

Análise proteômica da esquizofrenia

Large-scale analyses of schizophrenia proteome

BRUNO M. OLIVEIRA¹, DANIEL MARTINS-DE-SOUZA²

¹ Laboratório de Proteômica, Departamento de Bioquímica, Universidade Estadual de Campinas (Unicamp), Campinas, SP, Brasil.

² Instituto Max Planck de Psiquiatria e Universidade Ludwig Maximilians de Munique (LMU), Alemanha; Laboratório de Neurociências (LIM-27), Instituto de Psiquiatria, Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (IPq-FMUSP), São Paulo, SP, Brasil.

Recebido: 23/9/2012 – Aceito: 7/11/2012

Resumo

Valioso conhecimento a respeito de esquizofrenia tem sido gerado recentemente para decifrar sua patobiologia e revelar biomarcadores. Entretanto, esforços ainda são necessários, especialmente se levarmos em conta que essa debilitante desordem mental afeta aproximadamente 30 milhões de pessoas ao redor do mundo. Considerando que esquizofrenia é resultado de uma complexa interação entre fatores ambientais, função genética alterada e expressão proteica diferencial sistêmica, a proteômica é provavelmente uma ferramenta adequada ao estudo dessa desordem. Aqui sintetizamos os principais achados em estudos proteômicos e posteriores direções a serem tomadas de forma a melhor compreender a bioquímica da esquizofrenia, bem como revelar biomarcadores.

Oliveira BM, Martins-de-Souza D / *Rev Psiq Clín.* 2013;40(1):16-9

Palavras-chave: Proteômica, esquizofrenia, espectrometria de massas, metabolismo de energia, oligodendrócitos.

Abstract

Valuable knowledge about schizophrenia has been recently generated for deciphering its pathobiology and revealing biomarkers. However, efforts are still needed, especially if we take in account that this debilitating mental disorder affects approximately 30 million people worldwide. Considering that schizophrenia is a result of a complex interaction among environmental factors altered gene function and systematic differential protein expression, proteomics is likely to be a suitable tool for studying this disorder. Here we synthesize the main findings by proteomic studies and further directions to be taken in order to better comprehend the biochemistry of schizophrenia as well as reveal biomarkers. In addition, we summarize proteomic methodologies used in such studies.

Oliveira BM, Martins-de-Souza D / *Rev Psiq Clín.* 2013;40(1):16-9

Keywords: Proteomics, schizophrenia, mass spectrometry, energy metabolism, oligodendrocytes.

Introdução

A proteômica é uma ciência relativamente nova e tem sido usada na compreensão e identificação de vias moleculares alteradas, provendo um quadro de sistemas bioquímicos integrados, bem como potenciais candidatos a biomarcadores. Considerando que o desenvolvimento e a progressão da esquizofrenia (SCZ) – uma desordem mental crônica que afeta até 1% da população mundial – são provavelmente disparados por uma intrincada interação entre predisposição genética, fatores ambientais e expressão gênica e proteica alterada, a proteômica é consequentemente uma ferramenta adequada para descobrir alterações moleculares e identificar biomarcadores na SCZ. Tecidos *post-mortem* e *in vivo*, tais como cérebro, líquido cefalorraquidiano (CSF), fígado, fibroblastos e soro sanguíneo coletado de pacientes com SCZ, têm sido investigados extensivamente nos últimos 10 anos¹ usando metodologias proteômicas que serão revistas neste artigo.

Principais resultados

Cérebro, CSF e sistema neuroendócrino

Regiões cerebrais como o córtex frontal, córtex dorsolateral pré-frontal, lobo temporal anterior, córtex cingulado anterior, corpo caloso, córtex insular, giro temporal superior posterior, tálamo e hipocampo têm sido estudadas por análise proteômica. Alterações na arquitetura do citoesqueleto por meio da expressão diferencial de proteínas, tais como GFAP, NEFL, NEFM, DNMI1 e TUBB, são suportadas pelas diferenças observadas nesses cérebros quando comparados aos de controles mentalmente saudáveis². A expressão diferencial dessas

proteínas pode interferir em diversos processos, da estrutura celular e comunicação até a transmissão sináptica, a qual pode ser perturbada também por causa da expressão diferencial de proteínas relacionadas a cálcio, tais como CALN (PPP3CA), CALM e PMCA-4³. O cálcio é um metabólito essencial para a hipótese da dopamina em SCZ, especialmente considerando seu papel fundamental na função dos receptores de dopamina D1e D2⁴.

Diversas diferenças proteômicas observadas em tecidos cerebrais *post-mortem* revelaram proteínas relacionadas a oligodendrócitos⁵. Interessantemente, elas também foram encontradas em estudos transcricionômicos anteriores^{6,7}. Níveis de MBP e MOG, clássicos marcadores de esclerose múltipla, foram encontrados alterados em CSF de pacientes com SCZ comparados a controles⁸, sugerindo potenciais processos degenerativos, ainda que não neurodegeneração clássica. Em adição, a hipótese do metabolismo perturbado de colesterol e fosfolípidos em SCZ é suportado por dados proteômicos em estudos de CSF pela expressão diferencial de APOE, APOA1 e PTGDS^{9,10}. Além disso, processos neurodegenerativos podem ser acionados pela disfunção no metabolismo energético em oligodendrócitos¹¹.

Diferenças consistentes por meio de diferentes regiões cerebrais analisadas foram também observadas em proteínas relacionadas ao metabolismo energético, suportando o conceito da hipofrontalidade e reduzido fluxo sanguíneo em algumas regiões cerebrais¹²⁻¹⁴. A consistente expressão diferencial de ALDOC, ENO2, HK1, PGAM1, TPI1 e GAPDH coloca a glicólise como uma das principais vias bioquímicas para estudos posteriores básicos ou clínicos. Interessantemente, essa não é a via mais afetada encontrada no córtex pré-frontal de cérebros com depressão, mas a fosforilação oxidativa¹⁵.

Diferenças no metabolismo energético encontradas em cérebros foram também observadas em amostras de fígado em um estudo proteômico comparativo analisando 15 fígados de pacientes com SCZ e 15 controles. Proteínas de estresse oxidativo também foram encontradas¹⁶. Este estudo é particularmente interessante considerando que o fígado libera muitas moléculas diretamente na corrente sanguínea, que podem ser indicativas de metabolismo alterado e poderiam ser usadas para traduzir achados cerebrais a tecidos periféricos. Análise proteômica de pituitária de pacientes e controles relevou prejuízos no metabolismo energético, tais como expressão diferencial de AVP e GLUT1, as quais são responsáveis por controlar os níveis de glicose circulante¹⁷. Adicionalmente, apolipoproteínas como em CSF foram encontradas diferencialmente expressas em pituitárias.

Soro e fibroblastos de pele

Como forma de traduzir achados do sistema nervoso central (SNC) para a periferia, fibroblastos de pele podem ser uma interessante amostra a ser escolhida, já que muitas vias moleculares são compartilhadas com células neuronais. Fibroblastos de pele podem ser coletados de pacientes vivos e podem também ser utilizados como fonte de biomarcadores. Usando abordagem *label-free* na análise proteômica, 12 pacientes com SCZ foram comparados a 12 controles, levando à identificação de proteínas do ciclo celular, bem como de metabolismo energético e oxidativo¹⁸.

Sangue é o mais acessível tecido para estudos clínicos. Enquanto achados no SNC e fígado são úteis para a compreensão da base molecular da SCZ, estudos em soro sanguíneo podem render potenciais biomarcadores para uso clínico, como diagnóstico, prognóstico, estratificação de pacientes e estudos de resposta a tratamento com drogas.

Dez proteínas foram encontradas diferencialmente expressas em um conjunto de 55 amostras de pacientes de SCZ de primeira ordem não tratados com drogas em comparação com 33 controles¹⁹. Essas proteínas foram adaptadas em uma plataforma de imunensaio multiplexado DiscoveryMAP (Myriad Genetics), levando a um teste sanguíneo capaz de distinguir pacientes com SCZ sem uso de drogas de controles. Esse teste tem sido vendido sob o nome comercial de VeriPsych™ somente nos Estados Unidos e, de acordo com os fabricantes, "... não tem como intenção prover um diagnóstico definitivo de esquizofrenia, ou ser usado como único meio de tratamento dos pacientes", mas ser usado como um auxílio ao diagnóstico (<http://www.veripsych.com/about>).

Em um estudo proteômico direcionado de 66 pacientes com SCZ comparados a 68 controles, níveis circulantes aumentados de proinsulina, des-31,32-proinsulina, insulina, peptídeo C conector e cromogranina A foram observados²⁰. O mesmo grupo de pesquisa encontrou níveis aumentados de insulina, cromogranina A polipeptídeo pancreático, prolactina, progesterona e cortisol no soro de 236 indivíduos com SCZ comparados a 230 controles, bem como níveis diminuídos de hormônio de crescimento. Ambos os estudos suportam uma disfunção metabólica e do eixo HPA em SCZ²¹.

Conclusões

Estudos proteômicos em tecidos cerebrais visam revelar biomarcadores proteicos que possam ter um potencial diagnóstico, assim como biomarcadores de resposta a tratamento com drogas e prognóstico. Embora diversos candidatos a potenciais biomarcadores²² fossem revelados em diversas regiões cerebrais, eles não poderiam ser diretamente traduzidos a tecidos periféricos para uso clínico. Por outro lado, dados resultantes dessas análises podem lançar luz na compreensão da SCZ. Por exemplo, embora a disfunção do metabolismo energético fosse conhecida em cérebros com SCZ, estudos proteômicos puderam apontar as exatas enzimas e vias mais envolvidas na doença. Similarmente, diferenças na expressão proteica de proteínas do citoesqueleto foram também caracterizadas. Prejuízos no metabolismo de oligodendrócitos puderam também ser suportados por proteômica em tecidos cerebrais, sugerindo o papel

central da glia em SCZ, como tem sido hipotetizado²³. Estudos em CSF de SCZ revelaram biomarcadores mais tangíveis, mais a amostragem é muito mais invasiva e dolorosa do que de soro sanguíneo, na qual resultados bem-sucedidos poderiam ser obtidos. Análises de soro levaram ao desenvolvimento de um produto que auxilia no diagnóstico. Embora esse teste não seja um produto definitivo, a mesma estratégia pode ser aplicada para estudos de resposta a drogas e efetividade. Os próximos passos incluem o acompanhamento dos marcadores proteicos encontrados nesses estudos proteômicos. A respeito da patobiologia da SCZ, estudos funcionais envolvendo *knockouts* e superexpressão de certos alvos proteicos podem decifrar seu papel em modelos pré-clínicos. Do ponto de vista de biomarcadores, estudos de acompanhamento devem objetivar transformar achados básicos em aplicações clínicas. Estudos de estratificação de pacientes e caracterização de resposta a drogas são necessários.

Metodologias proteômicas

Já que estudos proteômicos objetivam a representação do conjunto de proteínas sendo expressas por uma célula, tecido ou organismo em uma dada condição e a um dado momento, é interessante que tais estudos alcancem a visualização mais completa das proteínas em tais contextos²⁴.

Uma análise proteômica necessariamente envolve as etapas de extração de proteínas, a identificação delas e, potencialmente, uma análise quantitativa delas. É interessante ressaltar que o número de proteínas extraídas é maior que o número de proteínas identificadas, o qual, por sua vez, é maior que o número daquelas passíveis de quantificação. Dessa forma, a preparação de amostras e a extração de proteínas para as etapas subsequentes se tornam um passo crítico em qualquer estudo proteômico. Processos otimizando os diversos passos envolvidos nessa etapa são desenvolvidos, embora muito ainda seja necessário. De maneira geral, proteínas com características extremas, tais como ponto isoelétrico (pI) muito ácido ou básico, massa molecular muito baixa ou alta, proteínas de membrana, que são geralmente hidrofóbicas e pouco solúveis, sofrem com uma pobre representação nas análises, ainda que estejam presentes em quantidades significativas na célula, tecido ou organismo a ser analisado. O proteoma de uma célula, por sua característica oligárquica, apresenta como dificuldade adicional a faixa dinâmica de concentração das proteínas presentes. Assim, proteínas que por vezes são mais importantes na resposta à pergunta de um processo fisiológico não podem ser visualizadas, por causa da abundância de outras proteínas menos interessantes que não estão diretamente relacionadas com o processo em questão. Convencionou-se que uma maneira interessante de abordar o estudo das proteínas seria fracioná-las de acordo com suas diferentes características, ou localização celular, possibilitando uma maior resolução do proteoma completo a ser analisado. Para tal, foram desenvolvidas diversas técnicas, cada qual apresentando seus pontos fortes e fracos e que, quando combinadas, podem gerar uma cobertura maior do proteoma do que se fossem individualmente utilizadas²⁵.

Tais técnicas podem ser divididas, de maneira geral, como "em gel" ou "fora de gel". As abordagens dependentes de gel foram durante muito tempo um sinônimo para eletroforese bidimensional (2-DE), fato que se deve ao grande número de trabalhos realizados com o uso dessa plataforma. Nessa técnica as proteínas são separadas de acordo com seu pI; então em um passo posterior as proteínas são separadas mais uma vez, porém agora de acordo com sua massa molecular, resultando em um eixo de coordenadas cartesianas, no qual em "x" é apresentado o pI das proteínas e em "y" sua massa molecular, sendo cada um dos pontos desse plano um *spot* que é representado, em teoria, por proteínas diferentes. Após a separação, a detecção das proteínas pode ser feita por métodos de coloração, sendo as principais aquelas que utilizam Coomassie Blue e nitrato de prata. Softwares específicos para análise de imagem realizam a análise densitométrica, permitindo a quantificação relativa de *spots* e a comparação entre diferentes géis. Os *spots* considerados interessantes podem, então, ser identificados por um processo chamado "*peptide*

mass fingerprinting” (PMF) ou “impressão digital de peptídeos”. Aqui, após digestão do *spot* com uma protease definida, as massas dos peptídeos resultantes são obtidas por espectrometria de massas (MS) e comparadas com massas teóricas previstas, obtidas por uma digestão *in silico* realizada em bancos de dados de proteína, permitindo sua identificação. A grande desvantagem dessa plataforma é a variação existente entre os diferentes géis, impossibilitando em alguns casos a comparação confiável entre eles. Visando solucionar esse problema, uma nova abordagem em gel – 2D-DIGE – reduziu os efeitos de tal desvantagem. Aqui diferentes amostras podem ser comparadas no mesmo gel, pois cada amostra é marcada com um composto fluorescente específico, e, antes da separação, são misturadas, o que leva a uma diminuição dos efeitos de erros técnicos que poderiam seguir se cada amostra fosse analisada em um gel separadamente. Após a definição dos *spots* de interesse, o processo de identificação pode seguir o mesmo descrito anteriormente.

Abordagens independentes de gel foram um marco na proteômica, já que a velocidade, a automatização e a precisão na aquisição de dados aumentaram de maneira surpreendente, contornando algumas das desvantagens encontradas na 2-DE. Em “*shotgun proteomics*”²⁶, as proteínas são digeridas antes mesmo de sua separação, sendo então os peptídeos separados por cromatografia líquida e eluídos de maneira acoplada a espectrômetro de massas (LC-MS) para sua identificação. Como a complexidade das amostras aumenta muito, geralmente são necessários passos de fracionamento anteriores à aplicação ao sistema LC-MS, podendo ser utilizados outros tipos de cromatografia, focalização isoeletrica ou eletroforese. Aqui a identificação de proteínas depende fortemente de recursos de informática para combinar a quantidade de informações geradas por MS/MS usado na identificação dos peptídeos e combiná-los.

A quantificação pode ser realizada por diferentes métodos. O uso de isótopos estáveis em sistemas como ICAT²⁷ e ICPL²⁸ permite a etiquetagem dos peptídeos em duas amostras a serem comparadas, anteriormente ao passo de MS, cada um com uma etiqueta, leve ou pesada, com uma diferença conhecida de massa molecular. Tal diferença permite a identificação de peptídeos presentes nas duas amostras e ainda leva a uma quantificação relativa pela análise da intensidade dos íons do peptídeo em questão em cada amostra. Outro sistema muito utilizado na pesquisa proteômica na psiquiatria é o de etiquetas isobáricas como iTRAQ²⁹, o qual permite a rotulagem e a análise de até oito amostras simultaneamente. Aqui, as etiquetas são compostas por três partes: um sítio de reação, uma porção balanceadora e o íon repórter. Quando rotulados, os peptídeos presentes nas diferentes amostras apresentam a mesma massa molecular, porém, uma vez submetidos ao processo de MS/MS, os íons repórteres fragmentam-se do resto das etiquetas conferindo informação quantitativa relativa do peptídeo analisado por meio da análise das intensidades daqueles. A desvantagem do métodos utilizando tais etiquetas é que a rotulagem das amostras ocorre depois de sua preparação, envolvendo etapas como extração, fracionamento e geração de peptídeos, o que pode levar à inserção de erros técnicos e à diminuição da precisão do processo de quantificação. Logo, métodos *in vivo* de etiquetagem de proteínas, como discutido nesta edição pela Dr. M. Filiou, têm sido implementados. Outro método de etiquetagem *in vivo* é o SILAC – “*stable isotope labeling by amino acids in cell culture*” ou “etiquetagem por aminoácidos isotópicos em cultura de células”³⁰. Nele, células são crescidas em um meio de cultura contendo aminoácidos isótopos, ou seja, que contém por exemplo ²H, ¹³C e ¹⁵N. Em contrapartida, a amostra controle é crescida em meio de cultura normal. Logo, as proteínas provindas da condição estudada serão relativamente mais pesadas que os controles, e essa diferença de massas pode ser identificada e consequentemente quantificada por MS. O princípio de SILAC tem sido também aplicado a modelos animais. Alternativamente às técnicas de etiquetagem, existe a quantificação “*label-free*”, que se baseia no fato de que a concentração de um determinado peptídeo presente em uma amostra é proporcional à sua área cromatográfica³¹. Com esse princípio, a técnica possibilita a análise de um número ilimitado de amostras, o que a torna interessante para estudos clínicos e na busca de biomarcadores. Outra vantagem reside no fato de a

análise poder ser realizada por meio de uma abordagem de aquisição independente de dados, resultando em maior precisão dos dados.

Nem todas as técnicas proteômicas têm sido exploradas em estudos de desordens psiquiátricas. Estudos sobre modificações pós-traducionais e quantificação direcionada por “*selective/multiple reaction monitoring*” (SRM/MRM) podem ainda ser tirados da caixa de ferramentas proteômicas para a melhor compreensão da patogênese e na identificação de biomarcadores para SCZ.

Referências

- Martins-de-Souza D, Guest PC, Rahmoune H, Bahn S. Proteomic approaches to unravel the complexity of schizophrenia. *Expert Rev Proteomics*. 2012;9:97-108.
- Martins-De-Souza D, Dias-Neto E, Schmitt A, Falkai P, Gormanns P, Maccarrone G, et al. Proteome analysis of schizophrenia brain tissue. *World J Biol Psychiatry*. 2010;11:110-20.
- Martins-de-Souza D, Gattaz WF, Schmitt A, Rewerts C, Marangoni S, Novello JC, et al. Alterations in oligodendrocyte proteins, calcium homeostasis and new potential markers in schizophrenia anterior temporal lobe are revealed by shotgun proteome analysis. *J Neural Transm*. 2009;116:275-89.
- Bergson C, Levenson R, Goldman-Rakic PS, Lidow MS. Dopamine receptor-interacting proteins: the Ca(2+) connection in dopamine signaling. *Trends Pharmacol Sci*. 2003;24:486-92.
- Martins-de-Souza D. Proteome and transcriptome analysis suggests oligodendrocyte dysfunction in schizophrenia. *J Psychiatr Res*. 2010;44:149-56.
- Hakak Y, Walker JR, Li C, Wong WH, Davis KL, Buxbaum JD, et al. Genome-wide expression analysis reveals dysregulation of myelination-related genes in chronic schizophrenia. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001;98:4746-51.
- Tkachev D, Mimmack ML, Ryan MM, Wayland M, Freeman T, Jones PB, et al. Oligodendrocyte dysfunction in schizophrenia and bipolar disorder. *Lancet*. 2003;362:798-805.
- Martins-de-Souza D, Maccarrone G, Wobrock T, Zerr I, Gormanns P, Reckow S, et al. Proteome analysis of the thalamus and cerebrospinal fluid reveals glycolysis dysfunction and potential biomarkers candidates for schizophrenia. *J Psychiatr Res*. 2010;44:1176-89.
- Huang JT, Wang L, Prabakaran S, Wengenroth M, Lockstone HE, Koethe D, et al. Independent protein-profiling studies show a decrease in apolipoprotein A1 levels in schizophrenia CSF, brain and peripheral tissues. *Mol Psychiatry*. 2008;13:1118-28.
- Martins-De-Souza D, Wobrock T, Zerr I, Schmitt A, Gawinecka J, Schneider-Axmann T, et al. Different apolipoprotein E, apolipoprotein A1 and prostaglandin-H2 D-isomerase levels in cerebrospinal fluid of schizophrenia patients and healthy controls. *World J Biol Psychiatry*. 2010;11:719-28.
- Lee Y, Morrison BM, Li Y, Lengacher S, Farah MH, Hoffman PN, Liu Y, et al. Oligodendroglia metabolically support axons and contribute to neurodegeneration. *Nature*. 2012;487:443-8.
- Jacqy J, Wilmotte J, Piraux A, Noel G. Cerebral blood flow patterns studied by rheoencephalography in schizophrenia. *Neuropsychobiology*. 1976;2:94-103.
- Marek GJ, Behl B, Beshpalov AY, Gross G, Lee Y, Schoemaker H. Glutamate (N-methyl-D-aspartate receptor) hypofrontality in schizophrenia: too little juice or a miswired brain? *Mol Pharmacol*. 2010;77:317-26.
- Tamminga CA, Thaker GK, Buchanan R, Kirkpatrick B, Alphas LD, Chase TN, et al. Limbic system abnormalities identified in schizophrenia using positron emission tomography with fluorodeoxyglucose and neocortical alterations with deficit syndrome. *Arch Gen Psychiatry*. 1992;49:522-30.
- Martins-de-Souza D, Guest PC, Harris LW, Vanattou-Saifoudine N, Webster MJ, Rahmoune H, et al. Identification of proteomic signatures associated with depression and psychotic depression in *post-mortem* brains from major depression patients. *Transl Psychiatry*. 2012;2:e87.
- Prabakaran S, Wengenroth M, Lockstone HE, Lilley K, Leweke FM, Bahn S. 2-D DIGE analysis of liver and red blood cells provides further evidence for oxidative stress in schizophrenia. *J Proteome Res*. 2007;6:141-9.
- Krishnamurthy D, Harris LW, Levin Y, Koutroukides TA, Rahmoune H, Pietsch S, et al. Metabolic, hormonal and stress-related molecular changes in *post-mortem* pituitary glands from schizophrenia subjects. *World J Biol Psychiatry*. 2012 Jan 17.

18. Wang L, Lockstone HE, Guest PC, Levin Y, Palotás A, Pietsch S, et al. Expression profiling of fibroblasts identifies cell cycle abnormalities in schizophrenia. *J Proteome Res.* 2010;9:521-7.
19. Levin Y, Wang L, Schwarz E, Koethe D, Leweke FM, Bahn S. Global proteomic profiling reveals altered proteomic signature in schizophrenia serum. *Mol Psychiatry.* 2010;15:1088-100.
20. Guest PC, Wang L, Harris LW, Burling K, Levin Y, Ernst A, et al. Increased levels of circulating insulin-related peptides in first-onset, antipsychotic naive schizophrenia patients. *Mol Psychiatry.* 2010;15:118-9.
21. Guest PC, Schwarz E, Krishnamurthy D, Harris LW, Leweke FM, Rothermundt M, et al. Altered levels of circulating insulin and other neuroendocrine hormones associated with the onset of schizophrenia. *Psychoneuroendocrinology.* 2011;36(7):1092-6.
22. Martins-de-Souza D. Is the word "biomarker" being properly used by proteomics research in neuroscience? *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci.* 2010;260:561-2.
23. Bernstein HG, Steiner J, Bogerts B. Glial cells in schizophrenia: pathophysiological significance and possible consequences for therapy. *Expert Rev Neurother.* 2009;9:1059-71.
24. Martins de Souza D, Oliveira BM, Castro-Dias E, Winck FV, Horiuchi RS, Baldasso PA, et al. The untiring search for the most complete proteome representation: reviewing the methods. *Brief Funct Genomic Proteomic.* 2008;7:312-21.
25. Martins-de-Souza D, Guest PC, Vanattou-Saifoudine N, Harris LW, Bahn S. Proteomic technologies for biomarker studies in psychiatry: advances and needs. *Int Rev Neurobiol.* 2011;101:65-94.
26. Link AJ, Eng J, Schieltz DM, Carmack E, Mize GJ, Morris DR, et al. Direct analysis of protein complexes using mass spectrometry. *Nat Biotechnol.* 1999;17:676-82.
27. Gygi SP, Rist B, Gerber SA, Turecek F, Gelb MH, Aebersold R. Quantitative analysis of complex protein mixtures using isotope-coded affinity tags. *Nat Biotechnol.* 1999;17:994-9.
28. Schmidt A, Kellermann J, Lottspeich F. A novel strategy for quantitative proteomics using isotope-coded protein labels. *Proteomics.* 2005;5:4-15.
29. Ross PL, Huang YN, Marchese JN, Williamson B, Parker K, Hattan S, et al. Multiplexed protein quantitation in *Saccharomyces cerevisiae* using amine-reactive isobaric tagging reagents. *Mol Cell Proteomics.* 2004;3:1154-69.
30. Ong SE, Blagoev B, Kratchmarova I, Kristensen DB, Steen H, Pandey A, et al. Stable isotope labeling by amino acids in cell culture, SILAC, as a simple and accurate approach to expression proteomics. *Mol Cell Proteomics.* 2002;1:376-86.
31. Chelius D, Bondarenko PV. Quantitative profiling of proteins in complex mixtures using liquid chromatography and mass spectrometry. *J Proteome Res.* 2002;1:317-23.