongation factor A protein 1   | Tcea1                        | 312  | nucleolus [GO:0005730]; transcription factor TFIID complex [GO:0005669]; nucleic acid binding [GO:0003676]; zinc ion binding [GO:0008270]; positive regulation of exonuclease activity [GO:1901919]; regulation of transcription, DNA-templated [GO:0006355]; transcription, DNA-templated [GO:0006351]  | TFIIS; transcription elongation factor S-II                           | 2/3 | 45750000 | 33870415  |
| F8WHL2     | Coatmer subunit alpha   | Copa                         | 1233 | COPI vesicle coat [GO:0030126]; Golgi membrane [GO:0000139]; structural molecule activity [GO:0005198]; intracellular protein transport [GO:0006886]; vesicle-mediated transport [GO:0016192]  | COPA; coatmer subunit alpha   | 2/3 | 42400000 | 35213918  |
| D6RHL9     | Reticulocalbin-2  | Rcn2                         | 71   | N.D.   | N.D.  | 2/3 | 41850000 | 14212846  |
| Q91Z50     | Flap endonuclease 1 (FEN-1) (EC 3.1.-.-) (Flap structure-specific endonuclease 1)                 | Fen1 FEN1<br>mCG_1942        | 380  | mitochondrion [GO:0005739]; nuclear chromosome, telomeric region [GO:0000784]; nucleolus [GO:0005730]; nucleoplasm [GO:0005654]; protein-containing complex [GO:0032991]; 5'-3' exonuclease activity [GO:0008409]; 5'-flap endonuclease activity [GO:0017108]; DNA binding [GO:0003677]; magnesium ion binding [GO:0000287]; RNA-DNA hybrid ribonuclease activity [GO:0004523]; base-excision repair [GO:0006284]; DNA replication [GO:0006260]; DNA replication, removal of RNA primer [GO:0043137]; memory [GO:0007613]; positive regulation of sister chromatid cohesion [GO:0045876] | FEN1; flap endonuclease-1 [EC:3.-.-.-]                                | 2/3 | 41000000 | 28142850  |
| A2AIN5     | B-cell differentiation antigen CD72   | Cd72                         | 347  | integral component of plasma membrane [GO:0005887]; transmembrane signaling receptor activity [GO:0004888]   | CD72; CD72 antigen  | 2/3 | 40500000 | 23193102  |
| A0A1Y7VNY4 | Endoplasmic reticulum aminopeptidase 1 (Fragment)   | Erap1                        | 95   | endoplasmic reticulum membrane [GO:0005789]; metalloaminopeptidase activity [GO:0070006]; antigen processing and presentation of endogenous peptide antigen via MHC class I [GO:0019885]; regulation of blood pressure [GO:0008217]  | N.D.  | 2/3 | 40250000 | 25385133  |

|            |  |   |      |  |  |     |          |          |
|------------|--|---|------|--|--|-----|----------|----------|
| A0A1B0GSV1 | 39S ribosomal protein L17, mitochondrial (Fragment)                                | Mrp17                                     | 122  | ribosome [GO:0005840]; structural constituent of ribosome [GO:0003735]; translation [GO:0006412]   | RP-L17; large subunit ribosomal protein L17  | 2/3 | 39800000 | 11172287 |
| Q3UZ35     | B-cell differentiation antigen CD72  | Cd72                                      | 361  | integral component of plasma membrane [GO:0005887]; transmembrane signaling receptor activity [GO:0004888]   | CD72; CD72 antigen   | 2/3 | 39800000 | 24183052 |
| F6W7C7     | 39S ribosomal protein L3, mitochondrial  | Mrp13                                     | 156  | ribosome [GO:0005840]; structural constituent of ribosome [GO:0003735]; translation [GO:0006412]   | RP-L3; large subunit ribosomal protein L3  | 2/3 | 39450000 | 10253048 |
| A0A2R8W750 | Protein kinase C and casein kinase substrate in neurons protein 2 (Fragment)       | Pacsin2                                   | 124  | actin cytoskeleton organization [GO:0030036]; caveola assembly [GO:0070836]; plasma membrane tubulation [GO:0097320]   | PACSNIN; protein kinase C and casein kinase substrate in neurons protein           | 2/3 | 37450000 | 17324116 |
| Q3UP40     | Protein kinase C and casein kinase substrate in neurons protein 2 (Fragment)       | Pacsin2                                   | 191  | actin cytoskeleton organization [GO:0030036]; caveola assembly [GO:0070836]; plasma membrane tubulation [GO:0097320]   | PACSNIN; protein kinase C and casein kinase substrate in neurons protein           | 2/3 | 37450000 | 17324116 |
| B1B1A7     | Kalirin (Fragment)   | Kalm                                      | 1403 | Rho guanyl-nucleotide exchange factor activity [GO:0005089]; regulation of Rho protein signal transduction [GO:0035023]  | KALRN; kalirin [EC:2.7.11.1]   | 2/3 | 37400000 | 8768124  |
| F6QYT9     | Kalirin (Fragment)   | Kalm                                      | 2371 | Rho guanyl-nucleotide exchange factor activity [GO:0005089]; regulation of Rho protein signal transduction [GO:0035023]  | KALRN; kalirin [EC:2.7.11.1]   | 2/3 | 37400000 | 8768124  |
| E9QML5     | Zinc finger protein 638  | Zfp638                                    | 1960 | nucleus [GO:0005634]; RNA binding [GO:0003723]; zinc ion binding [GO:0008270]; RNA splicing [GO:0008380]   | N.D.   | 2/3 | 37290000 | 47955982 |
| F6SAD4     | Oxidoreductase NAD-binding domain-containing protein 1 (Fragment)                  | Oxnad1                                    | 105  | N.D.   | N.D.   | 2/3 | 36600000 | 25314423 |
| F6XLU3     | Oxidoreductase NAD-binding domain-containing protein 1 (Fragment)                  | Oxnad1                                    | 86   | oxidoreductase activity [GO:0016491]   | N.D.   | 2/3 | 36600000 | 25314423 |
| Q3U7G2     | Disintegrin and metalloproteinase domain-containing protein 8                      | Adam8                                     | 825  | integral component of membrane [GO:0016021]; metalloendopeptidase activity [GO:0004222]  | ADAM8; disintegrin and metalloproteinase domain-containing protein 8 [EC:3.4.24.-] | 2/3 | 36400000 | 31254120 |
| D3Z560     | Kalirin  | Kalm                                      | 823  | Rho guanyl-nucleotide exchange factor activity [GO:0005089]; regulation of Rho protein signal transduction [GO:0035023]  | KALRN; kalirin [EC:2.7.11.1]   | 2/3 | 35250000 | 5727565  |
| Z4YKA3     | Heterochromatin protein 1-binding protein 3  | Hp1bp3                                    | 516  | nucleosome [GO:000786]; nucleus [GO:0005634]; chromatin binding [GO:0003682]; DNA binding [GO:0003677]; heterochromatin organization [GO:0070828]; nucleosome assembly [GO:0006334]; regulation of transcription, DNA-templated [GO:0006355] | N.D.   | 2/3 | 35250000 | 31607673 |
| A0A1L1STC6 | Nesprin-1  | Syne1                                     | 8799 | integral component of membrane [GO:0016021]; meiotic nuclear membrane microtubule tethering complex [GO:0034993]; actin filament binding [GO:0051015]; cytoskeletal anchoring at nuclear membrane [GO:0090286]                               | SYNE1; nesprin-1   | 2/3 | 35200000 | 35072496 |
| A0A087WRM5 | Nucleolin (Fragment)   | Ncl                                       | 76   | N.D.   | N.D.   | 2/3 | 34850000 | 9404520  |
| Q3TSA8     | Secretory carrier-associated membrane protein (Secretory carrier membrane protein) | Scamp1                                    | 286  | integral component of membrane [GO:0016021]; protein transport [GO:0015031]  | SCAMP; secretory carrier-associated membrane protein                               | 2/3 | 34450000 | 23546656 |
| A0A2I3BPG9 | MCG113838 (Ribosomal protein L36A, pseudogene 1)                                   | Rpl36a-ps1<br>mCG_113838                  | 106  | ribosome [GO:0005840]; structural constituent of ribosome [GO:0003735]; translation [GO:0006412]   | RP-L44e; large subunit ribosomal protein L44e                                      | 2/3 | 33450000 | 1343503  |
| A0A2I3BRW0 | Signal peptidase complex subunit 1   | Spsc1                                     | 102  | integral component of membrane [GO:0016021]; signal peptidase complex [GO:0005787]; peptidase activity [GO:0008233]; signal peptide processing [GO:0006465]  | SPCS1; signal peptidase complex subunit 1 [EC:3.4.-.]                              | 2/3 | 32250000 | 18172644 |
| B2RUJ2     | ErbB2ip protein (Erbin)  | Erbin Erbb2ip                             | 1294 | ErbB-2 class receptor binding [GO:0005176]; negative regulation of NF-kappaB transcription factor activity [GO:0032088]; signal transduction [GO:0007165]  | ERBB2IP; erbb2-interacting protein   | 2/3 | 32000000 | 22203153 |
| B7ZNX6     | ErbB2ip protein (Erbin)  | Erbin Erbb2ip                             | 1411 | ErbB-2 class receptor binding [GO:0005176]; negative regulation of NF-kappaB transcription factor activity [GO:0032088]; signal transduction [GO:0007165]  | ERBB2IP; erbb2-interacting protein   | 2/3 | 32000000 | 22203153 |
| B1AXC5     | Coiled-coil-helix-coiled-coil-helix domain-containing protein 7                    | Chchd7                                    | 59   | N.D.   | N.D.   | 2/3 | 31900000 | 10889444 |
| B1AXC7     | Coiled-coil-helix-coiled-coil-helix domain-containing protein 7 (Fragment)         | Chchd7                                    | 57   | N.D.   | N.D.   | 2/3 | 31900000 | 10889444 |
| B1AXC8     | Coiled-coil-helix-coiled-coil-helix domain-containing protein 7 (Fragment)         | Chchd7                                    | 79   | N.D.   | N.D.   | 2/3 | 31900000 | 10889444 |
| Q3TFT3     | Coiled-coil-helix-coiled-coil-helix domain-containing protein 7                    | Chchd7                                    | 52   | N.D.   | N.D.   | 2/3 | 31900000 | 10889444 |
| B1AX78     | Hydroxysteroid dehydrogenase-like protein 2  | Hsd12                                     | 370  | N.D.   | N.D.   | 2/3 | 31350000 | 9828784  |
| Q9CPN9     | RIKEN cDNA 2210010C04 gene (RIKEN cDNA 2210010C04, isoform CRA_b) (Trypsinogen 7)  | 2210010C04Rik<br>trypsinogen<br>mCG_15095 | 247  | extracellular space [GO:0005615]; serine-type endopeptidase activity [GO:0004252]; proteolysis [GO:0006508]  | PRSS1_2_3; trypsin [EC:3.4.21.4]   | 2/3 | 31200000 | 565685   |
| D3YUR8     | Probable ergosterol biosynthetic protein 28 (Fragment)                             | Erg28                                     | 54   | integral component of membrane [GO:0016021]  | N.D.   | 2/3 | 30450000 | 19162594 |



0610007P14Rik

|            |  |                           |      |   |   |     |          |          |
|------------|--|---------------------------|------|---|---|-----|----------|----------|
| D3Z5I5     | Epidermal growth factor receptor kinase substrate 8 (Fragment)                         | Eps8                      | 329  | actin binding [GO:0003779]; signaling adaptor activity [GO:0035591]; actin filament bundle assembly [GO:0051017]; barbed-end actin filament capping [GO:0051016]  | EPS8; epidermal growth factor receptor kinase substrate 8                                       | 2/3 | 29965000 | 39930320 |
| A0A087WQY7 | NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex assembly factor 8                   | Ndufaf8<br>1810043H04Rik  | 86   | mitochondrion [GO:0005739]; mitochondrial respiratory chain complex I assembly  | N.D.  | 2/3 | 29100000 | 12869343 |
| A0A1W2P772 | Plasma membrane calcium-transporting ATPase 1 (Fragment)                               | Atp2b1                    | 317  | integral component of membrane [GO:0016021]; ATP binding [GO:0005524]; calcium-transporting ATPase activity [GO:0005388]  | ATP2B; Ca <sup>2+</sup> transporting ATPase, plasma membrane [EC:3.6.3.8]                       | 2/3 | 28375000 | 32420846 |
| A0A1B0GRH2 | Receptor-type tyrosine-protein phosphatase (EC 3.1.3.48)                               | Ptpre                     | 712  | integral component of membrane [GO:0016021]; protein tyrosine phosphatase activity [GO:0004725]   | PTPRE; receptor-type tyrosine-protein phosphatase epsilon [EC:3.1.3.48]                         | 2/3 | 28100000 | 11455130 |
| A0A1B0GRT6 | Receptor-type tyrosine-protein phosphatase (EC 3.1.3.48)                               | Ptpre                     | 719  | cytoplasm [GO:0005737]; integral component of membrane [GO:0016021]; nucleus [GO:0005634]; plasma membrane [GO:0005886]; protein tyrosine phosphatase activity [GO:0004725]; negative regulation of insulin receptor signaling pathway [GO:0046627]   | PTPRE; receptor-type tyrosine-protein phosphatase epsilon [EC:3.1.3.48]                         | 2/3 | 28100000 | 11455130 |
| A0A1D5RM23 | Cleavage and polyadenylation-specificity factor subunit 5                              | Nudt21                    | 218  | mRNA cleavage factor complex [GO:0005849]; hydrolase activity [GO:0016787]; mRNA binding [GO:0003729]; mRNA polyadenylation [GO:0006378]  | NUDT21; cleavage and polyadenylation specificity factor subunit 5                               | 2/3 | 27885000 | 33396653 |
| E9Q2E4     | HECT domain E3 ubiquitin protein ligase 4  | Hectd4                    | 4418 | ubiquitin-protein transferase activity [GO:0004842]; glucose homeostasis [GO:0042593]; glucose metabolic process [GO:0006006]   | HECTD4; E3 ubiquitin-protein ligase HECTD4 [EC:2.3.2.26]  | 2/3 | 27730000 | 30080322 |
| A0A1B0GRJ5 | Predicted gene 45799 (Fragment)  | Gm45799                   | 61   | N.D.  | TIM10B; mitochondrial import inner membrane translocase subunit TIM10B                          | 2/3 | 27600000 | 3818377  |
| D6RG99     | Mitochondrial import inner membrane translocase subunit Tim10 B (Predicted gene 45799) | Timm10b<br>Gm45799        | 68   | N.D.  | TIM10B; mitochondrial import inner membrane translocase subunit TIM10B                          | 2/3 | 27600000 | 3818377  |
| A0A2I3BQF4 | 60S ribosomal protein L30  | Rpl30                     | 94   | ribosome [GO:0005840]; RNA binding [GO:0003723]; structural constituent of ribosome [GO:0003735]; translation [GO:0006412]  | RP-L30e; large subunit ribosomal protein L30e   | 2/3 | 27050000 | 15061374 |
| H3BK16     | ATPase family, AAA domain-containing 3A  | Atad3a                    | 211  | mitochondrion [GO:0005739]; mitochondrion organization [GO:0007005]   | ATAD3A_B; ATPase family AAA domain-containing protein 3A/B                                      | 2/3 | 27050000 | 22980970 |
| A0A0R4J1G5 | Erlin-1 (SPFH domain family, member 1, isoform CRA_a)                                  | Erlin1 Spfh1<br>mCG_18924 | 348  | endoplasmic reticulum membrane [GO:0005789]; protein-containing complex [GO:0032991]; cholesterol binding [GO:0015485]; ubiquitin protein ligase binding [GO:0031625]; negative regulation of cholesterol biosynthetic process [GO:0045541]; negative regulation of fatty acid biosynthetic process [GO:0045717]; SREBP signaling pathway [GO:0032933]; ubiquitin-dependent ERAD pathway [GO:0030433] | N.D.  | 2/3 | 26000000 | 15980613 |
| A0A2C9F2D2 | Annexin  | Anxa7                     | 485  | calcium ion binding [GO:0005509]; calcium-dependent phospholipid binding [GO:0005544]   | ANXA7_11; annexin A7/11   | 2/3 | 25550000 | 3464823  |
| A0A0J9YUS1 | HECT domain E3 ubiquitin protein ligase 4 (Fragment)                                   | Hectd4                    | 678  | glucose homeostasis [GO:0042593]; glucose metabolic process [GO:0006006]  | HECTD4; E3 ubiquitin-protein ligase HECTD4 [EC:2.3.2.26]  | 2/3 | 24880000 | 26049814 |
| A0A1D5RLX9 | Putative sodium-coupled neutral amino acid transporter 7 (Fragment)                    | Slc38a7                   | 409  | integral component of membrane [GO:0016021]   | SLC38A7_8; solute carrier family 38 (sodium-coupled neutral amino acid transporter), member 7/8 | 2/3 | 22960000 | 19855558 |
| H3BLL3     | Leucine-rich repeat and calponin homology domain-containing protein 4                  | Lrch4                     | 649  | N.D.  | N.D.  | 2/3 | 22450000 | 70711    |
| J3QNY6     | Bile salt export pump  | Abcb11                    | 1321 | integral component of membrane [GO:0016021]; ATP binding [GO:0005524]; ATPase activity, coupled to transmembrane movement of substances [GO:0042626]; bile acid and bile salt transport [GO:0015721]  | ABCB11; ATP-binding cassette, subfamily B (MDR/TAP), member 11                                  | 2/3 | 22350000 | 7141778  |
| E9Q3N1     | High affinity cationic amino acid transporter 1 (Fragment)                             | Slc7a1                    | 542  | integral component of membrane [GO:0016021]; transmembrane transporter activity [GO:0022857]; amino acid transport [GO:0006865]   | SLC7A1; solute carrier family 7 (cationic amino acid transporter), member 1                     | 2/3 | 22250000 | 11242998 |
| E9Q1V0     | Hsc70-interacting protein (Fragment)   | St13                      | 129  | N.D.  | ST13; suppressor of tumorigenicity protein 13   | 2/3 | 20860000 | 16178603 |
| E9Q0A3     | Rho guanine nucleotide exchange factor (GEF) 11 (Fragment)                             | Arhgef11                  | 1475 | cytoplasm [GO:0005737]; G protein-coupled receptor binding [GO:0001664]; Rho guanyl-nucleotide exchange factor activity [GO:0005089]; G protein-coupled receptor signaling pathway [GO:0007186]; positive regulation of transcription, DNA-templated [GO:0045893]; regulation of Rho protein signal transduction [GO:0035023]; Rho protein signal transduction [GO:0007266]                           | ARHGEF11; Rho guanine nucleotide exchange factor 11   | 2/3 | 20520000 | 27690302 |
| Q68FM7     | Rho guanine nucleotide exchange factor (GEF) 11  | Arhgef11                  | 1552 | cytoplasm [GO:0005737]; G protein-coupled receptor binding [GO:0001664]; Rho guanyl-nucleotide exchange factor activity [GO:0005089]; G protein-coupled receptor signaling pathway [GO:0007186]; positive regulation of transcription, DNA-templated [GO:0045893]; regulation of Rho protein signal transduction [GO:0035023]; Rho protein signal transduction [GO:0007266]                           | ARHGEF11; Rho guanine nucleotide exchange factor 11   | 2/3 | 20520000 | 27690302 |
| E9Q4U7     | Protein diaphanous homolog 2   | Diaph2                    | 1102 | actin binding [GO:0003779]; Rho GTPase binding [GO:0017048]; actin filament organization [GO:0007015]; female gamete generation [GO:0007292]  | DIAPH2; diaphanous 2  | 2/3 | 20300000 | 1838478  |
| G8JL35     | MOB-like protein phocein (Fragment)  | Mob4                      | 183  | N.D.  | N.D.  | 2/3 | 19635000 | 15648273 |

|            |  |                                    |      |   |  |     |          |          |
|------------|--|------------------------------------|------|---|--|-----|----------|----------|
| D3Z7M5     | Nucleolar protein 16   | Nop16                              | 181  | N.D.  | N.D.   | 2/3 | 19345000 | 13371389 |
| E0CYJ0     | MOB-like protein phocein (Fragment)  | Mob4                               | 186  | N.D.  | N.D.   | 2/3 | 18985000 | 14729034 |
| Q5ND45     | Unconventional myosin-Ic (Fragment)  | Myo1c                              | 80   | N.D.  | N.D.   | 2/3 | 18550000 | 1484924  |
| E9Q3G8     | Nucleoporin 153  | Nup153                             | 1462 | annulate lamellae [GO:0005642]; cytosol [GO:0005829]; nuclear inclusion body [GO:0042405]; nuclear membrane [GO:0031965]; nuclear periphery [GO:0034399]; nuclear pore [GO:0005643]; nuclear pore central transport channel [GO:0044613]; nuclear pore nuclear basket [GO:0044615]; nucleolus [GO:0005730]; nucleoplasmic side of nuclear pore [GO:1990875]; protein-containing complex [GO:0032991]; chromatin binding [GO:0003682]; double-stranded DNA binding [GO:0003690]; identical protein binding [GO:0042802]; nuclear localization sequence binding [GO:0008139]; protein membrane anchor [GO:0043495]; Ran GTPase binding [GO:0008536]; structural constituent of nuclear pore [GO:0017056]; zinc ion binding [GO:0008270]; mitotic cell cycle [GO:0002278]; negative regulation of RNA export from nucleus [GO:0046832]; nuclear pore complex assembly [GO:0051292]; protein import into nucleus [GO:0006606]   | NUP153; nuclear pore complex protein Nup153  | 2/3 | 18450000 | 494975   |
| E9Q3P4     | Centromere protein F   | Cenpf                              | 2997 | axoneme [GO:0005930]; centrosome [GO:0005813]; chromosome, centromeric region [GO:0000775]; ciliary basal body [GO:0036064]; ciliary transition fiber [GO:0097539]; condensed chromosome outer kinetochore [GO:0000940]; cytoplasm [GO:0005737]; midbody [GO:0030496]; nuclear envelope [GO:0005635]; nuclear matrix [GO:0016363]; nucleoplasm [GO:0005654]; nucleus [GO:0005634]; pronucleus [GO:0045120]; spindle [GO:0005819]; spindle pole [GO:0000922]; dynein complex binding [GO:0070840]; protein C-terminus binding [GO:0008022]; protein homodimerization activity [GO:0042803]; transcription factor binding [GO:0008134]; chromosome segregation [GO:0007059]; kidney development [GO:0001822]; metaphase plate congression [GO:0051310]; mitotic cell cycle [GO:0000278]; negative regulation of transcription, DNA-templated [GO:0045892]; protein transport [GO:0015031]; regulation of G2/M transition of mitotic cell cycle [GO:0010389]; regulation of striated muscle tissue development [GO:0016202]; ventricular system development [GO:0021591] | CENPF; centromere protein F  | 2/3 | 18390000 | 19247447 |
| Q6ZWQ9     | MCG5400 (Myosin, light chain 12A, regulatory, non-sarcomeric)                                  | My12a<br>2900073G15Rik<br>mCG_5400 | 172  | cell cortex region [GO:0099738]; myosin II complex [GO:0016460]; protein-containing complex [GO:0032991]; stress fiber [GO:0001725]; Z disc [GO:0030018]; calcium ion binding [GO:0005509]; glutamate receptor binding [GO:0035254]; protein localization to plasma membrane [GO:0072659]; regulation of cell shape [GO:0008360]  | MYL12; myosin regulatory light chain 12  | 2/3 | 18100000 | 6505382  |
| A0A1B0GRZ8 | ELMO domain-containing protein 2 (Fragment)  | Elmod2                             | 189  | GTPase activator activity [GO:0005096]  | N.D.   | 2/3 | 17700000 | 6788225  |
| F7CUU8     | Liprin-beta-1 (Fragment)   | Ppfbp1                             | 242  | N.D.  | N.D.   | 2/3 | 17445000 | 12381440 |
| A0A0N4SV08 | alpha-1,2-Mannosidase (EC 3.2.1.-)   | Edem1                              | 539  | membrane [GO:0016020]; calcium ion binding [GO:0005509]; mannosyl-oligosaccharide 1,2-alpha-mannosidase activity [GO:0004571]; metabolic process [GO:0008152]   | EDEM1; ER degradation enhancer, mannosidase alpha-like 1                               | 2/3 | 17275000 | 12480435 |
| D3YYI6     | AF4/FMR2 family member 3   | Aff3                               | 1229 | cytosol [GO:0005829]; nuclear body [GO:0016604]; double-stranded DNA binding [GO:0003690]; embryonic hindlimb morphogenesis [GO:0035116]; response to tumor necrosis factor [GO:0034612]  | AFF3; AF4/FMR2 family member 3   | 2/3 | 17050000 | 2899138  |
| F8WJA7     | AF4/FMR2 family member 3   | Aff3                               | 1228 | N.D.  | AFF3; AF4/FMR2 family member 3   | 2/3 | 17050000 | 2899138  |
| A0A0A6YVZ1 | Signal sequence receptor, beta, isoform CRA_b (Translocon-associated protein subunit beta)     | Ssr2 mCG_8842                      | 164  | endoplasmic reticulum [GO:0005783]; integral component of membrane [GO:0016021]   | SSR2; translocon-associated protein subunit beta                                       | 2/3 | 16750000 | 1767767  |
| A0A0A6YXB7 | Translocon-associated protein subunit beta (TRAP-beta) (Signal sequence receptor subunit beta) | Ssr2                               | 185  | endoplasmic reticulum membrane [GO:0005789]; integral component of membrane [GO:0016021]  | SSR2; translocon-associated protein subunit beta                                       | 2/3 | 16750000 | 1767767  |
| A0A286YDA2 | Nucleolar and coiled-body phosphoprotein 1   | Nolc1                              | 700  | nucleolus [GO:0005730]  | N.D.   | 2/3 | 16200000 | 6788225  |
| F8WI93     | P2X purinoceptor   | P2rx7                              | 442  | integral component of plasma membrane [GO:0005887]; postsynapse [GO:0098794]; ATP binding [GO:0005524]; extracellularly ATP-gated cation channel activity [GO:0004931]; purinergic nucleotide receptor activity [GO:0001614]; response to ATP [GO:0033198]  | P2RX7; P2X purinoceptor 7  | 2/3 | 16130000 | 11695546 |
| E9Q4M4     | MICOS complex subunit  | Chchd6                             | 245  | MICOS complex [GO:0061617]  | CHCHD6; coiled-coil-helix-coiled-coil-helix domain-containing protein 6, mitochondrial | 2/3 | 15980000 | 10352043 |
| Q8BZN7     | Thyroid hormone receptor-associated protein 3  | Thrap3                             | 709  | RNA splicing [GO:0008380]   | THRAP3; thyroid hormone receptor-associated protein 3                                  | 2/3 | 15900000 | 848528   |
| A0A2I3BRQ3 | Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H3   | Itih3                              | 699  | serine-type endopeptidase inhibitor activity [GO:0004867]; hyaluronan metabolic process [GO:0030212]  | N.D.   | 2/3 | 15350000 | 5727565  |
| A0A338P7F1 | Proteasome subunit beta (EC 3.4.25.1)  | Psmb1                              | 203  | cytoplasm [GO:0005737]; nucleus [GO:0005634]; proteasome core complex [GO:0005839]; threonine-type endopeptidase activity [GO:0004298]; proteolysis involved in cellular protein catabolic process [GO:0051603]   | PSMB1; 20S proteasome subunit beta 6 [EC:3.4.25.1]                                     | 2/3 | 15300000 | 5656854  |
| E9PY39     | Predicted gene 20431   | Gm20431                            | 371  | integral component of membrane [GO:0016021]; nucleus [GO:0005634]; ubiquitin conjugating enzyme activity [GO:0061631]; postreplication repair [GO:0006301]; protein K63-linked ubiquitination [GO:0070534]  | TMEM189; transmembrane protein 189   | 2/3 | 15165000 | 15888689 |
| B1AZ42     | Charged multivesicular body protein 6 (Fragment)   | Chmp6                              | 78   | vacuolar transport [GO:0007034]   | CHMP6; charged multivesicular body   | 2/3 | 14285000 | 12466293 |

| protein 6  |   |                              |      |   |   |     |          |          |  |
|------------|---|------------------------------|------|---|---|-----|----------|----------|--|
| G3UWH1     | Molybdenum cofactor biosynthesis protein 1 (Molybdenum cofactor synthesis 1, isoform CRA_d) | Mocs1 mCG_1174               | 143  | 4 iron, 4 sulfur cluster binding [GO:0051539]; catalytic activity [GO:0003824]; metal ion binding [GO:0046872]  | MOCS1; GTP 3',8-cyclase / cyclic pyranopterin monophosphate synthase [EC:4.1.99.22 4.6.1.17]  | 2/3 | 13730000 | 10988439 |  |
| Q6W4W7     | DIA3 (Protein diaphanous homolog 2)   | Diaph2 Diap2                 | 1102 | endoplasmic reticulum [GO:0005783]; nucleolus [GO:0005730]; actin binding [GO:0003779]; Rho GTPase binding [GO:0017048]; actin filament organization [GO:0007015]; female gamete generation [GO:0007292]    | DIAPH2; diaphanous 2  | 2/3 | 13535000 | 11405632 |  |
| D3Z312     | Tumor necrosis factor alpha-induced protein 8   | Tnfaip8                      | 212  | regulation of apoptotic process [GO:0042981]  | N.D.  | 2/3 | 13410000 | 15825050 |  |
| D3YUJ4     | Battenin (Fragment)   | Cln3                         | 195  | integral component of membrane [GO:0016021]; lysosomal membrane [GO:0005765]  | BTS; battenin   | 2/3 | 13140000 | 5883128  |  |
| Q4FJZ2     | Importin subunit alpha  | Kpna6 mCG_13554              | 533  | cytoplasm [GO:0005737]; nucleus [GO:0005634]; nuclear import signal receptor activity [GO:0061608]; protein transporter activity [GO:0008565]; protein import into nucleus [GO:0006606]                     | N.D.  | 2/3 | 13100000 | 141421   |  |
| A0A140T8Q6 | Allergin-1  | Milr1                        | 245  | integral component of membrane [GO:0016021]; mast cell granule [GO:0042629]; mast cell degranulation [GO:0043303]; negative regulation of mast cell activation [GO:0033004]                                 | N.D.  | 2/3 | 12955000 | 12791562 |  |
| S4R1V2     | Allergin-1 (Fragment)   | Milr1                        | 143  | integral component of membrane [GO:0016021]; mast cell granule [GO:0042629]; mast cell degranulation [GO:0043303]; negative regulation of mast cell activation [GO:0033004]                                 | N.D.  | 2/3 | 12955000 | 12791562 |  |
| A0A2I3BS22 | Purine nucleoside phosphorylase (Fragment)  | Pnp                          | 136  | purine-nucleoside phosphorylase activity [GO:0004731]; nucleoside metabolic process [GO:0009116]  | pnpA; purine-nucleoside phosphorylase [EC:2.4.2.1]  | 2/3 | 12880000 | 8654987  |  |
| A0A1W2P8F6 | Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit (EC 2.7.1.153)             | Pik3cg                       | 1024 | 1-phosphatidylinositol-3-kinase activity [GO:0016303]; ATP binding [GO:0005524]; phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase activity [GO:0046934]; phosphatidylinositol-mediated signaling [GO:0048015] | PIK3CG; phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit gamma [EC:2.7.1.153] | 2/3 | 12800000 | 11879394 |  |
| D3Z4E6     | Vezatin   | Vezt                         | 784  | cytosol [GO:0005829]; integral component of membrane [GO:0016021]; nucleoplasm [GO:0005654]; myosin binding [GO:0017022]; cell-cell adhesion [GO:0098609]   | N.D.  | 2/3 | 12700000 | 4101219  |  |
| A0A2I3BQU9 | Inactive ubiquitin thioesterase OTULINL (Fragment)  | Otulini                      | 149  | N.D.  | N.D.  | 2/3 | 12490000 | 9630794  |  |
| B8JJI4     | Vesicle transport protein SEC20   | Bnip1                        | 194  | integral component of membrane [GO:0016021]   | SEC20; protein transport protein SEC20  | 2/3 | 12300000 | 3111270  |  |
| A0A3B2W486 | Differentially-expressed in FDCP 6 (Fragment)   | Def6                         | 129  | N.D.  | N.D.  | 2/3 | 11555000 | 8831764  |  |
| D6RDC2     | Solute carrier family 15 member 4   | Slc15a4                      | 296  | integral component of membrane [GO:0016021]; transmembrane transporter activity [GO:0022857]; oligopeptide transport [GO:0006857]   | SLC15A3_4; solute carrier family 15 (peptide/histidine transporter), member 3/4               | 2/3 | 11190000 | 13590592 |  |
| F6QFB4     | Solute carrier family 15 member 4 (Fragment)  | Slc15a4                      | 246  | integral component of membrane [GO:0016021]; transmembrane transporter activity [GO:0022857]; oligopeptide transport [GO:0006857]   | SLC15A3_4; solute carrier family 15 (peptide/histidine transporter), member 3/4               | 2/3 | 11190000 | 13590592 |  |
| D3YXZ3     | Kinesin light chain 2   | Klc2                         | 617  | kinesin complex [GO:0005871]; microtubule motor activity [GO:0003777]   | KLC; kinesin light chain  | 2/3 | 10960000 | 2602153  |  |
| Q91YS4     | Kinesin light chain 2 (Klc2 protein)  | Klc2 mCG_8395                | 619  | cytosol [GO:0005829]; kinesin complex [GO:0005871]; mitochondrion [GO:0005739]; nucleoplasm [GO:0005654]; plasma membrane [GO:0005886]; microtubule motor activity [GO:0003777]                             | KLC; kinesin light chain  | 2/3 | 10960000 | 2602153  |  |
| Q8BZY3     | DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 19b  | Ddx19b                       | 494  | nuclear envelope [GO:0005635]; ATP binding [GO:0005524]; nucleic acid binding [GO:0003676]; positive regulation of apoptotic process [GO:0043065]; response to zinc ion [GO:0010043]                        | DDX19; ATP-dependent RNA helicase DDX19/DBP5 [EC:3.6.4.13]                                    | 2/3 | 10855000 | 3882016  |  |
| E9PXB9     | Mitochondrial import inner membrane translocase subunit Tim22                               | Timm22                       | 90   | N.D.  | TIM22; mitochondrial import inner membrane translocase subunit TIM22                          | 2/3 | 10535000 | 10415683 |  |
| Z4YN86     | Mitochondrial import inner membrane translocase subunit Tim22 (Fragment)                    | Timm22                       | 116  | N.D.  | TIM22; mitochondrial import inner membrane translocase subunit TIM22                          | 2/3 | 10535000 | 10415683 |  |
| A0A0X1KG66 | ER membrane protein complex subunit 10 (RIKEN cDNA 2310044H10, isoform CRA_a)               | Emc10 2310044H10Rik mCG_8748 | 264  | N.D.  | N.D.  | 2/3 | 10240000 | 1357645  |  |
| A0A0X1KG67 | ER membrane protein complex subunit 10 (RIKEN cDNA 2310044H10, isoform CRA_b)               | Emc10 2310044H10Rik mCG_8748 | 268  | ER membrane protein complex [GO:0072546]; positive regulation of angiogenesis [GO:0045766]; positive regulation of endothelial cell proliferation [GO:0001938]  | N.D.  | 2/3 | 10240000 | 1357645  |  |
| D3Z665     | ER membrane protein complex subunit 10 (Fragment)   | Emc10 2310044H10Rik          | 224  | N.D.  | N.D.  | 2/3 | 10240000 | 1357645  |  |
| A0A1D5RLY2 | Protein VAC14 homolog   | Vac14                        | 461  | PAS complex [GO:0070772]; phosphatidylinositol biosynthetic process [GO:0006661]  | VAC14; vacuole morphology and inheritance protein 14  | 2/3 | 10075000 | 9369165  |  |
| Q3UF75     | Alpha-parvin  | Parva                        | 336  | actin binding [GO:0003779]; actin cytoskeleton reorganization [GO:0031532]; cell adhesion [GO:0007155]  | PARV; parvin  | 2/3 | 10045000 | 4320422  |  |

|            |   |                    |     |  |   |     |          |         |
|------------|---|--------------------|-----|--|---|-----|----------|---------|
| Q3TJ55     | Syntaxin-2  | Stx2 Epim          | 288 | cell [GO:0005623]; integral component of membrane [GO:0016021]; SNAP receptor activity [GO:0005484]; acrosome reaction [GO:0007340]; cell differentiation [GO:0030154]; intracellular protein transport [GO:0006886]; vesicle-mediated transport [GO:0016192]  | STX1B_2_3; syntaxin 1B/2/3  | 2/3 | 10015000 | 3514321 |
| Q80W45     | Syntaxin-2  | Stx2 Epim          | 289 | basolateral plasma membrane [GO:0016323]; extracellular space [GO:0005615]; integral component of membrane [GO:0016021]; lamellipodium [GO:0030027]; protein dimerization activity [GO:0046983]; SNAP receptor activity [GO:0005484]; acrosome reaction [GO:0007340]; cell differentiation [GO:0030154]; cornified envelope assembly [GO:1903575]; intracellular protein transport [GO:0006886]; protein complex oligomerization [GO:0051259]; response to hydroperoxide [GO:0033194]; vesicle-mediated transport [GO:0016192] | STX1B_2_3; syntaxin 1B/2/3  | 2/3 | 10015000 | 3514321 |
| A0A2I3BQH8 | Acyl-CoA-binding domain-containing protein 5                      | Acbd5              | 519 | integral component of membrane [GO:0016021]; fatty-acyl-CoA binding [GO:0000062]; lipid binding [GO:0008289]; autophagy of peroxisome [GO:0030242]   | N.D.  | 2/3 | 9820000  | 5628570 |
| A0A2I3BRB9 | Acyl-CoA-binding domain-containing protein 5                      | Acbd5              | 483 | integral component of membrane [GO:0016021]; fatty-acyl-CoA binding [GO:0000062]; lipid binding [GO:0008289]; autophagy of peroxisome [GO:0030242]   | N.D.  | 2/3 | 9820000  | 5628570 |
| E9QNH7     | Acyl-CoA-binding domain-containing protein 5                      | Acbd5              | 509 | integral component of membrane [GO:0016021]; nucleoplasm [GO:0005654]; peroxisome [GO:0005777]; fatty-acyl-CoA binding [GO:0000062]; lipid binding [GO:0008289]; autophagy of peroxisome [GO:0030242]  | N.D.  | 2/3 | 9820000  | 5628570 |
| E0CXZ0     | Nucleolar protein 56  | Nop56              | 261 | N.D.   | NOP56; nucleolar protein 56   | 2/3 | 9725000  | 2793072 |
| F6USW7     | Nucleolar protein 56 (Fragment)                                   | Nop56              | 125 | N.D.   | NOP56; nucleolar protein 56   | 2/3 | 9725000  | 2793072 |
| E9QAJ4     | Calcium/calmodulin-dependent protein kinase type II subunit delta | Camk2d             | 142 | ATP binding [GO:0005524]; calmodulin-dependent protein kinase activity [GO:0004683]  | CAMK2; calcium/calmodulin-dependent protein kinase (CaM kinase) II [EC:2.7.11.17] | 2/3 | 9570000  | 1739483 |
| A0A0N4SUV6 | Selenocysteine-specific elongation factor                         | Eefsec             | 534 | GTP binding [GO:0005525]; GTPase activity [GO:0003924]   | selB; selenocysteine-specific elongation factor                                   | 2/3 | 9315000  | 1251579 |
| A0A0N4SUM7 | Transmembrane protein 176B (Fragment)                             | Tmem176b           | 172 | integral component of membrane [GO:0016021]  | N.D.  | 2/3 | 8770000  | 820244  |
| A0A0N4SUY1 | Transmembrane protein 176B (Fragment)                             | Tmem176b           | 194 | integral component of membrane [GO:0016021]  | N.D.  | 2/3 | 8770000  | 820244  |
| A0A0N4SV46 | Transmembrane protein 176B (Fragment)                             | Tmem176b           | 196 | integral component of membrane [GO:0016021]  | N.D.  | 2/3 | 8770000  | 820244  |
| A0A0N4SVT4 | Transmembrane protein 176B (Fragment)                             | Tmem176b           | 195 | integral component of membrane [GO:0016021]  | N.D.  | 2/3 | 8770000  | 820244  |
| B1AQD4     | Ras-related protein Rab-34 (Fragment)                             | Rab34              | 265 | GTP binding [GO:0005525]; GTPase activity [GO:0003924]   | RAB34; Ras-related protein Rab-34   | 2/3 | 8680000  | 4695189 |
| Q0PD20     | Rab34 (Ras-related protein Rab-34)                                | Rab34              | 259 | GTP binding [GO:0005525]; GTPase activity [GO:0003924]   | RAB34; Ras-related protein Rab-34   | 2/3 | 8680000  | 4695189 |
| D3Z2U2     | Tumor protein D52 (Fragment)                                      | Tpd52              | 77  | N.D.   | N.D.  | 2/3 | 8410000  | 5218448 |
| D3Z637     | MCG10134, isoform CRA_c (Tumor protein D52)                       | Tpd52<br>mCG_10134 | 162 | N.D.   | N.D.  | 2/3 | 8410000  | 5218448 |
| B1AT36     | 26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 12                   | Psm12              | 436 | N.D.   | PSMD12; 26S proteasome regulatory subunit N5                                      | 2/3 | 8345000  | 7431692 |
| D3YVH4     | Splicing factor 1 (Fragment)                                      | Sf1                | 267 | pre-mRNA branch point binding [GO:0045131]; zinc ion binding [GO:0008270]; mRNA splicing, via spliceosome [GO:0000398]   | SF1; splicing factor 1  | 2/3 | 8195000  | 5663925 |
| D3YZC9     | Splicing factor 1   | Sf1                | 571 | pre-mRNA branch point binding [GO:0045131]; zinc ion binding [GO:0008270]; mRNA splicing, via spliceosome [GO:0000398]   | SF1; splicing factor 1  | 2/3 | 8195000  | 5663925 |
| D3YZD0     | Splicing factor 1   | Sf1                | 638 | pre-mRNA branch point binding [GO:0045131]; zinc ion binding [GO:0008270]; mRNA splicing, via spliceosome [GO:0000398]   | SF1; splicing factor 1  | 2/3 | 8195000  | 5663925 |
| E9Q4Q2     | Splicing factor 1   | Sf1                | 548 | pre-mRNA branch point binding [GO:0045131]; zinc ion binding [GO:0008270]; mRNA splicing, via spliceosome [GO:0000398]   | SF1; splicing factor 1  | 2/3 | 8195000  | 5663925 |
| B1AWH6     | Structural maintenance of chromosomes protein 2 (Fragment)        | Smc2               | 471 | N.D.   | SMC2; structural maintenance of chromosome 2                                      | 2/3 | 8135000  | 7021570 |
| G3UWV7     | 26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 11 (Fragment)        | Psm11              | 89  | N.D.   | N.D.  | 2/3 | 8125000  | 4772971 |
| G3UX15     | 26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 11 (Fragment)        | Psm11              | 100 | proteasome assembly [GO:0043248]   | PSMD11; 26S proteasome regulatory subunit N6                                      | 2/3 | 8125000  | 4772971 |
| G3UX67     | 26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 11 (Fragment)        | Psm11              | 67  | N.D.   | N.D.  | 2/3 | 8125000  | 4772971 |
| G3UYL3     | 26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 11                   | Psm11              | 116 | proteasome assembly [GO:0043248]   | PSMD11; 26S proteasome regulatory subunit N6                                      | 2/3 | 8125000  | 4772971 |

|            |  |                       |      |  |   |     |         |         |
|------------|--|-----------------------|------|--|---|-----|---------|---------|
| G3UYL8     | 26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 11 (Fragment)   | Psm11                 | 100  | proteasome assembly [GO:0043248]   | PSMD11; 26S proteasome regulatory subunit N6  | 2/3 | 8125000 | 4772971 |
| A2AUG7     | Threonine synthase-like 1  | Thns1                 | 226  | N.D.   | N.D.  | 2/3 | 8105000 | 5084098 |
| A0A0R4J260 | OTU domain-containing protein 4  | Otud4                 | 1106 | N.D.   | OTUD4; OTU domain-containing protein 4 [EC:3.4.19.12]                               | 2/3 | 7915000 | 1845549 |
| Q8BS59     | Syntaxin 8, isoform CRA_d (Syntaxin-8)   | Stx8<br>mCG_140386    | 126  | N.D.   | STX8; syntaxin 8  | 2/3 | 7790000 | 353553  |
| A0A0B4J1G3 | H-2 class I histocompatibility antigen, K-K alpha chain  | H2-K1                 | 187  | integral component of membrane [GO:0016021]; antigen processing and presentation [GO:0019882]; immune response [GO:0006955]  | MHC1; major histocompatibility complex, class I                                     | 2/3 | 7210000 | 4228499 |
| D6RG44     | Transmembrane protein 126A (Transmembrane protein 126A, isoform CRA_c)                               | Tmem126a<br>mCG_22691 | 89   | integral component of membrane [GO:0016021]  | TMEM126A; transmembrane protein 126A  | 2/3 | 7180000 | 2107178 |
| E9Q9A5     | Bifunctional polynucleotide phosphatase/kinase   | Pnkp                  | 486  | N.D.   | PNKP; bifunctional polynucleotide phosphatase/kinase [EC:3.1.3.32 2.7.1.78]         | 2/3 | 7065000 | 2227386 |
| G5E8N7     | Bifunctional polynucleotide phosphatase/kinase (Polynucleotide kinase 3'-phosphatase, isoform CRA_b) | Pnkp<br>mCG_23134     | 522  | mitochondrion [GO:0005739]; nucleolus [GO:0005730]; ATP-dependent polydeoxyribonucleotide 5'-hydroxyl-kinase activity [GO:0046404]; nucleoside monophosphate kinase activity [GO:0050145]; polynucleotide 3'-phosphatase activity [GO:0046403]; DNA damage response, detection of DNA damage [GO:0042769]; DNA repair [GO:0006281]; negative regulation of protein ADP-ribosylation [GO:0010836]; nucleotide phosphorylation [GO:0046939]; positive regulation of telomerase activity [GO:0051973]; positive regulation of telomere capping [GO:1904355]; positive regulation of telomere maintenance via telomerase [GO:0032212]; response to oxidative stress [GO:0006979] | PNKP; bifunctional polynucleotide phosphatase/kinase [EC:3.1.3.32 2.7.1.78]         | 2/3 | 7065000 | 2227386 |
| A0A0A6YW16 | Serine/threonine-protein kinase DCLK2  | Dclk2                 | 641  | ATP binding [GO:0005524]; protein kinase activity [GO:0004672]; intracellular signal transduction [GO:0035556]   | DCLK1_2; doublecortin-like kinase 1/2 [EC:2.7.11.1]                                 | 2/3 | 6770000 | 1032376 |
| A0A0A6YX33 | Serine/threonine-protein kinase DCLK2  | Dclk2                 | 591  | ATP binding [GO:0005524]; protein kinase activity [GO:0004672]; intracellular signal transduction [GO:0035556]   | DCLK1_2; doublecortin-like kinase 1/2 [EC:2.7.11.1]                                 | 2/3 | 6770000 | 1032376 |
| A0A0A6YX71 | Serine/threonine-protein kinase DCLK2  | Dclk2                 | 711  | ATP binding [GO:0005524]; protein kinase activity [GO:0004672]; intracellular signal transduction [GO:0035556]   | DCLK1_2; doublecortin-like kinase 1/2 [EC:2.7.11.1]                                 | 2/3 | 6770000 | 1032376 |
| F8WHW6     | Phosphatidylinositol 4-phosphate 5-kinase type-1 gamma   | Pip5k1c               | 687  | cytosol [GO:0005829]; endosome membrane [GO:0010008]; nucleoplasm [GO:0005654]; ATP binding [GO:0005524]; phosphatidylinositol phosphate kinase activity [GO:0016307]  | PIP5K; 1-phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinase [EC:2.7.1.68]                    | 2/3 | 6695000 | 3754737 |
| A2AJ11     | MAP7 domain-containing protein 1   | Map7d1<br>Mtap7d1     | 774  | microtubule cytoskeleton [GO:0015630]; microtubule cytoskeleton organization [GO:0000226]  | MAP7D1; MAP7 domain-containing protein 1  | 2/3 | 6580000 | 933381  |
| Q8CAA2     | Phospholipid transfer protein C2CD2L   | C2cd2l Tmem24         | 654  | integral component of membrane [GO:0016021]  | N.D.  | 2/3 | 6435000 | 1025305 |
| Q8CFV7     | C2cd2l protein (Phospholipid transfer protein C2CD2L) (Fragment)                                     | C2cd2l                | 361  | N.D.   | N.D.  | 2/3 | 6435000 | 1025305 |
| Q8K0A8     | Phosphodiesterase (EC 3.1.4.-)   | Pde6a<br>mCG_130305   | 860  | cell [GO:0005623]; 3',5'-cyclic-GMP phosphodiesterase activity [GO:0047555]; metal ion binding [GO:0046872]; G protein-coupled receptor signaling pathway [GO:0007186]; regulation of cytosolic calcium ion concentration [GO:0051480]; visual perception [GO:0007601]   | PDE6A; rod cGMP-specific 3',5'-cyclic phosphodiesterase subunit alpha [EC:3.1.4.35] | 2/3 | 6355000 | 5720494 |
| D3YU83     | Cell growth-regulating nucleolar protein (Fragment)  | Lyar                  | 99   | DNA binding [GO:0003677]   | LYER; cell growth-regulating nucleolar protein                                      | 2/3 | 6235000 | 3783021 |
| D3Z009     | Cell growth-regulating nucleolar protein (Fragment)  | Lyar                  | 49   | DNA binding [GO:0003677]   | N.D.  | 2/3 | 6235000 | 3783021 |
| D3Z345     | Cell growth-regulating nucleolar protein (Fragment)  | Lyar                  | 191  | DNA binding [GO:0003677]   | LYER; cell growth-regulating nucleolar protein                                      | 2/3 | 6235000 | 3783021 |
| D3Z5X8     | Cell growth-regulating nucleolar protein (Fragment)  | Lyar                  | 131  | DNA binding [GO:0003677]   | LYER; cell growth-regulating nucleolar protein                                      | 2/3 | 6235000 | 3783021 |
| D3Z7N3     | Cell growth-regulating nucleolar protein (Fragment)  | Lyar                  | 190  | DNA binding [GO:0003677]   | LYER; cell growth-regulating nucleolar protein                                      | 2/3 | 6235000 | 3783021 |
| D6RDT2     | Cell growth-regulating nucleolar protein (Ly1 antibody reactive clone, isoform CRA_a)                | Lyar mCG_3754         | 40   | DNA binding [GO:0003677]   | N.D.  | 2/3 | 6235000 | 3783021 |
| F8VQG4     | Histocompatibility 2, T region locus 24  | H2-T24                | 363  | external side of plasma membrane [GO:0009897]; extracellular space [GO:0005615]; integral component of membrane [GO:0016021]; plasma membrane [GO:0005886]; peptide antigen binding [GO:0042805]; signaling receptor binding [GO:0005102]; antigen processing and presentation of endogenous peptide antigen via MHC class I via ER pathway, TAP-independent [GO:0002486]; antigen processing and presentation of endogenous peptide antigen via MHC class Ib [GO:0002476]; immune response [GO:0006955]; positive regulation of T cell mediated cytotoxicity [GO:0001916]   | MHC1; major histocompatibility complex, class I                                     | 2/3 | 6130000 | 4794184 |
| A0A2I3BR78 | Exosome complex exonuclease RRP44  | Dis3                  | 566  | ribonuclease activity [GO:0004540]; RNA binding [GO:0003723]   | DIS3; exosome complex exonuclease   | 2/3 | 6120000 | 1781909 |

|            |  |                          |      |  |   |     |         | DIS3/RRP44 [EC:3.1.13.-] |  |
|------------|--|--------------------------|------|--|---|-----|---------|--------------------------|--|
| A0A2R8VKL5 | La-related protein 4   | Larp4                    | 660  | RNA binding [GO:0003723]   | LARP4; la-related protein 4   | 2/3 | 6115000 | 3924443                  |  |
| A0A2R8W6Y5 | La-related protein 4   | Larp4                    | 610  | RNA binding [GO:0003723]   | LARP4; la-related protein 4   | 2/3 | 6115000 | 3924443                  |  |
| E9Q066     | La-related protein 4   | Larp4                    | 718  | RNA binding [GO:0003723]   | LARP4; la-related protein 4   | 2/3 | 6115000 | 3924443                  |  |
| G3X9Q6     | La-related protein 4 (MCG123519)   | Larp4<br>mCG_123519      | 719  | cytoplasmic stress granule [GO:0010494]; cytosolic small ribosomal subunit [GO:0022627]; polysome [GO:0005844]; poly(A) binding [GO:0008143]; cytoskeleton organization [GO:0007010]; positive regulation of translation [GO:0045727]; regulation of cell morphogenesis [GO:0022604]   | LARP4; la-related protein 4   | 2/3 | 6115000 | 3924443                  |  |
| D3Z7U0     | Annexin  | Anxa11                   | 447  | calcium ion binding [GO:0005509]; calcium-dependent phospholipid binding [GO:0005544]  | ANXA7_11; annexin A7/11   | 2/3 | 6100000 | 1484924                  |  |
| A0A0N4SVI8 | Zinc finger protein 638  | Zfp638                   | 1273 | nucleus [GO:0005634]; RNA binding [GO:0003723]; zinc ion binding [GO:0008270]; RNA splicing [GO:0008380]   | N.D.  | 2/3 | 5960000 | 3648671                  |  |
| E9QKZ7     | Zinc finger protein 638  | Zfp638                   | 1275 | nucleus [GO:0005634]; RNA binding [GO:0003723]; zinc ion binding [GO:0008270]; RNA splicing [GO:0008380]   | N.D.  | 2/3 | 5960000 | 3648671                  |  |
| A0A286YD19 | Selenoprotein K  | Selenok                  | 40   | integral component of membrane [GO:0016021]  | N.D.  | 2/3 | 5930000 | 155563                   |  |
| A1L3P4     | Sodium/hydrogen exchanger  | Slc9a6                   | 702  | axon terminus [GO:0043679]; axonal spine [GO:0044308]; cytoplasmic vesicle [GO:0031410]; dendrite [GO:0030425]; early endosome [GO:0005769]; early endosome membrane [GO:0031901]; endoplasmic reticulum membrane [GO:0005789]; endosome [GO:0005768]; integral component of membrane [GO:0016021]; intracellular membrane-bounded organelle [GO:0043231]; late endosome [GO:0005770]; mitochondrion [GO:0005739]; plasma membrane [GO:0005886]; recycling endosome [GO:0055037]; recycling endosome membrane [GO:0055038]; synapse [GO:0045202]; potassium:proton antiporter activity [GO:0015386]; sodium:proton antiporter activity [GO:0015385]; axon extension [GO:0048675]; brain-derived neurotrophic factor receptor signaling pathway [GO:0031547]; dendrite extension [GO:0097484]; dendritic spine development [GO:0060996]; neuron projection morphogenesis [GO:0048812]; potassium ion transmembrane transport [GO:0071805]; proton transmembrane transport [GO:1902600]; regulation of intracellular pH [GO:0051453]; regulation of neurotrophin TRK receptor signaling pathway [GO:0051386]; sodium ion import across plasma membrane [GO:0098719]; synapse organization [GO:0050808] | SLC9A6_7; solute carrier family 9 (sodium/hydrogen exchanger), member 6/7 | 2/3 | 5625000 | 3882016                  |  |
| A2A4M9     | Transmembrane protein 106A (Fragment)  | Tmem106a                 | 156  | integral component of membrane [GO:0016021]  | N.D.  | 2/3 | 5545000 | 445477                   |  |
| A2A4N0     | Transmembrane protein 106A (Fragment)  | Tmem106a                 | 171  | integral component of membrane [GO:0016021]  | N.D.  | 2/3 | 5545000 | 445477                   |  |
| A0A2R8V190 | NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 6   | Ndufa6                   | 72   | N.D.   | NDUFA6; NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 alpha subcomplex subunit 6      | 2/3 | 5510000 | 933381                   |  |
| A0A1Y7VMA0 | Ribosylidihyronicotinamide dehydrogenase [quinone] (Fragment)  | Nqo2                     | 187  | N.D.   | NQO2; ribosylidihyronicotinamide dehydrogenase (quinone) [EC:1.10.5.1]    | 2/3 | 5360000 | 2913280                  |  |
| G3UXX3     | Sepiapterin reductase  | Spr                      | 219  | N.D.   | SPR; sepiapterin reductase [EC:1.1.1.153]                                 | 2/3 | 5325000 | 1944544                  |  |
| Q91XH5     | Sepiapterin reductase (Sepiapterin reductase, isoform CRA_b)   | Spr<br>mCG_128676        | 262  | cytosol [GO:0005829]; nucleoplasm [GO:0005654]; sepiapterin reductase activity [GO:004757]; nitric oxide biosynthetic process [GO:0006809]; tetrahydrobiopterin biosynthetic process [GO:0006729]  | SPR; sepiapterin reductase [EC:1.1.1.153]                                 | 2/3 | 5325000 | 1944544                  |  |
| E9QAY5     | Predicted gene, 37240  | Gm37240                  | 252  | cytoplasm [GO:0005737]; trans-Golgi network membrane [GO:0032588]; phosphatidylinositol-4-phosphate binding [GO:0070273]; phospholipid binding [GO:0005543]; protein domain specific binding [GO:0019904]; intracellular protein transport [GO:0006886]; regulation of protein secretion [GO:0050708]  | ARFIP; arfaptin   | 2/3 | 5260000 | 2036468                  |  |
| D3Z1K5     | Mitochondrial import inner membrane translocase subunit Tim17-A (Fragment)   | Timm17a                  | 70   | N.D.   | TIM17; mitochondrial import inner membrane translocase subunit TIM17      | 2/3 | 5210000 | 975807                   |  |
| Q99JZ4     | GTP-binding protein SAR1a (SAR1 gene homolog A (S. cerevisiae)) (SAR1 gene homolog A (S. cerevisiae), isoform CRA_b) | Sar1a Sara1<br>mCG_15771 | 198  | COPII vesicle coat [GO:0030127]; endoplasmic reticulum [GO:0005783]; Golgi membrane [GO:0000139]; GTP binding [GO:0005525]; COPII-coated vesicle cargo loading [GO:0090110]; intracellular protein transport [GO:0006886]  | SAR1; GTP-binding protein SAR1 [EC:3.6.5.-]                               | 2/3 | 4980000 | 2743574                  |  |
| A0A087WRY3 | Nuclear ubiquitous casein and cyclin-dependent kinase substrate 1  | Nucks1                   | 233  | N.D.   | N.D.  | 2/3 | 4950000 | 2432447                  |  |
| F6UAF9     | FAD-dependent oxidoreductase domain-containing protein 1 (Fragment)  | Foxred1                  | 141  | oxidoreductase activity [GO:0016491]   | FOXRED1; FAD-dependent oxidoreductase domain-containing protein 1         | 2/3 | 4580000 | 2291026                  |  |
| A0A087WP00 | Nucleolar protein 58 (Fragment)  | Nop58                    | 195  | N.D.   | NOP58; nucleolar protein 58   | 2/3 | 4285000 | 403051                   |  |
| A0A087WQ46 | Nucleolar protein 58 (Fragment)  | Nop58                    | 213  | N.D.   | NOP58; nucleolar protein 58   | 2/3 | 4285000 | 403051                   |  |
| A0A0U1RPN7 | Rho guanine nucleotide exchange factor 1 (Fragment)  | Arhgef1                  | 233  | cytoplasm [GO:0005737]; Rho guanyl-nucleotide exchange factor activity [GO:0005089];   | ARHGEF1; Rho guanine nucleotide   | 2/3 | 4265000 | 21213                    |  |

|            |  |                     |      | regulation of Rho protein signal transduction [GO:0035023]   | exchange factor 1   |     |         |         |
|------------|--|---------------------|------|--|---|-----|---------|---------|
| A0A0U1RPP2 | Rho guanine nucleotide exchange factor 1 (Fragment)                      | Arhgef1             | 192  | cytoplasm [GO:0005737]; Rho guanyl-nucleotide exchange factor activity [GO:0005089]  | ARHGEF1; Rho guanine nucleotide exchange factor 1                         | 2/3 | 4265000 | 21213   |
| Q3TZK9     | Zinc finger protein 638 (Fragment)                                       | Zfp638 Zfml         | 891  | RNA binding [GO:0003723]; RNA splicing [GO:0008380]  | N.D.  | 2/3 | 4250000 | 1230366 |
| A0A2R8W6V7 | Myosin-9 (Fragment)  | Myh9                | 110  | myosin complex [GO:0016459]; motor activity [GO:0003774]   | N.D.  | 2/3 | 4230000 | 1824335 |
| A0A2U3TZ67 | Dynamin-1-like protein   | Dnm1l               | 587  | GTP binding [GO:0005525]; GTPase activity [GO:0003924]; mitochondrial fission [GO:0000266]; peroxisome fission [GO:0016559]  | DNM1L; dynamin 1-like protein [EC:3.6.5.5]                                | 2/3 | 4230000 | 848528  |
| E9PUD2     | Dynamin-1-like protein   | Dnm1l               | 712  | GTP binding [GO:0005525]; GTPase activity [GO:0003924]; mitochondrial fission [GO:0000266]; peroxisome fission [GO:0016559]  | DNM1L; dynamin 1-like protein [EC:3.6.5.5]                                | 2/3 | 4230000 | 848528  |
| A0A1W2P7Q1 | Exonuclease 3'-5' domain-containing protein 2 (Fragment)                 | Exd2                | 112  | 3'-5' exonuclease activity [GO:0008408]; nucleic acid binding [GO:0003676]   | EXD2; exonuclease 3'-5' domain-containing protein 2 [EC:3.1.11.1]         | 2/3 | 4205000 | 1138442 |
| A0A087WRV6 | E3 ubiquitin-protein ligase TRIP12 (Fragment)                            | Trip12              | 830  | ubiquitin-protein transferase activity [GO:0004842]  | TRIP12; E3 ubiquitin-protein ligase TRIP12 [EC:2.3.2.26]                  | 2/3 | 4155000 | 2637508 |
| A0A087WPH7 | 26S proteasome regulatory subunit 6A (Fragment)                          | Psmc3               | 305  | ATP binding [GO:0005524]; proteasome-activating ATPase activity [GO:0036402]   | PSMC3; 26S proteasome regulatory subunit T5                               | 2/3 | 4077500 | 4387598 |
| B7ZCF1     | 26S proteasome regulatory subunit 6A                                     | Psmc3               | 451  | cytoplasm [GO:0005737]; ATP binding [GO:0005524]; proteasome-activating ATPase activity [GO:0036402]; protein catabolic process [GO:0030163]   | PSMC3; 26S proteasome regulatory subunit T5                               | 2/3 | 4077500 | 4387598 |
| F6Q2E3     | 26S proteasome regulatory subunit 6A (Fragment)                          | Psmc3               | 203  | proteasome-activating ATPase activity [GO:0036402]   | PSMC3; 26S proteasome regulatory subunit T5                               | 2/3 | 4077500 | 4387598 |
| G5E866     | Splicing factor 3B subunit 1 (Splicing factor 3b, subunit 1)             | Sf3b1<br>mCG_117542 | 1304 | catalytic step 2 spliceosome [GO:0071013]; nuclear speck [GO:0016607]; U11/U12 snRNP [GO:0034693]; U12-type spliceosomal complex [GO:0005689]; U2 snRNP [GO:0005686]; U2-type precatally spliceosome [GO:0071005]; mRNA binding [GO:0003729]; spliceosomal complex assembly [GO:0000245]   | SF3B1; splicing factor 3B subunit 1                                       | 2/3 | 3640000 | 777817  |
| D3Z0Q9     | Solute carrier family 9 (sodium/hydrogen exchanger), member 6 (Fragment) | Slc9a6              | 313  | axon terminus [GO:0043679]; axonal spine [GO:0044308]; cytoplasmic vesicle [GO:0031410]; dendrite [GO:0030425]; early endosome [GO:0005769]; early endosome membrane [GO:0031901]; endoplasmic reticulum membrane [GO:0005789]; endosome [GO:0005768]; integral component of membrane [GO:0016021]; intracellular membrane-bounded organelle [GO:0043231]; late endosome [GO:0005770]; mitochondrion [GO:0005739]; plasma membrane [GO:0005886]; recycling endosome [GO:0055037]; recycling endosome membrane [GO:0055038]; synapse [GO:0045202]; potassium:proton antiporter activity [GO:0015386]; sodium:proton antiporter activity [GO:0015385]; axon extension [GO:0048675]; brain-derived neurotrophic factor receptor signaling pathway [GO:0031547]; dendrite extension [GO:0097484]; dendritic spine development [GO:0060996]; neuron projection morphogenesis [GO:0048812]; potassium ion transmembrane transport [GO:0071805]; proton transmembrane transport [GO:1902600]; regulation of intracellular pH [GO:0051453]; regulation of neurotrophin TRK receptor signaling pathway [GO:0051386]; sodium ion import across plasma membrane [GO:0096719]; synapse organization [GO:0050808] | SLC9A6.7; solute carrier family 9 (sodium/hydrogen exchanger), member 6/7 | 2/3 | 3460000 | 820244  |
| A0A1W2P6N3 | GTP-binding protein SAR1a (Fragment)                                     | Sar1a               | 131  | endoplasmic reticulum [GO:0005783]; Golgi apparatus [GO:0005794]; GTP binding [GO:0005525]; intracellular protein transport [GO:0006886]; vesicle-mediated transport [GO:0016192]  | SAR1; GTP-binding protein SAR1 [EC:3.6.5.-]                               | 2/3 | 2685000 | 502046  |
| A0A1W2P7T1 | ATP-dependent 6-phosphofructokinase, liver type (Fragment)               | Pfkf                | 167  | 6-phosphofructokinase activity [GO:0003872]; fructose 6-phosphate metabolic process [GO:0006002]   | pfkA; 6-phosphofructokinase 1 [EC:2.7.1.11]                               | 2/3 | 2665000 | 827315  |
| A0A2R8VJN7 | Spermatogenesis-associated serine-rich protein 2 (Fragment)              | Spats2              | 160  | N.D.   | N.D.  | 2/3 | 2660000 | 56569   |
| A0A2R8VJY7 | Spermatogenesis-associated serine-rich protein 2 (Fragment)              | Spats2              | 160  | N.D.   | N.D.  | 2/3 | 2660000 | 56569   |
| A0A2R8W6M8 | Spermatogenesis-associated serine-rich protein 2 (Fragment)              | Spats2              | 255  | N.D.   | N.D.  | 2/3 | 2660000 | 56569   |
| A0A2R8W6T4 | Spermatogenesis-associated serine-rich protein 2 (Fragment)              | Spats2              | 200  | N.D.   | N.D.  | 2/3 | 2660000 | 56569   |
| F8WIP8     | Osteopontin  | Spp1                | 295  | extracellular space [GO:0005615]; Golgi apparatus [GO:0005794]; androgen catabolic process [GO:0006710]; cell adhesion [GO:0007155]; cellular response to testosterone stimulus [GO:0071394]; ossification [GO:0001503]; positive regulation of estradiol secretion [GO:2000866]; positive regulation of transcription, DNA-templated [GO:0045893]; response to vitamin D [GO:0033280]   | SPP1; secreted phosphoprotein 1   | 2/3 | 2590000 | 1131371 |
| F6ZZ61     | Testis-expressed protein 10 (Fragment)                                   | Tex10               | 338  | N.D.   | IPI1; pre-rRNA-processing protein IPI1                                    | 2/3 | 2585000 | 1619275 |
| A0A2R8VHW8 | La-related protein 4   | Larp4               | 107  | N.D.   | N.D.  | 2/3 | 2490000 | 1202082 |
| A0A0D9SEG8 | Adhesion G protein-coupled receptor E5                                   | Adgre5              | 724  | integral component of membrane [GO:0016021]; calcium ion binding [GO:0005509]; G protein-coupled receptor activity [GO:0004930]; cell surface receptor signaling pathway [GO:0007166]  | ADGRE5; CD97 antigen  | 2/3 | 2465000 | 558614  |
| E9QJS7     | Adhesion G protein-coupled receptor E5                                   | Adgre5 Cd97         | 818  | integral component of membrane [GO:0016021]; calcium ion binding [GO:0005509]; G protein-coupled receptor activity [GO:0004930]; cell surface receptor signaling pathway [GO:0007166]  | ADGRE5; CD97 antigen  | 2/3 | 2465000 | 558614  |

|            |   |                   |      |   |  |     |         |         |
|------------|---|-------------------|------|---|--|-----|---------|---------|
| E9QMJ5     | Adhesion G protein-coupled receptor E5  | Adgre5 Cd97       | 773  | integral component of membrane [GO:0016021]; calcium ion binding [GO:0005509]; G protein-coupled receptor activity [GO:0004930]; cell surface receptor signaling pathway [GO:0007166] | ADGRE5; CD97 antigen   | 2/3 | 2465000 | 558614  |
| Q9DC42     | Adhesion G protein-coupled receptor E5  | Adgre5 Cd97       | 722  | integral component of membrane [GO:0016021]; calcium ion binding [GO:0005509]; G protein-coupled receptor activity [GO:0004930]; cell surface receptor signaling pathway [GO:0007166] | ADGRE5; CD97 antigen   | 2/3 | 2465000 | 558614  |
| E9Q1T9     | Exportin-2  | Cse1l             | 915  | nucleus [GO:0005634]; Ran GTPase binding [GO:0008536]; intracellular protein transport [GO:0006886]   | CSE1; exportin-2 (importin alpha re-exporter)  | 2/3 | 2370000 | 1541493 |
| F7D1H9     | Exportin-2 (Fragment)   | Cse1l             | 74   | Ran GTPase binding [GO:0008536]   |  | 2/3 | 2370000 | 1541493 |
| A0A140LHL5 | NAD-dependent protein deacetylase (EC 3.5.1.-)  | Sirt2             | 351  | NAD+ binding [GO:0070403]; NAD-dependent histone deacetylase activity [GO:0017136]; zinc ion binding [GO:0008270]   | SIRT2; NAD-dependent deacetylase sirtuin 2 [EC:3.5.1.-]                                    | 2/3 | 2010000 | 509117  |
| D6RG52     | Myotubularin-related protein 5  | Sbf1              | 403  | N.D.  | SBF1_2; myotubularin-related protein 5/13  | 2/3 | 1969000 | 1542907 |
| E9QA45     | GTP-binding protein 2   | Gtbp2             | 604  | GTP binding [GO:0005525]; GTPase activity [GO:0003924]  | N.D.   | 2/3 | 1965000 | 77782   |
| A0A2R8V188 | Peroxisomal membrane protein PMP34 (Solute carrier family 25 (Mitochondrial carrier, peroxisomal membrane protein), member 17, isoform CRA_f) | Slc25a17 mCG_8798 | 186  | integral component of membrane [GO:0016021]; transmembrane transporter activity [GO:0022857]  | SLC25A17; solute carrier family 25 (peroxisomal adenine nucleotide transporter), member 17 | 2/3 | 1730000 | 410122  |
| A0A0N4SUU3 | Selenocysteine-specific elongation factor (Fragment)  | Eefsec            | 266  | GTP binding [GO:0005525]; GTPase activity [GO:0003924]  | selB; selenocysteine-specific elongation factor  | 2/3 | 1595000 | 586899  |
| D6RJ12     | Serum paraoxonase/lactonase 3   | Pon3              | 74   | N.D.  | N.D.   | 2/3 | 1197500 | 399515  |
| F6PYU5     | Piezo-type mechanosensitive ion channel component 1 (Fragment)  | Piezo1 Fam38a     | 1085 | integral component of membrane [GO:0016021]; mechanosensitive ion channel activity [GO:0008381]   | PIEZO1_2; piezo-type mechanosensitive ion channel component 1/2                            | 2/3 | 622500  | 184555  |
| F6QY99     | Piezo-type mechanosensitive ion channel component 1 (Fragment)  | Piezo1 Fam38a     | 1003 | integral component of membrane [GO:0016021]; mechanosensitive ion channel activity [GO:0008381]   | PIEZO1_2; piezo-type mechanosensitive ion channel component 1/2                            | 2/3 | 622500  | 184555  |
| F7AC58     | Piezo-type mechanosensitive ion channel component   | Piezo1 Fam38a     | 2547 | integral component of membrane [GO:0016021]; mechanosensitive ion channel activity [GO:0008381]   | PIEZO1_2; piezo-type mechanosensitive ion channel component 1/2                            | 2/3 | 622500  | 184555  |

N.D.: No determinado. D.E.: Desviación estándar.

En letra grande y negrita se encuentran proteínas detectadas en 3/3 muestras.

Las proteínas se encuentran agrupadas por especie (*B. abortus* y *M. musculus*) y ordenadas descendientemente por promedio de intensidad.