

A QUÍMICA ANALÍTICA DO PROTEOMA

► Resumo

Dentre os inúmeros desenvolvimentos recentes na área de Biotecnologias, um dos programas que ocasionou maior impacto no mundo científico internacional na última década foi, sem dúvida, o denominado Projeto Genoma. Entretanto, o avanço recente na elucidação do Genoma Humano demonstrou que este programa, per se, não deverá elucidar algumas das principais dúvidas existentes nesta área do conhecimento. Uma das razões foi a descoberta de que o Genoma Humano possui um número de genes muito inferior ao anteriormente antecipado. Assim, o conhecimento de todas as proteínas expressas por um genoma, o qual tem sido denominado de Proteoma, torna-se o centro das atenções atualmente nesta área de investigação. Entretanto, a complexidade do Proteoma, quando comparada à do Genoma, requer o uso de ferramentas analíticas mais complexas para que seja adequadamente elucidado.

Este trabalho apresenta uma discussão crítica a respeito da Química Analítica do Proteoma. Dois enfoques principais têm sido empregados para analisar-se o conjunto de proteínas que atuam em uma célula, tecido ou órgão em seu estado normal, assim como suas variações em diferentes situações fisiológicas e patológicas: de um lado a Eletroforese Bidimensional em Gel (2D-PAGE), procedimento já bem conhecido e sedimentado, e de outro a Cromatografia Líquida Acoplada a Espectrometria de Massas (LC/MS), técnica mais recente e mais promissora para a análise de misturas complexas tais como o Proteoma. As principais vantagens e limitações de cada uma destas técnicas são apresentadas e discutidas criticamente neste trabalho.

*Fernando Mauro Lanças**
José Carlos Rodrigues Silva
Rogério Campos Bicudo
Mário Benassi Neto

Universidade de São Paulo
Instituto de Química de São Carlos
Laboratório de Cromatografia (CROMA)

*Autor para correspondência:

Universidade de São Paulo
Instituto de Química de São Carlos
Laboratório de Cromatografia (CROMA)
13560-970. São Carlos. SP
Fone: (16) 273-9983
Fax: (16) 273-9984
E-mail: flancas@iqsc.sc.usp.br

■ Introdução

Com a conclusão das primeiras avaliações científicas do genoma humano, a atenção dos pesquisadores se volta para um novo desafio e uma nova frente de estudos: a identificação de genes e o seqüenciamento de proteínas. Uma pesquisa está diretamente ligada a outra, pois são as proteínas que carregam as mensagens dos genes para controlar as funções do organismo. A importância das proteínas não é novidade para os cientistas, mas a descoberta de que o genoma humano possui um número muito menor de genes do que se esperava – cerca de 30 mil, quando previsões iniciais chegavam a 100 mil – reforçou a idéia de que os maiores frutos em pesquisa médica serão colhidos a partir do estudo das proteínas, não do DNA. O segredo para a complexidade do homem, portanto, não está no número de genes – igual ao do milho e pouco maior que o de

um verme, por exemplo, mas na capacidade de produzir uma diversidade maior de proteínas (1).

A Importância das Proteínas

O genoma, o qual consiste no conjunto de todos os genes de um organismo, determina como os aminoácidos serão unidos para formar uma proteína (2).

Os genes, por sua vez, são estruturas químicas que determinam instruções responsáveis pelas características físicas individuais de cada um, como a cor dos olhos e a altura de cada indivíduo. Também produzem proteínas indispensáveis ao funcionamento do corpo, dentre as quais, as enzimas que participam na digestão dos alimentos no estômago e no intestino (3).

¹ O norte-americano Walter Gilbert ganhou o Nobel de química em 1980 por ter criado um método para determinar a seqüência das 'letras' que compõem o DNA (ele dividiu o prêmio com o britânico Frederick Sanger, que havia criado um outro método de seqüenciamento, e o norte americano Paul Berg, o primeiro a construir uma molécula de DNA recombinante).

Alguns cientistas acreditam que a genética não trará todas as respostas, visto que os processos orgânicos estão na dependência de outras substâncias, como as proteínas, que exercem papéis essenciais em virtualmente todos os processos biológicos, sendo elas que determinam o padrão de transformações químicas dentro das células.

As proteínas são intermediárias de uma ampla faixa de funções, tais como: o transporte e armazenamento de algumas substâncias dentro das células (por exemplo, a hemoglobina que transporta oxigênio pelo sangue); o movimento coordenado dos músculos, visto que as proteínas são os principais componentes destes; a sustentação mecânica, devido à presença do colágeno, que dá resistência à pele e aos ossos; a proteção imunológica, porque os anticorpos são as proteínas responsáveis pela defesa do organismo; a geração e transmissão de impulsos nervosos, pois os receptores das células nada mais são do que proteínas; e, por fim, o controle do crescimento e da diferenciação celular, já que a expressão sequencial e controle da informação genética são essenciais para o crescimento e diferenciação das células e essa ação é controlada pelas proteínas repressoras do DNA, das quais apenas uma pequena fração se expressa a cada momento, em cada célula (3).

O proteoma

As perspectivas para a biologia do século 21, segundo o norte-americano Walter Gilbert¹, são a genômica estrutural e a proteômica. É preciso saber quais são e como interagem as proteínas que os genes produzem (4).

O esforço para produzir um índice de todas as proteínas humanas (o índice de proteína humano, ou HPI) começou vinte anos atrás, antes do início do programa do genoma humano. No entanto, o projeto genoma deslocou o pensamento da maioria dos biólogos moleculares durante a última década. Porém, agora que a seqüência do genoma humano está se aproximando da conclusão, o centro do pensamento biológico volta-se para as proteínas (5).

O termo proteoma foi cunhado por Wilkins e Williams como significando o conjunto de todas as proteínas expressas por um genoma (2).

Portanto, o proteoma é o conjunto de todas as proteínas que intervêm nos processos biológicos de uma espécie. O objetivo agora, depois de se conhecer o genoma humano completo, assim como o de outros organismos também, passa a ser a determinação da composição, estrutura, e funções de todas as proteínas do corpo para saber como elas interagem entre si (6).

O genoma de um organismo individual é essencialmente estático e o DNA, do qual pode ser extraído em princípio de uma única célula, contém toda a informação. Em contraste, o proteoma observável de uma única célula, definido como

a coleção de todas as proteínas existentes em seu fenótipo molecular específico, é altamente dinâmico e dependente do estado da célula (7). Portanto, o proteoma não é estacionário mas muda com o desenvolvimento do organismo e com qualquer mudança no seu ambiente (2).

O proteoma é, sem dúvida, muito mais extenso e complicado que o genoma pois, enquanto o DNA possui somente quatro bases nitrogenadas, as proteínas estão compostas de aminoácidos, dos quais existem 20 tipos diferentes (6). Assim, há mais proteínas em um proteoma do que genes em um genoma (2). Uma vez que o proteoma muda mais que o genoma, é possível obter-se mais informações sobre o organismo estudando-se o proteoma (2).

O proteoma é mais complexo que genoma, não apenas devido ao número de proteínas mas, também, devido às inúmeras possibilidades de interações entre elas. Há diferença entre a função molecular de uma proteína isolada e a função dessa proteína num ambiente celular complexo (2).

Por último, não basta enumerar a seqüência de aminoácidos que formam a proteína, pois tão importante quanto a seqüência é a estrutura tridimensional que a mesma possui, indo interferir decisivamente no papel que ela realiza (6).

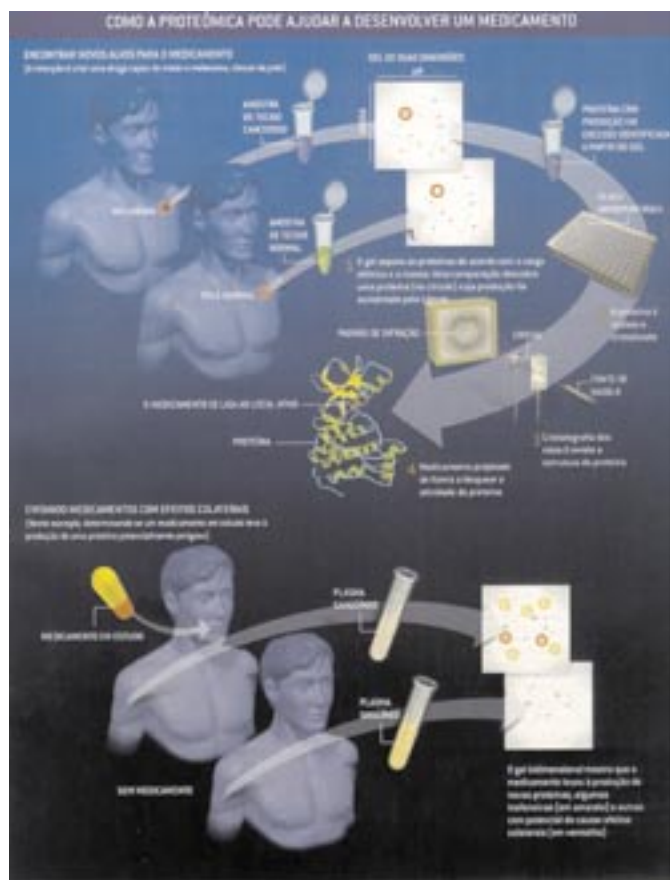
O primeiro desafio do projeto proteoma é identificar todas as proteínas que atuam em uma célula, tecido ou órgão no estado normal e depois, suas variações em diferentes situações fisiológicas ou patológicas (8).

O proteoma e a indústria farmacêutica

O proteoma tem como um dos seus objetivos fornecer informações que possam ajudar na produção de composto menos prejudiciais aos seres vivos e ao meio ambiente. Tais compostos podem ter seu emprego em diversas áreas como: industriais, agrícolas, veterinárias e médicas.

Não é segredo que companhias farmacêuticas têm um forte interesse no proteoma, estando efetuando um forte investimento comercial no seu desenvolvimento (7).

As dificuldades em se completar os proteomas não implica que o conhecimento que se está gerando não tenha aplicações práticas. Por exemplo, para os laboratórios farmacêuticos basta conhecer a função de uma proteína específica para poder explorar sua possível utilização na elaboração de determinado medicamento. Uma das maneiras consiste em comparar proteínas presentes em pessoas normais com pessoas que apresentam alguma patologia, por exemplo, o câncer. Em teoria, os laboratórios teriam que encontrar essas diferenças nas proteínas e, a partir daí, tentar desenvolver remédios capazes de bloquear a sua atividade patológica (6). A Figura 1 ilustra, de forma esquemática, um exemplo de como a proteômica poderá auxiliar no desenvolvimento de novos medicamentos.



(Scientific American Brasil 1, 54-61, Junho, 2002)

Figura 1. Diagrama esquemático ilustrando um exemplo de como a proteômica pode ajudar no desenvolvimento de um novo medicamento (9)

Nem tudo é perfeito na natureza e milhões de seres, inclusive humanos, nascem doentes ou sofrem doenças durante a vida e precisam de tratamento. O meio ambiente e os seres vivos mudam a cada dia, em resposta aos mais de 10 mil novos produtos químicos criados por ano, a novos vírus e bactérias e a produtos geneticamente modificados (não se sabe o número certo) gerados com técnicas de engenharia industrial e biotecnológica (8).

Como curar ou tentar combater as doenças? A grande maioria das drogas convencionais tem como alvo proteínas do sangue, enzimas de ciclos metabólicos, canais iônicos e receptores de membrana, e não genes (8). Isso se deve ao fato de que todas as doenças humanas envolvem mudanças na estrutura, localização ou abundância de proteínas (5). A identificação de todas as proteínas humanas, portanto, poderá viabilizar novas drogas e terapias: esse é o principal objetivo do projeto Proteoma (8).

As informações obtidas do proteoma poderão permitir aos patologistas conhecer o interior das proteínas e, com

isso, poderão aperfeiçoar os métodos diagnósticos e prever a evolução das doenças.

Uma catalogação das proteínas irá permitir uma melhor seleção dos marcadores de doença e objetivar melhor os tratamentos. A criação do projeto Proteoma, em complemento ao projeto Genoma, é uma necessidade. No entanto, isso não é fácil, pois são mais de 250 tipos de células diferentes no corpo humano, e cada uma delas expressa diferentes subtipos de proteínas, em cada momento, sob determinadas condições [o mesmo tipo de célula pode apresentar diferentes proteomas em resposta a estímulos externos, como a ação de drogas, poluição ou mesmo estresse nervoso (10)]. Há, portanto, uma enorme complexidade (3).

Técnicas analíticas utilizadas no estudo do proteoma

Já há evidência considerável de que o papel funcional de uma determinada proteína pode ser fortemente dependente do tipo de célula na qual ela é expressa e no estado dessa célula (7).

A meta ideal para o proteoma é que o mesmo seja capaz de monitorar todas as proteínas celulares. Há vários requisitos para esta meta ser atingida: 1- todas as proteínas devem ser quantitativamente extraídas do material biológico original; 2- as proteínas devem ser totalmente resolvidas (separadas); 3- cada proteína deve ser quantificada com precisão; e 4- a identidade de cada proteína deve ser determinada (7).

No momento, duas estratégias gerais para a análise do proteoma estão sendo usadas. A primeira estratégia, eletroforese bidimensional em gel de poliacrilamida (2D PAGE); constitui-se em uma metodologia analítica capaz de separar centenas de proteínas em uma única corrida analítica. Nessa caso, o gel, já com a amostra aplicada, é submetido a um campo elétrico para separação bidimensional. Na primeira dimensão, a separação ocorre de acordo com os pontos isoeletrônicos das proteínas (focalização isoeletrica). Já na segunda dimensão, a separação se dá de acordo com suas massas moleculares. A identificação de manchas nos géis 2D geralmente é executada cortando-se manchas de proteína do gel, digerindo a proteína do gel com tripsina, extraíndo os peptídeos e identificando estes fragmentos com espectrometria de massas (7). A metodologia empregada para a 2-D PAGE é apresentada na Figura 2.

Esta técnica (2-D PAGE) requer pequeno ou nenhum conhecimento anterior sobre o proteoma analisado e é conceitualmente simples (11). Porém, tem severas limitações.

Primeiro, é impossível se analisar todas as proteínas de uma amostra biológica em um único gel devido à tremenda

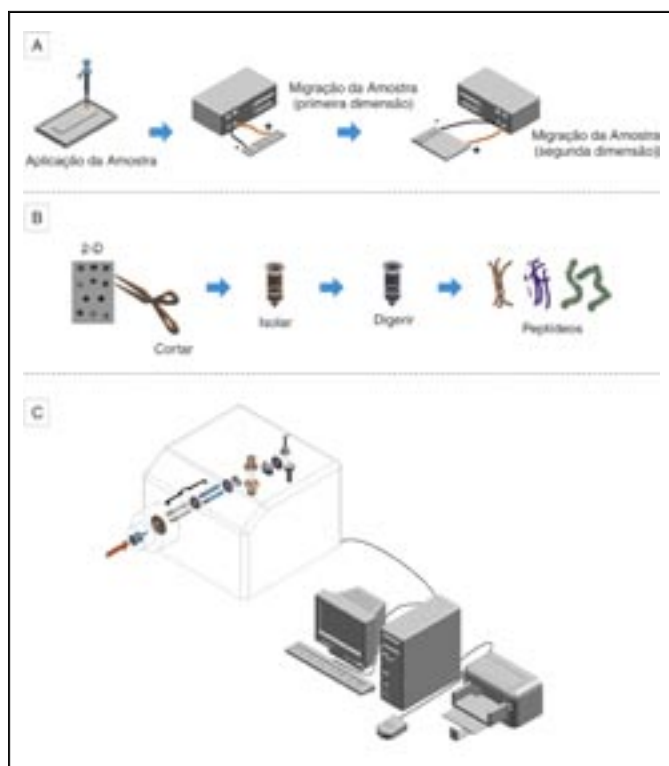


Figura 2. Diagrama esquemático ilustrando as etapas envolvidas na metodologia típica usada em eletroforese bidimensional empregando gel de poliacrilamida [2-D PAGE]. (A) Separação eletroforética; (B) Isolamento dos Peptídeos; (C) Identificação dos Espectrômetros de Massas

variação, em abundância, das proteínas. Usando-se pouca quantidade de amostra, somente proteínas de alta abundância (mais que 10.000 cópias por célula) são detectadas. Se a quantidade de amostra é aumentada para se detectar proteínas de baixa abundância, o gel é sobrecarregado pelas proteínas de alta abundância, e a resolução é perdida (12).

A segunda limitação do 2-D PAGE é a necessidade de se encontrar uma estratégia de solubilização e separação que atenda a todas as proteínas de uma amostra. Proteínas hidrofóbicas requerem solubilização com o uso de surfactantes e requerem múltiplos passos de extração. Proteínas básicas podem requerer técnicas de enriquecimento. Proteínas muito grandes (maiores que 200 kDa) podem não migrar eficientemente no gel, e proteínas muito pequenas (menores que 10 kDa) se sobrepõem (devido a sua alta mobilidade no gel) na segunda dimensão, o que resulta em perda de resolução.

A terceira limitação do 2-D PAGE é a ausência de técnicas integradas completas para se processar o gel. Esta limitação é particularmente séria por causa do formato do gel e de sua fragilidade (12).

Em resumo, proteínas de membrana, com baixo número de cópias, altamente básicas, muito grandes (maiores que 200 kDa) ou pequenas (menores que 10 kDa), não são facil-

mente analisadas por essa técnica (13). Ainda, géis 2-D, normalmente permitem a visualização de somente cerca de 20% do número de proteínas lidas e somente proteínas de massa molecular entre 10 e 100 kDa migram bem no gel (2). Além disso, esse procedimento desnatura as proteínas em ambas dimensões e assim, não pode indicar associações funcionais entre proteínas individuais (14).

Um outro inconveniente do 2-D PAGE é o grande número de passos durante a preparação da amostra. Organelas subcelulares podem ser isoladas por técnicas de sedimentação tal como centrifugação. Ácidos nucleicos podem ser removidos por digestão nuclease e lipídios podem ser removidos por extração com o uso de solventes. Sais que poderiam interferir no processo de eletroforese podem ser removidos por diálises, filtração em gel e ultracentrifugação. Os passos de solubilização de proteínas podem incluir redução de ligações de dissulfeto pelo tratamento com tióis seguidos por alquilação para prevenir re-oxidação. Surfactantes podem ser necessários para solubilizar espécies hidrofóbicas (12).

Além de tudo, 2-D PAGE é uma técnica lenta, consumindo muito tempo do analista; de difícil automação e, ainda, sem uma solução adequada para o acoplamento direto com a espectrometria de massas (13).

Portanto, apesar da conveniência aparente do 2-D PAGE para separação de misturas complexas de proteínas, a técnica sofre várias limitações que potencialmente deverão restringir seu uso com a tecnologia padrão para estudos de proteoma.

As limitações do 2-D PAGE são suficientes para incitar muitos grupos a investigar técnicas alternativas para análise das proteínas em misturas complexas. Uma técnica complementar robusta e de autoprocessamento para análise de proteínas, ou para substituir 2-D PAGE, traria um grande impacto no proteoma (14).

■ A Necessidade de Estratégias Alternativas

Para minimizar algumas das limitações da eletroforese bidimensional (2-D PAGE), técnicas de separação alternativas têm sido integradas com detectores de massas (MS) compondo uma nova plataforma para análise do proteoma.

Várias destas estratégias dependem da habilidade de uma associação entre espectrômetros de massas (tandem MS) para coletar, numa seqüência de operações, um peptídeo específico, mesmo se numerosos outros peptídeos estiverem simultaneamente presentes na amostra.

Quando as misturas são extremamente complexas, utiliza-se cromatografia líquida em fase reversa, conectada "on-line" a um espectrômetro de massas, para concentrar e separar os peptídeos antes do seqüenciamento por MS (15-17). Dentro do espectrômetro de massas ocorre o isolamento

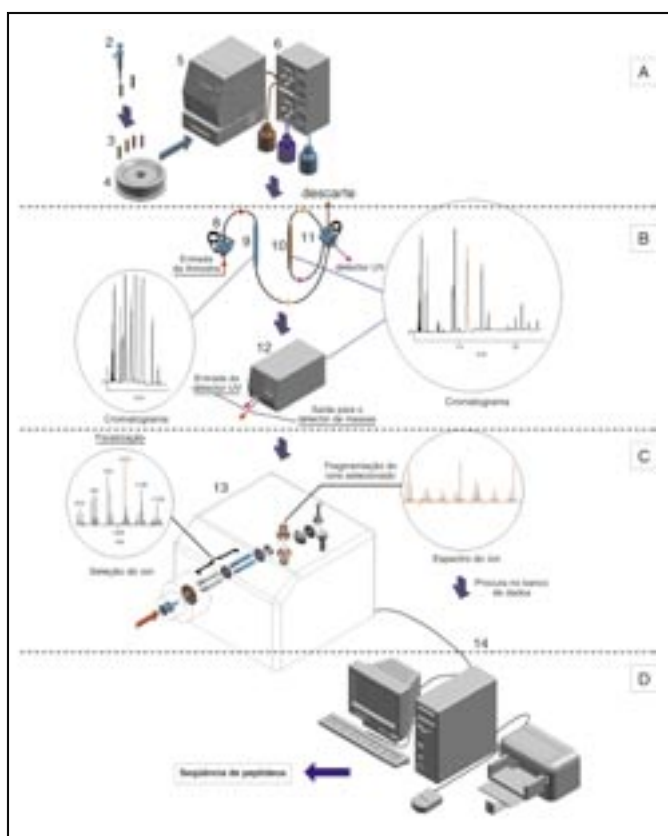


Figura 3. Análise de uma mistura de peptídeos por cromatografia líquida 2D conectada em linha com uma associação de espectrômetros de massas (LC/MS/MS).

1-mistura de proteínas digeridas com protease, 2-transferência dos peptídeos produzidos na digestão, 3-transferência das amostras para o carrossel do injetor automático, 4-carrossel, 5-Injetor automático, 6-Bombas para HPLC, 7-Frascos com solventes e tampões, 8-Válvula de 6 vias, 9-coluna de troca iônica, 10-coluna de fase reversa ODS (C₁₈), 11-válvula de 6 ou 8 vias, 12-detector UV 13-Espectrômetro de massas, 14-Aquisição e tratamento de dados.

- (A) Introdução da Amostra no Cromatógrafo Líquido
- (B) Separação da mistura por Cromatografia Bidimensional (2D-LC)
- (C) Identificação dos Fragmentos e seqüenciamento dos peptídeos através de comparação com banco de dados e interpretação manual dos espectros de massas
- (D) Seleção de um íon no primeiro analisador de massas, sua fragmentação e o espectro de massas resultante após isolamento no segundo analisador.

seletivo do íon peptídico de interesse de outros íons co-eluídos e, em seguida, esse íon sofre uma fragmentação branda na região das ligações peptídicas produzindo fragmentos que são registrados como um espectro de massas no sistema em tandem (MS/MS).

São esses fragmentos de massas que representam identificadores específicos para o peptídeo e permitem que sua seqüência de aminoácidos seja determinada com precisão.

Misturas de peptídeos usualmente não apresentam problemas para o sistema de espectrometria de massas em tandem, uma vez que cada peptídeo é isolado no espectrômetro de massas antes do seqüenciamento. O resultado mais estimulante desse tipo de análise é que um grande número de peptídeos podem ser individualmente selecionados, isolados e seqüenciados durante uma única análise por LC/MS/MS.

No exemplo apresentado na Figura 3, é mostrada a seqüência operacional e de equipamentos envolvida em uma análise típica via LC/MS/MS: A parte (A) da figura ilustra os componentes do cromatógrafo líquido e a etapa de amostragem, na qual as amostras são introduzidas no carrossel do injetor automático; a amostra é introduzida na coluna 1 (geralmente troca iônica), através da válvula de amostragem (item 8 da figura), gerando o cromatograma 1. A fração de interesse é então desviada para a coluna 2. Os analitos que deixam a coluna 2 são focalizados no espectrômetro de massas. Cada pico separado no cromatógrafo é avaliado no primeiro analisador (parte C da figura) e um íon específico de cada analito é selecionado. Este íon é fragmentado através de colisões com um gás, gerando novos fragmentos iônicos os quais são avaliados no segundo analisador, gerando um segundo espectro de massas. O estudo destes fragmentos através de comparação de base de dados e a análise do perfil de fragmentação conduzem, finalmente, à seqüência dos peptídeos (item D da figura)

Utilização de Colunas Capilares Empacotadas em LC/MS/MS

Um ganho considerável na sensibilidade é o fator motivador do desenvolvimento de colunas para LC/MS/MS de diâmetro cada vez menor (17-20). A diminuição do diâmetro, porém, acarreta uma diminuição exponencial na velocidade de fluxo da fase móvel, por exemplo, para uma coluna de 1mm I.D. a vazão operacional é de $\approx 50\mu\text{L min}^{-1}$, enquanto que para uma coluna de $75\mu\text{m}$ I.D., a vazão ideal cai para aproximadamente 300nL min^{-1} .

As colunas capilares empacotadas são, geralmente, produzidas pelo empacotamento/recheio de tubos capilares de sílica fundida com partículas de sílica quimicamente ligadas; essas colunas propiciam limites de detecção e seqüenciamento de peptídeos rotineiramente na faixa de femtomol. A coluna capilar é geralmente empacotada com partículas de sílica, quimicamente ligadas a um grupo octadecil (C18). Há muitas variantes deste modelo, uma destas, utilizada por alguns autores (21,22) os quais fazem uso de uma coluna capilar de $75\mu\text{m}$ I.D. empacotada com partículas de diâmetro médio igual a $5\mu\text{m}$ quimicamente ligadas a C18 possuindo 12 cm de comprimento. A amostra pode ser introduzida e eluída de uma coluna capilar de diferentes formas. Dependendo da sua concentração e volume, a forma mais usual é a introdução via alça de injeção (loop), instalada em uma válvula de seis vias.

Os peptídeos que eluem da coluna capilar são, geralmente, ionizados via ionização com electrospray. Os íons peptídeos são analisados por um sistema de espectrômetros de massas acoplados (tandem MS). No caso de espectrômetros de massas que utilizam "íon trap" como analisador, os íons peptídeos são usualmente focalizados, transferidos e, finalmente, alcançam a área onde são retidos e armazenados em órbitas estáveis. Durante a aquisição do espectro de massas por varredura, os íons peptídeos retidos são seqüencialmente ejetados de acordo com sua relação massa-carga (m/z) para o detector onde o sinal de cada íon é medido. Durante uma varredura MS/MS, um íon peptídico selecionado é isolado dentro do "trap" pela ejeção dos outros íons com valores de m/z diferentes dos de interesse; o íon isolado é, então, fragmentado pela adição de energia externa e colisão com átomos de um gás leve. Os fragmentos do íon retidos são então ejetados para o detector para produzir um espectro de massas contendo a informação da seqüência daquele peptídeo (vide Figura 3).

Quando uma maior separação dos peptídeos é requerida antes da seqüência de análise pelo sistema de espectrometria de massas, pode-se utilizar um sistema de cromatografia líquida multidimensional (15, 23-25, 26). O arranjo mais comum é a utilização de uma resina de troca iônica como primeira coluna ou primeira dimensão, em geral utiliza-se uma resina trocadora de íons fortemente catiônica forte (Strong Cation-Exchange Resin, SCX) como fase para a coluna cromatográfica. Nesta coluna, a eluição dos peptídeos é primariamente baseada na carga da solução de peptídeos e sua hidrofobicidade em $\text{pH} \cong 3,0$. Uma simples carga positiva é suficiente para adsorver o peptídeo na coluna; se os peptídeos possuírem a mesma carga, o peptídeo hidrofóbico será eluído após o peptídeo hidrofílico. Em $\text{pH} 3,0$ há exclusivamente grupos funcionais amina contribuindo para a carga da solução.

Conclusão

Os avanços alcançados com o desenvolvimento do projeto genoma induziram os pesquisadores da área a alçarem um voo mais distante e complexo: o proteoma. O conhecimento do conjunto de todas as proteínas que intervêm nos processos biológicos de uma espécie deverá conduzir a novos conhecimentos de dimensão ainda não avaliada apropriadamente, notadamente na área farmacêutica e biomolecular. A eletroforese capilar bidimensional em gel tem sido a técnica analítica padrão até recentemente; o avanço no aprimoramento da cromatografia líquida capilar e seu fácil acoplamento com espectrometria de massas em tandem (MS/MS) têm aberto novos horizontes nesta área cujas pesquisas estão ainda no início. A próxima década mostra-se altamente promissora nesta área interdisciplinar das Ciências da Vida.

Referências

- Escobar H, Miranda L. *Depois do genoma, a corrida pelo proteoma. O Estado de São Paulo*, 13/02/2001.
- Kazmi S, Krull IS. *Proteomics and the current state of protein separations science, Part one. Pharma Genomics*, p.14-29, August, 2001.
- Jane Bradbury. *Proteomics: The next step after genomics. The Lancet*, v.356, p.50, 2000.
- Gilbert W. *Rumo ao proteoma. Ciência Hoje*, v.29, n.173, p.8-11.
- Anderson NG, Matheson A, Anderson NL. *Back to the future: The human protein index (HPI) and the agenda for post-proteomic biology. Proteomics*, 1, p.3-12, 2001.
- <http://www.waldolar.triang.net>. *Proteoma*. Acesso em 10/03/2003.
- Godovac-Zimmermann J, Brown LR. *Perspectives for mass spectrometry and functional proteomics. Mass Spectrometry Reviews*, 20, p.1-57, 2001.
- Belizário JE. (2000) *Proteoma: o desafio tecnológico do século 21. Ciência Hoje*, v.27, n.162, p.78-81, Julho, 2000.
- Ezzel C. *O universo mutante das proteínas. Scientific American Brasil*, 1, p. 54-61, Junho, 2002.
- Pandey A, Mann M. *Proteomics to study genes and genome. Nature*, v.405, n.6788, p.837-846, 2000.
- Miklos GLG, Maleszka R. *Protein functions and biological contexts. Proteomics*, 1, p.169-178, 2001.
- Wehr T. *Separation technology in proteomics. LCGC*, v.19, n.7, p.702-711, 2001.
- Wagner K, Miliotis T, Marko-Varga G, Bischoff R, Unger KK. *An automated on-line multidimensional HPLC system for protein and peptide mapping with integrated sample preparation. Analytical Chemistry*, 74, p.809-820, 2002.
- Jenkins RE, Pennington SR. *Arrays for protein expression profiling: Towards a viable alternative to two-dimensional gel electrophoresis? Proteomics*, 1, p.13-29, 2001.
- Gygi SP, Corthals GL, Zhang Y, Rochon Y, Aebersold R. *Evaluation of two-dimensional gel electrophoresis-based proteome analysis technology. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v.97, n.17, p.9390-9395, 2000.
- Yates JR. *Mass spectrometry and the age of the proteome. Journal of Mass Spectrometry*, v.33, n.1, p.1-19, 1998.
- Mann M, Hendrickson RC, Pandey A. *Analysis of proteins and proteomes by mass spectrometry. Annual Review of Biochemistry*, v. 70, p.437-473, 2001
- Yates JR, Eng JK, McCormack AL. *Mining genomes - Correlating tandem mass-spectra of modified and unmodified peptides to sequences in nucleotide databases. Analytical Chemistry*, v.67, n.18, p.3202-3210, 1995.
- Eng JK, McCormack AL, Yates JR. *An approach to correlate tandem mass-spectral data of peptides with amino-acid-sequences in a protein database. Journal of the American Society for Mass Spectrometry*. n.5, v.11, p.976-989, 1994.
- Yates JR. *Mass spectrometry - from genomics to proteomics. Trends in Genetics*. n.16, v.1, p.5-8, 2000.
- Gygi SP, Rochon Y, Franza BR, Aebersold R. *Correlation between protein and mRNA abundance in yeast. Molecular and Cellular Biology*. v.19, n.3., p.1720-1730, 1999.
- Gygi SP, Rist B, Gerber AS, Turecek F, Gelb MH, Aebersold R. *Quantitative analysis of complex protein mixtures using isotope-coded affinity tags. Nature Biotechnology*, v.17, n.10, p.994-999, 1999.
- Davis MT, Beierle J, Bures ET, McGinley MD, Mort J, Robinson JH, Spahr CS, Yu W, Luethy R, Patterson SD. *Automated LC-LC-MS-MS platform using binary ion-exchange and gradient reversed-phase chromatography for improve proteomic analyses. Journal of Chromatography B*, v. 752, n.2, p.281-291, 2001.
- Opitck GJ, Lewis KC, Jorgenson JW, Anderegg RJ. *Comprehensive on-line LC/LC/MS of proteins. Analytical Chemistry*, v.69, n.8, p.1518-1524, 1997.
- Opitck GJ, Jorgenson JW, Anderegg RJ. *Two-dimensional SEC/RPLC coupled to mass spectrometry for the analysis of peptides. Analytical Chemistry*, v.69, n.13, p.2283-2291, 1997.
- Washburn MP, Wolters D, Yates JR. *Large-scale analysis of the yeast proteome by multidimensional protein identification technology. Nature biotechnology*, v.19, n.3, p.242-247, 2001.