

1 **Métodos e estratégias em proteômica e suas aplicações na área vegetal**

2 **Methods & strategies in proteomics and their applications in plants**

3 **Fernanda Salvato^{I*} Mayra Costa da Cruz Gallo de Carvalho^{II}**

4 **-REVISÃO BIBLIOGRÁFICA-**

5
6 **RESUMO**

7 A implementação da espectrometria de massa (MS) para as análises de peptídeos (MS)
8 e de aminoácidos (MS em tandem ou MS/MS) tornou possível a identificação de centenas de
9 proteínas em experimentos únicos. Uma grande variedade de estratégias está disponível
10 atualmente para o fracionamento e a purificação de amostras, a identificação de proteínas, a
11 quantificação, a análise de modificações pós-traducionais (MPT's) e os estudos de interação.
12 Dessa forma, a proteômica abre novas perspectivas na biologia de plantas com ênfase nos
13 estudos de variabilidade genética, estresses fisiológicos e desenvolvimento de plantas.

14
15 **Palavras-chave:** proteômica, análise de proteínas, interatômica, plantas.

16
17 **ABSTRACT**

18 The implementation of mass spectrometry (MS) for peptides (MS) and amino acids
19 (tandem MS or MS/MS) analysis allowed the identification of hundreds of proteins in single
20 experiments. A number of different strategies are current available for sample fractioning and
21 purification, proteins identification, quantification, post-translational modifications (PTM)
22 and interaction analyses. In this way, the proteomics open up new perspectives in plant
23 biology with emphasis on studies of genetic variability, physiological stresses and plant
24 development.

^(I)Departamento de Genética, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiróz, Universidade São Paulo (USP), Avenida Pádua Dias, n. 11, CP. 9, 13418-900, Piracicaba, São Paulo, Brasil. E-mail: fersalvato@gmail.com.
*Autor para correspondência.

^(II) Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Estadual Paulista (UNESP), Avenida Dom Antonio, 2100, 19806-900, Assis, São Paulo, Brasil. E-mail: mayra@assis.unesp.br

1 **Key words:** proteomics, protein analysis, interactomics, plants.

2

3 **INTRODUÇÃO**

4 No contexto da genética atual, o fenótipo pode ser observado a partir dos pontos de
5 vista morfológico, fisiológico, bionquímico e molecular. Sob a visão molecular, o fenótipo
6 pode ser descrito em termos de RNAm e proteínas, associados ao genoma e influenciados
7 pelo ambiente. Dessa maneira, a relação entre genótipo e fenótipo torna-se bastante complexa
8 (MATTICK, 2003). A sequência de um gene não deve ser mais considerada isoladamente na
9 predição de sua função, e a análise do RNAm é somente um pouco mais informativa. Já a
10 atividade das proteínas está proximamente associada à função do gene, uma vez que é o
11 produto final da regulação da atividade gênica. Nesse sentido, a proteômica, que visa a
12 caracterizar o conjunto de proteínas expressas em um dado momento, surge como mais uma
13 ramificação entre as ômicas para complementar os estudos sobre a biologia molecular das
14 células (WILKINS et al., 1996). A proteômica é também uma poderosa ferramenta no
15 melhoramento genético, pois, diferentemente do que ocorre quando são utilizados marcadores
16 fenotípicos ou baseados em DNA, a proteômica fornece informação em nível molecular da
17 variabilidade genética que é efetivamente expressa do genoma (PENNINGTON & DUNN,
18 2001).

19 Muitas das tecnologias hoje utilizadas na proteômica foram desenvolvidas muito antes
20 do início da proteômica. No entanto, foi o avanço na tecnologia de sequenciamento de
21 proteínas por meio da espectrometria de massas que possibilitou o seu surgimento e
22 desenvolvimento (TYERS & MANN, 2003). O início da proteômica foi marcado pela
23 caracterização de perfis proteicos, passando, posteriormente, a focar outros aspectos como a
24 quantificação de proteínas, as interações entre proteínas e as modificações pós-traducionais.

1 Nesta revisão, serão abordadas as principais estratégias para caracterização de proteínas em
2 larga escala e sua aplicação na área vegetal.

3 Métodos experimentais e tecnologia

4 O fluxo experimental normalmente utilizado na proteômica consiste na extração de
5 proteínas, separação, quantificação e, por último, na sua identificação (Figura 1). As
6 informações sobre o proteoma de uma amostra podem derivar da análise de proteínas intactas
7 (proteômica *top-down*) ou de seus peptídeos (proteômica *bottom-up*). Na proteômica *bottom-*
8 *up*, as proteínas de uma mistura são digeridas, e os peptídeos resultantes são analisados por
9 MS. As limitações dessa estratégia podem estar na cobertura incompleta da sequência das
10 proteínas, na perda das MPT's e nas degradações como resultado da digestão proteolítica. Já a
11 análise *top-down* permite deduzir a estrutura primária da proteína e a maior parte das MPT's.
12 No entanto, essa estratégia é limitada pela energia de colisão necessária na fragmentação da
13 proteína que é insuficiente para proteínas maiores que 50KDa, ficando restrita sua aplicação à
14 análise de proteínas purificadas (NESATY & SUTER, 2008).

15 Separação e identificação das proteínas

16 Após a extração de proteínas, o resultado é uma mistura complexa que deve ser
17 resolvida em frações simples de proteínas individuais ou em uma mistura simples de proteínas
18 para identificação (Figura 1). Na análise *bottom-up*, de misturas complexas, são utilizados
19 géis desnaturantes (2D) ou cromatografia líquida.

20 Na eletroforese bidimensional a massa e a carga das proteínas são utilizadas em duas
21 etapas (focalização isoeétrica e eletroforese em gel de poliacrilamida) para promover a
22 separação de misturas complexas com melhor resolução. O resultado da eletroforese
23 bidimensional é um perfil de distribuição de *spots* formados por proteínas únicas ou misturas
24 simples de proteínas (PENNINGTON & DUNN, 2001). As principais limitações associadas à
25 eletroforese bidimensional são a sua baixa reprodutibilidade e o seu pequeno poder de

1 automação. A reprodutibilidade pode ser aumentada definindo-se condições ótimas para a
2 eletroforese, mas a automação do processo só é possível com relação à análise de géis. Os
3 *softwares* de análise de géis determinam os *spots*, identificam aqueles diferencialmente
4 expressos e seus volumes, inferindo uma quantificação relativa da expressão daquela proteína
5 em comparação ao mesmo *spot* de outro gel (LÓPEZ et al., 2002). Como a automação
6 completa é o principal alvo dos métodos para análises em larga escala, foram desenvolvidos
7 métodos de separação livres de gel por cromatografia líquida de fase reversa acoplada à
8 espectrometria de massas em tandem (LC/MS/MS). Maior automação é possível com a
9 cromatografia líquida multidimensional que utiliza diferentes características das proteínas em
10 colunas de propriedades distintas ou em uma única coluna bifásica (MOTOYAMA &
11 YATES, 2008). A fração eluída na primeira coluna é diretamente introduzida na segunda
12 coluna, a qual pode ser diretamente acoplada ao espectrômetro de massas. Essa técnica,
13 chamada de MudPIT (*Multidimensional Protein Identification Technology*), está inserida no
14 contexto da proteômica *shotgun*, em que uma maior resolução dos proteomas é possível,
15 facilitando a identificação das proteínas menos abundantes, frequentemente perdidas quando
16 utilizados os géis (WASHBURN et al., 2001).

17 Depois de separadas as misturas complexas de proteínas, o próximo passo é
18 caracterizar os componentes dessas frações (Figura 1). Quando o objetivo do estudo
19 compreende a produção de mapas proteômicos, a espectrometria de massas surge imperativa,
20 permitindo o processamento de centenas de amostras em uma única análise. A identificação
21 de proteínas por meio da espectrometria de massas depende da digestão proteolítica que
22 produz uma coleção de peptídeos que são ionizados por eletronebulização ou por dessorção a
23 laser auxiliada por matriz (PENNINGTON & DUNN, 2001). Após a ionização, analisadores
24 de massas detectam as relações massa/carga (m/z) e os espectros resultantes e relacionam a
25 abundância dos fragmentos *versus* a relação m/z , os quais são então confrontados nos bancos

1 de dados para a identificação das proteínas. As análises podem ser realizadas a partir de íons
2 de peptídeos intactos (espectrometria de massa ou MS) – *fingerprint* - ou de peptídeos
3 fragmentados (espectrometria de massa em tandem ou MS/MS) (TWYMAN, 2004). Nas
4 análises de *fingerprinting*, os valores m/z dos peptídeos intactos são correlacionados às
5 proteínas de um banco de dados específico, o que torna esse método aplicável somente às
6 espécies com genomas sequenciados. Já na espectrometria de massas em tandem, a
7 fragmentação dos peptídeos em aminoácidos possibilita determinar a relação m/z desses
8 resíduos identificando-se a sequência de aminoácidos, o que torna possível trabalhar com
9 genomas não sequenciados e moléculas desconhecidas (AEBERSOLD & GOODLETT,
10 2001).

11 Análise de modificações pós-traducionais (MPT's)

12 Uma das formas de se produzir proteínas diferentes de um mesmo gene é por meio das
13 MPT's. Essas ocorrem em sítios específicos nas proteínas (BLOM et al., 2004), alterando
14 suas propriedades físicas, químicas e biológicas (NESATY & SUTER, 2008). Elas podem
15 ocorrer por meio de clivagens ou pela adição de um grupo químico a um ou mais aminoácidos
16 (MANN & JENSEN, 2003). Os principais objetivos dos estudos de MPT's em proteômica são
17 identificar as proteínas que as apresentam, mapear os sítios onde essas modificações ocorrem,
18 quantificar a ocorrência das MPT's nos diferentes sítios e caracterizar MPT's cooperativas
19 (SEO & LEE, 2004). Mais de 300 diferentes tipos de MPT's já foram identificados até o
20 momento com o auxílio da espectrometria de massas. O fato de que modificações covalentes
21 resultam em alterações nas massas moleculares de proteínas torna possível que essas
22 modificações e o aminoácido que as carregam sejam identificados por MS. A espectrometria
23 de massas, no entanto, possui um poder reduzido de resolução de MPT's, pois estas ocorrem
24 em níveis estequiométricos baixos (MANN & JENSEN, 2003). Esse problema pode ser
25 resolvido adotando-se métodos de fracionamento anteriores ao sequenciamento que permitam

1 um enriquecimento da amostra para as proteínas que apresentam um determinado tipo de
2 MPT. Os sistemas de enriquecimento de proteínas modificadas em larga escala são
3 geralmente realizados por meio da cromatografia de afinidade. Um exemplo é o sistema
4 IMAC (coluna de imobilização por afinidade a um metal) para isolamento de proteínas
5 fosforiladas em que íons metálicos de Fe(III) são aderidos à matrix para promover o
6 isolamento de proteínas que possuem resíduos fosforilados, já que o íon Fe(III) é capaz de
7 interagir reversivelmente com o grupo fosfato do peptídeo modificado mantendo-o fixo à
8 coluna (VENER et al., 2001).

9 Diferentemente do que ocorre com as MPT's reversíveis, nas permanentes, como a
10 glicosilação, a baixa estequiometria não ocorre, mas a adição de carboidratos dificulta a
11 digestão proteolítica necessária para a identificação por MS (PENNINGTON & DUNN,
12 2001). Além disso, quando o peptídeo modificado é fragmentado para o sequenciamento, ele
13 perde resíduos de açúcar, impedindo a identificação dos aminoácidos modificados. Para
14 resolver esse problema, realiza-se uma digestão das proteínas de forma a remover os resíduos
15 de açúcar e produzir uma modificação no sítio modificado que o torne identificável (CANTIN
16 & YATES, 2004).

17 Géis de eletroforese também podem ser utilizados no enriquecimento de amostras para
18 MPT's como realizado para detecção de fosforilações e glicosilações com *kits*
19 comercialmente disponíveis. As proteínas modificadas, especificamente marcadas no gel, são
20 visualizadas e excisadas para identificação por espectrometria de massas. Um aspecto
21 interessante do uso de géis para identificação de MPT é a possibilidade de visualizar os *spots*
22 diferencialmente expressos entre amostras que apresentam a MPT.

23 Quantificação relativa de proteínas

24 Os métodos de quantificação de proteínas em larga escala possibilitam uma estimativa
25 da expressão relativa de proteínas por meio da marcação com isótopos radioativos,

1 fluorescentes e leves/pesados, permitindo que uma mesma proteína seja quantificada de forma
2 relativa entre amostras marcadas diferentemente. Os mais utilizados são o iCAT (*Isotopic*
3 *coded affinity tag*), iTRAQ (*isobaric tags*) e H₂O¹⁸.

4 O iCAT consiste na adição de uma etiqueta que tem afinidade por resíduos de cisteína e
5 que possui uma molécula ligada de oito átomos de hidrogênio ou oito átomos de deutério.
6 Uma amostra é marcada com a etiqueta contendo hidrogênio e a outra amostra com a etiqueta
7 contendo o deutério. Após digestão das proteínas, os peptídeos resultantes são identificados
8 por MS. Peptídeos iguais marcados nas duas amostras são identificados pela sobreposição dos
9 picos que apresentaram m/z distintas devido ao tipo de isótopo ligado, sendo a relação entre a
10 área dos dois picos uma medida relativa da expressão daquela proteína. Os principais
11 problemas associados à técnica são a obrigatoriedade da presença de resíduos de cisteína, o
12 alto custo dos reagentes e o maior tempo necessário para o sequenciamento (YI &
13 GOODLETT, 2003).

14 Na técnica de iTRAQ, também é utilizada a marcação de proteínas com etiquetas e
15 identificação por MS. As etiquetas se ligam a todos grupos do tipo amino livres no terminal N
16 de todos peptídeos e nas cadeias laterais internas com resíduos de lisina e variam em função
17 do grupo repórter que carregam, podendo ter: 114, 115, 116 ou 117Da, possibilitando assim a
18 quantificação de proteínas em até quatro tipos de amostras ao mesmo tempo. A quantificação
19 relativa é realizada da mesma forma que no iCAT, mas seu elevado custo tem restringido seu
20 uso (SCHMIDT & URLAUB, 2009).

21 As técnicas citadas anteriormente requerem o consumo de reagentes específicos e
22 caros. No entanto, o mesmo objetivo pode ser alcançado com um método mais simples de
23 marcação, em que as proteínas são marcadas com um ou dois átomos de O incorporados no
24 terminal carboxil, por meio do simples fornecimento de uma solução com H₂O para uma

1 amostra e uma solução com H₂O¹⁸ para a outra amostra. Assim, estima-se a abundância
2 relativa dos peptídeos que irão diferir por 2Da (YE et al., 2009).

3 Interatômica

4 A interatômica destina-se ao estudo das interações entre proteínas sendo, portanto,
5 fundamental para a compreensão do seu papel biológico. Os estudos que visam a caracterizar
6 em larga escala proteínas que interagem podem ser realizados *in silico* (DROIT et al., 2005),
7 utilizando ferramentas de predição computacionais (baseadas em domínios ou sítios
8 evolutivamente conservados), *in vitro* (MONTI et al., 2009), com sistemas cromatográficos,
9 ou *in vivo* (SUTER et al., 2008), por meio dos sistemas de híbridos.

10 As estratégias *in vitro* para detecção de interações proteicas dependem da redução da
11 complexidade de proteínas presentes na amostra. A cromatografia de afinidade é utilizada
12 com esse objetivo. Para estudos em larga escala, podem ser empregados os microarranjos de
13 proteínas ; ou então a purificação por afinidade em tandem (TAP) e os híbridos de levedura
14 (POPESCU et al., 2007), os quais são os dois sistemas mais utilizados.

15 O TAP consiste na expressão de proteínas-alvo fusionadas a etiquetas introduzidas
16 geneticamente para promover a identificação dos híbridos. As proteínas-alvo fusionadas
17 passam por uma matriz que contém um ligante específico para a etiqueta e são posteriormente
18 eluídas da matrix pela ação de uma enzima com afinidade à outra porção da etiqueta. Os
19 híbridos de levedura também envolvem a manipulação genética das leveduras para detecção
20 de proteínas em larga escala que interagem no ambiente nuclear. No sistema *two-hybrid*
21 *system*, duas culturas haploides de leveduras são utilizadas na construção de duas bibliotecas
22 de cDNA. Em uma biblioteca, o vetor possui a sequência de um domínio de ligação ao DNA
23 de um fator de transcrição fusionada à sequência-alvo (da amostra); na outra biblioteca, o
24 vetor possui a sequência do fator de transcrição propriamente dito fusionada à sequência-alvo.
25 Esse fator de transcrição é capaz de promover a transcrição de um gene repórter somente

1 quando ligado ao domínio de ligação ao DNA. Assim, quando as duas culturas haploides são
2 cruzadas, será observada a expressão do gene repórter somente nas células diploides em que
3 as sequências-alvo codificam para proteínas que interagem na célula, o que causa a
4 aproximação do domínio de ligação ao DNA e do fator de transcrição no promotor do gene
5 repórter. Depois de identificadas as células, DNA plasmidial é sequenciado para identificação
6 das proteínas (CAUSIER, 2004).

7 Aplicações da proteômica na área vegetal

8 A produção de géis 2D tornou-se rotina na proteômica vegetal para estudar a
9 expressão de centenas de genes, produzindo mapas proteicos correspondentes a diferentes
10 genótipos, estádios de desenvolvimento e condições estressantes. Recentemente, o mapa
11 proteico de raízes da leguminosa *Lupinus albus* foi caracterizado para identificar proteínas
12 envolvidas na tolerância dessas plantas a substratos pobres em fósforo e também na
13 capacidade fitorremediadora que esta leguminosa apresenta com o acúmulo de metais pesados
14 (TIAN et al., 2009).

15 Os *spots* resolvidos nos géis 2D podem ser considerados marcadores genéticos ou
16 fisiológicos, sendo úteis no acesso à variabilidade genética, bem como no estabelecimento de
17 distâncias genéticas e relações filogenéticas entre linhagens, espécies e gêneros
18 (THIELLEMENT et al., 2002). Em um estudo conduzido com linhas diplóides de *Triticum*
19 sp., *Secale* sp. e *Hordeum* sp., foram estimadas as distâncias genéticas e suas relações
20 filogenéticas entre as espécies com base no número de *spots* comuns e não comuns em géis
21 2D (ZIVY et al., 1995). A aplicabilidade da abordagem utilizada foi também evidenciada por
22 meio da concordância dos resultados obtidos com aqueles oriundos da taxonomia clássica.

23 A produção de perfis proteicos na comparação de indivíduos com características de
24 interesse contrastantes em espécies agrônomicas envolvendo embriões (FUKUDA et
25 al., 2003), endospermas (KOMATSU et al. 1993), raízes (ZHONG et al., 1997), cultura de

1 células e folhas (SHEN et al., 2002) contribuem cada vez mais para o estudo funcional de
2 proteínas envolvidas na germinação, no enchimento e na maturação de grãos e no
3 desenvolvimento tardio ou precoce de grãos (HAJDUCH et al., 2005; DAI et al., 2007).

4 Em geral, a aplicação da proteômica no melhoramento genético de plantas pode se
5 iniciar com a detecção de proteínas responsivas aos efeitos bióticos ou abióticos. Estudos na
6 área de estresses abióticos, como seca, temperatura (SULE et al., 2004) e salinidade (DANI et
7 al., 2005), e estresses bióticos, como doenças (KONISHI et al., 2001) e pragas, podem
8 empregar a análise de proteínas diferencialmente expressas, com o intuito principal de
9 fornecer base à descoberta de novos marcadores moleculares. Muitas dessas proteínas podem
10 revelar funções consistentes com a resposta ao estresse. O próximo passo é verificar se o
11 comportamento das proteínas cosegrega com a característica de interesse ou com um QTL
12 (locos de caracteres quantitativos), permitindo a integração de genes de interesse em
13 programas de melhoramento genético assistido por marcadores moleculares ou ainda em
14 programas que incluem a transformação genética (TOUZET et al., 1995; SALEKDEH &
15 KOMATSU, 2007). A identificação dos principais efetores envolvidos na resposta de plantas
16 ao estresse de déficit hídrico, por exemplo, tem sido alvo de muitos trabalhos. As respostas
17 fenotípicas ao estresse de seca são comuns às plantas tolerantes e sensíveis (XIAO et al.,
18 2009), o que dificulta a seleção de indivíduos superiores. Nesse sentido, XIAO et al. (2009)
19 utilizaram gel-2D e MS para identificar proteínas diferencialmente expressas entre plantas de
20 *Populus* adaptadas e não adaptadas à condição de seca as quais podem funcionar como
21 biomarcadores na seleção assistida.

22 Outra aplicação importante seria na avaliação das modificações da expressão de
23 proteínas decorrentes de mutações (SANTONI et al., 1994) ou até mesmo do processo de
24 transgenia (RUEBELT et al., 2006). A identificação das proteínas afetadas, nesses casos, pode
25 fornecer valiosas informações sobre os processos bioquímicos que são alterados no

1 metabolismo desses indivíduos, derivados tanto dos efeitos pleiotrópicos quanto dos
2 decorrentes das perturbações genéticas propriamente ditas (GSTAIGER & AEBERSOLD,
3 2009). Plantas selvagens, variedades e plantas geneticamente modificadas (GM) de batata
4 foram avaliadas quanto aos possíveis efeitos não intencionais da modificação genética sobre o
5 proteoma de fundo ou não alvo da transgenia (LEHESRANTA et al., 2005). Rigorosas
6 análises têm sido adotadas quando se trata da segurança alimentar de alimentos transgênicos e
7 nesse aspecto a análise de perfis proteicos tem sido sugerida como uma estratégia mais
8 abrangente para avaliação da equivalência substancial entre organismos GM e seus
9 equivalentes não modificados (LEHESRANTA et al., 2005), como realizado por CORPILLO
10 et al. (2004), que compararam o proteoma de plântulas de tomates GM para resistência a vírus
11 com tomates não modificados.

12 A proteômica tornou-se uma importante abordagem na biologia molecular de plantas,
13 e sua integração com técnicas clássicas de melhoramento genético resultam em novas
14 possibilidades a serem alcançadas no desenvolvimento de variedades de plantas mais
15 resistentes e produtivas.

16 **CONCLUSÃO**

17 O surgimento da espectrometria de massas foi decisivo para o desenvolvimento da
18 proteômica contemporânea possibilitando experimentos em larga escala. Diversas plataformas
19 de análise rápida, direta e sensível são utilizadas, dentre elas, os géis 2D e o shotgun, que
20 tornou as análises ainda mais dinâmicas. No entanto, apenas a geração de dados proteômicos
21 não resolve por si só a complexidade dos sistemas biológicos. É necessária a integração de
22 dados oriundos da proteômica com a genômica, transcritômica e metabolômica, o que não é
23 uma tarefa trivial. A combinação desses dados requer parâmetros normalizadores, controle
24 experimental rígido e uma visão ampla para associar resultados estatísticos aos mecanismos
25 moleculares da atividade celular. Nesse sentido, o futuro da proteômica está certamente

1 calçado no incremento das ferramentas de bioinformática e estatística, bem como no
2 desenvolvimento estratégico e tecnológico. Assim, a proteômica surge para expandir a gama
3 de informações biológicas, permitindo entender melhor aspectos fundamentais da biologia de
4 plantas e podendo gerar no futuro um evidente impacto nas práticas agrônômicas.

5

6 **AGRADECIMENTO (S) ou Agradecimento (s) e Apresentação (opcional)**

7

8 **FONTES DE AQUISIÇÃO (opcional)**

9

10 **INFORME VERBAL (opcional)**

11

12 **COMIT DE ÉTICA E BIOSSEGURANÇA (obrigatório quando envolver animais e**
13 **organismos geneticamente modificados)**

14

15 **REFERÊNCIAS**

16 AEBERSOLD, R.; GOODLETT, D.R. Mass spectrometry in proteomics. **Chemical**
17 **Reviews**, v.101, n.2, p.269-296, 2001. Disponível em:
18 <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/cr990076h>. Acesso em 21 out. 2009. doi:
19 10.1021/cr990076h. (Sempre que possível as citações de artigos devem acompanhar a url para
20 o artigo e o número de identificação DOI).

21 BLOM, N. et al. Prediction of post-translational glycosylation and phosphorylation of
22 proteins from the amino acid sequence. **Proteomics**, CIDADE (opcional. Caso faça essa
23 opção, deve estar presente em todas as referências de periódicos)v.4, n.6, p.1633-1649, 2004.

1 CANTIN, G.T.; YATES, J.R. Strategies for shotgun identification of post-translational
2 modifications by mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v.1053, n.1-2, p.7-14,
3 2004

4 CAUSIER, B. Studying the interactome with the yeast two-hybrid system and mass
5 spectrometry. **Mass Spectrometry Reviews**, v.23, p.350-367, 2004.

6 CORPILLO, D. et al. Proteomics as a tool to improve investigation of substantial
7 equivalence in genetically modified organisms: the case of a virus-resistant tomato.
8 **Proteomics**, v.4, p.193-200, 2004

9 DAI, S. et al. Proteomic identification of differentially expressed proteins associated with
10 pollen germination and tube growth reveals characteristics of germinated *Oryza sativa* pollen.
11 **Molecular Cell Proteomics**, v.6, p.207-230, 2007.

12 DANI, V. et al. Changes in the tobacco leaf apoplast proteome in response to salt stress.
13 **Proteomics**, v.5, p.737-745, 2005.

14 DROIT, A. et al. Experimental and bioinformatic approaches for interrogating protein-
15 protein interactions to determine protein function. **Journal of Molecular Endocrinology**,
16 v.34, n.2, p.263-280, 2005.

17 FUKUDA, M. et al. Assessing matrix assisted laser desorption/ ionization-time of flight-
18 mass spectrometry as a means of rapid embryo protein identification in rice.
19 **Electrophoresis**, v.24, p.1319-1329, 2003.

20 GSTAIGER, M.; AEBERSOLD, R. Applying mass spectrometry-based proteomics to
21 genetics, genomics and network biology. **Nature Reviews**, v.10, p.617-627, 2009.

22 HAJDUCH, M. et al. A systematic proteomic study of seed-filling in soybean: establishment
23 of high-resolution two-dimensional reference maps, expression profiles, and an interactive
24 proteome database. **Plant Physiology**, v.137, p.1397-1419, 2005.

1 KOMATSU, S. et al. A rice protein library: a data-file of rice proteins separated by two-
2 dimensional electrophoresis. **Theoretical and Applied Genetics**, v.86, p.935, 1993.

3 KONISHI, H. et al. A proteomics approach towards understanding blast fungus infection of
4 rice grown under different levels of nitrogen fertilization. **Proteomics**, v.1, p.1162-1171,
5 2001.

6 LEHESRANTA, S.J. et al. Comparison of tuber proteomes of potato varieties, Landraces,
7 and genetically modified lines. **Plant Physiology**, v.138, p.1690-1699, 2005.

8 LÓPEZ, J.L. et al. A proteomic approach to the study of the marine mussels *Mytilus edulis*
9 and *M. galloprovincialis*. **Marine Biology**, v.141, n.2, p.217-223, 2002.

10 MANN, M.; JENSEN, O.N. Proteomic analysis of post-translational modifications. **Nature**
11 **Biotechnology**, v.21, p.255-261, 2003.

12 MATTICK, J.S. Challenging the dogma: the hidden layer of non-protein-coding RNAs in
13 complex organisms. **BioEssays**, v.25, p.930-939, 2003.

14 MOTOYAMA, A.; YATES III, J.R. Multidimensional LC separations in shotgun
15 proteomics. **Analytical Chemistry**, v.80, n.19, p.7187-7193, 2008.

16 MONTI, M. et al. Puzzle of protein complexes in vivo: a present and future challenge for
17 functional proteomics. **Expert Review of Proteomics**, v.6, n.2, p.159-169, 2009.

18 NESATY, V.J.; SUTER, M.J.F. Analysis of environmental stress response on the proteome
19 level. **Mass Spectrometry Reviews**, v.27, p.556-574, 2008.

20 PENNINGTON, S.R.; DUNN, M.J. **Proteomics: from protein sequence to function**. New
21 York: Springer-Verlag e BIOS scientific Publishers, 2001. 1v.

22 POPESCU, S.C. et al. Differential binding of calmodulin-related proteins to their targets
23 revealed through high-density Arabidopsis protein microarrays. **Proceedings of the National**
24 **Academy of Sciences of the United States of America**, v.104, p.4730-4735, 2007.

1 RUEBELT, M.C. et al. Application of two-dimensional gel electrophoresis to interrogate
2 alterations in the proteome of genetically modified crops. 3. Assessing unintended effects.
3 **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.54, n.6, p.2169-2177, 2006.

4 SALEKDEH, G.H.; KOMATSU, S. Crop proteomics: aim at sustainable agriculture of
5 tomorrow. **Proteomics**, v.7, n.16, p.2976-2996, 2007.

6 SANTONI V, et al. Use of two-dimensional protein-pattern analysis for the characterization
7 of *Arabidopsis thaliana* mutants. **Planta**, v.192, p.557-566, 1994.

8 SCHMIDT, C.; URLAUB, H. iTRAQ-labeling of in-gel digested proteins for relative
9 quantification. **Methods in Molecular Biology**, v.564, p.207-226, 2009.

10 SEO, J.; LEE, K.J. Post-translational modifications and their biological functions: proteomic
11 analysis and systematic approaches. **Journal of Biochemistry and Molecular Biology**, v.37,
12 n.1, p.35-44.

13 SHEN, S. et al. A proteomic analysis of leaf sheaths from rice. **Journal of Biochemistry**,
14 v.132, p.613-620, 2002.

15 SULE, A. et al. Proteomic analysis of small heat shock protein isoforms in barley shoots.
16 **Phytochemistry**, v.65, p.1853-1863, 2004.

17 SUTER, B. et al. Two-hybrid technologies in proteomics research. **Current Opinion on**
18 **Biotechnology**, v.19, n.4, p.316-23, 2008.

19 TIAN, L. et al. Transcript and proteomic analysis of developing white lupin (*Lupinus albus*
20 L.) roots. **BMC Plant Biology**, v.9, n.1, p.1-14, 2009.

21 TYERS, M.; MANN, M. From genomics to proteomics. **Nature**, v.422, n.6928, p.193-197,
22 2003.

23 THIELLEMENT, H. et al. Combining proteomic and genetic studies in plants.
24 **Chromatography B Analytical Technologies in Biomedical Life Sciences**, v.782, n.1-2,
25 p.137-149, 2002.

1 TOUZET, P. et al. Characterizing allelic proteins for genome mapping in maize.
2 **Electrophoresis**, v.16, p.1289-1294, 1995.

3 TWYMAN, R.M. Strategies for protein identification. In: _____. **Principles of proteomics**.
4 York, UK. BIOS Scientific, 2004. Cap.3, p.49-65.

5 VENER, A.V. et al. Mass spectrometric resolution of reversible protein phosphorylation in
6 photosynthetic membranes of *Arabidopsis thaliana*. **Journal of Biological Chemistry**, v.276,
7 p.6959-6966, 2001.

8 XIAO, X. et al. Physiological and proteomic responses of two contrasting *Populus cathayana*
9 populations to drought stress. **Physiologia Plantarum**, v.136, p.150-168, 2009.

10 WASHBURN, M.P. et al. Large-scale analysis of the yeast proteome by multidimensional
11 protein identification technology. **Nature Biotechnology**, v.19, p.242-247, 2001.

12 WILKINS, M.R. et al. Current challenges and future applications for protein maps and
13 posttranslational vector maps in proteome projects. **Electrophoresis**, v.17, p.830-838, 1996.

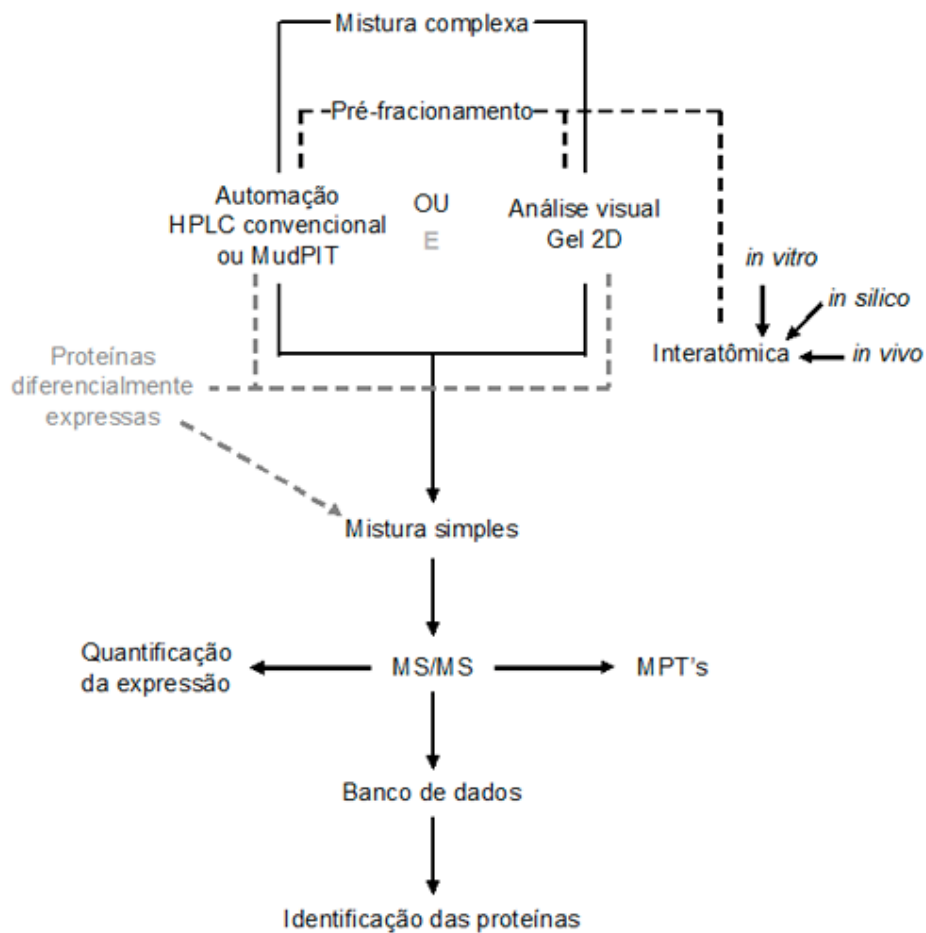
14 YE, X. et al. ¹⁸O stable isotope labeling in MS-based proteomics. **Briefings in Functional**
15 **Genomics & Proteomics**. v.8, n.2, p.136-144, 2009.

16 YI, E.C.; GOODLETT, D.R. Quantitative protein profile comparisons using the isotope-
17 coded affinity tag method. **Current Protocols in Protein Science**, Sup.34, unit 23.2, 2003.

18 ZHONG, B. et al. Screening of rice genes from a cDNA catalog based on the sequence data-
19 file of proteins separated by two-dimensional electrophoresis. **Breeding Science**, v.47,
20 p.245-251, 1997.

21 ZIVY, M. et al. Distance indices in a comparison between the A, D, I and R genomes of the
22 Triticeae tribe. **Electrophoresis**, v.16, p.1295-1300, 1995

23
24
25



1

2 Figura 1 - Fluxo experimental de um estudo de proteômica. A mistura complexa de proteínas

3 resultantes da extração de proteínas totais pode ser resolvida por meio de HPLC (*high*

4 *performace liquid cromatography*) convencional ou do sistema MudPIT, e/ou ainda

5 utilizando géis. Uma vez obtida uma mistura simples, esta é submetida ao sequenciamento

6 para identificação das proteínas. Os espectros de massa/carga obtidos podem ainda ser

7 utilizados na quantificação dos níveis de expressão de proteínas de interesse e na identificação

8 de modificações pós-traducionais (MPT's). O sequenciamento MS/MS pode ainda ser

9 destinado à identificação em larga escala de proteínas que apresentam interações moleculares,

10 previamente isoladas em experimentos de conduzidos *in silico*, *in vitro* ou *in vivo*

11 (interatômica).

12

13 **OBS.:** Caso as legendas sejam enviadas em páginas separadas, não irão contar como página

14 adicional.