



Departament de Ciències Experimentals i de la Salut

PROTEÓMICA DE EXPRESIÓN
DIFERENCIAL EN *Acinetobacter baumannii*
RESISTENTE A COLISTINA

TESI DOCTORAL UPF/2010

Manuel Rodríguez Falcón

Barcelona, Juny 2010



Departament de Ciències Experimentals i de la Salut

Programa de Doctorat en Ciències de la Salut i de la Vida

PROTEÓMICA DE EXPRESIÓ
DIFERENCIAL EN *Acinetobacter baumannii*
RESISTENTE A COLISTINA

Memòria presentada per MANUEL RODRÍGUEZ FALCÓN per a optar al títol de Doctor per la Universitat Pompeu Fabra. Treball dirigit pel Dr. David Andreu Martínez, en el grup de recerca en Proteòmica i Química de Proteïnes, programa de Doctorat en Ciències de la Salut i de la Vida de la Universitat Pompeu Fabra.

Dr. David Andreu Martínez
Director de tesis

Manuel Rodríguez Falcón
Doctorand

Barcelona, Juny 2010

*Gracias a la familia consanguínea y a la que no lo es
porque siempre creísteis en mí, pero también gracias
a los que nunca lo hicieron al haberme
servido de gran inspiración.*

SUMMARY

Normally present in water, soil and waste water, *Acinetobacter baumannii* has become an important nosocomial pathogen, as causal agent of pneumonias, septicemias and urinary tract infections, among other complications in compromised patients from hospital's intensive care units. One of its last acquired abilities is the resistance to colistin (polymixin E), the last therapeutic option for its infections. In this thesis, descriptive and quantitative differential expression proteomics is used in the study of acquired colistin resistance. As result of this research, 1,097 proteins belonging to the *Acinetobacter* genus have been identified by combined application of bidimensional gel electrophoresis (2DE), differential gel electrophoresis (DIGE), and peptide labeling with stable isobaric isotopes tags (iTRAQ). Analyses have been performed on the global expressed proteome of a reference, colistin-sensible strain (*A. baumannii* ATCC 19606) and, for comparative purposes, on a derived strain on which colistin resistance has been induced *in vitro*. The resistant phenotype shows reduced fitness, with significant differences in expression found in outer membrane proteins, membrane active transporters, diverse metabolic enzymes (fatty acids, citrate, phenylacetate, piruvate and nitrogen), proteins involved in stress response and biofilm formation, as well as in protein synthesis and folding pathways. The work has allowed to assess the strengths and weaknesses of the different techniques currently used in this type of proteomic analysis.

RESUMEN

Acinetobacter baumannii, normalmente aislado en suelos y aguas (corrientes o residuales), se ha convertido en importante patógeno nosocomial, siendo agente causal de, entre otras complicaciones, neumonías, septicemias e infecciones del tracto urinario de pacientes comprometidos en unidades hospitalarias de cuidados intensivos. La más reciente de sus capacidades adquiridas es la resistencia a colistina (polimixina E), antibiótico peptídico considerado la última opción terapéutica en contextos clínicos. Esta tesis doctoral emplea la proteómica descriptiva y de expresión diferencial cuantitativa para investigar la resistencia adquirida por *A. baumannii* a dicho antibiótico. Los resultados han supuesto la identificación de 1.097 proteínas de *Acinetobacter* mediante el empleo combinado de electroforesis bidimensional convencional (2DE), 2DE diferencial (DIGE) y marcaje peptídico mediante isótopos isobáricos estables (iTRAQ). Los análisis se han realizado en el proteoma expresado por una cepa de referencia sensible a colistina (*A. baumannii* ATCC 19606), así como en una cepa derivada de ésta en la que se ha inducido, a efectos comparativos, resistencia a colistina *in vitro*. El fenotipo resistente manifestó reducida adaptabilidad biológica, encontrándose las principales diferencias en la estructura de la membrana externa, en la expresión de transportadores activos de membrana, en diversos enzimas metabólicos (ácidos grasos, citrato, fenilacetato, piruvato, nitrógeno) y de respuesta a condiciones de estrés, así como en la expresión de proteínas participantes en la formación de biopelículas y en el proceso de síntesis y plegamiento de proteínas. Además, el trabajo ha permitido evaluar los puntos fuertes y débiles de las técnicas empleadas actualmente en este tipo de análisis proteómicos.

ÍNDICE

1. Introducción	1
2. Revisión bibliográfica	3
2.1. Proteínas, proteoma y proteómica	3
2.2. Métodos usados en proteómica	6
2.3. Preparación de la muestra	7
2.4. Separación de proteínas	9
2.4.1. Fraccionamiento subcelular	10
2.4.2. Separación electroforética	10
2.4.3. Fraccionamiento basado en la cromatografía	13
2.5. Identificación de proteínas por espectrometría de masas	14
2.5.1. Aspectos metodológicos e instrumentales	14
2.5.2. Herramientas informáticas para la identificación de proteínas	18
2.6. Cuantificación y marcaje cuantitativo	21
2.6.1. Cuantificación de proteínas basada en la electroforesis	22
2.6.1.1. Marcaje metabólico mediante marcadores radiactivos	22
2.6.1.2. Tinción de proteínas en geles de electroforesis	23
2.6.1.3. Herramientas informáticas para el análisis de imagen 2DE	28
2.6.2. Cuantificación de proteínas basada en el marcaje isotópico y espectrometría de masas	30
2.6.2.1. Marcaje químico mediante isótopos estables – ICAT, iTRAQ	33
2.6.2.2. Marcaje metabólico mediante isótopos estables – SILAC	38
2.6.2.3. Marcaje enzimático mediante isótopos estables – Marcaje O ¹⁸ proteolítico	39

2.6.2.4. Algoritmos para la cuantificación de proteínas	40
2.6.3. Secuencia de procesos en el análisis de los datos de origen proteómico	40
2.7. Problemática actual de las infecciones nosocomiales y la resistencia antibiótica: Aproximación mediante estudios proteómicos.	42
2.8. <i>Acinetobacter baumannii</i> .	45
2.8.1. Historia y estado actual de la clasificación taxonómica en <i>Acinetobacter</i>	46
2.8.2. Epidemiología	50
2.8.3. Patogenia	52
2.8.4. Bases genéticas de la adquisición de resistencia antibiótica	55
2.8.5. Principales mecanismos de resistencia antibiótica	58
2.8.5.1. Mecanismos de resistencia a las polimixinas	67
2.8.6. Coste biológico de la resistencia antibiótica	72
3. Justificación del proyecto e hipótesis de trabajo	75
4. Objetivos	79
5. Materiales y métodos	81
5.1. Cultivo bacteriano e inducción de la resistencia a colistina	81
5.2. Extracción de proteínas	82
5.2.1. Extracción de proteínas solubles	82
5.2.2. Extracción de proteínas de membrana	83
5.3. Electroforesis bidimensional	84
5.3.1. Primera dimensión o isoelectroenfoque	84
5.3.2. Segunda dimensión o SDS-PAGE	84
5.3.3. Tinción de proteínas en gel de electroforesis	85
5.3.4. Análisis de imagen	85
5.4. Electroforesis bidimensional diferencial (DIGE)	85

5.4.1. Marcaje de proteínas, primera y segunda dimensión electroforética	85
5.4.2. Análisis de imagen cuantitativo	86
5.4.3. Tinción de proteínas totales y digitalización	88
5.5. Digestión enzimática de las proteínas incluidas en el gel y extracción de los péptidos	88
5.6. Marcaje de iTRAQ	88
5.6.1. Digestión trípica y marcaje con los reactivos iTRAQ	88
5.6.2. Fraccionamiento peptídico por cromatografía de intercambio catiónico y desalado por cromatografía en fase reversa	90
5.7. Análisis por espectrometría de masas y búsqueda en bases de datos	91
5.7.1. MALDI TOF MS	91
5.7.2. nanoLC-MS/MS	92
5.7.2.1. Análisis de los péptidos procedentes de las proteínas incluidas en geles de electroforesis	92
5.7.2.2. Análisis de los péptidos procedentes del experimento iTRAQ	93
5.7.3. Búsquedas en bases de datos	93
5.7.3.1. Identificación de las proteínas procedentes de los geles de electroforesis	93
5.7.3.2. Identificación y cuantificación en el análisis iTRAQ	94
6. Resultados	97
6.1. Visión global del proteoma de <i>A. baumannii</i> ATCC 19606 mediante 2DE	97
6.1.1. Patrón proteico constituido por las proteínas solubles	97
6.1.2. Patrón proteico constituido por las proteínas de membrana	106
6.2. Proteómica de expresión diferencial cuantitativa entre <i>A. baumannii</i> sensible y resistente a colistina	112
6.2.1. Análisis por gel de electroforesis diferencial (DIGE)	112

6.2.2. Análisis por marcaje con isótopos isobáricos estables (iTRAQ)	121
7. Discusión	137
7.1. Aproximación al proteoma de <i>A. baumannii</i> a través de 2DE convencional	138
7.2. Análisis cuantitativo	140
7.2.1. Proteoma caracterizado por análisis DIGE	140
7.2.1.1. Arquitectura de la membrana y permeabilidad	141
7.2.1.2. Biosíntesis y plegamiento de proteínas	144
7.2.1.3. Metabolismo	147
7.2.1.4. Resistencia a colistina y sensibilidad antibiótica	150
7.2.2. Proteoma caracterizado por análisis iTRAQ	151
7.2.2.1. Proteínas con expresión aumentada en la cepa resistente a colistina	152
7.2.2.2. Proteínas con expresión disminuida en la cepa resistente a colistina	155
7.2.3. Comparativa DIGE <i>vs.</i> iTRAQ	160
7.3. Comparativa entre todos los métodos de análisis utilizados: <i>in-gel</i> (2DE <i>vs.</i> DIGE) <i>vs.</i> <i>off-gel</i> (iTRAQ)	170
8. Conclusiones	177
9. Referencias bibliográficas	179
ANEXO A: Protocolos utilizados en esta tesis	229
ANEXO B: Resultados adicionales	249
ANEXO C: Artículos derivados de esta tesis	353
C.1. <i>The cost of resistance to colistin in <u>Acinetobacter baumannii</u>: a proteomic perspective</i>	354
C.2. <i>iTRAQ[®] monitoring of membrane architecture changes in colistin-resistant <u>Acinetobacter baumannii</u></i>	368

1. INTRODUCCIÓN

Recientemente, gran parte de los esfuerzos en la investigación básica en el ámbito clínico se han concentrado en la búsqueda de una solución al frecuente incremento de los patógenos Gram-negativos no fermentadores de lactosa responsables de las infecciones adquiridas en el ambiente hospitalario [1]. Dentro de este grupo de organismos, *Acinetobacter baumannii* despunta como uno de los patógenos que habitualmente produce infecciones en pacientes de las unidades de cuidados intensivos dentro de los hospitales [2, 3]. Esta bacteria se haya comúnmente en el agua, suelo y aguas residuales, pero recientemente se ha convertido en uno de los más importantes patógenos nosocomiales [4], siendo agente causal de una gran variedad de infecciones humanas incluyendo neumonía, septicemia e infecciones del tracto urinario [5]. Aunque hasta la década de los setenta se conocía su sensibilidad frente a la mayoría de los antibióticos, *A. baumannii* ha ido desarrollando resistencia a los agentes antimicrobianos de uso común a lo largo del tiempo, de manera que, a día de hoy, la diseminación de cepas de *Acinetobacter* resistente a múltiples fármacos entre enfermos críticos, pacientes hospitalizados y las resultantes epidemias, se han convertido en una causa de gran preocupación [3].

El fenotipo resistente a los antibióticos en bacterias Gram-negativas puede surgir tras la adquisición de uno o varios mecanismos que, frecuentemente, incluyen la mutación de la DNA girasa, la producción de enzimas modificadoras de las dianas de los antibióticos, el incremento en los sistemas de expulsión de fármacos fuera de la célula y el descenso en la permeabilidad de la membrana. Los dos últimos mecanismos están relacionados con la estructura compleja de la envuelta celular o membrana externa que presentan las bacterias Gram-negativas y que actúa como barrera previniendo la entrada de los antibióticos o aumentando su expulsión activa mediada por varias clases de proteínas integradas en la membrana [6].

Las proteínas de membrana están involucradas en procesos como el ensamblaje de la pared celular, la síntesis y modelaje del peptidoglicano, la obtención de nutrientes, la producción de energía, la adherencia celular, la motilidad, la sensibilidad medioambiental, la virulencia y la resistencia antibiótica. La asociación entre estas proteínas y la resistencia a los antibióticos ha sido observada en las bacterias Gram-negativas, lo que ha generado gran

interés en su estudio [7]. La relevancia que tienen en el campo de la medicina queda ilustrada por el hecho de que más de la mitad de las dianas conocidas de los antimicrobianos actualmente activos contra bacterias Gram-negativas son proteínas de la membrana celular [8].

En la actual era post-genómica, la proteómica ha conseguido integrar un conjunto de metodologías indispensables por su elevada precisión y eficacia, como herramientas con las que llevar a cabo el análisis de proteínas a gran escala. Inicialmente definido por M. Wilkins en 1994 como el conjunto de proteínas expresadas por un genoma, el término “proteoma” fue rápidamente aceptado, así como el vocablo derivado “proteómica”, algo más ambiguamente definido como un área o campo del conocimiento más que como una rama del saber acotada y estática. La proteómica podría así definirse como el uso de medidas cuantitativas de la expresión génica a nivel de proteínas con el fin de caracterizar procesos biológicos (como por ejemplo el desarrollo de una enfermedad o el efecto de un fármaco) y descifrar los mecanismos de control de la expresión genética [9].

Los genomas de cinco especies del género *Acinetobacter* han sido publicados, pero pocos estudios proteómicos se han realizado sobre este organismo. Aunque su resistencia intrínseca es bien conocida, así como su gran capacidad para adquirir genes de resistencia, poco se ha avanzado en el conocimiento de los mecanismos moleculares que subyacen a la adquisición de este fenotipo.

La presente tesis doctoral se engloba dentro de las líneas de investigación que utilizan la proteómica descriptiva y de expresión diferencial cuantitativa en el estudio de la adquisición de resistencia al antibiótico colistina adquirida por *Acinetobacter baumannii*. El trabajo realizado aporta novedades en este área gracias a la aplicación de la electroforesis bidimensional diferencial (o DIGE), así como del marcaje peptídico mediante el uso de isótopos isobáricos estables (en concreto los de la tecnología iTRAQ), para comparar cuantitativamente las diferencias que existen a nivel de la expresión de proteínas entre cepas sensibles y resistentes al antibiótico.

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1. Proteínas, proteoma y proteómica

Las proteínas son moléculas orgánicas compuestas por aminoácidos unidos entre sí mediante enlaces peptídicos que adquieren una estructura tridimensional secundaria, terciaria y/o cuaternaria característica. Las proteínas fueron descritas por primera vez en el siglo XIX por Jöns Jakobs Berzelius quien las denominó πρωτειοξ, que en griego significa “somos número uno” o πρωτειον que quiere decir “preeminente” o “primer premio”, deriva de la palabra griega πρώτα que significa “lo primero”, aunque también puede haberse las bautizado en honor al dios de la mitología griega Proteo por la cantidad de formas que éste y éstas pueden adquirir. Estas moléculas tienen un papel crucial en todos los organismos vivos, pudiendo actuar como enzimas catalizadoras de muchas reacciones químicas esenciales del metabolismo celular, o constituyendo el esqueleto o sistema de sostén de la célula, así como de diferentes estructuras subcelulares. También hay que resaltar el papel que juegan en el mantenimiento de la estructura del DNA (*Deoxyribonucleic acid*) y durante la transcripción y replicación del mismo. Además, las proteínas participan en la motilidad celular, en la señalización celular, actúan como hormonas en el sistema endocrino, como transportadoras en la sangre, como anticuerpos en el sistema inmunitario, en la mitosis, meiosis, etcétera. La importancia de las proteínas se ve resaltada por su participación en la mayoría de procesos y funciones celulares.

El término proteoma, entendido como el conjunto de todas las proteínas expresadas por un genoma dado, no fue acuñado hasta finales de 1994 [10]. Aunque las proteínas han sido estudiadas desde su descubrimiento, su análisis se vuelve particularmente intenso al serles reconocido su importante papel en todos los organismos vivos. El término “*proteome*”, que surge de la abreviación de la expresión inglesa “*PROTEin complement of the genOME*”, sólo hace referencia al conjunto de proteínas expresadas por la célula [11], pero, según una concepción más precisa en la que se enfatiza su naturaleza dinámica, el proteoma debe entenderse como el conjunto de proteínas expresadas en un tiempo y espacio dado, debido a que la composición del mismo varía de tejido a tejido e incluso de célula a célula. Así, la composición de un proteoma es dependiente de una gran variedad de factores internos y

externos tales como el medio ambiente, edad, sexo, enfermedad, etcétera. La proteómica podría describirse como el análisis de proteínas a gran escala [12] o, de una manera más exhaustiva, la proteómica no sólo incluye la identificación y cuantificación de proteínas, sino también la determinación de sus localizaciones, modificaciones, interacciones, actividades y funciones [13].

El genoma humano está constituido de aproximadamente 3×10^9 pares de bases nucleotídicas (A, C, T y G) o nucleótidos, almacenados en 23 parejas de cromosomas (22 parejas de cromosomas autosómicos y la pareja de cromosomas sexuales, gonosomas o heterocromosomas). Se estima que contiene entre 20.000 y 25.000 genes que codifican para proteínas [14-16], lo que representa un 1,5% del genoma, mientras que el resto son genes que codifican para RNA que no se traducirá en proteína o RNA no codificante, secuencias reguladoras, intrones y el denominado “*junk DNA*” o secuencias repetidas que no codifican para nada. Aunque la secuencia de aminoácidos de una proteína esté definida por un gen concreto, la información genética por sí sola no puede contener la información completa concerniente a la misma. Así, los transcritos de mRNA procedentes del DNA que sí codifica para proteínas, pueden ser procesados siguiendo sitios de corte y empalme alternativos (o *splicing* alternativo) y las proteínas traducidas pueden ser cortadas así como modificadas químicamente en la célula según un procesado posttraduccional. Se han documentado al menos unas 200 posibles modificaciones posttraduccionales diferentes, lo cual demuestra la existencia de un complejo entorno proteico dentro de la célula [17]. La figura 1 (página siguiente) pretende ilustrar esquemáticamente la complejidad del proteoma celular.

El rápido desarrollo de la proteómica se ha hecho posible gracias al progreso en la instrumentación analítica, especialmente en espectrometría de masas (MS, *mass spectrometry*), con la introducción de cada vez más potentes espectrómetros de masas unidos a las mejoras en las técnicas de ionización suave. No menos importantes son los avances tecnológicos y metodológicos en la separación de proteínas y péptidos así como en la reducción de la complejidad de las muestras, mayoritariamente por técnicas de cromatografía líquida y electroforesis. La bioinformática es la otra gran herramienta responsable del avance de la proteómica, gracias a su cada vez mayor capacidad para

colectar, almacenar, procesar y visualizar la gran cantidad de datos que se generan en los estudios proteómicos.

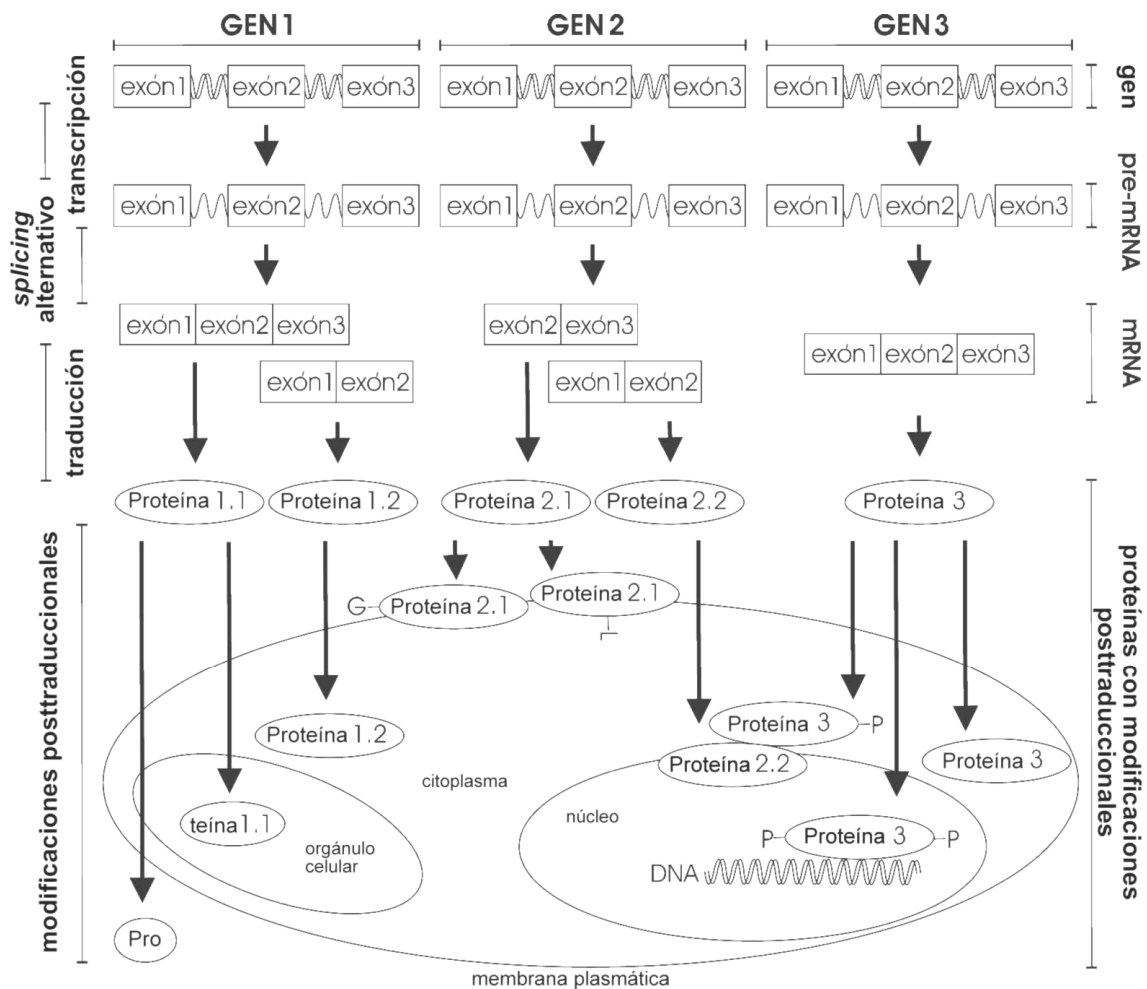


Figura 1. El proteoma es mucho más complejo que el genoma correspondiente. Esta figura pretende ilustrar el proteoma creado a partir de tres genes. En primer lugar los genes son transcritos a mRNA (*Messenger-RNA*) que puede ser cortado y empalmado en posiciones alternativas (o *splicing* alternativo). El mRNA resultante es traducido a proteínas que también pueden ser cortadas o procesadas según distintos tipos de modificaciones posttraduccionales. La localización de las proteínas y sus interacciones con otras proteínas o moléculas juega un importante papel en su funcionalidad. Las modificaciones posttraduccionales afectan, entre otras características, a la localización e interacción de las proteínas. Adaptado de [18].

Aunque la genómica ha estado dominando el área de la investigación biomédica durante las décadas pasadas, la proteómica ha ido ganando terreno en este ámbito. La razón fundamental para ello es el hecho de que el patrón proteico de una muestra biológica es mucho más informativo sobre el estado fisiológico de un organismo que su genoma, lo que subraya el papel muy prometedor de la proteómica en el campo de la biomedicina del futuro.

2.2. Métodos usados en proteómica

Hay una gran variedad de métodos, reactivos, instrumentación y herramientas informáticas disponibles para el diseño, la realización y el análisis de datos de experimentos proteómicos [12, 19-22]. En general, dichos experimentos suelen consistir en cuatro etapas básicas: 1) preparación de la muestra, 2) fraccionamiento de la muestra, 3) análisis por MS y 4) análisis informático de los datos. En la proteómica cuantitativa las proteínas son normalmente marcadas durante la preparación de la muestra y cuantificadas durante el fraccionamiento de la misma en la aproximación que se conoce como proteómica basada en la electroforesis bidimensional (o *gel-based proteomics*). En otra alternativa que ha ido adquiriendo mayor popularidad, las proteínas también pueden ser cuantificadas durante el análisis de MS en lo que se denomina como proteómica basada en la espectrometría de masas (*gel-free* ó *MS-based proteomics*). La figura 2 (página siguiente) recoge las cuatro fases por las que normalmente pasa un experimento proteómico. Todos los métodos usados en las distintas etapas están estrechamente relacionados entre sí, por lo que el camino seguido durante la preparación de la muestra debe estar unido al posterior método de fraccionamiento y, de la misma manera, el análisis de MS debe ser seleccionado en base al método de fraccionamiento usado.



Figura 2. El diseño experimental en un ensayo proteómico normalmente pasa por cuatro fases: la preparación de la muestra, el fraccionamiento de la misma, su análisis por espectrometría de masas (MS) y el análisis de los datos obtenidos. En la proteómica cuantitativa, la abundancia de las proteínas puede ser medida durante el fraccionamiento de la muestra (proteómica cuantitativa basada en la electroforesis bidimensional) o durante el análisis de MS (proteómica cuantitativa basada en la espectrometría de masas). Adaptado de [23].

2.3. Preparación de la muestra

El origen de la muestra utilizada en un experimento proteómico puede ser muy diverso y las fuentes desde las que extraer proteínas muy diferentes. Por citar algunos ejemplos, los cultivos celulares, los tejidos celulares o los fluidos corporales serían los más comúnmente utilizados en la investigación biomédica. Un experimento proteómico tiene buenas posibilidades de éxito cuando existe la posibilidad de acceder a la secuencia genómica del organismo estudiado. Para la investigación que nos ocupa, los resultados proteómicos obtenidos antes de la liberación pública del genoma de *Acinetobacter baumannii* (principios del año 2007), dificultaban el progreso de esta línea de investigación dada la escasez de información genética referente a este organismo y las restricciones para el acceso libre y gratuito a la misma. Desde diversos ámbitos se ha reclamado suprimir las limitaciones al acceso a la información biológica [24-26]. En concreto, el acta firmada en Noviembre de 2008 por la Convención sobre Diversidad Biológica del Programa de las Naciones Unidas para el Medioambiente [27], afirma categóricamente que el acceso libre a la información y material de naturaleza biológica es crítica para la investigación de índole no comercial, al contribuir esta a la conservación y uso sostenible de la biodiversidad.

Una vez se tiene acceso al código genético secuenciado del organismo objeto de estudio, este puede ser traducido *in silico* a sus secuencias proteicas, lo que facilita la identificación de las proteínas durante el análisis de los datos. La mayoría de las conclusiones inferidas en proteómica están basadas en la mayor o menor precisión con la que se realizan las

comparaciones entre los resultados experimentales y las especies proteicas presentes en las bases de datos biológicas que, en su mayoría, proceden de traducciones teóricas (*in silico*) de las secuencias de los genes en ellas presentes. Este hecho representa una de las mayores debilidades de la proteómica moderna, puesto que debido a las numerosas modificaciones posttraduccionales, a posibles mutaciones genéticas y a la carencia de sistemas estandarizados, la veracidad de los resultados siempre debe ser cuidadosamente valorada [28, 29]. Algunos han criticado abiertamente – y, a nuestro juicio, de modo exagerado – las técnicas “-ómicas” porque fomentan un reduccionismo que aleja cada vez más al investigador del sistema objeto de estudio, al tiempo que tienden a generar un cúmulo de datos que, al margen de su calidad, no siempre son fáciles de extrapolar y traducir al campo clínico-asistencial [30]. En todo caso, incluso sin acceso a la información genética, las proteínas también pueden ser identificadas tanto por secuenciación *de novo* [31, 32], como por comparación con proteínas similares en otros organismos cuyos genomas sí se encuentren secuenciados [33], aunque tales métodos hacen el análisis de los datos más complicado y no favorecen los estudios a gran escala.

La facilidad con la que pueden introducirse contaminantes en la muestra, así como la de que parte del contenido proteico pueda malograrse durante su manipulación, subraya la importancia de la primera etapa de todo experimento proteómico. Así pues, la muestra debe ser manejada con el máximo cuidado, prestando especial atención a evitar cualquier contaminación. La habitual presencia de queratina humana, proteína contaminante que con mayor frecuencia se encuentra en los análisis proteómicos, enfatiza la importancia de un manejo cuidadoso de la muestra durante su preparación. Además, muchos de los agentes químicos utilizados en biología celular deben ser cuidadosamente eliminados de la muestra antes de su análisis por MS, dado que la presencia de los mismos también influye negativamente en los resultados finales obtenidos.

La preparación de la muestra comienza con el cultivo o el lisado de células, homogenizando tejidos u obteniendo fluidos corporales para la extracción de las proteínas presentes. Las proteínas extraídas son desnaturalizadas y modificadas químicamente para solubilizarlas y prever así la agregación y la actividad proteasa que pueda presentar la muestra. Las proteínas pueden ser desnaturalizadas por calor o a través de agentes químicos como la urea o distintos detergentes [34, 35]. Sin embargo, los detergentes generan un ruido de

fondo que puede llegar a enmascarar señales específicas de origen peptídico, por lo que la cantidad de detergente presente en la muestra debe ser mantenida al mínimo o, alternativamente, ser diluida o eliminada de la muestra antes de su digestión enzimática y análisis por MS. Una vez desnaturalizadas, las proteínas son además reducidas y alquiladas para prevenir su agregación a través de la formación de enlaces o puentes disulfuro entre los grupos tiol de dos cisteínas. Los agentes reductores más comúnmente utilizados son el beta-mercaptoetanol, el ditioneitol (DTT), la tributilfosfina (TBP) y la tris(2-carboxietil)fosfina (TCEP), mientras que la iodoacetamida, algunos derivados de la acrilamida y las vinilpiridinas son normalmente utilizados como agentes alquilantes [36-39]. El último paso en la preparación de la muestra es la digestión de las proteínas hasta sus péptidos resultantes. Un gran número de reactivos y enzimas con diferentes especificidades están disponibles para llevar a cabo la digestión proteica [40]. La tripsina es el enzima más comúnmente utilizado para llevar a cabo la digestión proteolítica dada su alta especificidad para escindir enlaces peptídicos entre residuos de lisina o arginina y cualquier siguiente aminoácido [41, 42]. Tras la digestión triptica, los péptidos resultantes tienen carga positiva, lo cual favorece su ionización en el posterior análisis de MS. Además, la tripsina es rentable por bajo coste y alta eficiencia.

2.4. Separación de proteínas

Aunque la instrumentación en el campo de la proteómica ha mejorado significativamente durante la última década [43, 44], el conjunto total de proteínas que constituye cualquier proteoma celular resulta demasiado complejo como para ser medido. Es por ello que el fraccionamiento de la muestra es un paso crucial en todo experimento proteómico, al permitir incrementar el número de proteínas identificadas y favorecer la detección de aquellas presentes en menor cantidad. Las muestras pueden ser fraccionadas usando diferentes métodos de prefraccionamiento, a los que siguen separaciones basadas en la electroforesis o la cromatografía. Existen diferentes formas de prefraccionar la muestra durante su preparación y así conseguir una reducción en su complejidad. En lugar de usar el extracto total de proteínas, se pueden aislar y caracterizar orgánulos u otras estructuras subcelulares [45-47]. Si el objeto de estudio son ciertos complejos proteicos, estos pueden ser enriquecidos mediante el uso de epítomos clonados o mediante el uso de etiquetas (o *tags*) para su purificación por afinidad [48, 49]. El enmascaramiento de las proteínas de

interés producido por algunas de las proteínas de gran abundancia presentes en la muestra, puede ser eliminado por reducción de las mismas mediante el uso de anticuerpos específicos, como suele hacerse en el caso de la albúmina sérica del plasma sanguíneo [50]. Aún existiendo numerosas vías para el prefraccionamiento de la muestra, es necesario continuar su posterior fraccionamiento mediante cromatografía o electroforesis, o haciendo uso de la combinación de ambas antes del análisis por MS.

2.4.1. Fraccionamiento subcelular

Conocer la localización de las proteínas en la célula es un dato muy importante que nos puede ayudar a dilucidar su funcionalidad. Así, el análisis del proteoma de los compartimentos subcelulares provee información concerniente a la funcionalidad de las proteínas, reduciendo de esta manera la complejidad de la muestra. Existen numerosos métodos para el aislamiento y purificación de distintas estructuras subcelulares [45-47, 51], entre los que se incluye la clásica centrifugación en gradiente de densidad y la purificación por afinidad mediante anticuerpos específicos para proteínas transmembrana de diferentes orgánulos. También pueden emplearse técnicas electroforéticas como la electroforesis de flujo libre, la electroforesis en gradiente de densidad de alta resolución o la inmunoelectroforesis. Los orgánulos pueden además ser también seleccionados mediante técnicas basadas en la citometría de flujo. Durante los últimos años se han publicado numerosos artículos caracterizando los proteomas de distintos orgánulos celulares [46, 51-54]. El número de identificaciones proteicas en estos estudios varía desde diez hasta miles de proteínas identificadas, dependiendo del orgánulo objeto de estudio y los métodos utilizados.

2.4.2. Separación electroforética

La electroforesis ha sido y sigue siendo una herramienta fundamental de separación de proteínas. En función de la complejidad de la muestra puede optarse por electroforesis mono o bidimensional, siendo esta última (2DE, *2-Dimensional Electrophoresis*) la más adecuada para separar mezclas complejas de proteínas. En la 2DE, desarrollada de manera independiente por tres grupos distintos [55-57], las proteínas son fraccionadas respecto a sus puntos isoelectricos y sus pesos moleculares mediante una primera etapa de enfoque

isoelectric (IEF, *Iso-electric focussing*) seguida de electroforesis en gel de poliacrilamida desnaturizante (SDS-PAGE, *Sodium Dodecyl Sulfate – Polyacrilamide Gel Electrophoresis*). Las proteínas se cuantifican desde el mismo gel mediante distintas tinciones o métodos de marcaje que permiten llevar a cabo un análisis cuantitativo basado en la intensidad de su señal. Así, aquellas que presentan interés pueden ser detectadas en el gel, extraídas del mismo y preparadas para su identificación mediante análisis de MS.

La 2DE presenta diversas ventajas que explican su popularidad en los estudios proteómicos. Entre otras destaca el hecho de que permite realizar una visualización directa del mapa de proteínas del proteoma estudiado, a diferencia de los métodos de fraccionamiento cromatográfico. Ello permite la fácil identificación de isoformas proteicas y sus modificaciones posttraduccionales, así como la comparación con otros mapas proteicos existentes en las bases de datos. Por ejemplo, la base de datos de SWISS-2DPAGE (accesible en <http://www.expasy.ch/ch2d/> y consultada el 1 de Marzo de 2009), contiene unas 1.200 entradas para 36 mapas proteicos de referencia en humano, ratón, *Arabidopsis thaliana*, *Dictyostelium discoideum*, *Escherichia coli*, *Saccharomyces cerevisiae* y *Staphylococcus aureus* (N315) [58, 59]. La resolución de los geles 2DE es suficiente para detectar unas 2.000 proteínas de manera rutinaria, pero el uso de geles de electroforesis de gran tamaño, así como la múltiple superposición de distintos gradientes inmovilizados de pH (IPG, *Immobilized pH gradients*), permiten la identificación de entre 5.000 y 10.000 proteínas [34, 60]. El desarrollo de los IPG eliminó gran parte de las limitaciones que presentaban los geles 2DE basados en anfolitos portadores, tales como la baja reproducibilidad o la dificultad de detección de proteínas muy ácidas, básicas o de baja abundancia [34, 61]. Los progresos en la preparación de muestras para 2DE han facilitado también el análisis de proteínas de membrana, tradicionalmente difíciles de estudiar a través de esta técnica [35]. La figura 3 representa el típico flujo de trabajo en un experimento de proteómica basada en 2DE.

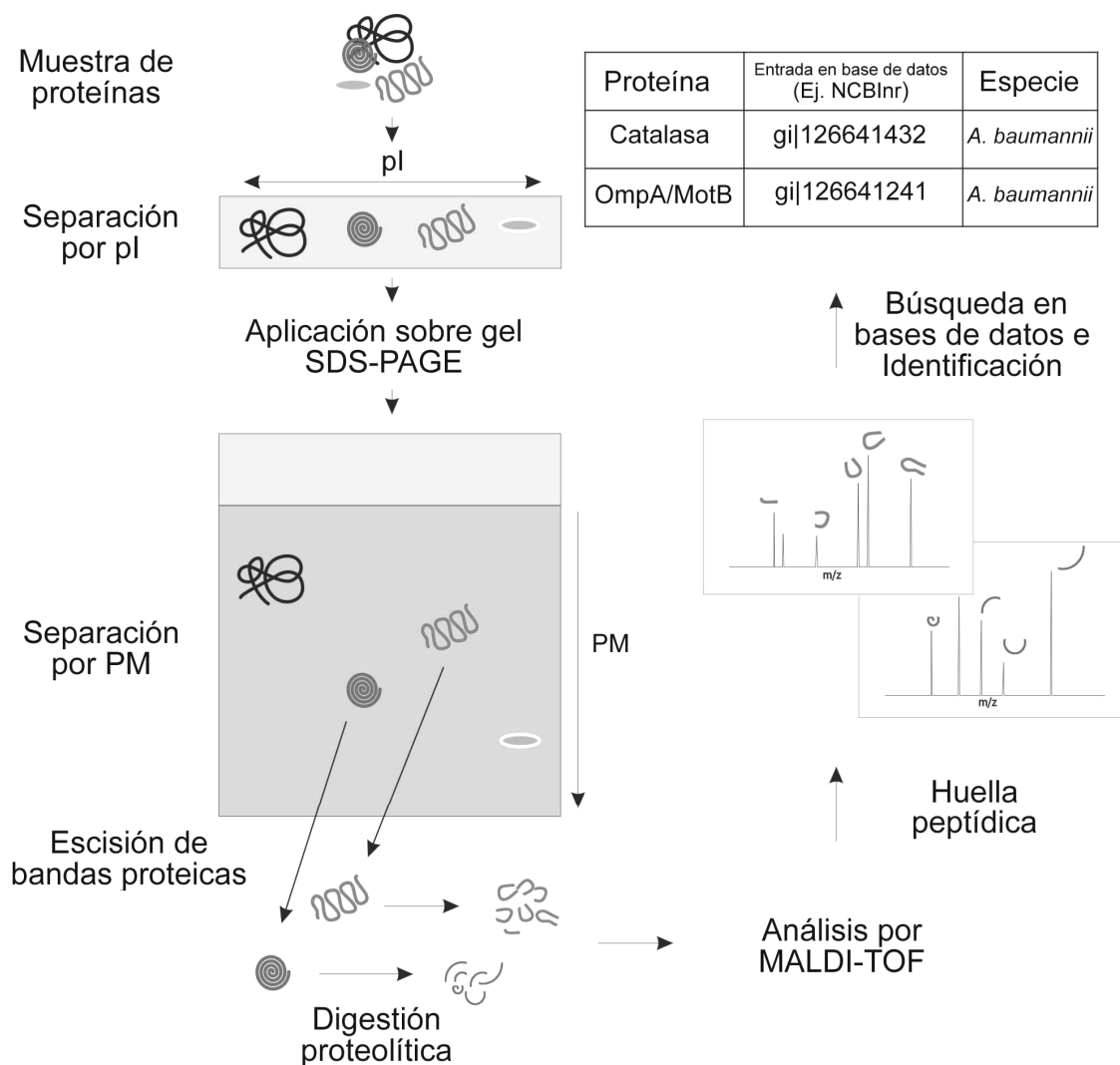


Figura 3. Secuencia de pasos en un experimento típico de proteómica basada en 2DE. Una muestra compleja de proteínas se aplica a un gel con un gradiente de pH inmovilizado en el que las proteínas se separan de acuerdo a sus puntos isoeléctricos (pI). Una vez resueltas, el gel se deposita sobre un gel de poliacrilamida desnaturalizante (SDS-PAGE) en el que las proteínas se separan por peso molecular (PM) en una segunda dimensión perpendicular a la anterior. Tras la tinción del gel, las bandas proteicas de interés se extraen y se digieren; los péptidos resultantes permiten identificar la proteína correspondiente a partir de su huella peptídica por MALDI-TOF MS y subsiguiente búsqueda en bases de datos. Adaptado de [22].

Aunque la 2DE ha sido aplicada para la búsqueda de biomarcadores, las proteínas detectadas con niveles de expresión alterada suelen pertenecer al conjunto de proteínas de alta abundancia [62]. Sin embargo, empleando fracciones específicas de proteínas o utilizando métodos de enriquecimiento durante la preparación de la muestra, se pueden

detectar en suero sanguíneo incluso proteínas derivadas de otros tejidos mediante esta aproximación [63].

2.4.3. Fraccionamiento basado en la cromatografía

Las técnicas cromatográficas son otra potente estrategia con la que fraccionar muestras proteicas. En los métodos basados en la cromatografía las proteínas son normalmente digeridas antes de ser separadas mediante cromatografía multidimensional, para luego analizarlas de manera automatizada mediante espectrometría de masas en tándem (o MS/MS). En la cromatografía multidimensional se llevan a cabo sucesivos fraccionamientos cromatográficos empleando como fases estacionarias columnas de fase reversa (RP, *Reverse Phase*), de exclusión molecular (SEC, *Size Exclusion Chromatography*), de intercambio catiónico (SCX, *Strong Cation Exchange*) o aniónico (SAX, *Strong Anion Exchange*), de afinidad o de hidroxapatita [52]. En las primeras aplicaciones de la cromatografía multidimensional en proteómica se usó tanto la cromatografía de exclusión por tamaño molecular como el intercambio catiónico, combinados en línea con la cromatografía en fase reversa [64, 65]. A partir de estos experimentos iniciales, muchas han sido las combinaciones introducidas en la separación cromatográfica mediante el uso de instrumentos de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC, *High Performance Liquid Chromatography*), conectados en línea con equipos de MS/MS.

La creciente popularidad del fraccionamiento basado en la cromatografía es consecuencia de su capacidad para superar algunas de las limitaciones de los métodos basados en la 2DE, permitiendo de este modo el estudio de ciertas proteínas difíciles de abordar mediante 2DE, incluyendo las de membrana o las de baja abundancia [18, 66-70]. La razón reside en que en la 2DE las proteínas se separan para ser posteriormente digeridas, mientras que en la cromatografía multidimensional son primero digeridas a péptidos y después fraccionadas. Además, la cromatografía multidimensional permite el análisis automatizado y simultáneo de un mayor número de muestras que la 2DE. La resolución de la cromatografía multidimensional es tan buena como la de la 2DE, permitiendo la identificación de más de 1.000 proteínas. Sin embargo, la detección de isoformas y modificaciones posttraduccionales resulta más complicada. Aún así, el uso del fraccionamiento

cromatográfico en los estudios de proteómica cuantitativa se ha visto incrementado por la reciente aparición del marcaje mediante isótopos estables.

Tanto el fraccionamiento basado en la 2DE como en la cromatografía presentan ventajas y desventajas y el método tiene que ser seleccionado cuidadosamente para cada tipo de muestra y estudio. Además, estos métodos pueden ser utilizados paralelamente, obteniéndose resultados complementarios [71-75].

2.5. Identificación de proteínas por espectrometría de masas

La espectrometría de masas es un método analítico utilizado para medir la relación de la masa frente a la carga de las moléculas (*ratio m/z*). Esta medida se lleva a cabo mediante ionización de las moléculas, separación de los iones resultantes de acuerdo con su relación masa/carga, y detección de las abundancias de los mismos. El primer espectrómetro de masas fue desarrollado a principios del siglo XX, pero las técnicas de ionización suave como el electrospray (ESI, *Electrospray Ionization*) o la ionización por desorción con láser asistida por matriz (MALDI, *Matrix-assisted Laser Desorption Ionization*), aparecieron en la década de los 80, revolucionando el uso de la espectrometría de masas en las ciencias de la vida y permitiendo el estudio de biomoléculas como las proteínas [76-78]. La importancia de la ESI o de la MALDI se puso de relieve en 2002, cuando sus respectivos inventores fueron galardonados con el premio Nobel de química. Hoy en día, los equipos de MS son cada vez más potentes y más utilizados de manera rutinaria en muchos laboratorios. En el campo de la proteómica, los espectrómetros de masas son utilizados en tres áreas mayoritarias: 1) para identificar proteínas, 2) para detectar sus modificaciones covalentes, incluyendo las modificaciones posttraduccionales y 3) para caracterizar y como control de calidad de las proteínas recombinantes [79].

2.5.1. Aspectos instrumentales y metodológicos

En paralelo a la introducción de las técnicas de ionización suave se han desarrollado distintos tipos de espectrómetros de masas para el análisis de proteínas y péptidos. En principio, todos los equipos de MS consisten en una fuente de iones, un analizador de

masas y un detector. Estos componentes pueden combinarse en distintas configuraciones con el fin de crear espectrómetros con distintas especificidades y prestaciones en términos de velocidad, resolución, sensibilidad, exactitud o precisión, rango de masas y precio [80, 81].

Una fuente ESI ioniza por electronebulización moléculas disueltas en fase líquida, dando lugar a un haz de iones extremadamente fino que se enfoca directamente hacia el analizador de masas. En contraste con ello, en la técnica MALDI los analitos se co-cristalizan con una molécula orgánica de bajo peso molecular denominada matriz, y en esta propia fase sólida son ionizados por la acción de pulsos de luz láser. Los iones resultantes de uno u otro proceso pasan al analizador de masas, en el que son separados de acuerdo a sus *ratios* m/z . Los analizadores de masas más comúnmente utilizados son el cuadrupolo (Q, *Quadrupole*), el de tiempo de vuelo (TOF, *Time-Of-Flight*), de trampa iónica (IT, *Ion Trap*), de resonancia ciclotrónica de iones con Transformada de Fourier (FTICR, *Fourier transform ion cyclotron resonance*) o de trampa orbital (Orbitrap), y pueden emplearse tanto de manera individual como en tándem. En la modalidad en tándem (MS/MS) se pueden llevar a cabo múltiples pasos de análisis mediante distintos analizadores individuales separados en el espacio o en el tiempo. En la MS/MS separada en el espacio, los analizadores están físicamente separados, pero estrechamente conectados con el fin de mantener el vacío a lo largo de todo el recorrido de los iones. Este tipo de configuraciones se observa en instrumentos como el Q-TOF, TOF-TOF, QqQ (o triple cuadrupolo), etc. Por otra parte, la MS/MS separada en el tiempo puede llevarse a cabo con iones atrapados en una misma cámara con distintas etapas de análisis a lo largo del tiempo. Este tipo de procesos se pueden llevar a cabo con analizadores tipo IT, FTICR u Orbitrap.

Desde el o los analizadores de masas, los iones entran en el detector, encargado de medir la abundancia de cada ión con relación m/z específica. Los actuales espectrómetros de masas pueden detectar de manera rutinaria cantidades del orden de femtomoles (10^{-15} mol) de péptido, aunque se han alcanzado sensibilidades del orden del zeptomol (10^{-21} mol) [82]. Por otra parte, el equipo de FTICR más exacto puede alcanzar una resolución superior a 1.000.000, lo que significa distinguir una diferencia en la relación m/z de entre 1.000,001 y 1.000,000 [83].

Las proteínas separadas en un gel bidimensional suelen identificarse a partir de su huella peptídica obtenida por MALDI-TOF. En este proceso, la banda de gel que contiene una única proteína aislada se digiere enzimáticamente con tripsina u otra proteasa para obtener una mezcla de péptidos que es detectada por el espectrómetro de masas. Este nos ofrece un espectro de masas que caracteriza a esa proteína y en el que los *ratios* m/z obtenidos para cada péptido son utilizados para realizar una búsqueda en las bases de datos y obtener su identificación (figura 4, página siguiente). Si con el espectro de masas obtenido o huella peptídica, no es suficiente para obtener una identificación con confianza, puede ser usado un espectrómetro de masas en tándem, puesto que este instrumento ofrece de manera directa la secuencia de uno o varios de los péptidos que identifican de manera inequívoca a la proteína [84].

La combinación de la cromatografía líquida (LC, *liquid chromatography*) y la MS/MS es una aproximación multidimensional que permite la identificación de las proteínas que componen un proteoma de una manera más profunda y con un mayor rango dinámico y precisión en las cuantificaciones realizadas que cuando se utilizan técnicas de MS unidimensional, en las que todos los iones se obtienen a partir de un solo espectro de masas. Típicamente, en este tipo de aproximaciones una mezcla compleja de proteínas se digiere con tripsina u otra proteasa y la mezcla de péptidos obtenida se fracciona mediante HPLC antes de ser analizada en el espectrómetro de masas en tándem. Estos dos sistemas pueden estar conectados en línea de manera que los eluidos del capilar del HPLC fluyen directamente dentro de la fuente de ESI o, por el contrario, no estarlo, haciéndose uso de un colector de fracciones que va recuperando los eluidos de péptidos de una manera tiempo dependiente para ser sometidos manualmente al análisis de MS. El espectrómetro de masas en tándem adquiere primero un espectro de masas de la mezcla de péptidos, de la que ciertos candidatos se seleccionan para su fragmentación. En concreto, aquellos que presentan ciertos requerimientos en lo que a intensidad y carga se refiere se aíslan del resto para ser utilizados como precursores y fragmentárselos, obteniéndose un espectro de fragmentación (o espectro de MS/MS). La información procedente tanto del primer espectro MS como del de fragmentación o MS/MS puede ser usada para identificar a las proteínas presentes en la mezcla [85]. La figura 4 (página siguiente) esquematiza la secuencia de pasos seguida en un experimento típico de LC-MS/MS.

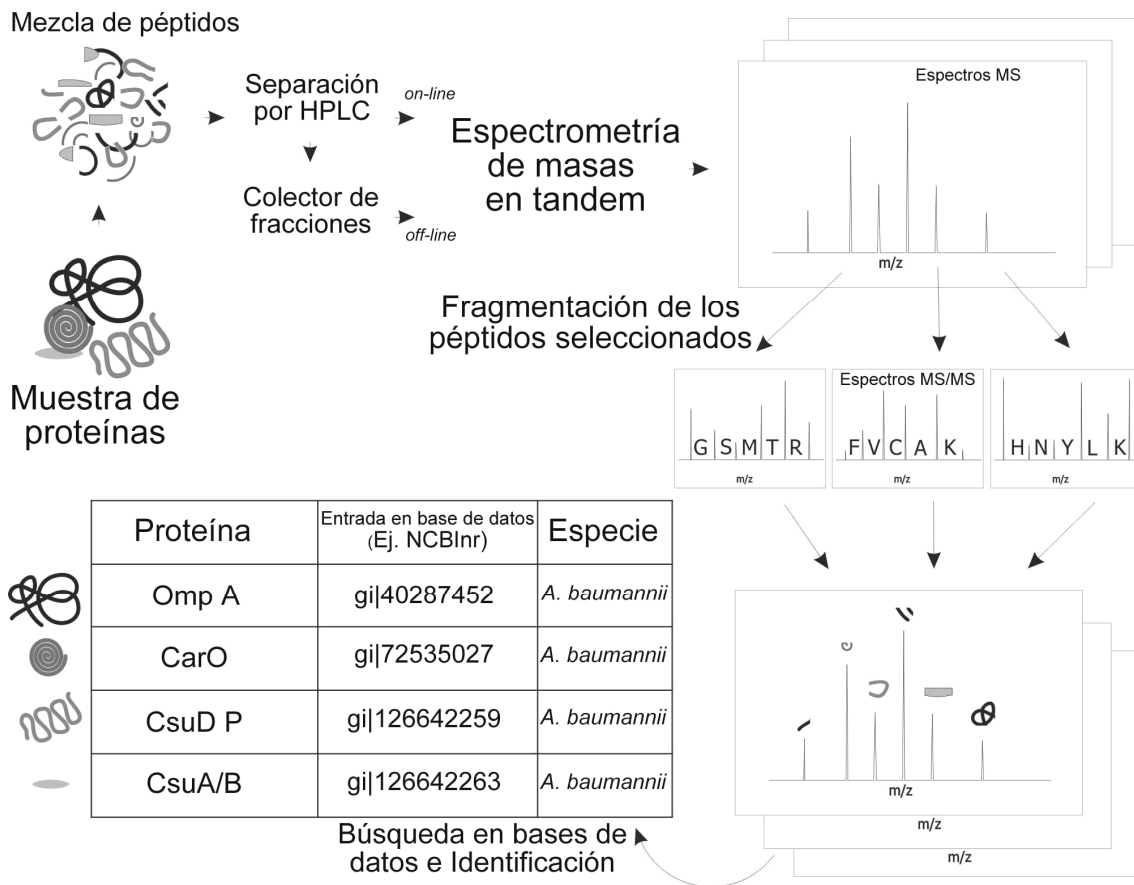


Figura 4. Secuencia de pasos seguida en un experimento típico de LC-MS/MS. Una mezcla compleja de proteínas se digiere enzimáticamente hasta sus péptidos correspondientes. La mezcla de péptidos puede ser fraccionada mediante cromatografía de alta resolución (HPLC) y cada fracción puede ir siendo inyectada directamente (*on-line*) en un espectrómetro de masas en tándem a medida que van eluyendo los péptidos. Opcionalmente, cada fracción puede ser colectada por separado mediante un colector de fracciones y cada una ser inyectada manualmente (*off-line*) en el espectrómetro de masas. En primer lugar, se adquieren espectros de MS desde los que ciertos péptidos son seleccionados para ser fragmentados. Los espectros de fragmentación resultantes (o espectros de MS/MS) se usan para llevar a cabo la identificación de la secuencia peptídica. La lista de péptidos secuenciados se utiliza con el fin de identificar, mediante su búsqueda en bases de datos, los componentes proteicos individuales de la muestra original. Adaptado de [22].

2.5.2. Herramientas informáticas para la identificación de proteínas

La identificación de proteínas a partir de la huella peptídica (PMF, *Peptide Mass Fingerprinting*), obtenida por MS o a partir de los espectros de fragmentación y secuenciación de péptidos mediante MS/MS, son las aproximaciones basadas en la espectrometría de masas más utilizadas para la identificación de proteínas en los estudios proteómicos. Se han desarrollado distintas herramientas informáticas que asisten en la identificación de proteínas mediante ambos métodos. Para PMF estos programas informáticos comparan el valor m/z de cada péptido del espectro de masas experimental con los valores teóricos derivados de bases de datos como la del UniProt (accesible en: <http://www.uniprot.org/>) o la del NCBI (accesible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). En caso de concordancia entre los valores experimentales y teóricos, una proteína es asignada al espectro de masas experimental con cierta probabilidad de acuerdo al algoritmo utilizado. Los valores m/z teóricos se obtienen a partir de la traducción *in silico* de las secuencias de DNA de los genes presentes en las bases de datos hasta sus proteínas correspondientes, para las que las masas peptídicas de una proteólisis también teórica, son computadas. Si no hay posibilidad de acceder al genoma del organismo estudiado, las proteínas también pueden ser identificadas por secuenciación *de novo* [32, 86].

Distintos tipos de herramientas tales como Mascot [87], MS-Fit [88], Profound [89], PeptideSearch [90], PeptIdent [91], Aldente [92] y PepFrag [93] permiten evaluar la similitud entre los valores m/z de los espectros MS experimentales obtenidos y los teóricos. Todos estos programas asignan una puntuación, valor probabilístico o *score* estadístico que indica lo bien correlacionados que se encuentran entre sí los valores experimentales y los teóricos. A la hora de asignar un *score* a la identificación realizada mediante esta comparación, se tienen en cuenta muchos factores, entre los que se incluye la precisión con la que se corresponden los picos peptídicos comparados; la intensidad de estos picos; los picos peptídicos que, teóricamente pertenecientes a la proteína, no estén presentes en el espectro experimental; los aminoácidos modificados; la aparición de errores o puntos de corte obviados o no específicos durante la digestión proteica; los errores presentes en las secuencias peptídicas descritas en las bases de datos; la calibración del instrumento y los picos originados a partir de otros péptidos o moléculas contaminantes que constituyen el ruido de fondo [94]. En algunos algoritmos, la asignación del *score* está basada únicamente

en el número de masas de ambos espectros que se corresponden entre sí, mientras que otros usan algoritmos más sofisticados como MOWSE, sobre el que se sustenta el motor de búsqueda Mascot y que está basado en la distribución de las masas peptídicas presentes en las bases de datos [95]. Debido a las diferencias que presentan los algoritmos de búsqueda, los resultados obtenidos pueden diferir. Así, comparándose ProFound, Mascot y MS-Fit, se observó como el último era capaz de identificar menos proteínas que los otros dos algoritmos [96]. Ante la evidencia de este fenómeno, se hace aconsejable validar los resultados obtenidos mediante distintos algoritmos y/o usar métodos estadísticos que estimen la validez o significado de las identificaciones realizadas.

La secuenciación por MS/MS puede llevarse a cabo tanto por secuenciación *de novo*, como por comparación con la información presente en las bases de datos (PFF, *Peptide Fragment Fingerprinting*). Esta última opción se usa normalmente para la identificación de las proteínas presentes en mezclas complejas y cuando hay disponibilidad de acceso a la información genómica del organismo estudiado. En los análisis de MS/MS automatizados, el espectrómetro de masas selecciona los picos del primer espectro MS obtenido (iones precursores o parentales), para su fragmentación y posterior análisis de los espectros de fragmentación resultantes (o espectros de MS/MS). Estos análisis generan cientos de espectros por hora, lo que requiere del uso de eficientes programas con los que llevar a cabo el análisis de los datos. Los análisis proteómicos a gran escala se han visto beneficiados por el desarrollo de múltiples paquetes informáticos que permiten el análisis de los datos presentes en los espectros de MS/MS. Algunos de estos son Mascot [87], Sequest [97], ProbID [98], Phenyx [99], X!Tandem [100], GutenTag [101], NoDupe [102] y Sonar MS/MS [103]. Muchas de estas herramientas (como Mascot y Sequest, por ejemplo), se basan en el ión precursor, utilizando la masa de este ión como principal criterio de búsqueda [88], aunque teniendo en consideración tanto el espectro de MS como el de MS/MS. Pero otras aproximaciones se basan en una secuenciación *de novo* parcial usando mayoritariamente los espectros de MS/MS adquiridos [90]. Todas estas herramientas comparan los espectros de MS/MS colectados experimentalmente con los espectros de MS/MS teóricos producto del procesado *in silico* de la información presente en las bases de datos y asignan un valor estadístico o *score* para cada espectro comparado. Cada una de estas herramientas informáticas aplica distintos algoritmos especializados y funciones de *score* que tienen en cuenta los diferentes factores que influyen en la identificación de

proteínas. Estos factores son, entre otros, la presencia de contaminantes y péptidos que coeluyen en los analitos, puntos de corte obviados o equivocados durante la digestión proteolítica, aminoácidos modificados, mutaciones no anotadas y variantes posttraduccionales de las proteínas, precisión en la masa del péptido precursor, así como en la de los fragmentos y sus intensidades y, por último, los errores presentes en las bases de datos [86, 94]. Las capacidades de algunos de estos paquetes informáticos, así como de los algoritmos implementados han sido comparadas, observándose como los distintos programas producen identificaciones proteicas solapadas, especialmente para las proteínas de alta abundancia, pero también identificaciones únicas de proteínas para cada uno de los paquetes informáticos de manera independiente, lo que pone de manifiesto la complementariedad en sus métodos de análisis [96, 104, 105].

Hay muchos instrumentos de MS y paquetes informáticos disponibles para el análisis de distintas muestras de proteínas, pero tanta diversidad conduce a una variabilidad significativa en los posibles resultados. Así, comparando distintos equipos y programas informáticos se demuestra claramente como las distintas herramientas producen diferentes resultados, aunque los parámetros de búsqueda se mantengan similares [96, 104, 105]. Esta variabilidad es posteriormente incrementada al introducirse distintos parámetros de búsqueda durante el procesamiento de los datos [96, 106]. Este hecho advierte sobre la importancia que tiene la validación de las identificaciones mediante distintos métodos con el fin de incrementar la confianza de las mismas y prevenir la obtención de falsos positivos. Existen distintas opciones disponibles para validar los resultados aparte de la validación manual [107]. Muchos algoritmos de identificación usados para la identificación de proteínas permiten determinar el rango de identificaciones catalogadas como falsos positivos mediante la realización de búsquedas reversas o contra bases de datos aleatorias [108]. En estos procesos de estimación del rango de falsos positivos, se realizan las búsquedas contra las mismas bases de datos, pero con las secuencias de aminoácidos presentes revertidas o mezcladas aleatoriamente. Además, existen programas informáticos que ayudan en el proceso de validación tales como PeptideProphet [109], ProteinProphet [110] y DTASelect [111]. Además, se ha publicado un método que evalúa la reproducibilidad de las estrategias de cuantificación relativa usadas en los métodos proteómicos basados en MS [112]. Las revistas especializadas en proteómica han publicado cuáles serían los requerimientos mínimos exigidos para la publicación de resultados

proteómicos [113, 114], muchos de los cuales pasan por la utilización de uno o más métodos de validación.

2.6. Cuantificación y marcaje cuantitativo

La cuantificación implica la medida de una propiedad existente dentro de un rango de magnitudes. El peso, la masa, el volumen y la concentración son cantidades normalmente medidas en química. La cuantificación puede diferenciarse entre cuantificación absoluta y cuantificación relativa, siendo la última mucho más utilizada en los estudios de proteómica cuantitativa. En las cuantificaciones relativas, la abundancia de las proteínas se mide por comparación entre distintas condiciones biológicas, por lo que, según esta definición, todas las metodologías cuantitativas descritas en esta tesis constituyen cuantificaciones relativas, al llevarse a cabo la comparación entre cantidades de proteínas expresadas en *Acinetobacter baumannii* sensible e inducido a resistencia frente al antibiótico colistina. Sin embargo, hay que resaltar que en proteómica también es posible medir cantidades absolutas de proteínas mediante la adición, por ejemplo, de concentraciones conocidas de un estándar de péptidos dentro de las muestras objeto de estudio, con las que comparar luego las cantidades de los péptidos procedentes de las proteínas en ella presentes [115].

La medida de la abundancia de péptidos en mezclas biológicas complejas no es una tarea fácil, puesto que distintos péptidos presentan distintas propiedades físico-químicas que tienen un impacto sobre su preparación y fraccionamiento, así como en su capacidad de ionización y volatilización durante el análisis de MS. Por este motivo, cantidades de péptidos distintos no pueden ser comparadas entre sí. En principio, un péptido presente en poca cantidad, pero con buena capacidad de ionización puede mostrarse en el espectro de MS con una mayor intensidad que otro péptido de mayor abundancia, pero con peor capacidad de ionización. Así, sólo cantidades de péptidos idénticos pueden ser comparadas entre sí. Los métodos de cuantificación relativa usados en los estudios de proteómica pueden ser divididos en dos categorías mayoritarias denominadas 1) cuantificaciones basadas en gel de electroforesis y 2) cuantificaciones basadas en MS.

2.6.1. Cuantificación de proteínas basada en la electroforesis

Las cuantificaciones basadas en la electroforesis son obtenidas a partir de las cantidades de proteína detectadas en los geles de electroforesis usados para la separación de las mismas. Debido al gran uso de la 2DE en proteómica, existe un gran número de métodos de tinción y de marcaje proteico que han sido desarrollados para detectar y cuantificar las cantidades relativas de proteínas en un gel de electroforesis [116, 117]. El marcaje radiactivo y las tinciones no radiactivas son las técnicas mayoritariamente utilizadas en proteómica cuantitativa basada en la electroforesis.

2.6.1.1. Marcaje metabólico mediante marcadores radiactivos

Para el marcaje metabólico, las células se cultivan en un medio de cultivo normal y en un medio de cultivo que contiene aminoácidos marcados con isótopos radiactivos, como por ejemplo metionina marcada con S^{35} [118, 119]. Mientras progresa el cultivo celular, los aminoácidos marcados radiactivamente son incorporados en las proteínas celulares a medida que estas son sintetizadas. Las proteínas marcadas radiactivamente pueden ser detectadas mediante la realización de una autorradiografía del gel bidimensional en el que son fraccionadas y, de esta manera, las bandas del gel (o *spots* proteicos) de interés pueden ser detectados, cortados del gel e identificados por PMF o mediante secuenciación peptídica por MS/MS. El marcaje metabólico mediante enzimas marcadas radiactivamente ofrece una gran sensibilidad para la detección de proteínas de baja abundancia, pero presenta serias desventajas relacionadas con el riesgo para la salud asociado a su manejo y el alto coste de los aminoácidos marcados radiactivamente. Por otra parte, la incorporación de marcadores radiactivos por parte de las células afecta a su estado fisiológico induciendo a la fragmentación del DNA, elevando los niveles de expresión del supresor tumoral p53, alterando la morfología celular y causando la detención del ciclo celular o apoptosis [117]. Los métodos de marcaje cuantitativo no radiactivos han emergido superando todas estas desventajas.

2.6.1.2 Tinción de proteínas en geles de electroforesis

Una alternativa al marcaje radiactivo es el uso de distintas tinciones con las que llevar a cabo el marcaje de las proteínas antes o después de su separación electroforética. Convencionalmente, las proteínas pueden ser teñidas mediante colorimetría con el uso de Coomassie Blue G-250 y R-250 [120, 121] ó plata [122, 123], o mediante fluorescencia (como por ejemplo usando la tinción de SYPRO Ruby [124] o los fluorocromos CyDye. Distintos autores han analizado cuidadosamente los distintos métodos de tinción de proteínas disponibles [116, 117]. La tabla 1 recopila las principales características de estas técnicas de tinción.

Tabla 1. Las proteínas separadas en geles de electroforesis desnaturizantes (SDS-PAGE), pueden ser teñidas para su cuantificación. En esta tabla se resumen las principales características de los métodos de tinción más frecuentes. Adaptado de [116].

Método	Detección	Tinción	Límite de detección (ng)	Rango lineal	Muestras por gel	Compatibilidad con MS
Coomassie	Colorimetría	Tras la electroforesis	8 - 10	++	1	++
Plata	Colorimetría	Tras la electroforesis	~ 1	+	1	(+)
SYPRO Ruby	Fluorescencia	Tras la electroforesis	~ 1	++++	1	+++
CyDyes	Fluorescencia	Antes de la electroforesis	~ 2	++++	3	++

Los métodos de tinción a base de Coomassie [125] y plata [126], fueron desarrollados mucho antes de la actual era post-genómica y, aún hoy, permanecen como técnicas rutinarias con las que detectar proteínas en los geles de electroforesis. En ambos métodos, las proteínas se separan mediante SDS-PAGE para luego teñirlas incluidas en el gel. El Coomassie es un colorante textil de triarilmetano que se une a los grupos amino de las proteínas en solución ácida. Los beneficios de esta tinción son su fácil uso, bajo coste y la

alta compatibilidad que presenta con el análisis de MS. La tinción de Coomassie se ha optimizado en gran medida, tanto para reducir el ruido de fondo producido por su unión a señales inespecíficas, como para mejorar su sensibilidad y rango lineal de detección [120, 121, 127, 128]. Sin embargo, su sensibilidad y rango lineal, siguen siendo sus principales limitaciones, además de la dificultad para controlar la reproducibilidad de la tinción entre distintos geles [117].

La tinción de plata normalmente se lleva a cabo mediante uso de nitrato de plata y formaldehído revelado en una solución de carbonato alcalino, aunque existen muchos protocolos alternativos [129]. En esta tinción, los geles se saturan en nitrato de plata, quedando unida con más firmeza a las proteínas contenidas en el gel de poliacrilamida que al mismo gel. Además, la plata unida al gel puede eliminarse mediante sucesivos lavados, mientras que el enlace de la plata con las proteínas es posteriormente reducido, haciéndose visible. La tinción de plata es un método relativamente sensible que permite la detección de cantidades de proteínas del orden de 1 ng, pero hasta niveles de 0,1 ng se han detectado con este método de tinción [130]. El estrecho rango lineal es la mayor desventaja de la tinción de plata, por lo que los resultados cuantitativos no la hacen una técnica muy fiable [117]. Además, la reacción de tinción tiene que ser parada en un tiempo arbitrario de exposición con el fin de prevenir una sobresaturación de la señal. Este hecho produce problemas en la reproducibilidad de los geles teñidos [131]. La tinción de plata también interfiere con el análisis de MS posterior, viéndose reducido el número de péptidos identificados y, por consiguiente, la cobertura de la secuencia polipeptídica de las proteínas con ellos identificadas [132]. Sin embargo, una optimización cuidadosa de los protocolos y el uso de equipos de tinción robotizada [133], han mejorado los resultados cuantitativos obtenidos mediante las tinciones con plata [134].

El desarrollo de marcadores fluorescentes ha mejorado de manera dramática la cuantificación de proteínas en geles 2DE [117, 135], incrementándose tanto el rango dinámico de la cuantificación, como la reproducibilidad de las tinciones. Las proteínas se marcan con la señal fluorescente antes o después de la electroforesis y se detectan tras ser excitadas mediante el uso de luz ultravioleta o láser. La tinción de SYPRO Ruby es un método para la tinción de las proteínas una vez han sido separadas en el gel de electroforesis, mientras que los fluorocromos CyDye se usan para marcar las proteínas

antes de su separación electroforética. SYPRO Ruby utiliza un reactivo sintético formado por complejos orgánicos de metales tipo rutenio que se une a los residuos de aminoácidos básicos de las proteínas [136]. Es tan sensible como lo es la tinción de plata, pero ofrece un rango dinámico lineal más amplio. Es también más fácil de usar, mejorando la reproducibilidad de los resultados cuantitativos. La tinción de SYPRO es compatible con MS, mostrándose superior en comparación a los métodos convencionales de colorimetría como el Coomassie y la tinción de plata [137].

Otra opción para detectar proteínas en geles de electroforesis mediante marcadores fluorescentes es el uso de los fluorocromos derivados de la cianina CyDye, utilizados en el método conocido como gel de electroforesis diferencial (DIGE, *Difference gel electrophoresis*) [138, 139]. En esta técnica se pueden utilizar hasta 3 fluorocromos derivados de la cianina (denominados Cy2, Cy3 y Cy5), que portan un grupo éster reactivo con el que se unen covalentemente al grupo ϵ -amino de los residuos lisina de las proteínas. En la figura 5 se muestra esquemáticamente la reacción de marcaje de los fluorocromos CyDye y se describen algunas de las características que presenta cada uno de ellos.

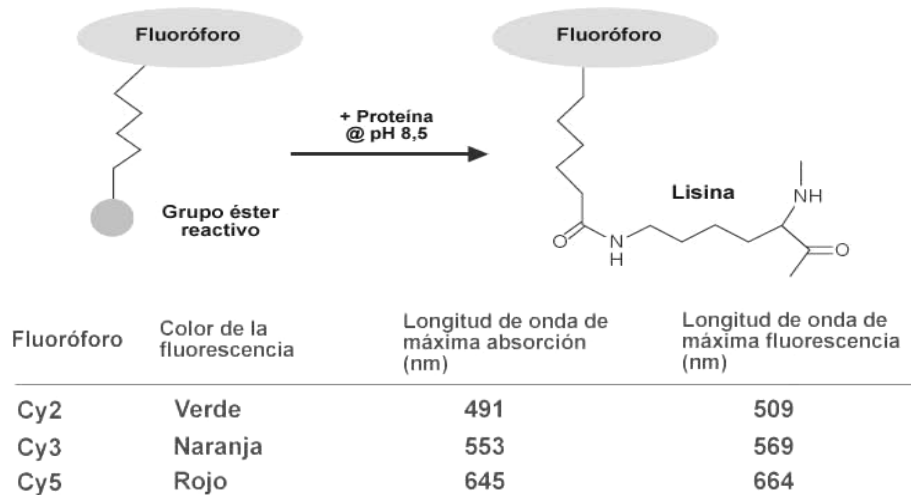


Figura 5. Esquema de la reacción de marcaje con los reactivos CyDye y características de cada uno de los fluoróforos. Los fluoróforos CyDye de la técnica DIGE presentan un grupo éster reactivo que se une covalentemente a los residuos lisina de las proteínas a través de un enlace amida (margen superior). Gracias a la diferencia entre sus longitudes de onda de absorción y emisión, es posible obtener el patrón proteico característico de cada muestra marcada con un marcador distinto, aún estando combinadas en un mismo gel de electroforesis (margen inferior). Adaptado de [140].

Así, las proteínas son marcadas antes de la 2DE y se pueden analizar hasta tres muestras distintas a la vez, mediante exposición de cada una de ellas a un marcador distinto. Una de estas muestras puede ser un estándar interno constituido por cantidades equimolares de todas las muestras que participan en el experimento que, marcada con uno de los fluorocromos, puede proporcionar un patrón contra el que comparar la intensidad del marcaje de las proteínas presentes en las distintas muestras. Tras el marcaje, dos de las muestras y el estándar interno son combinadas y sometidas a una electroforesis simultánea en la que comparten el mismo gel bidimensional, ya que, gracias a las distintas longitudes de onda de excitación y emisión que presentan los marcadores, se puede adquirir un mapa proteico bidimensional único para cada una de las muestras marcadas [139]. Para esto se hace uso de un scanner de fluorescencia con el que, al mismo tiempo que se lleva a cabo la excitación de cada fluorocromo, se captura la imagen resultante tras la emisión de la fluorescencia inducida. El protocolo seguido en la técnica de marcaje DIGE está esquemáticamente resumido en la figura 6 (página siguiente).

Esta técnica permite la detección de diferencias cuantitativas en la expresión proteica de distintas muestras en un solo gel, lo que, a la vez que mejora la reproducibilidad de los resultados, reduce el consumo de tiempo y reactivos. La sensibilidad de los marcadores CyDye se encuentra entre la sensibilidad alcanzada por la tinción de plata y Coomassie, pero el rango dinámico alcanzado es mucho más amplio. La principal desventaja tiene que ver con la necesidad de llevar a cabo un marcaje mínimo de las proteínas (tan solo entre el 1% y el 3% de las mismas), requerido con el fin de mantenerlas solubles durante su separación electroforética. Esta imposición provoca una ligera desviación en la masa molecular de las proteínas marcadas respecto a las no marcadas, resultando en una diferencia en la migración electroforética de ambas [138]. Este fenómeno supone un inconveniente a la hora de extraer del gel la proteína detectada y su posterior análisis de MS, porque representa una cantidad minoritaria de la misma en la muestra y, la mayoría de las veces, insuficiente para una identificación exitosa. Por este motivo, los geles de proteínas marcadas con fluorocromos CyDye normalmente son teñidos *a posteriori* mediante otro método de tinción que permita detectar tanto las proteínas marcadas como las no marcadas y así poderlas extraer del gel para su posterior análisis de MS [141]. Otro inconveniente lo supone el alto coste de los marcadores, del equipo necesario para la detección y del paquete informático asociado con el que se realiza el análisis de imagen.

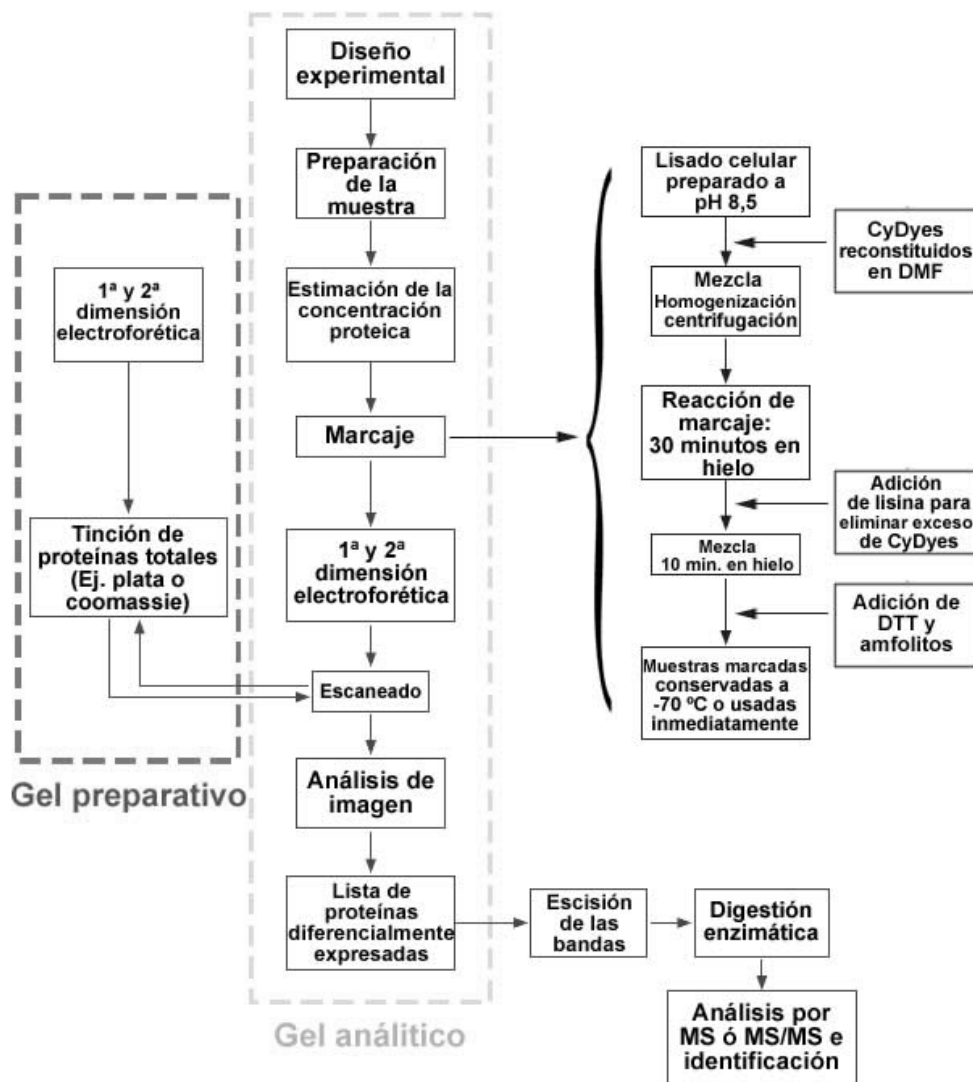


Figura 6. Un experimento DIGE comienza con su diseño experimental, en el que se decide el número de muestras que han de ser comparadas y el reactivo CyDye con la que se marcará cada una, así como la combinación que se ha de hacer de las mismas que asegure una máxima aleatorización. Tras la extracción de las proteínas de cada muestra a pH 8,5 (óptimo para la unión de los fluorocromos), y llevar a cabo la cuantificación de las mismas, se procede con el protocolo de marcaje (margen derecho). Éste pasa por la reconstitución de los CyDyes con dimetilformamida (DMF), su puesta en contacto con las muestras, la adición de lisina para eliminar el exceso de señal, así como de los reactivos necesarios para los pasos siguientes de 2DE, esto es, el ditiotreitól (DTT) y los anfólitos. Tras la 2DE, se captura la imagen del patrón proteico descrito por excitación de cada una de las señales fluorescentes y se procede con el análisis de imagen substractivo que culmina con una lista de las bandas proteicas diferencialmente expresadas en las distintas muestras. Estas son las bandas o *spots* de interés que se extraen del gel para su digestión enzimática e identificación por MS. Por imposiciones técnicas (explicado en el texto), muchas veces se hace necesario llevar a cabo una tinción de las proteínas totales e incluso elaborar geles preparativos en los que se asegure una cantidad de proteína suficiente que permita su posterior identificación (margen izquierdo de la figura).

2.6.1.3. Herramientas informáticas para el análisis de imagen 2DE

El mapa proteico de un gel de electroforesis bidimensional puede contener más de 1.000 proteínas detectadas y, normalmente, se analizan múltiples geles en un solo experimento de 2DE. Con el fin de abordar esta situación, se han desarrollado muchos programas informáticos con los que se analizan las imágenes digitalizadas obtenidas tras la tinción de los geles [94, 142]. Las funciones básicas de estos paquetes informáticos incluyen la visualización de los geles, la detección de proteínas en función de la densidad óptica que presenten tras su tinción, la correlación de los mapas proteicos obtenidos en los distintos geles participantes de un mismo experimento y la cuantificación de la cantidad relativa de proteínas en función de la intensidad de su tinción [142]. Esta etapa del proceso es crucial, puesto que cualquier discordancia durante el procesado de la imagen puede conducir a resultados erróneos, mayoritariamente en la cuantificación [143]. Por este motivo, el diseño experimental propuesto en la técnica DIGE, con la introducción del estándar interno de proteínas, minimiza al máximo las posibles variaciones instrumentales inherentes a la 2DE, así como la subjetividad introducida por el investigador durante el análisis de imagen. Esto es así porque, haciendo uso de los algoritmos de co-detección incluidos en el paquete informático asociado a la técnica, se realiza una comparación automatizada entre los distintos patrones proteicos obtenidos sin intervención del ojo humano en este proceso. La figura 7 (página siguiente), pretende explicar cómo tiene lugar este análisis de imagen automatizado.

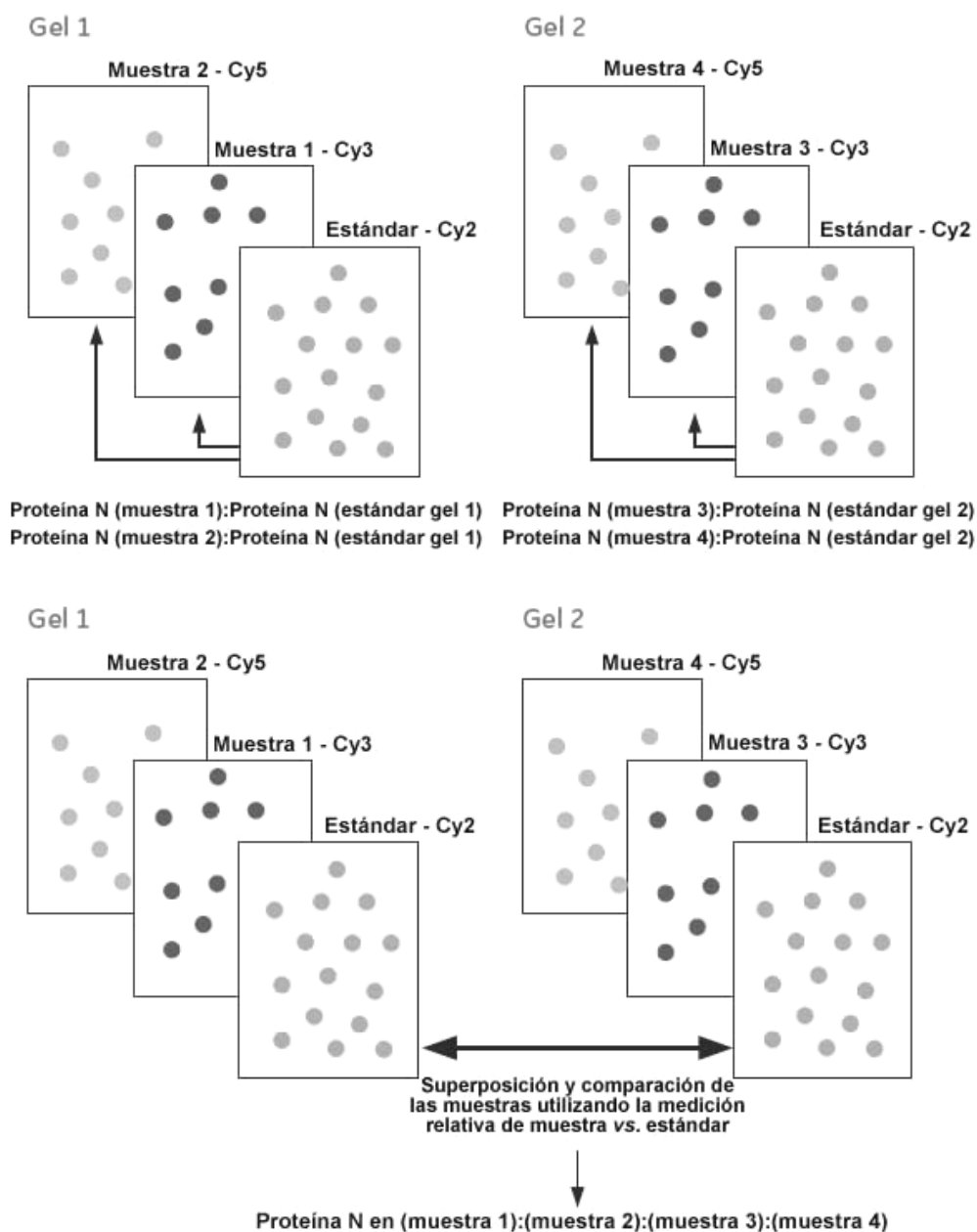


Figura 7. Cuantificación de la abundancia de proteínas usando algoritmos de co-detección. De cada gel se obtienen tres imágenes: la derivada de la señal Cy2 para el estándar interno y las derivadas de las señales Cy3 y Cy5 para las muestras analizadas. La abundancia proteica de cada *spot* en cada muestra es expresada como la relación normalizada relativa a la de los *spots* del estándar interno (panel superior). El estándar interno presente en cada gel permite llevar a cabo el proceso de superposición de los spots entre los distintos gels. Las relaciones o *ratios* relativos de los *spots* individuales frente a la de sus estándares internos son usados para comparar de manera precisa la abundancia proteica entre las muestras presentes en los diferentes gels (panel inferior). Adaptado de [140].

2.6.2. Cuantificación de proteínas basada en el marcaje isotópico y espectrometría de masas

En la proteómica basada en la espectrometría de masas, la cuantificación se lleva a cabo normalmente marcando las proteínas o péptidos mediante isótopos estables, de manera que una de las muestras se marca con un isótopo ligero (o natural), mientras que la otra se marca con el isótopo pesado correspondiente. Los péptidos así marcados producen, en el análisis de MS, parejas de picos con una diferencia de masa característica a la de los isótopos usados. La abundancia relativa de los péptidos puede medirse por comparación de las áreas descritas bajo estos picos. Alternativamente, los péptidos pueden marcarse mediante marcadores isobáricos, en cuyo caso, los péptidos presentarán la misma masa tras su marcaje, pero, en el análisis de MS/MS, estos marcadores producen fragmentos iónicos distinguibles que pueden ser usados para la cuantificación.

La mayoría de las técnicas de marcaje isotópico están basadas en la cuantificación a nivel de los espectros de MS, de manera que se buscan las señales que difieren entre sí por una variación específica en su relación m/z y la concentración relativa de un péptido dado se obtiene por comparación de las intensidades de las señales correspondientes. Pero estas técnicas permiten el análisis simultáneo de un número limitado de muestras, mientras que las técnicas de marcaje isobárico, basadas en los espectros de MS/MS, ofrecen un número mayor de posibles canales de cuantificación.

Los isótopos estables pueden ser incorporados metabólicamente, químicamente o enzimáticamente a las proteínas o péptidos presentes en la muestra [144-146]. En la figura 8 (página siguiente), se representan las distintas vías de incorporación isotópica utilizadas en proteómica cuantitativa basada en la espectrometría de masas.

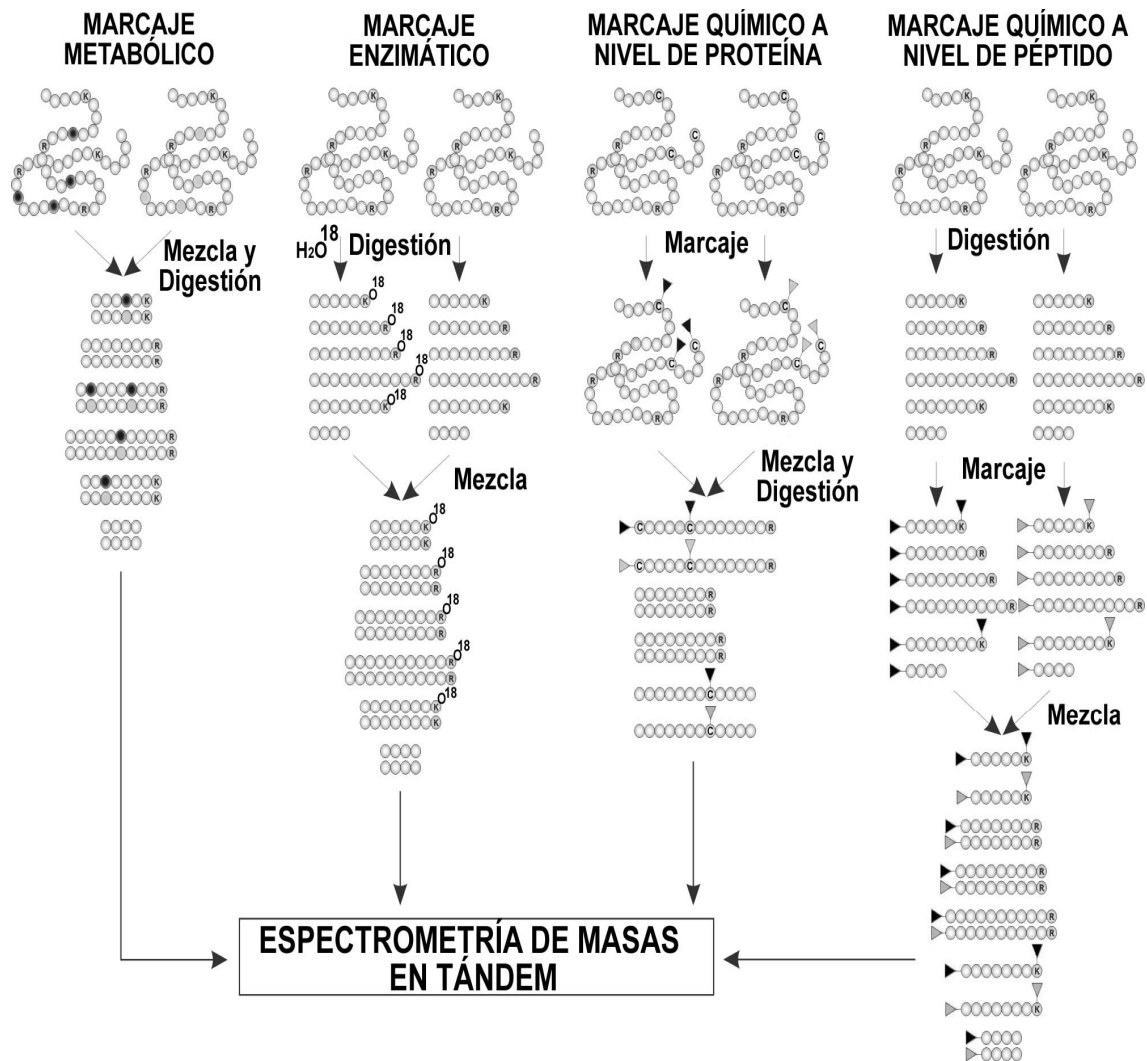


Figura 8. Estrategias seguidas en el marcaje de péptidos y proteínas mediante isótopos estables. En el marcaje metabólico, dos líneas celulares cuyos proteomas se quiere comparar se cultivan en medios normales o enriquecidos con compuestos marcados con isótopos estables. Tras su crecimiento, los isótopos distintivos habrán sido incorporados a las proteínas celulares producidas y, una vez extraídas, pueden ser combinadas, digeridas enzimáticamente y analizadas como una sola muestra. En el marcaje enzimático dos muestras de proteínas se digieren enzimáticamente en presencia de “agua ligera” (H_2O^{16}) o “agua pesada” (H_2O^{18}), de manera que el oxígeno marcado se incorpora a los péptidos resultantes como marcador distintivo. Tras la digestión, los péptidos pueden ser combinados y procesados como una muestra única. En el marcaje químico a nivel de proteína, las proteínas de dos muestras son marcadas usando los reactivos del método de marcaje ICAT. Tras el marcaje las proteínas son digeridas enzimáticamente y combinadas antes del análisis de MS. Finalmente, en el marcaje químico a nivel peptídico (iTRAQ), las proteínas de distintas muestras se digieren separadamente hasta sus péptidos resultantes y tras la digestión cada péptido es marcado usando reactivos de estructura química semejante, pero que difieren en la composición del isótopo estable. Tras el marcaje las muestras son combinadas antes de ser analizadas. Adaptado de [22].

En el marcaje metabólico los isótopos estables se incorporan a las proteínas durante el crecimiento y producción de proteínas por parte de las células en cultivo, la incorporación enzimática de los isótopos estables se lleva a cabo durante la digestión trípica de las proteínas y en el marcaje químico las proteínas o péptidos se marcan mediante exposición a los reactivos con los que se produce su marcaje isotópico. Los marcadores isotópicos son muy utilizados para el análisis de mezclas complejas de proteínas, en las que un cuidadoso fraccionamiento de la muestra se hace esencial para la identificación y cuantificación comprensiva de las diferentes proteínas presentes en la misma.

Además de estas aproximaciones, también se han desarrollado aplicaciones proteómicas que permiten la cuantificación de proteínas sin el uso de ningún tipo de marcaje proteico ni peptídico. En estas aplicaciones, (conocidas por su término inglés como *label-free quantification*), los péptidos derivados de distintas muestras proteicas se analizan mediante múltiples análisis de LC-MS. El conjunto de datos derivado de distintas muestras es alineado mediante uso de potentes programas informáticos, de manera que las áreas de los picos peptídicos seleccionados pueden compararse para determinar las cantidades de péptido presente en distintas muestras. Sería una comparación de las intensidades de las señales de MS entre experimentos individuales [147]. La cuantificación es posible hasta cierta extensión contando el número de péptidos inambiguamente identificados [148]. Este método presenta ventajas y posibles aplicaciones dado que los pasos de marcaje pueden ser omitidos, evitando los posibles errores adjudicados a las modificaciones químicas de los péptidos y haciendo a los experimentos más cortos y baratos. El número de muestras a comparar sería virtualmente ilimitado y la complejidad de los espectros no se ve incrementada, lo que podría conducir a un mayor número de proteínas identificadas. Esta aproximación es capaz de cuantificar a través de un mayor rango dinámico de concentraciones, sin embargo, como distintos péptidos ionizan de manera diferente en experimentos individuales, sus intensidades pueden variar de un análisis a otro, haciéndose muy difícil el cuantificarlos correctamente. Además, estos métodos son menos precisos, lo que está causado tanto por la influencia de errores sistemáticos como los causados al azar durante el desarrollo de los experimentos [149]. Sin embargo, están apareciendo técnicas que superan estos inconvenientes mediante el uso de programas bioinformáticos especializados [150]. De esta manera, la proteómica cuantitativa *label-free* en combinación

con la espectrometría de masas de alta resolución (FTICR, Orbitrap), está posicionándose como una prometedora vía para cuantificar grandes conjuntos de muestras.

2.6.2.1. Marcaje químico mediante isótopos estables – ICAT, iTRAQ

Comúnmente, el marcaje químico se usa para incorporar isótopos estables a las proteínas o péptidos. En el mercado existen distintos marcadores isotópicos de origen químico que presentan distintas especificidades, así como isótopos estables y marcadores de purificación [151, 152]. Los reactivos que actúan como marcadores isotópicos reaccionan normalmente con las proteínas y péptidos a través de los grupos amino presentes en los extremos N-terminales de las cadenas polipeptídicas y en los residuos de Lisina, o con los grupos sulfhidrilo o tioles presentes en las cisteínas. También hay reactivos con afinidad por los grupos carboxílicos, por los residuos de triptófano, así como por los de serina y treonina fosforilados. Los isótopos estables más usados son los de hidrógeno/deuterio (H^1/H^2), carbono (C^{12}/C^{13}) y nitrógeno (N^{14}/N^{15}). Estos reactivos también incluyen un marcador de purificación para aislar específicamente a los péptidos marcados, como por ejemplo en el caso del ICAT (*Isotope-Coded Affinity Tag*), en el que un marcador biotina permite la cromatografía de afinidad por la avidina de estos péptidos marcados. Los reactivos para el marcaje isotópico de proteínas y péptidos disponibles han sido revisados por distintos autores [144, 146, 151, 152].

El desarrollo del marcaje ICAT [153], produjo una brecha en los análisis de proteómica cuantitativa basada en la espectrometría de masas, al permitir la identificación y cuantificación a gran escala de mezclas complejas de proteínas. Los reactivos de ICAT están constituidos por tres partes funcionales denominadas 1) grupo reactivo, 2) grupo de unión y 3) marcador de biotina. El grupo reactivo es la iodoacetamida, que se une covalentemente con los grupos sulfhidrilos de las cisteínas. El marcador de biotina permite la purificación de los péptidos marcados mediante una cromatografía de afinidad por la avidina. La cadena de unión entre la iodoacetamida y la biotina del reactivo pesado está constituida por ocho átomos de deuterio, mientras que la del reactivo ligero, se constituye de ocho átomos de hidrógeno. La figura 9 (página siguiente) representa la estructura de los reactivos ICAT.

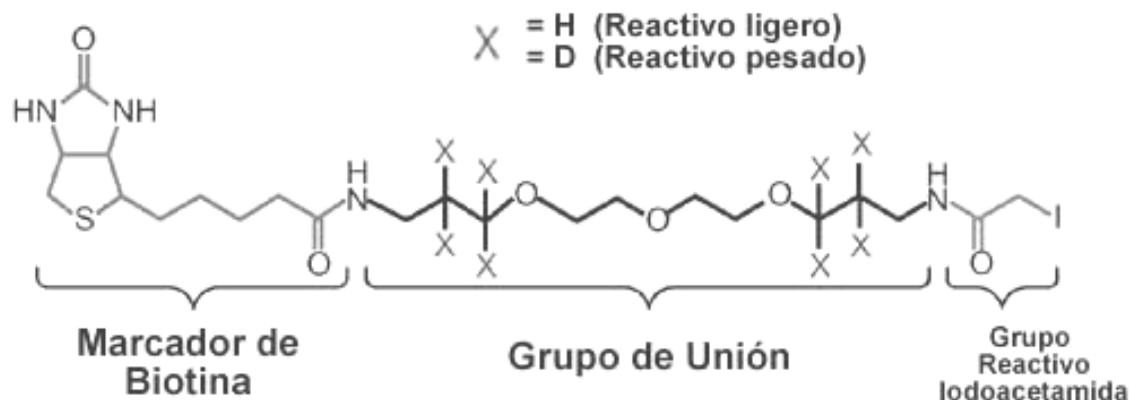


Figura 9. El reactivo ICAT presenta un grupo reactivo de iodoacetamida de unión a cisteína, una cadena de unión en donde se ubican los ocho átomos de hidrógeno (H) en la versión ligera o de deuterio (D) en la pesada (indicados por X), y un marcador de biotina.

También existe una versión de los reactivos ICAT en la que se usan isótopos de carbono (C^{12}/C^{13}) en vez de los de hidrógeno [154]. Con el protocolo de marcaje ICAT, las proteínas de dos muestras son marcadas con el reactivo ligero o pesado, para luego mezclarlas y digerirlas con tripsina. Los péptidos resultantes son primero fraccionados en múltiples fracciones por, por ejemplo, cromatografía de intercambio catiónico y estas fracciones son luego purificadas por cromatografía de afinidad por la avidina. Los péptidos marcados y purificados por afinidad se separan por cromatografía en fase reversa usando una cromatografía líquida en escala *nano* antes de someterlos al análisis por espectrometría de masas en tándem. En el análisis de MS, los péptidos se cuantifican por comparación de las áreas que describen los picos de cada péptido en su versión ligera o pesada e identificados por MS/MS. Este tipo de marcaje se ha empleado en muchos estudios de proteómica que han aportado descubrimientos muy significativos en el área de los mecanismos celulares [67, 155-159], en el de los complejos proteicos [160, 161] y en el de los orgánulos celulares [162, 163]. También ha sido exitosamente utilizado en el análisis de proteínas de membrana, tradicionalmente difíciles de analizar por los métodos basados en la 2DE [67, 162-164]. Un importante beneficio de la metodología ICAT es el elevado potencial que supone su automatización en los análisis a gran escala. Sin embargo, estos análisis generan enormes cantidades de datos que se hacen difíciles de manejar y analizar. A pesar de la existencia de potentes algoritmos para la identificación y cuantificación de proteínas, aún es relativamente lenta la validación de los resultados obtenidos en análisis de

ICAT. La detección de modificaciones posttraduccionales mediante ICAT es también más complicada que con el uso de los métodos basados en la 2DE, principalmente debido a que los reactivos ICAT sólo reaccionan con los residuos cisteína de las proteínas.

Siguiendo al éxito del marcaje de ICAT, Applied Biosystems desarrolló una nueva generación de reactivos de marcaje isotópico llamada iTRAQ (*Isotope Tagged Relative and Absolute Quantification*) [165]. Recientemente, se han desarrollado ocho formas isotópicamente diferentes de los reactivos iTRAQ [166], pero, en sus orígenes, salió al mercado con sólo cuatro de las mismas [165]. Estos marcadores se componen de tres regiones bien diferenciadas 1) el grupo reactivo, 2) el grupo compensador y 3) el grupo reportero (figura 10).

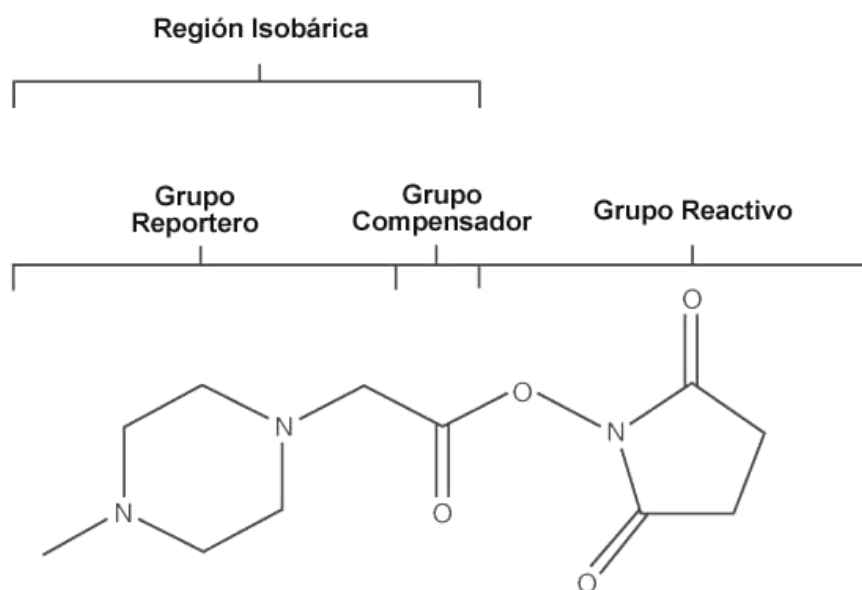


Figura 10. El reactivo iTRAQ es un marcador isobárico que presenta un grupo reportero, un grupo reactivo y una porción compensadora. El grupo reportero presenta una relación m/z que va desde 113,1 a 121,1 en la versión de ocho reactivos y de 114,1 a 117,1 en la de cuatro. Así, el grupo compensador compensa la diferencia que presentan entre sí los diferentes marcadores, por lo que su masa va de 184 a 192 Da en la versión de ocho reactivos y de 28 a 31 en la de cuatro. De esta manera, la masa de la región isobárica de todos los reactivos se mantiene constante, siendo de 305 Da en la versión de ocho reactivos y de 145 en la de cuatro.

El grupo reactivo es derivado de la N-hidroxisuccimida y reacciona con el grupo ϵ -amino de los residuos de lisina y el extremo N-terminal de todos los péptidos. Durante la fragmentación de los péptidos marcados, los grupos reporteros derivados de la N-metilpiperacina se liberan de los mismos y pueden ser detectados en el espectro de MS/MS como picos con una relación m/z de 113,1; 114,1; 115,1; 116,1; 117,1; 118,1; 119,1 y 121,1 en la versión de ocho reactivos o de 114,1 a 117,1 en la de cuatro, usándose los en la cuantificación relativa de la concentración peptídica. El grupo compensador ecualiza las masas de los distintos reactivos, de manera que la masa total de cada reactivo sea la misma. De esta manera, dado que la suma de los pesos moleculares de las tres partes de cada reactivo es constante, un péptido marcado es detectado como un pico único en el espectro MS, pero, como cada grupo reportero difiere en su peso molecular, los fragmentos originados tras la ruptura de cada marcador se observan como picos distintos en el espectro de MS/MS. Así, la concentración relativa de los péptidos se obtiene por comparación de las intensidades de las señales MS/MS de estos grupos reporteros. En el protocolo estandarizado para el marcaje de iTRAQ, las proteínas son primero digeridas con tripsina a sus péptidos resultantes y luego se marcan con los distintos reactivos iTRAQ. Todas las muestras marcadas se combinan, luego se fraccionan por ejemplo por cromatografía de intercambio catiónico y las fracciones resultantes se analizan por LC-MS/MS. El espectro de MS/MS se usa tanto en la identificación como en la cuantificación, porque al mismo tiempo que las señales procedentes de los grupos reporteros son usados para calcular la concentración relativa de los péptidos en las muestras, el resto de fragmentos originados, procedentes de la cadena principal de cada péptido, se usan en la identificación de los mismos. La figura 11 (página siguiente) esquematiza los pasos por los que pasa un experimento de iTRAQ.

Los reactivos de iTRAQ suponen un avance en los métodos de marcaje al permitir el análisis simultáneo de hasta ocho muestras en la versión actual de los mismos. Los reactivos de iTRAQ se incorporan a todos los péptidos presentes en la muestra, lo que incrementa la confianza de las identificaciones proteicas realizadas al alcanzarse con ellos un mayor porcentaje de cobertura de las secuencias polipeptídicas de las proteínas identificadas. Sin embargo, como el iTRAQ no reduce la complejidad de la muestra, tal como ocurre en el ICAT, el fraccionamiento de la misma es de gran importancia. La dificultad de los experimentos iTRAQ, como los del ICAT, radica en el manejo, depósito y

análisis de las grandes cantidades de datos generadas. Se han realizado distintas revisiones sobre las aplicaciones de esta técnica [167, 168].

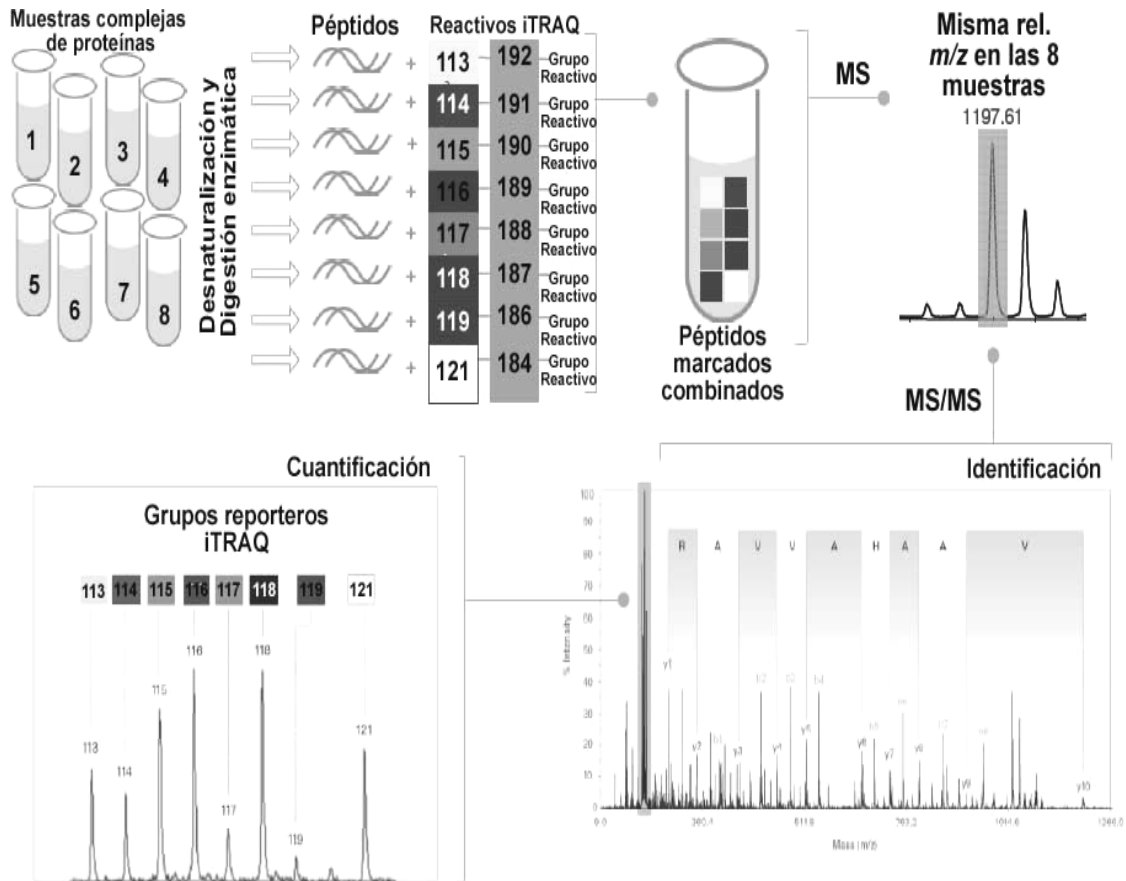


Figura 11. Una vez que las muestras de péptidos han sido marcadas con los distintos reactivos iTRAQ, estas son combinadas y tratadas como una muestra única en los siguientes procesos y análisis. Durante la obtención de los espectros de MS/MS cada marcador isobárico produce un ión reportero único que identifica la muestra del que procede e indica la abundancia relativa del péptido al que se encontraba unido antes de su fragmentación. Adaptado de [169].

2.6.2.2. Marcaje metabólico mediante isótopos estables – SILAC

Los isótopos estables pueden incorporarse metabólicamente a las proteínas sintetizadas por células en cultivo. Éstas se cultivan tanto en medio normal como en medio enriquecido con isótopos estables, tales como sales marcadas con N^{15} , glucosa marcada con C^{13} o aminoácidos marcados con distintos isótopos estables [146]. En el marcaje metabólico las células incorporan los isótopos estables a las proteínas sintetizadas y, de esa manera, el proteoma entero se convierte en un proteoma isotópicamente marcado. Las células cultivadas en ambas condiciones se combinan al colectarlas y los siguientes pasos de preparación y fraccionamiento son idénticos para ambas muestras. Este manejo simultáneo de las muestras repercute en una mejora sustancial en la precisión de la cuantificación realizada. Aparte de todo esto, la preparación de la muestra y su fraccionamiento, así como la identificación y cuantificación de las proteínas, es similar al método de marcaje llevado a cabo en el ICAT.

En las primeras publicaciones en las que los isótopos estables fueron usados para el marcaje metabólico, se usaron medios enriquecidos con N^{15} y C^{13} [170, 171]. La mayor desventaja que encontraron en este método residió en que los cambios de masa de los péptidos no pudieron predecirse dado que, tanto los átomos de nitrógeno de la cadena principal, como los de las cadenas laterales se hallaban marcados, hecho que hace más complicada la cuantificación de los péptidos presentes en las mezclas complejas. El desarrollo del marcaje isotópico estable usando aminoácidos en cultivo celular (SILAC, *Stable isotope labeling with amino acids in cell culture*), ha evitado el problema encontrado con el marcaje de N^{15} y C^{13} [172]. En esta técnica, las células se cultivan tanto en un medio normal como en un medio en el que ciertos aminoácidos están marcados con isótopos estables. Así, tanto los aminoácidos no marcados, como los que sí lo están serán incorporados a las proteínas celulares durante la síntesis proteica, lo que genera una diferencia de masa predecible entre ellos. Los aminoácidos marcados con isótopos estables más frecuentes son la H^2 -leucina, C^{13} -lisina y C^{13}/N^{15} -arginina [172, 173]. El mayor beneficio que proporciona el SILAC y otras técnicas de marcaje metabólico es la preparación y fraccionamiento simultáneo de las muestras, mientras que su mayor limitación reside en su única aplicabilidad para estudios sobre muestras de proteínas procedentes de células en cultivo

celular, siendo imposible el análisis de proteínas procedentes de fluidos corporales o tejidos celulares.

Sin embargo, el SILAC es la base de una nueva estrategia combinada para la identificación de biomarcadores denominada SILAP (*Stable Isotope Labeled Proteome*) [174, 175]. En esta aproximación, un modelo celular de la enfermedad estudiada, como por ejemplo una línea celular de cáncer pancreático, se hace crecer en un medio que contiene la versión pesada de los reactivos SILAC. Las proteínas marcadas procedentes de estas células y que han sido secretadas al medio extracelular son colectadas y combinadas con muestras de plasma sanguíneo humano de pacientes que sufren de cáncer pancreático, así como con plasma sanguíneo control de individuos sanos. Gracias al marcaje con isótopos pesados, las proteínas originadas de la línea celular se pueden diferenciar de las procedentes del plasma sanguíneo en el espectro de masas. Se comparan las proporciones entre las proteínas secretadas del cultivo celular (o secretoma) y las del plasma sanguíneo control, así como entre las del secretoma y las del plasma sanguíneo del enfermo, y aquellas proteínas que presentan proporciones alteradas pueden ser consideradas como candidatos marcadores que pueden ser posteriormente validados.

2.6.2.3. Marcaje enzimático mediante isótopos estables - Marcaje O^{18} proteolítico

Los péptidos pueden ser también marcados con isótopos estables durante su digestión enzimática. Comúnmente se incorpora O^{18} a los péptidos durante la digestión triptica, aunque otros enzimas como Lys-C o Glu-C pueden ser usados igualmente [176, 177]. Las proteínas extraídas de dos estados celulares distintos se digieren con tripsina en un tampón que incluye H_2O^{16} ó H_2O^{18} [178]. El isótopo O^{18} del agua es transferido al extremo C-terminal de los péptidos durante la reacción de digestión y estos péptidos son luego fraccionados y analizados por MS y MS/MS tal como se hace con los péptidos marcados en experimentos de ICAT o SILAC. Los inconvenientes de la técnica radican en que se hace necesario un fraccionamiento cuidadoso de la muestra y en que la eficiencia de la incorporación del O^{18} durante la digestión de tripsina puede estar por debajo del 50%, lo que complica la cuantificación [179].

2.6.2.4. Algoritmos para la cuantificación de proteínas

En la cuantificación basada en la MS se hacen necesarios programas informáticos que lleven a cabo los cálculos de las cantidades relativas de los péptidos marcados isotópicamente y corresponderlas con la abundancia de las proteínas de las que proceden. Estos programas calculan la abundancia de los péptidos por integración de las áreas descritas por los picos correspondientes a los péptidos marcados, tanto desde el cromatograma como desde el espectro de MS; determinan la abundancia relativa de estos péptidos por comparación con los correspondientes péptidos de referencia y combinan esta información a nivel peptídico para extrapolarla a la abundancia de las proteínas a las que estos pertenecen. Existen muchos métodos de marcaje isotópico y los programas usados para la cuantificación están especializados en cada tipo de marcador. XPRESS [67], ASAPRatio [180] y ProICAT (Applied Biosystems), están especializados en la cuantificación de péptidos marcados mediante ICAT; ZoomQuant [181], mide péptidos marcados con O^{18} y ProQuant (Applied Biosystems), se usa para cuantificar tanto péptidos marcados con ICAT como con iTRAQ. MSQuant (accesible en: <http://msquant.sourceforge.net/>), RelEx [182], Pepquan en Bioworks (Thermo Electron), Protein Pilot (Applied Biosystems) y Spectrum Mill (Agilent), son capaces de cuantificar distintos tipos de marcadores isotópicos estables incluyendo SILAC. Las últimas versiones de XPRESS también son capaces de cuantificar péptidos marcados con SILAC.

2.6.3. Secuencia de procesos en el análisis de los datos de origen proteómico

Los análisis proteómicos a gran escala demandan un manejo, procesado y almacenamiento eficaz de los datos generados. Así, distintos flujos o secuencias de procesos en el análisis de los datos han sido propuestos para analizar los datos proteómicos. En estos flujos existe un número de acciones llevadas a cabo con el fin de procesar y manipular los datos, partiendo de los datos en crudo o nativos y finalizando por la integración de los datos generados con otras aproximaciones, como son la transcriptómica, la metabolómica ó la metabonómica. La figura 12 (página siguiente) muestra esquemáticamente algunas de las acciones básicas que podrían ser ejecutadas según un flujo o secuencia de procesos en el análisis de los datos procedentes de un experimento proteómico.

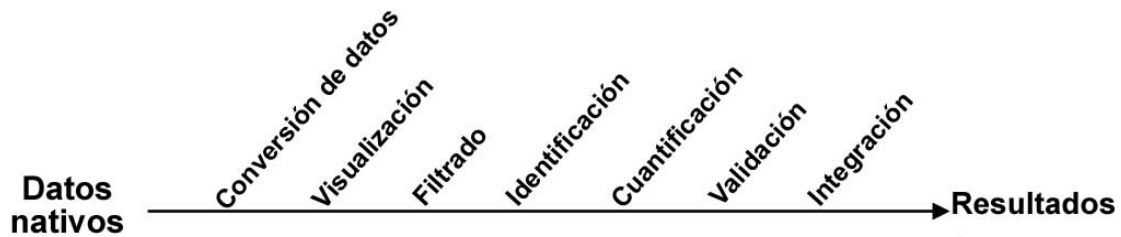


Figura 12. Los experimentos de proteómica a gran escala generan grandes cantidades de datos que necesitan ser procesados según flujos o secuencias más o menos automatizadas durante su análisis. En esta figura se resumen algunas de las acciones comúnmente llevadas a cabo sobre los datos generados en un análisis proteómico. Adaptado de [23].

El Instituto para la Biología de Sistemas (Seattle, EEUU), ha sido uno de los pioneros en el desarrollo de herramientas con las que llevar a cabo flujos lógicos en los análisis de los datos proteómicos. Así, en el proyecto Sashimi se desarrolló una gran variedad de convertidores de datos que permiten modificar los datos nativos a un formato apropiado con el que proceder con su posterior análisis mediante distintos motores de búsqueda como los de Sequest o Mascot. La conversión de datos se hace necesaria debido a que los distintos instrumentos y programas informáticos desarrollados por distintas compañías son, a menudo, incompatibles entre sí, lo que supone un gran problema a la hora de estandarizar los procesos en la investigación proteómica [29]. Tras su conversión, los datos pueden ser prefiltrados antes de analizarlos mediante los distintos motores de búsqueda. PeptideProphet y ProteinProphet pueden usarse para validar las identificaciones peptídicas y proteicas generadas, mientras que XPRESS y ASAPRatio están disponibles para cuantificar los péptidos y sus correspondientes proteínas. Todos estos resultados pueden ser resumidos con INTERACT [67]. Por fin, los resultados proteómicos pueden ser almacenados e integrados a los datos procedentes de otros niveles celulares con SBEAMS [183].

2.7. Problemática actual de las infecciones nosocomiales y la resistencia antibiótica: Aproximación mediante estudios proteómicos

Durante los últimos 15 años se ha producido un importante aumento a escala mundial de la incidencia de las infecciones nosocomiales provocadas por microorganismos multirresistentes como *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (MRSA, *meticillin-resistant Staphylococcus aureus*), *Enterococcus* resistente a la vancomicina (VRE, *vancomycin-resistant Enterococcus*) [184, 185] y diversas bacterias Gram-negativas, como *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter* spp., *Acinetobacter baumannii*, *Xantomonas maltophilia* y *Burkholderia cepacia* [185-188]. La Sociedad Americana de Enfermedades Infecciosas ha identificado los seis patógenos peligrosos de mayor prioridad contra los que hay muy pocos o ningún fármaco en desarrollo, viéndose muy limitada la elección de un tratamiento seguro y eficaz con el que combatir las infecciones por ellos producidas. Entre estos patógenos se encuentran las enterobacterias productoras de β -lactamasas de espectro extendido, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus faecium* resistente a vancomicina, *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina y distintas especies del género *Aspergillus* [189-191].

Este problema ha alcanzado gran envergadura y la situación ha sido catalogada por los Centros de Control de Enfermedades de los Estados Unidos de América como de “enfermedades infecciosas emergentes” [185], situándonos ahora en una nueva época que se ha denominado como “era post-antibiótica” [192, 193]. La contribución de la resistencia antibiótica al incremento de la morbilidad y mortalidad en pacientes hospitalizados ha sido objeto de numerosos estudios [184, 187, 194-200].

Entre las bacterias Gram-negativas, el desarrollo de la resistencia antibiótica múltiple responde a la existencia de resistencia innata presentada por algunas de las especies y a la facilidad o versatilidad que presentan otras para la adquisición de resistencia antibiótica [201]. La prevalencia de una especie resistente en una institución sanitaria viene determinada por 1) el número de admisiones hospitalarias de pacientes colonizados o infectados por cepas resistentes, 2) el grado de transmisión cruzada de paciente a paciente y

3) la selección de resistencia producida por el régimen antibiótico [202]. El problema ya ha sobrepasado el ámbito de un paciente u hospital determinado y se le considera como de carácter ecológico-medioambiental a escala mundial [203], cuya solución podría pasar por la puesta en marcha de programas de control de infección hospitalaria más actualizados [184, 185, 187, 195, 201, 204, 205].

Desde el punto de vista epidemiológico, cuatro de estas especies bacterianas, *Pseudomonas aeruginosa*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Burkholderia cepacia*, y *Acinetobacter baumannii* tienen en común varias características [206]: son bacterias Gram-negativas no fermentadoras, patógenos oportunistas, con resistencia intrínseca a múltiples antibióticos que pueden ser aisladas de forma rutinaria en el ambiente, capaces de causar infecciones relacionadas con el uso de distinto tipo de instrumentación clínica, se muestran resistentes a los desinfectantes, son fácilmente transmisibles de forma cruzada entre pacientes por medio del personal sanitario y producen sus implicaciones clínicas más importantes en el ámbito de las unidades de cuidados intensivos. Su trascendencia clínica viene además marcada por su capacidad para adquirir resistencia antibiótica y por la dificultad que plantea su tratamiento. De esta manera, *P. aeruginosa* se nos presenta como la especie más frecuente y de mayor virulencia seguida por *Acinetobacter* [207].

La figura 13 (página siguiente) muestra esquemáticamente los procesos celulares que constituyen las principales dianas en las que se basan los mecanismos de acción de los agentes antibióticos contra los que algunas bacterias, como *A. baumannii*, han podido adquirir estrategias con las que sobrevivir, superando la presión por ellos ejercida. Básicamente, estas dianas son: 1) el proceso de construcción de la pared celular, 2) la estructura y función de la membrana celular, 3) la síntesis del ácido fólico, 4) la estructura y función del DNA, 5) la síntesis de RNA y 6) la síntesis de proteínas.

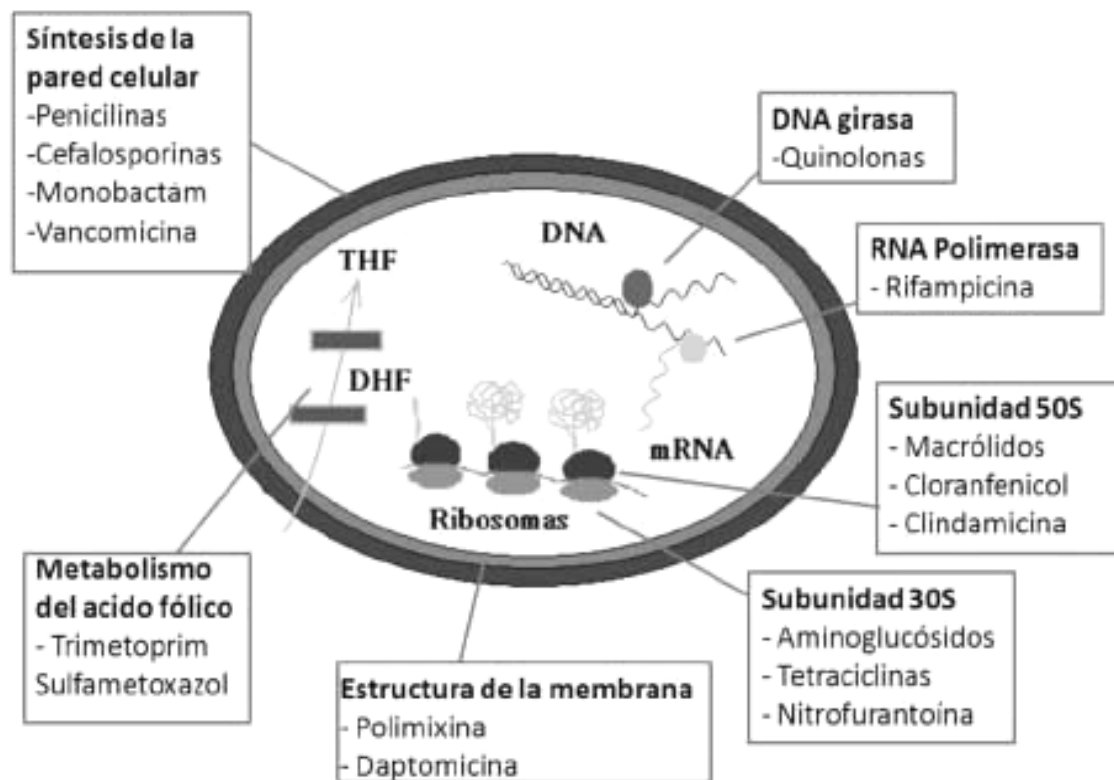


Figura 13. Principales dianas en las que se basan los diferentes mecanismos de acción antibiótica. Modificado de [208].

Gracias a la acumulación de datos genéticos referentes a los denominados agentes nosocomiales, en concreto para *Acinetobacter baumannii*, se han llevado a cabo recientemente diversos estudios proteómicos sobre la adquisición de resistencia antibiótica [209, 210]. El análisis del proteoma que expresa el organismo en respuesta a varias clases de antibióticos nos permite comprender en qué se basan los mecanismos moleculares que le conducen a la adquisición de resistencia. De manera más específica, el análisis de la arquitectura proteica de la pared y las membranas constituyen las líneas de mayor interés en este área, al ser la alteración en la permeabilidad uno de los mecanismos de resistencia bacteriana más comúnmente observados [211]. Los resultados de distintas investigaciones han demostrado que el análisis del proteoma constituido por las proteínas expresadas en las membranas bacterianas es una vía muy poderosa con la que extender nuestros conocimientos sobre los mecanismos de resistencia a los antibióticos [212]. Entre los últimos trabajos publicados en esta línea destacan [212-216].

2.8. *Acinetobacter baumannii*

El género bacteriano conocido como *Acinetobacter* ha sufrido significativas modificaciones taxonómicas durante los últimos treinta años (ver apartado 2.8.1 al respecto). A los miembros de este género se les reconoce como importantes patógenos nosocomiales desde 1996 [217], pero su emergencia como tales debió haber ocurrido a finales de los setenta, probablemente como consecuencia del incrementado uso de antibióticos de amplio espectro en los hospitales [5, 218]. Su especie más representativa y de importancia clínica es *Acinetobacter baumannii*, considerado como uno de los patógenos más problemáticos para las instituciones sanitarias de todo el mundo. Su importancia clínica, especialmente en los últimos quince años, ha estado marcada por su extrema capacidad de adquirir resistencia antibiótica, considerándosele como uno de los patógenos que mejor ilustran los problemas de la “era antibiótica” [219]. A día de hoy, se han descrito cepas de *A. baumannii* resistentes a todos los antibióticos conocidos, lo que le sitúa en una posición prioritaria para los sistemas de vigilancia de la comunidad sanitaria internacional. En combinación con su perfil de resistencia emergente está su gran capacidad para sobrevivir por prolongados períodos en el ambiente hospitalario, viéndose así potenciada su habilidad de dispersión. Normalmente aparece en los pacientes hospitalizados más vulnerables afectados de enfermedad crítica, que han recibido distintos regímenes antibióticos, con heridas quirúrgicas o no quirúrgicas y/o a los que se ha puesto en contacto con algún material hospitalario, tales como aparatos de ventilación mecánica, líquidos de diálisis peritoneal, catéteres y una amplia gama de instrumentos sobre los que ha sido posible hallarlos [219-222]. Según se ha informado desde la década de los setenta [223], las neumonías adquiridas en el ámbito hospitalario son todavía las infecciones más comúnmente causadas por este microorganismo, pero posteriormente se han descrito en distintas instituciones infecciones problemáticas que afectan al sistema nervioso central [224], piel y tejidos blandos [225-227] y tejido óseo [228].

El interés por *Acinetobacter*, tanto en la comunidad científica como por el público en general [229], ha crecido en los últimos años, lo que ha acelerado la obtención de avances significativos en nuestro entendimiento acerca de la biología de este organismo.

2.8.1. Historia y estado actual de la clasificación taxonómica en *Acinetobacter*

El origen del vocablo *Acinetobacter* procede del griego ακινετος (akinetos, inmóvil) y fue propuesto inicialmente por Brisou y Prévot en 1954 para distinguir los microorganismos inmóviles de los móviles dentro del género *Achromobacter* [230].

Actualmente, el género *Acinetobacter* está compuesto por bacterias Gram-negativas, bacilares o cocobacilares, muchas veces dispuestas en pareja, aerobias estrictas no fermentadoras, sin requerimientos especializados para su crecimiento en cultivo celular, inmóviles, catalasa positivas y oxidasa negativas y con un DNA cuyo contenido G+C es del 39% y el 47% respectivamente. Según datos taxonómicos basados en hibridación DNA-rRNA se ha propuesto que los miembros del género *Acinetobacter* sean clasificados dentro de la familia *Moraxellaceae* del orden *Pseudomonadales* en la clase *Gamma*proteobacteria, que incluye a los géneros *Moraxella*, *Acinetobacter*, *Psychrobacter*, *Enhydrobacter* y *Alkanindiges* [231]. Además, se ha propuesto incluir a la especie *Perlucidibaca piscinae* dentro de esta familia [232], quedándose actualmente compuesta por los seis géneros bacterianos citados. En 1986 Bouvet y Grimont distinguieron, en base a la hibridación DNA-DNA, doce grupos de DNA, especies genómicas o genomoespecies dentro del género *Acinetobacter*, dándoseles a algunas nombres formales como *A. baumannii*, *A. calcoaceticus*, *A. haemolyticus*, *A. johnsonii*, *A. junii* y *A. lwoffii* [233]. Posteriormente, se incluyeron diez especies adicionales del género *Acinetobacter* entre las que había tres especies aisladas del humano: *A. parvus*, *A. chandleri* y *A. ursingii* [234, 235] y siete especies aisladas desde lodos activos recuperados de plantas para el tratamiento de aguas residuales y denominadas *A. baylyi*, *A. bouvetii*, *A. grimontii*, *A. tjernbergiae*, *A. townneri*, *A. tandoii* y *A. gernerii* [236]. De esta manera, se han ido incluyendo más miembros al género, incrementándose el número de especies válidamente denominadas a 23 y 11 especies genómicas a la espera de designaciones formales de género y especie.

La tabla 2 (página siguiente) muestra la complejidad de la situación actual tras los continuos cambios sufridos en la clasificación taxonómica de los miembros de este género bacteriano.

Tabla 2. Especies del género *Acinetobacter* a las que se ha asignado nombres formales de género y especie y especies genómicas sin nombre formal asignado. Adaptado de [219, 237].

Especie	Especie genómica	Descrita por	Cepa tipo	Referencias	Nota
<i>A. calcoaceticus</i> (Especie tipo) Sinónimo: <i>Micrococcus calcoaceticus</i>	1	Beijerinck 1911; Baumann et al. 1968; Approved Lists 1980; Bouvet y Grimont 1986	cepa ATCC 23055 = CAIM 17 = CCUG 12804 = CIP 81.8 = DSM 30006 = JCM 6842 = LMG 1046 = NCCB 22016 = NCTC 12983	[233, 238-240]	
<i>A. Iwoffii</i> Sinónimos: <i>Moraxella Iwoffii</i> Audureau 1940, <i>Acinetobacter Iwoffii</i> Audureau 1940; Brisou y Prévot 1954.	8, 9	Audureau 1940; Brisou y Prévot 1954; Approved Lists 1980; Bouvet y Grimont 1986	cepa ATCC 15309 = CCUG 33984 = CIP 64.10 = DSM 2403 = JCM 6840 = LMG 1029 = NCAIM B.01101 = NCCB 73001 = NCTC 5866.	[230, 233, 239, 241]	
<i>A. haemolyticus</i> Sinónimo: <i>Achromobacter haemolyticus</i> , Stenzel y Mannheim 1963.	4	(ex Stenzel y Mannheim 1963); Bouvet y Grimont 1986.	cepa Mannheim 2446/60 = B40 = ATCC 17906 = CCUG 888 = CIP 64.3 = DSM 6962 = LMG 996 = NCCB 85026 = NCTC 12155.	[233]	En el trabajo publicado por Bouvet y Grimont 1986, este taxón está propuesto como <i>Acinetobacter haemolyticus</i> sp. nov.
<i>A. baumannii</i>	2	Bouvet y Grimont 1986.	cepa ATCC 19606 = CCUG 19096 = CIP 70.34 = DSM 30007 = JCM 6841 = LMG 1041 = NCCB 85021 = NCTC 12156.	[233]	
<i>A. johnsonii</i>	7	Bouvet y Grimont 1986.	cepa Mannheim 3865/60 = B8 = ATCC 17909 = CIP 64.6 = CCUG 19095 = DSM 6963 = HAMB1 1969 = HAMB1 1971 = LMG 999 = NCIMB 12460 = NCTC 12154.	[233]	
<i>A. junii</i>	5	Bouvet y Grimont 1986.	cepa Mannheim 2723/59 = B10 = ATCC 17908 = CIP 64.5 = CCUG 889 = DSM 6964 = LMG 998 = NCTC 12153.	[233, 242]	De acuerdo a Vanechoutte et al. 2008, <i>Acinetobacter junii</i> Bouvet y Grimont 1986 es un sinónimo heterotípico anterior de <i>Acinetobacter grimontii</i> Carr et al. 2003.

Especie	Especie genómica	Descrita por	Cepa tipo	Referencias	Nota
	3	Bouvet y Grimont, 1986	ATCC 19004	[233, 243]	
	6	Bouvet y Grimont, 1986	ATCC 17979	[233, 243]	
	13BJ, 14TU	Bouvet y Grimont, 1986	ATCC 17905	[243, 244]	
<i>A. radioresistens</i>	12	Nishimura <i>et al.</i> 1988.	cepa FO-1 = ATCC 43998 = CIP 103788 = DSM 6976 = IAM 13186 = JCM 9326 = LMG 10613 = NBRC 102413.	[245]	
	14BJ	Bouvet y Jeanjean, 1989	CCUG 14816	[244]	
	15BJ	Bouvet y Jeanjean, 1989	SEIP 23.78	[244]	
	16	Bouvet y Jeanjean, 1989	ATCC 17988	[244]	
	17	Bouvet y Jeanjean, 1989	SEIP Ac87.314	[244]	
	13TU	Bouvet y Jeanjean, 1989	ATCC 17903	[243]	
	15TU	Bouvet y Jeanjean, 1989	151a	[243]	
	Entre 1 y 3	Gerner-Smidt y Tjernberg, 1993	10095	[246]	
	Cercano a 13TU	Gerner-Smidt y Tjernberg, 1993	10090	[246]	
<i>A. schindleri</i>		Nemec <i>et al.</i> 2001.	cepa LUH 5832 = CCUG 45560 = CNCTC 6736 = LMG 19576 = NIPH 1034.	[234]	
<i>A. ursingii</i>		Nemec <i>et al.</i> 2001.	cepa LUH 3792 = CCUG 45559 = CNCTC 6735 = LMG 19575 = NIPH 137.	[234]	
<i>A. baylyi</i>		Carr <i>et al.</i> 2003.	cepa B2 = CIP 107474 = DSM 14961.	[236]	
<i>A. bouvetii</i>		Carr <i>et al.</i> 2003.	cepa 4B02 = CCUG 50766 = CIP 107468 = DSM 14964.	[236]	
<i>A. gernerii</i>		Carr <i>et al.</i> 2003.	cepa 9A01 = CIP 107464 = DSM 14967.	[236]	

Especie	Especie genómica	Descrita por	Cepa tipo	Referencias	Nota
<i>A. grimontii</i>		Carr <i>et al.</i> 2003.	cepa 17A04 = CCUG 50767 = CIP 107470 = DSM 14968.	[236, 242]	De acuerdo con Vanechoutte <i>et al.</i> 2008, <i>Acinetobacter grimontii</i> Carr <i>et al.</i> 2003 es un sinónimo heterotípico posterior de <i>Acinetobacter junii</i> Bouvet y Grimont 1986.
<i>A. parvus</i>		Nemec <i>et al.</i> 2003.	cepa LUH 4616 = CCUG 48800 = NIPH 384 = CCM 7030 = LMG 21765.	[235]	
<i>A. tandoii</i>		Carr <i>et al.</i> 2003.	cepa 4N13 = CIP 107469 = DSM 14970.	[236]	De acuerdo al DSMZ, la cepa tipo es DSM 14970, no DSM 14670 como se cita en Carr <i>et al.</i> 2003.
<i>A. tjernbergiae</i>		Carr <i>et al.</i> 2003.	cepa 7N16 = CIP 107465 = DSM 14971.	[236]	
<i>A. towneri</i>		Carr <i>et al.</i> 2003.	cepa AB1110 = CIP 107472 = DSM 14962	[236]	
<i>A. soli</i>		Kim <i>et al.</i> 2008.	cepa B1 = JCM 15062 = KCTC 22184.	[247]	
<i>A. gyllenbergii</i>		Nemec <i>et al.</i> 2009.	cepa 1271 = CCUG 51248 = CCM 7267 = NIPH 2150 = RUH 422.	[248]	
<i>A. beijerinckii</i>		Nemec <i>et al.</i> 2009.	cepa 58a = CCUG 51249 = CCM 7266 = LUH 4759 = NIPH 838.	[248]	
<i>A. venetianus</i>		Vanechoutte <i>et al.</i> 2009; ex Di Cello <i>et al.</i> 1997.	cepa RAG-1 = ATCC 31012 = CCUG 45561 = LMG 19082 = LUH 3904 = NIPH 1925.	[249]	<i>Acinetobacter venetianus</i> Vanechoutte <i>et al.</i> 2009 ex Di Cello <i>et al.</i> 1997 era conocido previamente como <i>Acinetobacter venetianus</i> Di Cello <i>et al.</i> 1997 (ver Di Cello <i>et al.</i> 1997)
<i>A. bereziniae</i>	10	Nemec <i>et al.</i> 2010; Bouvet y Grimont, 1986	cepa 69 = NIPH 521 = ATCC 17924 = CIP 70.12 = LMG 1003.	[233, 243, 250]	
<i>A. guillouiae</i>	11	Nemec <i>et al.</i> 2010. Bouvet y Grimont, 1986	cepa 73 = NIPH 522 = ATCC 11171 = CCUG 2491 = CIP 63.46 = LMG 988.	[233, 243, 250]	

Las especies *A. calcoaceticus*, *A. baumannii* y las especies genómicas o genomoespecies 3 y 13TU de *Acinetobacter* están estrechamente relacionadas entre sí, lo que las hace difícilmente distinguibles a través de propiedades fenotípicas. Por este motivo, se ha propuesto referirse a ellas como al complejo *A. calcoaceticus*–*A. baumannii* [251, 252], pero, dado que a día de hoy, *A. calcoaceticus* no ha estado implicado en enfermedades clínicas serias, esta clasificación carecería de sentido en este contexto clínico [219].

Debe advertirse que, como la identificación de *A. baumannii* por métodos moleculares no se realiza habitualmente en la práctica asistencial, cabe la posibilidad de que algunos de los aislados clasificados como *A. baumannii* no lo sean. Además, no existe la garantía de que todos los hospitales estén realizando las pruebas de sensibilidad siguiendo estrictamente los criterios del CLSI (*Clinical and Laboratory Standards Institute*, Wayne, EEUU) [253]. Por este motivo, en muchas de las publicaciones sobre manifestaciones clínicas de infecciones causadas por *Acinetobacter*, aquellos patógenos identificados como *A. baumannii* pueden estar representando a otras especies del complejo *A. calcoaceticus*-*A. baumannii* y muchos de estos estudios, junto a otros en los que se describen mecanismos de resistencia antibiótica en *A. baumannii*, pueden estar incorrectamente asociados a esta especie [219, 254, 255]. Aún así, se puede asumir que lo publicado sobre infecciones nosocomiales en *Acinetobacter* en general y sobre *A. baumannii* en particular es de hecho aplicable a *A. baumannii* [219].

2.8.2. Epidemiología

La gran adhesividad, notable resistencia a la desecación y alto poder de adaptación a diferentes condiciones confieren a *A. baumannii* una facilidad sorprendente para sobrevivir con muy pocos recursos en medios inanimados y durante periodos de tiempo más prolongados que otras bacterias Gram-negativas. Por otra parte, algunos de los miembros del género *Acinetobacter* pueden sobrevivir y colonizar la piel humana [217, 256], por lo que, aparte de aislárselas desde múltiples medios inanimados, pueden obtenerse también a partir de nuestra piel, donde persisten gracias a su alta tolerancia al jabón. Esto los convierte en los organismos Gram-negativos más frecuentemente aislados de las manos del personal médico [206] y explica la facilidad de diseminación que presentan en el ámbito hospitalario [203]. Desde estos reservorios, *A. baumannii* puede generar la mayoría de las infecciones humanas nosocomiales y *A. lwoffii* un pequeño número de estos casos [217]. El resto de

especies del género *Acinetobacter* tales como otros miembros del complejo *calcoaceticus-baumannii*, *A. junii* o *A. haemolyticus*, son menos frecuentes como agentes causales de infección nosocomial, presentando además una mayor sensibilidad a los antibióticos [257].

En la actualidad, *A. baumannii* es responsable de un número cada vez más creciente de infecciones nosocomiales en forma de brotes epidémicos circunscritos a una sola unidad de UCI y normalmente asociados a un equipo hospitalario que actúa como reservorio ambiental, o bien produciendo epidemias mantenidas en el tiempo que no pueden relacionarse con ningún reservorio específico. También se han descrito brotes epidémicos controlados tras su detección gracias a la puesta en marcha de las diversas medidas de control [258-260], pero, en la mayoría de los casos, su erradicación resulta muy difícil y se establece de forma endémica [203, 207].

Existen informes sobre brotes de *A. baumannii* multirresistente en muchos hospitales de Europa, América del Norte, Argentina, Brasil, China, Taiwan, Hong Kong, Japón y Corea, así como en áreas más remotas como es el caso de Tahití en el Pacífico sur [259, 261-269].

Centrándonos en Europa, las infecciones producidas por *A. baumannii* han constituido un problema clínico substancial en distintas regiones del continente [268]. Así, desde 1980 se ha estado informando acerca de brotes infecciosos hospitalarios producidos por *A. baumannii* mayoritariamente en Inglaterra, Francia, Alemania, Italia, España y Holanda [217, 270, 271], que han sido investigados mediante métodos de tipaje epidemiológico molecular. En la mayoría de los casos una o dos cepas epidémicas fueron detectadas para las que la transmisión se observó entre hospitales mediante la transferencia de pacientes colonizados [272, 273].

La dispersión de *A. baumannii* no queda confinada a hospitales dentro de una misma ciudad, sino que también se ha reportado a escala nacional [272, 274-277], intracontinental [278-280] e intercontinental gracias a la actividad de las líneas aéreas [281, 282], lo que subraya la importancia de la exploración y aislamiento de pacientes transferidos desde países con elevada prevalencia de organismos resistentes [219]. Este fenómeno de importación de *A. baumannii* multirresistentes hacia países de baja relevancia como España o Noruega ha sido demostrada [283] y casos en los que se produce el retorno de personal

militar y no militar portando infecciones causadas por *A. baumannii* multirresistente desde las últimas operaciones de guerra llevadas a cabo en Irak y Afganistán, han recibido una gran atención [284-288].

En España, la prevalencia de infecciones debidas a *A. baumannii* ha ido incrementándose en una tendencia al alza observada desde el año 1990 [289], con una tasa de resistencias a carbapenemes mucho mayores que las encontradas en unidades de cuidados intensivos de Estados Unidos y otros países europeos [254].

2.8.3. Patogenia

La infección producida por *A. baumannii* se inicia tras la colonización de los pacientes susceptibles [290]. Desde los reservorios ambientales o inanimados y desde otros pacientes ya colonizados o reservorios animados y a través del personal sanitario que actúa como portador transitorio, *A. baumannii* coloniza a los pacientes de forma generalizada, siendo el papel de la transmisión por vía aérea poco significativo [203]. Desde estas localizaciones se produce la infección en áreas susceptibles como las mucosas, tejidos del sistema urinario y heridas quirúrgicas, o produciéndose la invasión del torrente vascular a través de los puntos de inserción de catéteres. La carga de pacientes colonizados es una de las variables importantes en la adquisición de cepas resistentes [260].

Los factores de virulencia son aún poco conocidos, considerándose a una bacteria de baja patogenicidad [217, 291]. Al igual que en otras bacterias Gram-negativas, el lípido A del lipopolisacárido de la membrana tiene actividad endotóxica, aunque en menor grado que en otros miembros de este grupo de bacterias y el 15% de las cepas producen biopelículas que aumentan la virulencia bacteriana de otras bacterias Gram-negativas en el curso de la infección [291]. Si bien en estudios experimentales la inoculación intraperitoneal en ratones y el análisis de la dosis semiletal (DL_{50} , miligramos necesarios por kilogramo de peso del animal para matar al 50% de la población), muestra resultados cercanos a los de otras enterobacterias [291-293], su virulencia en la práctica clínica es notablemente inferior [218], lo que, según se ha propuesto en diferentes trabajos, puede explicarse como resultado de la pérdida de la aptitud biológica o *fitness*, que se ha asociado a la adquisición de resistencia y que, como coste de su adaptación a la presión antibiótica, ha de asumir el organismo [294-

297]. De esta manera, el aislamiento de esta bacteria en los cultivos de muestras biológicas no debe interpretarse sistemáticamente como sinónimo de infección, ya que, a menudo, se traduce en una simple colonización. Se ha estimado que, de los pacientes colonizados en las unidades de cuidados intensivos, alrededor del 50% desarrolla muestras clínicas positivas y sólo entre el 10 y 35% de los mismos presentan criterios significativos de infección [203, 217].

La diferenciación entre colonización e infección [298] comporta implicaciones en el pronóstico y en la terapia de gran trascendencia clínica, teniendo en cuenta la multiresistencia de estos microorganismos y la escasez de alternativas terapéuticas para combatir estas infecciones. Esta diferenciación se hace especialmente complicada en el entorno de vulnerabilidad de los pacientes ingresados en unidades de cuidados intensivos, debido a las enfermedades subyacentes que pueden presentar, su sometimiento a un gran número de manipulaciones e instrumentaciones y los tratamientos antibióticos de amplio espectro que reciben, lo que obliga a una valoración clínica muy meditada a la hora de llevar a cabo su determinación. El hallazgo frecuente de cultivos polimicrobianos hace, si cabe, aún más difícil esta evaluación que, en el caso de las colonizaciones respiratorias, se hace particularmente importante [299].

En la mayoría de las instituciones sanitarias la mayor parte de los aislados de *A. baumannii* proceden del tracto respiratorio de los pacientes en ellas ingresados. En muchos de estos centros se presentan altas proporciones de neumonías adquiridas asociadas al uso de respiradores automáticos y se observa una clara asociación entre los pacientes infectados por *A. baumannii* y sus prolongadas estancias en las unidades de cuidados intensivos [300]. Pero en regiones tropicales de Australia y Asia también se han descrito casos de neumonía adquirida en la comunidad causada por *A. baumannii* [301-305], siendo más comunes durante las épocas húmedas y entre personas con un historial de abuso en la ingesta de alcohol [301]. Está caracterizada por un proceso clínico fulminante, con infección sanguínea secundaria y rango de mortalidad de entre el 40 y el 60% [305].

A. baumannii es el agente causal más común en las infecciones del aparato circulatorio adquiridas en las unidades de cuidados intensivos, produciendo un alto nivel de mortalidad excedido sólo por las infecciones originadas por *P. aeruginosa* y *Candida* sp. Las infecciones

producidas por *A. baumannii* son las más tardías de todas las infecciones del torrente sanguíneo que ocurren durante la hospitalización, teniendo lugar tras una media de 26 días desde el momento de la admisión hospitalaria [2]. Las fuentes de infección del aparato circulatorio producidas por *A. baumannii* están típicamente relacionadas con el uso de catéteres o se atribuyen a una neumonía subyacente, infecciones del tracto urinario o heridas infectadas [306]. Muchos de los militares heridos en las intervenciones bélicas llevadas a cabo en Irak o Afganistán desde el 1 de Enero del 2002, han sufrido de infecciones del torrente vascular producidas por *A. baumannii* [307].

A. baumannii es también un patógeno bien conocido en las unidades hospitalarias reservadas a los heridos por quemaduras, de cuyas lesiones puede llegar a ser muy difícil de erradicar [308]. En el campo de batalla, ha sido el organismo más comúnmente aislado en fracturas abiertas de tibia, aunque aparentemente relacionado con una baja patogenicidad, sin asociársele directamente a una mala cicatrización o necesidad de amputación [309].

A. baumannii es responsable ocasional en infecciones del tracto urinario típicamente relacionadas con la colonización o infección asociada a catéter [1]. Por otra parte, su participación en la meningitis nosocomial postneuroquirúrgica es un fenómeno cada vez más importante. La epidemiología de esta complicación neurológica implica a más patógenos Gram-negativos [310-313], por lo que no es raro que *A. baumannii* multirresistente se encuentre entre ellos [314-317]. Lo normal es que la infección se relacione con la neurocirugía llevada a cabo y el drenaje ventricular externo típicamente utilizado. La tasa de mortalidad puede llegar a ser muy alta, aunque las causas directas de la misma difíciles de discernir [318].

Un pequeño número de casos asocian a *Acinetobacter* con endocarditis [319-323], estando la mayoría relacionados con el uso de prótesis de válvulas cardíacas. *Acinetobacter* spp. ha causado también endoftalmitis (infección en la cavidad ocular), o queratitis (úlceras corneanas), relacionadas con el uso de lentes de contacto o como consecuencia de una cirugía [324-327].

2.8.4. Bases genéticas de la adquisición de resistencia antibiótica

La gran capacidad de *Acinetobacter* spp. en general, y de *A. baumannii* en particular, para intercambiar material genético los sitúa dentro de la clase única de bacterias Gram-negativas descritas como naturalmente transformables [328-330], lo cual les ha facilitado la adquisición de resistencia a una amplia gama de antibióticos. Por ejemplo, la cepa ADP1 de *Acinetobacter baylyi* presenta una capacidad para la competencia natural cien veces superior a la de *Escherichia coli* tratada con cloruro cálcico [330]. Las cepas de *Acinetobacter* carentes del gen *mutS*, parte del sistema de reparación de apareamientos erróneos (*mismatch*), que actúa como preservador de la estabilidad genómica, presentan niveles de mutación incrementados [331]. Se comprobó que la presencia de los genes *comFECB* y *comQLONM* permite llevar a cabo una eficaz adquisición de DNA del medio circundante [332-335]. Aún no está del todo claro si otras especies del género, como *A. baumannii*, son naturalmente competentes o si son las condiciones medioambientales las que pueden ser alteradas para facilitar la patogenicidad o la adquisición de genes de resistencia a los antibióticos [336].

La descripción de las secuencias genéticas en aislados susceptibles y resistentes de *A. baumannii* ha proporcionado información sobre la abundancia de genes de resistencia encontrados en este organismo [337]. En cepas resistentes de *A. baumannii* AYE se indentificó una región a la que se denominó “isla genómica de resistencia AbaR1”, entendiéndose por ello segmentos de DNA codificante con los genes reguladores de inicio y terminación incluidos y que pueden pasar de una bacteria a otra a través de plásmidos. La isla genómica descrita contenía un conjunto de 45 genes de resistencia, entre los que estaban los que codifican para las beta-lactamasas VEB-1, AmpC y OXA-10, varias enzimas modificadoras de aminoglucósidos y bombas de expulsión de tetraciclina. Un análisis genético detallado de esta isla de resistencia AbaR1 mostró además que estaba compuesta por elementos genéticos móviles o transposones, así como de otros genes previamente identificados en *Pseudomonas* spp., *Salmonella* spp. y *E. coli*. Al observar la localización homóloga en cepas susceptibles de *A. baumannii* SDF, apareció una isla genómica de 20 kilobases carente de estos genes de resistencia [337].

En otro análisis del genoma de *A. baumannii* ATCC 17978 [4], se combinó la secuenciación de DNA y la mutagénesis insercional (en la que la inserción de DNA ajeno interrumpe el

marco de lectura generándose la denominada mutagénesis), con ensayos de virulencia en *Caenorhabditis elegans* y se desarrolló un nuevo ensayo de patogenicidad usando *Dictyostelium discoideum*. De esta manera se encontró que en el genoma ensamblado de un aislado del año 1951 con unos 3,98 millones de pares de bases y 3.830 secuencias abiertas de lectura [338], una fracción significativa de las mismas (alrededor del 17%), estaban localizadas en 28 islas genómicas foráneas potenciales, así denominadas con el fin de subrayar la adquisición, por parte del genoma, de una gran cantidad de DNA foráneo. Sorprendentemente, también fue descubierto que un gran número de los genes descritos estaban contenidos en las islas genómicas de virulencia, lo que vendría a sugerir que estos organismos dedican una considerable proporción de su genoma a la patogénesis. La gran isla genómica de virulencia contiene elementos genéticos homólogos a los sistemas de secreción tipo IV de *Legionella* y *Coxiella burnetii*, sistemas implicados tanto en procesos de secreción de factores de virulencia como en procesos de transmisión horizontal de DNA, y que participan en el incremento de la virulencia de las cepas bacterianas y en una respuesta inflamatoria más severa en la mucosa del hospedador, por lo que desempeñarían un papel central en la patogénesis bacteriana. Mediante uso de mutagénesis insercional fueron confirmadas las propiedades de seis de estas islas genómicas foráneas en *C. elegans*. También se localizó una secuencia de inserción que, a modo de isla genómica de resistencia, tenía una longitud de 13.277 pares de bases, constituyendo 9 genes localizados entre los extremos 5' y 3' del gen potencial de la ATPasa y entre los que sólo se encontró un gen de resistencia, en concreto el gen *suI*. Los autores afirman que *A. baumannii* ATCC 17978 posee 74 genes de resistencia potenciales, incluyendo 32 genes que codifican para bombas de eflujo o expulsión, 11 genes para permeasas y 26 genes que codifican para proteínas de resistencia a metales pesados, lo que sugiere la existencia de otras localizaciones en las que estos genes se encontrarían insertos dentro de este organismo [4].

Más recientemente se ha descrito en *A. baumannii* ACICU la existencia de otra isla genómica de resistencia (AbaR2), supuestamente derivada a partir de una evolución reductiva de la previamente descrita en *A. baumannii* AYE (AbaR1) [339]. Los autores describen en esta cepa bacteriana la presencia de 36 potenciales islas genómicas de origen externo, 24 de las cuales ya habían sido descritas anteriormente en el genoma de *A. baumannii* ATCC 17978, 4 son de nueva aportación tanto en ATCC 17978 como en ACICU, y 8 son exclusivas del genoma de ACICU. De estas islas descritas en el genoma de

ACICU, 15 presentan genes de resistencia, incluyendo transportadores de membrana y otros genes de resistencia adquiridos.

Hace unos 30 años que se demostró que *Acinetobacter* spp. puede adquirir factores de resistencia a distintos antimicrobianos a través de la conjugación plasmídica [340, 341]. Actualmente, los trasposones son reconocidos como importantes elementos en la diseminación de determinantes genéticos de resistencia en *Acinetobacter* spp. [342, 343]. Muchos de estos transposones contienen integrones (predominantemente de la clase 1 o retrotransposones), elementos genéticos que, aunque incapaces de moverse por sí mismos (hecho por el cual han de venir incluidos en un plásmido o transposón), contienen un gen *int* y genes en cassette, usualmente marcadores de resistencia a diferentes antibióticos formando parte de estos elementos móviles y constituidos por un gen carente de promotor y un lugar de recombinación específico conocido como elemento 59 bp [344, 345], y que pueden ser movilizados hacia otros integrones o sitios secundarios del genoma bacteriano [346-348]. Tal como ocurre en otras bacterias Gram-negativas, un fenotipo multirresistente de *A. baumannii* surge cuando coexisten múltiples determinantes de resistencia contra diferentes clases de antibióticos, dando lugar a los genes en cassette de resistencia a múltiples fármacos.

El proceso de selección y diseminación de los elementos móviles portadores de estos genes de resistencia puede ser amplificado en el ámbito clínico gracias al uso indiscriminado de antibióticos [349, 350]. La descripción de secuencias de inserción que promueven la expresión génica también ha jugado un importante papel para la comprensión de cómo tiene lugar la regulación de la resistencia. Por ejemplo, la presencia de la secuencia de inserción IS*Aba1*, que ha sido identificada en *A. baumannii*, pero no en la familia *Enterobacteriaceae* ni en *Pseudomonas aeruginosa* [351], resulta en la expresión aumentada de las β -lactamasas AmpC y OXA-51/OXA-69 y en una disminución de los niveles de sensibilidad a ceftazidime y carbapenemes [352, 353].

2.8.5. Principales mecanismos de resistencia antibiótica

Principalmente, los antibióticos contra los que *A. baumannii* y otras bacterias pueden presentar mecanismos de resistencia son los betalactámicos, aminoglucósidos, tetraciclinas, quinolonas y polimixinas. Al tratarse como objetivo del presente trabajo el análisis de la resistencia adquirida por este microorganismo frente al antibiótico colistina (Polimixina E), se reserva el siguiente subapartado (ver 2.8.5.1) para analizar esta cuestión y se dedica el presente a dar una visión global de cuáles son los mecanismos de resistencia contra los que cuentan las bacterias en general y *A. baumannii* en particular en su lucha contra la presión ejercida por esas otras especies antibióticas.

La figura 14 (página siguiente) muestra de manera esquemática cuáles serían los principales mecanismos de resistencia que las bacterias han adquirido frente a la acción de los antibióticos. Estos mecanismos que, de manera común, han sido desarrollados por las bacterias frente a la acción de distintos antibióticos son:

1) Inactivación enzimática del fármaco:

Este tipo de mecanismos está representado por, entre otros, la presencia de las betalactamasas, enzimas estructuralmente similares a las proteínas de unión a la penicilina (PBPs, *Penicillin-Binding-Proteins*) esenciales en la acción de los antibióticos betalactámicos, quienes se unen a ellas inhibiendo su papel en la transpeptidación (*cross-linking*) del peptidoglicano e impidiendo así este último paso crucial en la síntesis de la pared celular. Las betalactamasas se unen covalentemente al antibiótico y producen la hidroxilación del anillo betalactámico presente en su estructura molecular, inhibiendo su mecanismo de acción. Sería el mecanismo de resistencia a los betalactámicos más común y los genes que las codifican deben estar presentes en el cromosoma bacteriano o adquirírselos por transferencia genética para luego ser expresados tras inducción por exposición a estos antibióticos. La producción de betalactamasas no excluiría el tratamiento con betalactámicos, dado que, en algunos casos, pueden ser administrados junto a los inhibidores de betalactamasas, que, aún sin presentar la estructura molecular básica de este tipo de fármacos, están clasificados dentro de esta familia de antibióticos por el papel ejercido junto a los mismos en su acción bactericida.

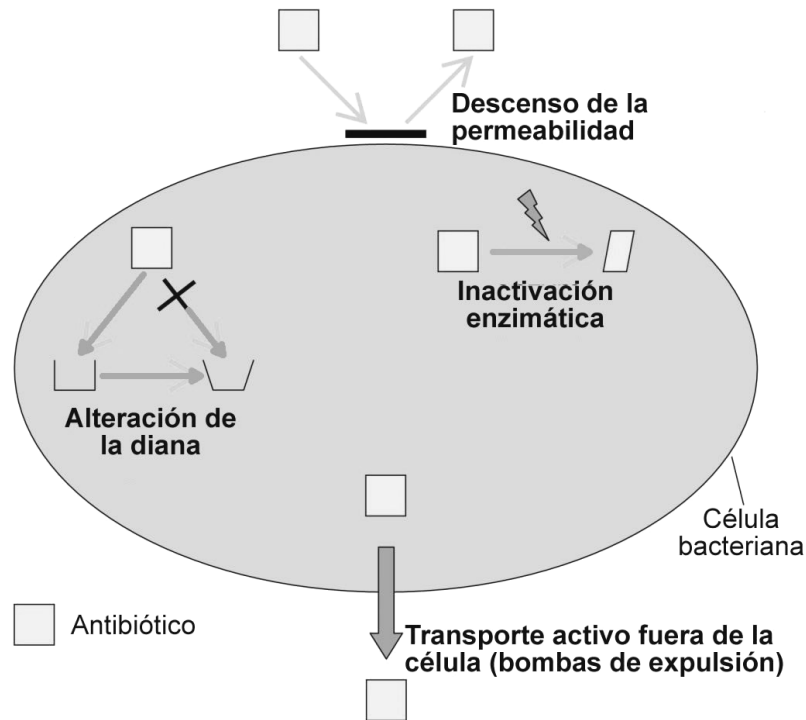


Figura 14. Principales mecanismos de resistencia bacteriana frente a la acción de los antibióticos. Adaptado de [354].

En *A. baumannii* este es el mecanismo de resistencia a los antibióticos β -lactámicos más prevalente, sin embargo, dada la compleja naturaleza de este organismo, pueden entrar en concierto varios mecanismos que conduzcan hasta la adquisición del fenotipo resistente [267, 355, 356]. Todas las cepas de *A. baumannii* expresan cefalosporinas AmpC [286, 357-360], también conocidas como cefalosporinas derivadas de *Acinetobacter* o ADC (*Acinetobacter-derived cephalosporinases*) [358]. A diferencia de las enzimas AmpC encontradas en otros organismos Gram-negativos, la expresión inducida de las mismas no ocurre en *A. baumannii* [352, 357], siendo el determinante clave que regula su expresión aumentada la presencia de la secuencia de inserción IS*Aba1* [352, 360-362]. La presencia de este elemento altamente conservado se relaciona con el incremento en la expresión de AmpC y con la resistencia a las cefalosporinas de amplio espectro [360, 361], mientras que el cefapime y los carbapenemes permanecen estables en respuesta a estas enzimas [358]. Las β -lactamasas de amplio espectro o ESBL (*Extended-spectrum β -lactamases*), de la clase A de Ambler, también se describieron en *A.baumannii*, pero la valoración de sus prevalencias reales se ha visto impedida dada las dificultades que conlleva su detección en el laboratorio, especialmente en presencia de AmpC. De las β -lactamasas, aquellas que presentan actividad

carbapenemasa son de gran preocupación e incluyen las serín-oxacilinasas (clase D de Ambler tipo OXA) y las metalo- β -lactamasas (MBLs de la clase B de Ambler) [363-365], mientras que las carbapenemasas de la clase A de Ambler no se han descrito en *A. baumannii* [364]. A pesar de que las metalobetalactamasas se han identificado con menor frecuencia en *A. baumannii*, sus actividades hidrolíticas sobre los carbapenemes son entre 100 y 1.000 veces más poderosas [363]. Estos enzimas tienen la capacidad de hidrolizar todos los β -lactámicos incluidos los carbapenemes, excepto el monobactámico aztreonam. En muchas regiones geográficas, incluyendo España, Singapur, Grecia y Australia, se ha observado la presencia tanto de enzimas tipo OXA como tipo MBL en la misma cepa [366-369], aunque los enzimas tipo MBL se localizan comúnmente dentro de integrones.

También por modificación enzimática se desarrolla el mecanismo de resistencia a aminoglucósidos más común. El antibiótico se vuelve inactivo sin poderse unir apropiadamente a su diana, el ribosoma celular. Los genes que codifican para estas enzimas están normalmente localizados en plásmidos o transposones, lo que facilita la rápida adquisición del fenotipo resistente al fármaco. Un gran número de genes ha sido caracterizado como responsable de la síntesis de tres tipos de enzimas [370-373]: 1) la N-Acetiltransferasa (AAC), que cataliza una reacción de acetilación de un grupo amino usando el acetil-coenzima A como donador; 2) la O-Adeniltransferasa (ANT), que cataliza la adenilación dependiente de ATP de un grupo hidroxilo y 3) la O-Fosfotransferasa (APH), que cataliza una fosforilación dependiente de ATP de un grupo hidroxilo. En cepas de *A. baumannii* multirresistente es muy prevalente la presencia de genes codificadores de enzimas modificadoras de aminoglucósidos dentro de los integrones de clase 1 [348, 374-380], habiéndose descrito todas las clases de enzimas mayoritarias, incluyendo las ya mencionadas acetiltransferasas, nucleotidiltransferasas y fosfotransferasas [286, 376].

Para el caso de las tetraciclinas, se observó que el gen *tet(X)* codifica para una proteína que modifica químicamente al antibiótico en presencia de oxígeno y NADPH, siendo este el único ejemplo descrito de este tipo de resistencia a las tetraciclinas y únicamente encontrado en *Bacteroides* spp. [381, 382]. Por último, a día de hoy no se han descrito mecanismos de inactivación enzimática de las quinolonas.

2) Expresión de bombas de expulsión:

La expresión aumentada de las mismas es uno de los mecanismos usados en la adquisición de resistencia frente a distintos tipos de agentes antimicrobianos. Su acción es dependiente de energía, expulsando de manera activa antibióticos y otras sustancias a través de la membrana.

El genoma de las cepas multirresistentes de *A. baumannii* codifica para una gran variedad de sistemas de expulsión o bombeo de fármacos fuera de la célula [337]. El sistema de bombeo AdeABC, perteneciente a la familia de bombas de expulsión tipo RND (*resistance-nodulation-division*), es el más profundamente estudiado y, dentro del perfil de sustratos que expulsan al exterior celular, se incluyen β -lactámicos como los carbapenemes [383, 384], aminoglucósidos, eritromicina, cloramfenicol, tetraciclinas, fluoroquinolonas, trimetoprima, bromuro de etidio y tigeciclina [383-390].

Al igual que otras bombas tipo RND, y tal como se muestra esquemáticamente en la figura 15 (página siguiente), AdeABC tiene tres componentes estructurales: 1) AdeB, que forma el componente transmembrana de la membrana interna; 2) AdeA, que forma la proteína de fusión en la cara periplasmática de ambas membranas y 3) AdeC, que forma el dominio transmembrana de la membrana externa. AdeABC está codificada cromosómicamente y normalmente regulada por un sistema de dos componentes, con una quinasa sensora (AdeS) y su regulador de respuesta asociado (AdeR) [386]. Las mutaciones por sustitución de bases en el sistema regulador están asociadas con la expresión aumentada de este sistema de bombeo [386], pero estas mutaciones no serían necesarias [388, 389]. Se ha descrito la alteración en la expresión del gen *adeS* por presencia de la secuencia de inserción IS*Aba1* [389] y la inactivación insercional del componente transmembrana del sistema de bombeo, codificado por el gen *adeB*, conduce a la pérdida de funcionalidad y multirresistencia [385]. Sin embargo, este no es el caso con la desactivación del gen *adeC*, que codifica para la región externa a la membrana del sistema de bombeo, sugiriéndose que AdeAB es capaz de reclutar otras OMPs (*outer-membrane proteins*) para constituir un complejo funcional [386]. Además de este, se han descrito otros sistemas de bombeo tipo RND para diferentes especies genómicas del género *Acinetobacter* [391, 392].

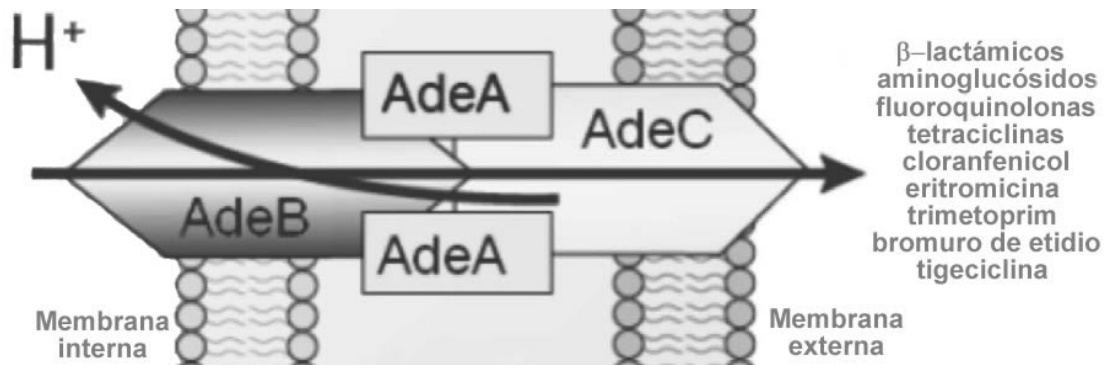


Figura 15. Representación esquemática de una de las bombas de expulsión de la familia RND que, con su actividad excretando sustancias tóxicas desde el interior celular, confieren resistencia frente a múltiples fármacos. Adaptado de Wieczorek *et al.* 2008.

Además de la bomba de expulsión AdeABC, que transporta con baja efectividad amikacina y kanamicina debido a sus naturalezas más hidrofílicas [385], los aminoglucósidos gentamicina y kanamicina son también sustratos de la bomba AbeM, miembro de la familia de transportadores que llevan a cabo la expulsión de múltiples fármacos y compuestos tóxicos. En *P. aeruginosa*, la extrusión de aminoglucósidos es específica del sistema de bombeo MexXY-OprM, bomba de eflujo que reconoce una amplia gama de sustratos [393, 394]. En *E. coli*, la proteína AcrD está involucrada en el bombeo de aminoglucósidos fuera de la célula, dado que la delección de su gen decrece la concentración mínima inhibitoria de la amikacina, gentamicina, neomicina, kanamicina y tobramicina. Además, el transporte activo mediado por MdfA se ha observado también para la neomicina, kanamicina e higromicina A. Sin embargo, el significado clínico de este mecanismo de resistencia está aún sin clarificar, comparado al del bombeo activo de otras clases de antimicrobianos [373, 395].

En el caso de las tetraciclinas, los genes *tet* codifican para proteínas asociadas a membrana que exportan tetraciclinas fuera de la célula mediante su intercambio por protones en un complejo antiporte tetraciclina/catión. Este mecanismo reduce la concentración del antibiótico en el interior de la célula y protege a los ribosomas de la acción de los mismos. Generalmente, estos genes confieren resistencia a la tetraciclina y doxiciclina, pero el gen *tetB* también otorga resistencia a la monociclina. A día de hoy, las glicilciclinas no se han visto afectadas por estas bombas de expulsión, aunque sí se ha obtenido resistencia a este tipo de antibióticos en ensayos *in vitro*, sugiriéndose que la resistencia podría ser

desarrollada en su uso clínico [381, 382, 396]. Se ha propuesto que la tigeciclina supera estos mecanismos gracias a la resistencia estérica que produce el sustituyente presente en posición 9 [397]. Aparte de las bombas de expulsión específicas de las tetraciclinas, estos agentes antimicrobianos pueden también ser expulsados de la célula por los sistemas de expulsión de múltiples fármacos como el sistema CmeABC en *Campilobacter jejuni* [398], MexAB, MexCD y MexXY en *P. aeruginosa* [393, 394] o los sistemas AdeABC y AdeIJK en *A. baumannii* [219, 399]. La tigeciclina, primer miembro de la nueva clase de tetraciclinas denominadas glicilciclinas, también es uno de los sustratos expulsados por estos sistemas de expulsión emergentes [388, 389] Mediante el desarrollo de una PCR a tiempo real con el gen *adeB* en aislados clínicos y de laboratorio expuestos al antibiótico con incrementadas concentraciones mínimas inhibitorias (MICs) de tigeciclina, se observó un incremento en la expresión del gen [388]. Se observó que el aumento en el MIC de tigeciclina ocurre rápidamente con el pase seriado de células in vitro, sugiriéndose que la expresión de esta bomba de expulsión de múltiples fármacos puede estar rápidamente regulada al alza en respuesta a la presión selectiva. El papel de la bomba de eflujo AdeABC en la baja susceptibilidad a tigeciclina fue confirmada por inactivación insercional del gen *adeB*, que condujo a una caída significativa del MIC de tetraciclina (de 4 µg/ml a 0,5 µg/ml) [389]. Estos datos sugieren que debe ser considerado con cautela el uso de la tigeciclina en el tratamiento de la infección causada por *A. baumannii* en tejidos como la sangre, en los que la concentración del fármaco puede estar por debajo de su nivel óptimo [400].

Los análisis del genoma de *E. coli*, han revelado la presencia de, al menos, 37 transportadores de fármacos [401]. Al igual que los aminoglucósidos, muchas quinolonas son también sustratos de las bombas de expulsión de múltiples fármacos [402], incluyendo la bomba AdeABC [384, 385] y la bomba AdeM de la familia MATE (*multidrug and toxic compound extrusion*) [403].

3) Reducción de la permeabilidad de la membrana:

La alteración en la permeabilidad de la membrana puede conducir a la adquisición de resistencia a distintos tipos de antibióticos betalactámicos. Este tipo de mecanismo de resistencia, atribuido a mecanismos no enzimáticos, se justifica ante el hecho de que estos fármacos son moléculas generalmente hidrofílicas que necesitan penetrar a través de

porinas o proteínas OMPs (*Outer Membrane Proteins*) de la membrana externa. Poco se sabe aún sobre las porinas expresadas en *A. baumannii*, pero se ha observado que la pérdida de la proteína de 29 kDa, también conocida como CarO, está asociada con la resistencia a imipenem y meropenem [404-406]. Esta proteína pertenece a la nueva familia de las proteínas OMP de la membrana externa, encontrada solamente en miembros de la familia de bacterias *Moraxellaceae* de la clase *Gammaproteobacteria* [405]. No se ha visto un sitio específico de unión a imipenem en CarO [406], indicando que esta porina constituye canales no específicos. Una segunda proteína, conocida como Omp25, fue identificada en asociación con CarO, pero carece de capacidad para la formación de poros [406]. La pérdida de CarO en *A. baumannii* resistente a imipenem ocurre de manera secundaria a la interrupción de la expresión del gen *carO* promovida por elementos de inserción definidos [405]. Los brotes clínicos de *A. baumannii* resistente a carbapenem gracias a la pérdida de porinas, incluyendo la expresión reducida de las OMPs de 47, 44 y 37 kDa en cepas endémicas de *A. baumannii* en la ciudad de Nueva York [267] y por la reducida expresión de las OMPs de 22 y 33 kDa en asociación con OXA-24 en España [355], también se han descrito. Otras OMPs identificadas con relación a la adquisición de resistencia a β -lactámicos incluyen la proteína modificable por calor HMP-AB (*heat-modifiable protein – A. baumannii*) [407], homóloga a la proteína OmpA de las enterobacterias y OmpF de *P. aeruginosa* [408]; la proteína de 33 a 36 kDa [409, 410]; una proteína de 43 kDa que muestra una homología significativa con OprD de *P. aeruginosa* [209] y la proteína OmpW homóloga a las proteínas OmpW observadas en *E. coli* y *P. aeruginosa* [211, 408]. Estudios proteómicos comparando cepas de *A. baumannii* multirresistente con cepas de referencia, no observan alteraciones en la expresión de Omp33/36 o OprD, pero la expresión de CarO y las isoformas estructurales de OmpW sí se muestran diferentes [211].

Este tipo de mecanismo de resistencia produce un descenso en la incorporación de aminoglucósidos y en su acumulación dentro de la célula. El nivel de resistencia producido es moderado, pero puede resultar en una reactividad cruzada a todos los aminoglucósidos [371-373].

La presencia de mutaciones que modifican la permeabilidad de la membrana externa puede tener un efecto a nivel de la resistencia a las tetraciclinas. Además, la presencia de otras

bombas de expulsión no específicas para las tetraciclinas puede también reducir la concentración de tetraciclinas dentro de la célula bacteriana [382].

Las quinolonas pueden cruzar la membrana externa de las bacterias Gram-negativas a través de las porinas, mientras que las quinolonas hidrofóbicas pueden también entrar en la célula usando una ruta no dependiente de porinas. Aunque los mutantes defectivos de LPS presentan sensibilidad a las quinolonas hidrofóbicas, la resistencia asociada a la permeabilidad ha estado normalmente asociada al descenso de la expresión de porinas, especialmente en el caso de la porina OmpF [401, 411, 412].

4) Modificación de la diana:

Dado que los betalactámicos han de unirse a las PBPs, la expresión disminuida de las mismas, así como leves modificaciones en su estructura pueden conducir a una reducción en su unión a los antibióticos, siendo este otro de los mecanismos de resistencia descritos frente a esta clase de antibióticos.

Para los aminoglucósidos, este mecanismo es mayoritariamente responsable de la resistencia a estreptomycin, dado que este antibiótico se une a un único sitio de la subunidad 30S del ribosoma. Las mutaciones que conducen a una alteración del sitio de unión de los aminoglucósidos son responsables de una reducción de la afinidad del fármaco por los ribosomas. Este mecanismo de autodefensa pasa por la metilación posttranscripcional del RNA ribosómico mediante uso de la S-adenosil-metionina como cofactor y ha sido desarrollado por los mismos microorganismos productores de aminoglucósidos con el fin de evitar su propia destrucción. El gen *armA* (metilasa de resistencia a aminoglucósido), está involucrado en la adquisición de resistencia a las deoxiestreptaminas y fortimicina, inicialmente caracterizada en *Klebsiella pneumoniae*. Este gen se ha visto siempre asociado a la presencia de *bla*_{CTX-M-3} en un plásmido IncL/M [370-373, 413].

En cuanto a las tetraciclinas, las mutaciones en distintas posiciones del rRNA 16S están involucradas en la resistencia a estos antibióticos en *Propionibacterium cutania* y *Helicobacter pylori* [382].

Las dianas de las quinolonas son distintas entre las bacterias Gram-positivas y Gram-negativas. Así, en las Gram-negativas la diana mayoritaria es la DNA girasa y las mutaciones involucradas en la adquisición de resistencia a las quinolonas ocurren mayoritariamente en una región del gen *gyrA* conocida como la región determinante de resistencia a quinolona o QRDR (*quinilone-resistance determining region*). La presencia de una sola mutación resulta en un alto nivel de resistencia al ácido nalidíxico, si embargo, en el caso de las fluoroquinolonas, son necesarias mutaciones adicionales de los genes *gyrA* o *parC* [401, 411, 412]. En *A. baumannii* han sido descritas modificaciones de la DNA girasa y la topoisomerasa IV a través de mutaciones en los genes *gyrA* y *parC* [378, 384, 414-416], que interfieren con el sitio de unión en la diana.

Aparte de estos mecanismos que, de manera general, aportan resistencia antibiótica a las bacterias, existen otros mecanismos que, de manera particular, han desarrollado estos microorganismos frente a ciertas clases de antibiótico. Entre ellos destacan:

1) Proteínas de protección ribosomal:

De manera exclusiva a la acción de las tetraciclinas, los genes *tet* también codifican para proteínas de protección ribosomal que confieren un mayor espectro de resistencia que el descrito para las bombas de expulsión. Estas proteínas citoplasmáticas protegen a los ribosomas de la acción de la tetraciclina, doxiciclina y minociclina, quedando libres, hasta el momento, las gliciliclinas de este efecto. Las proteínas de protección ribosomal tienen una actividad GTPasa, sugiriéndose que la energía generada en la hidrólisis de GTP pueda ser la que libere a la tetraciclina del ribosoma [381, 382, 396, 397]. Los determinantes génicos *tet(A)* y *tet(B)* han sido descritos en *A. baumannii* [417-419] y, en concreto *tet(A)*, se encontró dentro de un transposón similar a Tn1721 en asociación con un elemento de inserción [418]. Este determinante proporciona resistencia a tetraciclina, pero no a minociclina, un agente con mayor actividad contra *A. baumannii*. La protección ribosomal está mediada por los determinantes *tet(M)* y *tet(O)*, siendo *tet(M)* raramente descrito en *A. baumannii* [419].

2) Resistencia mediada por plásmido:

Este mecanismo de resistencia está descrito como protector de la acción de las quinolonas. El primer informe sobre resistencia mediada por plásmido describió este mecanismo en un aislado de *Klebsiella pneumoniae*. El gen *qnr* está generalmente localizado dentro de un integrón y es transmitido a través de la transferencia plasmídica entre distintas cepas. Este gen codifica para una proteína que protege a la DNA girasa de la actividad de las quinolonas, aportando un bajo nivel de resistencia [412]. Una nueva variante de la aminoglucósido-acetiltransferasa Aac(6⁷)-Ib, también produce una susceptibilidad reducida frente a ciprofloxacino. Así, la presencia de la enzima modificada Aac(6⁷)-Ib-cr (siendo cr de *ciprofloxacin resistance*), junto con el gen *qnr*, resulta en cuatro veces más resistencia a ciprofloxacino [420]. Además, un nuevo mecanismo de resistencia mediado por plásmido ha sido descrito, en el que el gen *qepA* codifica para una bomba de expulsión que aporta resistencia para quinolonas hidrofílicas como el norfloxacino y el ciprofloxacino [421]. Hasta el momento, la resistencia a quinolonas mediada por plásmido no se ha descrito en *A. baumannii*.

2.8.5.1. Mecanismos de resistencia a las polimixinas

La familia de las polimixinas fue descubierta en 1947 tras aislárselas desde distintas cepas de *Bacillus polymyxa* e incluye cinco compuestos químicamente distintos denominados como polimixina A, B, C, D y E. Entre ellos, los únicos que presentan valor terapéutico son la polimixina B y E (colistina), que, sin embargo, a principios de los setenta fueron reemplazados por otros antibióticos de menor toxicidad.

Actualmente, la alarma suscitada por la emergencia de patógenos Gram-negativos portadores de mecanismos de resistencia frente a múltiples fármacos y la ausencia de nuevos agentes antimicrobianos con los que combatirlos, ha conducido a la recuperación de antibióticos supuestamente desfasados como la colistina aunque, dada su elevada toxicidad, ésta se mantiene como el último de los recursos posibles en el tratamiento de infecciones provocadas por patógenos multiresistentes [422-424].

Estructuralmente, las polimixinas B y E (colistina) consisten en un heptapéptido cíclico policatiónico con una cadena lateral tripeptídica unida a una cadena de ácido graso a través de un enlace amida en posición alfa (figura 16, página siguiente). En función de la cadena de ácido graso presente, se diferencia entre colistina A (con ácido 6-metiloctanoico) y colistina B (con el 6-metilheptanoico). Las preparaciones farmacéuticas pueden contener distintas cantidades de estas dos moléculas [422-424]. La posterior elaboración química de la estructura de la colistina hace posible su administración en dos formatos químicamente diferenciados: (1) el sulfato de colistina (policatiónico), prescrito para uso oral y tópico, y el sulfometato de colistina, o colistín-metano-sulfonato (CMS), para uso parenteral [423], en el cual cada una de las unidades de ácido diaminobutírico (Dab) se ha derivatizado como metanosulfonato, convirtiendo así la molécula en un polianión (figura 17, página siguiente).

Las polimixinas tienen un mecanismo de acción parecido al de los detergentes sobre la membrana celular, interaccionando además con el LPS y siendo transportadas al interior de la célula mediante un mecanismo de captación autopromovido. La unión inicial de la colistina a la membrana de la célula bacteriana se debe a la interacción electrostática entre el anillo peptídico policatiónico y el LPS con su carácter aniónico. Como consecuencia de esa unión se anulan las interacciones electrostáticas del LPS con cationes divalentes (puentes de calcio y magnesio), resultando en la desestabilización de la membrana. Una interacción adicional entre la cadena de ácido graso y el LPS contribuye a la inserción de la colistina dentro de la membrana y causa un incremento de la permeabilidad de la misma. Las fisuras producidas en la membrana hacen que se produzca pérdida del contenido celular y con ello la muerte del patógeno [422, 424]. Además de la actividad antibacteriana directa, la colistina presenta también una potente actividad anti- endotóxica, aunque el significado de esta función en la acción antimicrobiana *in vivo* no está clara [422].

La administración parenteral de colistina produce comúnmente nefro- y neurotoxicidad, pero los altos niveles de toxicidad observados en los estudios clínicos iniciales se debían a una falta de conocimiento sobre la farmacocinética, farmacodinámica y toxicodinámica del fármaco, junto al empleo de dosis inapropiadas del mismo. Así, los datos observados en distintos estudios sugieren que la toxicidad causada por polimixinas es menos frecuente y severa de lo que inicialmente se observó.

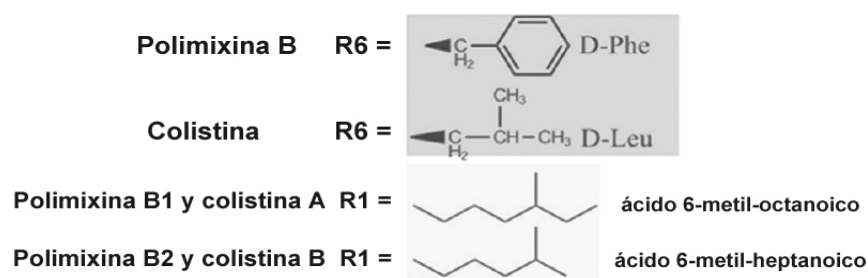
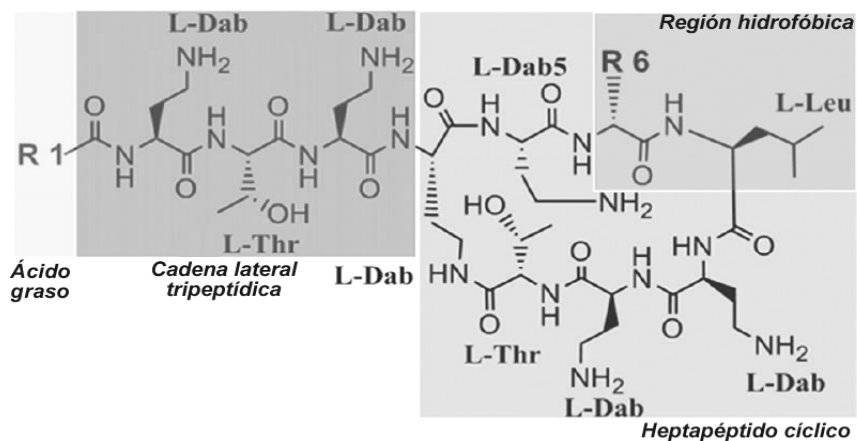


Figura 16. Estructura molecular de la polimixina B y colistina. Abreviaciones: Dab, ácido L- α - γ -diaminobutírico; Thr, treonina; Leu, leucina y Phe, fenilalanina. Adaptado de [425].

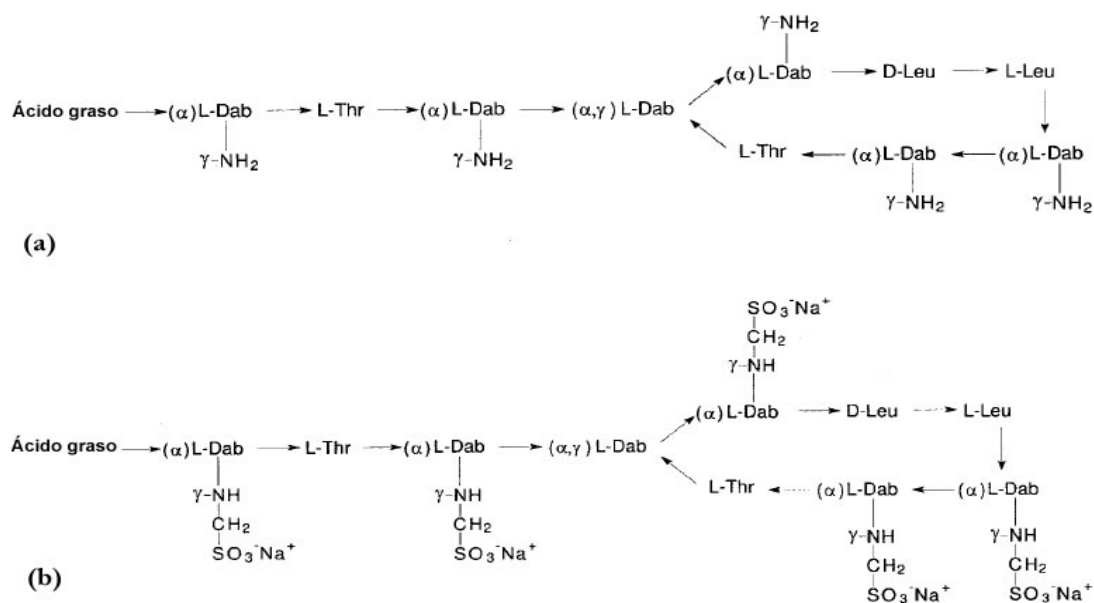


Figura 17. (a) Estructura de la colistina A y B; (b) estructura del sulfometato de colistina. Ácido graso, ácido 6-metiloctanoico para colistina A y ácido 6-metilheptanoico para la B; Thr, treonina; Leu, leucina; Dab, ácido L- α - γ -diaminobutírico. α y γ indican los respectivos grupos -NH₂ implicados en el enlace peptídico. Adaptado de [426].

Se ha podido comprobar como en pacientes con fibrosis quística, la nefrotoxicidad de este fármaco es similar a la de los aminoglucósidos, mientras que la neurotoxicidad es normalmente ligera y se resuelve rápidamente después de suspender el tratamiento [422, 423, 427]. Esta controversia entre los resultados de toxicidad de la colistina observados en diferentes estudios puede ser debida al menos a tres factores: 1) las formulaciones usadas actualmente están mejor purificadas; 2) la administración de fluidos y el tratamiento de soporte ha mejorado y 3) las dosis de colistina administradas en épocas anteriores eran mayores, probablemente debido a la anteriormente citada ignorancia sobre la farmacodinámica, farmacocinética y toxicodinámica [428].

Un primer paso crítico en la acción de las polimixinas sobre las bacterias Gram-negativas es su interacción electrostática entre los residuos de ácido L- α - γ -diaminobutírico (Dab) presentes en la estructura molecular de estos antibióticos y los grupos fosfato negativamente cargados del lípido A [429-432]. Así, muchos de los mecanismos de resistencia descritos frente a las polimixinas están basados en modificaciones en la estructura molecular del lípido A conducentes a una reducción en esta interacción electrostática inicial. En *E. coli*, *S. enterica*, *K. pneumoniae* y *P. aeruginosa*, modificaciones en los fosfatos del lípido A con residuos positivamente cargados tales como la 4-amino-4-deoxi-L-arabinosa y/o fosfoetanolamina reducen la carga negativa neta del lípido A, incrementado su resistencia frente a las polimixinas [433-437]. En *K. pneumoniae*, la presencia de la cápsula también puede ser importante en la resistencia frente a esta clase de antibióticos [438, 439].

En muchas especies bacterianas la resistencia a péptidos catiónicos antimicrobianos está regulada por un sistema regulador de dos componentes, PhoP-PhoQ. Este sistema también se emplea en la supervivencia bajo condiciones de baja concentración de Mg^{2+} que podrían desestabilizar la estructura de la membrana externa debido al descenso en el papel de unión que los cationes divalentes desempeñan entre las moléculas de LPS. El sistema PhoP-PhoQ permanece reprimido en medios con elevada concentración de Mg^{2+} y se activa en condiciones de baja concentración del mismo [433, 440]. En *S. enterica* este sistema está bien caracterizado [434, 435, 437, 440, 441] y actúa como regulador principal de su virulencia y evasión de la acción de los péptidos catiónicos antimicrobianos. PhoQ es una quinasa que fosforila al regulador PhoP en respuesta al bajo nivel de Mg^{2+} o a la presencia de

concentraciones subletales de péptidos catiónicos antimicrobianos. Esto conduce a la activación del sistema PmrA-PmrB, el cual confiere resistencia por activación de la expresión de genes que codifican para enzimas requeridas para la modificación covalente de los grupos fosfatos del lípido A con 4-amino-4-deoxi-L-arabinosa o fosfoetanolamina [434, 435, 441]. Esta modificación conduce a un descenso en su carga negativa neta y reduce la repulsión entre moléculas de LPS vecinas, fortaleciendo el empaquetamiento de la membrana externa [442]. También se ha observado como los péptidos catiónicos antimicrobianos activan directamente el sistema PmrA-PmrB [443].

De esta manera, existen distintos mecanismos para la adquisición de resistencia a la colistina basados mayoritariamente en cambios en la arquitectura de la membrana externa. El mecanismo de resistencia de mayor importancia sería el basado en la modificación del LPS, sin embargo, la resistencia a colistina puede también deberse al reducido nivel de porinas específicas (OMPs) y a una reducción en el contenido de Mg^{+2} y Ca^{+2} [422, 424].

Actualmente es motivo de gran preocupación que, en el ámbito clínico, bacterias patógenas como *A. baumannii* hayan desarrollado resistencia a la colistina, considerada como la última herramienta con la que combatir las infecciones producidas por los patógenos con resistencia a múltiples fármacos. Esta inquietud también motivó el desarrollo del trabajo de investigación aquí presentado.

Desafortunadamente, hay muchas publicaciones que informan de la heterorresistencia a colistina en el ámbito hospitalario [444-447] y, a pesar de la aparición de cada vez más informes sobre la obtención in vitro de resistencia y heterorresistencia incrementada a las polimixinas en *A. baumannii* [447, 448], los mecanismos moleculares que subyacen a la adquisición de la misma, permanecen aún desconocidos.

Aparte de lo ya mencionado sobre la unión reducida al lipopolisacárido que participa en la adquisición de resistencia en *E. coli*, *Salmonella* spp. y *P. aeruginosa* [449, 450], así como los cambios observados en las porinas (OMPs) descritas en *P. aeruginosa* [451, 452], poco más se sabe sobre la adquisición de la resistencia a colistina. Un reciente trabajo sugiere que la proteína PstA, un regulador del sistema de secreción tipo III, regula la resistencia a polimixina y a otros péptidos antimicrobianos, así como la movilidad y la formación de

biopelículas. También se sugiere que este regulador es capaz de controlar la expresión aumentada o disminuída de 178 genes, incluidos, entre otros, muchos genes que codifican para proteínas que influyen en la permeabilidad de la membrana externa [453].

Para *A. baumannii*, otros trabajos apuntan mayoritariamente a la reducción en la permeabilidad de la membrana externa gracias a la expresión disminuida de OMPs. En concreto, la expresión disminuida de OmpW ha sido descrita en un mutante de *A. baumannii* resistente a colistina *in vitro* [408].

La modificación en la expresión del LPS y los cambios en las proteínas de membrana están asociados al incremento en la resistencia a colistina en aislados clínicos de *A. baumannii* y genomoespecies 3 y 17 de *Acinetobacter*. La resistencia a colistina se ha visto asociada a la expresión aumentada de LPS junto a modificaciones en la expresión de proteínas, incluyendo la ya citada expresión disminuida de la proteína OmpW y a la expresión aumentada de un péptido señal de 10 kDa [210].

En un reciente trabajo se ha descrito como la adquisición de resistencia *in vitro* por parte de *A. baumannii* está asociada con la ocurrencia de mutaciones que conducirían a una expresión constitutiva del gen *pmrA*, que, junto al *pmrB*, codifica para el sistema de dos componentes PmrAB. Como se explica anteriormente, y como respuesta a la detección medioambiental de los niveles de pH, Fe^{3+} y Mg^{2+} , el sistema PmrAB conduce a una alteración en la expresión de un conjunto de genes que codifican para enzimas participantes en la modificación de la composición del lípido A. En este trabajo se propone que, en *A. baumannii*, el pH ácido o el Fe^{3+} podrían inducir a la resistencia a colistina, quedando sin evaluar el papel de una concentración limitante de Mg^{2+} en este fenómeno [454].

2.8.6. Coste biológico de la resistencia antibiótica

En la mayoría de los casos, la resistencia antibiótica está asociada a un coste o gasto biológico en términos de adaptabilidad biológica o *fitness* por parte de la bacteria resistente, por lo que ha sido propuesto que una reducción en el uso de los antibióticos – y así en la presión selectiva para la adquisición de resistencia – podría beneficiar a la bacteria sensible,

permitiéndole superar a la resistente en su competencia a lo largo del tiempo [455, 456]. Este concepto básico está apoyado en estudios experimentales y modelos teóricos [455, 457], pero otros procesos tales como la evolución compensatoria y la co-selección genética complican el panorama y hacen que la reversibilidad de la resistencia resulte poco probable [458].

El *fitness* o adaptabilidad biológica de un patógeno resistente a un antibiótico está determinado por las tasas relativas de crecimiento y muerte en el hospedador y en el medio de crecimiento, de transmisión entre hospedadores y de eliminación desde el hospedador [456]. En un modelo experimental *in vitro* como el estudiado en el presente trabajo, se suele tener en cuenta la tasa de crecimiento y muerte en cultivo celular. Este coste biológico puede ser definido como la reducción del *fitness* – esencialmente en la tasa reproductiva – de la población resistente respecto a la población salvaje en ausencia de la presión selectiva ejercida por el antibiótico.

Dado que las dianas de los antibióticos se encuentran en importantes funciones como la síntesis de la pared celular, la regulación del superenrollamiento del cromosoma, la transcripción del RNA o la síntesis de proteínas (figura 13, página 44), no sorprende que los mutantes resistentes sufran normalmente de un descenso en su *fitness* biológico. La adquisición de resistencia por transmisión horizontal de determinantes génicos de resistencia también tiene asociada un coste biológico [459, 460].

Los estudios experimentales acerca del gasto que la bacteria ha de afrontar en su adquisición a la resistencia están normalmente dirigidos a determinar las tasas de crecimiento, supervivencia y competitividad de la cepa sensible y resistente [456]. A grandes rasgos, se hacen crecer *in vitro* o *in vivo* mezclas de cepas bacterianas isogénicas sensibles y resistentes y se miden los cambios en sus frecuencias relativas seguido de un crecimiento selectivo usando marcadores genéticos o usando la misma resistencia como criterio de selección. Estos experimentos de competitividad permiten estimar distintos aspectos del *fitness* de la cepa sensible y resistente, como son sus períodos de retraso, tasas de crecimiento exponencial, eficiencias de utilización de distintas fuentes y sus mortalidades [461].

En muchos estudios se ha observado que la resistencia causada por alteraciones en la diana del antibiótico conduce a un mayor coste biológico [461]. Este coste biológico, mediado por la competición entre la cepa sensible y resistente y dependiente de las condiciones de crecimiento, es considerable y no fácilmente predecible ni a partir de dianas moleculares ni por mutaciones específicas.

En ausencia de antibiótico, es más común que el patógeno intente reducir, mediante mutaciones secundarias, el coste biológico que le ha supuesto la adquisición de resistencia, que no que recupere la sensibilidad frente al fármaco [456]. Este hecho puede ser debido a dos procesos: 1) a que es más sencillo que ocurran mutaciones compensatorias que una reversión real, al requerir esta última de la sustitución de un nucleótido único y específico y 2) a que los pases seriados de células en cultivo a veces están asociados a la selección de los clones de mutantes que se encuentran con mayor frecuencia [462]. Así, los clones que revierten a la sensibilidad, de baja frecuencia, raramente son lo suficientemente comunes como para ser transferidos en experimentos de pases seriados de células. En contraste, los mutantes por compensación, que deben presentar un menor *fitness* que los que revierten a la sensibilidad, tienen una mayor probabilidad de ser transferidos en cada pase, simplemente porque serían los más comunes [461]. Los mecanismos fisiológicos por los que las mutaciones compensatorias restauran el *fitness* se han determinado para pocos casos y en la mayoría de los mismos no queda claro cómo la resistencia afecta a la virulencia, a la habilidad de un patógeno para sobrevivir, replicarse y causar los síntomas de enfermedad en un hospedador infectado. En los casos en los que se mide tanto el *fitness* como la virulencia, generalmente se observa un descenso en ambos aspectos fisiológicos por parte de los mutantes resistentes [463-466].

3. JUSTIFICACIÓN DEL PROYECTO E HIPÓTESIS DE TRABAJO

Acinetobacter baumannii es responsable de un número de infecciones hospitalarias que va en aumento gracias a su prolongada supervivencia en el medio hospitalario y a su capacidad para desarrollar resistencia a los agentes antimicrobianos. La causa de mayor preocupación la constituye su potencial para producir brotes epidémicos y persistir endémicamente en los hospitales, aspecto que hace muy difícil su control y erradicación.

La mayoría de los aislados clínicos de *A. baumannii* son resistentes a múltiples fármacos, habiéndose informado de la existencia de cepas resistentes a todos los agentes antimicrobianos disponibles. La acción de la colistina, conservada hasta ahora como la última estrategia a utilizar en el tratamiento de las enfermedades causadas por estos patógenos multirresistentes, también ha sido superada por ciertas cepas aisladas de *A. baumannii*. Se ha llegado a esta situación gracias a que este organismo presenta resistencia intrínseca a la mayoría de antimicrobianos, debido a su gran adaptabilidad metabólica, su capacidad de reducción de la permeabilidad de membrana y de expresión constitutiva de los sistemas de expulsión activa. Además, es capaz de adquirir con rapidez nuevos mecanismos de resistencia que se pueden observar junto con los mecanismos intrínsecos en muchos de los aislados de *A. baumannii*.

Como ya se ha indicado anteriormente, se desconocen los mecanismos de virulencia y resistencia a los agentes antimicrobianos, a la desecación y a la desinfección que ha ido desarrollando *A. baumannii*. Este hecho justifica el diseño de líneas experimentales que, como la presentada en esta memoria, tengan como objetivo esclarecer cuáles son, a nivel molecular, las capacidades adquiridas por *A. baumannii* durante el desarrollo del fenotipo resistente.

Los estudios sobre el desarrollo de mecanismos de resistencia en *A. baumannii* están mayoritariamente basados en el análisis de cepas clínicas aisladas desde pacientes infectados en el ámbito hospitalario, en las que, normalmente, es muy difícil discernir cuáles de los mecanismos moleculares detectados son específicos para la adquisición de resistencia a uno

u otro fármaco, al encontrarse el organismo sometido a las presiones de distintos fármacos que, con mayor o menor interacción mutua, influyen conjuntamente en el desarrollo del fenotipo resistente.

Siendo la resistencia a colistina una de las adquiridas más recientemente por este patógeno, y debido a lo anteriormente comentado, nos planteamos estudiar los mecanismos moleculares que, de manera intrínseca, permiten a este organismo superar la presión ejercida por el fármaco sin la influencia del resto de antibióticos comúnmente utilizados en la práctica clínica. Por este motivo, nuestro estudio está basado en una línea celular de referencia para *A. baumannii* (en concreto la ATCC 19606), a la que se le ha inducido resistencia por exposición a concentraciones subletales crecientes de colistina. Aunque algo reduccionista, este modelo experimental ha permitido observar algunos de los mecanismos moleculares que permiten a la bacteria sobrevivir ante la presión específicamente ejercida por este antibiótico.

Nuestro estudio parte de la hipótesis de que la versatilidad metabólica que demuestra poseer el patógeno para adaptarse a la presión del antibiótico puede, en último término, plantear vías de estudio tanto o más adecuadas que la búsqueda, a menudo infructuosa, de determinadas dianas bactericidas, sin renunciar a que, en un futuro cercano, nuestros análisis puedan derivar en una expansión de las estrategias antimicrobianas de las que se dispone actualmente.

En el análisis de los principales actores del metabolismo bacteriano, la proteómica aborda el estudio de los mecanismos de adaptación metabólica con una mayor perspectiva que la transcriptómica y puede servir de ayuda en la identificación de ciertas proteínas bacterianas con las que poder detectar la aparición y prevenir la posterior dispersión de los fenotipos resistentes. Por otra parte, los datos a nivel proteómico sobre los mecanismos de resistencia que presenta *A. baumannii* siguen siendo escasos, particularmente en lo que al antibiótico colistina se refiere, no existiendo estudios de proteómica de expresión diferencial cuantitativa inherentes a la adquisición de resistencia a colistina, aparte de los llevados a cabo durante el desarrollo de esta tesis.

Dado nuestro limitado conocimiento sobre la biología de *A. baumannii*, es apropiado aplicar más de una aproximación proteómica cuantitativa para poder entender cuáles son los cambios, a nivel de la expresión de proteínas, asociados a la adquisición de resistencia al antibiótico colistina. Así, en esta tesis se utiliza tanto la técnica iTRAQ como la del DIGE para la caracterización de los proteomas constituidos por las proteínas solubles y de membrana expresadas por la cepa de referencia ATCC 19606 de *A. baumannii* antes y después de inducir su resistencia a colistina.

4. OBJETIVOS

Con el fin de caracterizar el proteoma de *Acinetobacter baumannii* y dilucidar las diferencias cuantitativas entre la cepa sensible y resistente al antibiótico colistina, en esta tesis se plantearon los siguientes objetivos:

- 1) Obtención de un patrón proteico global tanto para las proteínas solubles como para las de membrana que defina el proteoma de la línea celular de referencia de *A. baumannii* ATCC 19606 sensible al antibiótico colistina mediante uso de la electroforesis bidimensional (2DE) y la espectrometría de masas (MALDI TOF MS y LC-MS/MS).
- 2) Análisis cuantitativo de la expresión proteica diferencial tanto en la fracción de proteínas solubles como en la enriquecida en proteínas de membrana para la cepa de referencia y la cepa inducida a resistencia a colistina, mediante el uso de una metodología *in-gel*, en concreto la de la electroforesis bidimensional diferencial (DIGE) seguida de la espectrometría de masas (MALDI TOF MS y LC-MS/MS).
- 3) Estudio cuantitativo de la expresión proteica diferencial en la fracción enriquecida en proteínas de membrana entre la cepa de referencia sensible al antibiótico colistina y la cepa inducida a la resistencia frente al mismo antibiótico, mediante el uso de una metodología *off-gel*, en concreto la del marcaje químico de péptidos mediante isótopos isobáricos estables (iTRAQ) y espectrometría de masas (LC-MS/MS).

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. Cultivo bacteriano e inducción de resistencia a colistina

La cepa ATCC 19606 de *Acinetobacter baumannii* (cedida por el Prof. M. López-Brea del Hospital de la Princesa, Madrid), con sensibilidad a colistina a una concentración mínima inhibitoria (MIC) de 2 μM , fue cultivada en un medio de Luria Bertani a 37°C. El MIC fue determinado tal como se describe en [467]. Resumidamente, La MIC de colistina fue determinada en duplicados de las cepas de *A. baumannii* por el método de microdilución en caldo. Placas *Mueller-Hinton II Broth Cation Adjusted* (Becton Dickinson, Cockeysville, Md, EEUU) fueron usadas como medio de crecimiento, empleándose un inóculo inicial de 5×10^5 CFU/ml en fase de crecimiento exponencial. El MIC se definió como la mínima concentración de agente antimicrobiano que produjo una inhibición total del crecimiento del microorganismo en los pocillos de microdilución, lo que se midió por turbidimetría a las 24 horas y a 450 nm en un lector de placas ELISA *Bio-Rad 680 Microplate* (BioRad, Hercules, CA, EEUU). El inóculo inicial y el crecimiento bacteriano fueron determinados por diluciones seriadas en suero fisiológico que fueron, a su vez, sub-cultivadas en placas de agar *Columbia III* con un 5% de agar suplementado con sangre de oveja e incubadas a 37°C durante 20 horas. Las concentraciones de colistina fueron desde los 0,06 hasta los 128 mg/L.

La resistencia a colistina fue inducida en cultivo líquido sometido a incrementos en la concentración de sulfato de colistina (Sigma España, Madrid). Una vez alcanzado un nivel máximo de resistencia (MIC = 36 μM), la bacteria se cultivó durante dos meses en presencia de una concentración constante de colistina (64 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Tras este tiempo, un único clon fue aislado, cultivado y dispuesto en alícuotas para su conservación en el tampón de conservación (glicerol al 65%, MgSO_4 0,1 M, Tris-HCl 25 mM, pH 8,0), y congeladas a -80°C. Para cada experimento posterior de crecimiento celular, una de estas alícuotas se usó como fuente de células en los nuevos cultivos bacterianos.

5.2. Extracción de proteínas

5.2.1. Extracción de proteínas solubles

Las células resultantes del crecimiento bacteriano en un volumen de 25 mL de medio de cultivo para clones sensibles ó 35 mL del mismo para clones resistentes a colistina, fueron colectadas en fase de crecimiento exponencial ($OD_{600} = 1,5$ para ATCC 19606 ó $OD_{600} = 1,0$ para la cepa resistente), por centrifugación a 4.500 x g durante 20 minutos y a 4°C, lavadas dos veces con PBS (Na_2HPO_4 10 mM, KH_2PO_4 1 mM, NaCl 140 mM, KCl 3 mM, pH 7.0) y una vez con agua bidestilada. Los sedimentos celulares o *pellets* fueron conservados a -80°C hasta proceder con la extracción de proteínas. El lisado proteico se obtuvo por disruptión mecánica de las células de la siguiente manera: los *pellets* fueron resuspendidos en 300 μ L de tampón de lisis [(SDS 10 mM, DTT 190 mM, Tris 80 mM y $MgCl_2$ 4 mM), 17 μ g/mL de RNAasa libre de proteasa (Sigma) y 7 μ g/mL de DNasa I libre de proteasa (Roche Diagnostics, San Cugat del Vallès, Cataluña)]; las células fueron lisadas incluidas en este tampón mediante uso de un equipo que promueve la rotura celular *Hybaid Ribolyser Cell Disrupter* (Hampshire, Reino Unido), usando tubos de lisis que incluían la matriz B (Q-Biogene, Irvine, CA, USA) como se describe en [468], con mínimas modificaciones para la lisis celular de *A. baumannii* (1 único ciclo a velocidad 6, durante 45 segundos y 4°C). Estos tubos de lisis de 2,0 ml contienen esferas de sílica de 0,1 mm contra las que las células impactan debido a la enérgica agitación promovida por el *Hybaid Ribolyser*, lo que produce la rotura de las células y el vertido del contenido celular. Tras este proceso la matriz fue eliminada por centrifugación a 13.000 x g durante 20 minutos y 4°C, los sobrenadantes fueron enriquecidos en su contenido proteico con el kit *Ready-Prep 2-D cleanup kit* (BioRad), siguiendo las instrucciones adjuntas al mismo (protocolo A.1. del anexo A, página 229) y resuspendidos en el tampón de rehidratación 2DE [(urea 7 M, tiourea 2M, CHAPS (3-[(3-Colamidopropil)dimetilamonio]-1-propanosulfonato) al 2%, tampón de anfólitos (*IPG buffer*) al 0,5% a pH entre 4.0 y 7.0 (GE Healthcare, Madrid), DTT 16,2 mM, Azul de Bromofenol al 0,002%)]. La concentración de proteínas fue medida mediante el método del ácido bicinonínico (método del BCA), usando un kit comercial (Pierce, Rockford, IL, EEUU) y siguiendo las instrucciones en él incluidas (protocolo A.2. del anexo A, página 231).

5.2.2. Extracción de proteínas de membrana

Para la extracción de las proteínas de membrana se siguió el protocolo descrito en [469]. Las células fueron colectadas como se explicó anteriormente y se procedió a 2 disrupciones mecánicas a 12.000 *psi* cada una mediante una prensa francesa (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EEUU), de los *pellets* celulares resuspendidos en PBS 0,1 M a pH 6,0 que contenía DNasa y RNasa a una concentración final de 0,1 mg/mL y MgSO₄ a 10 mM. Se añadió sal potásica del ácido etiléndiaminotetracético (K-EDTA) al lisado resultante hasta una concentración final de 15 mM. Las células no lisadas se sedimentaron por centrifugación a 4.500 x g durante 20 minutos a 4°C y, tras extraer el sobrenadante, el sedimento resultante fue re-extraído con el mismo tampón empleado anteriormente para realizar la lisis celular y vuelto a centrifugar en las mismas condiciones anteriores con el fin de obtener el nuevo sobrenadante y combinarlo con el anterior. La fracción cruda de membrana se obtuvo por ultracentrifugación a 140.000 x g durante 50 minutos a 4°C y la contaminación por material soluble se eliminó mediante dos lavados consecutivos con 10 mL del mismo tampón. El sedimento resultante fue entonces resuspendido en 20 mL de Na₂CO₃ 0,1 M a pH 11 y con agitación suave durante 1 hora a 4°C, para volver a ser ultracentrifugado como se describió anteriormente. Tras descartar el sobrenadante, el sedimento resultante fue resuspendido en 2 mL de Tris-HCl 50 mM a pH 7,3 conteniendo un 1% de detergente zwitteriónico derivado de la sulfobetaina (*3-[N,N-dimethyl(3-myristoyl aminopropyl) ammonio]propanesulfonate*) (ASB-14, amidosulfobetaina-14) (Sigma) y 2 mM de tributilfosfina (TBP). El contenido proteico fue medido con el método del ácido bicinconínico antes de ser enriquecido en su contenido proteico mediante el kit *Ready-Prep 2-D cleanup kit* (BioRad), de acuerdo a las instrucciones en él adjuntas (protocolo A.1. del anexo A, página 229), para ser, el *pellet* resultante, resuspendido en el mismo tampón de rehidratación 2DE utilizado en el apartado anterior, pero incluyendo, en este caso, TBP 2 mM, ASB-14 al 1% en vez de CHAPS al 2% y un tampón de anfólitos (*IPG buffer*) al 0,5% de pH entre 3,0 y 10,0 (GE Healthcare).

5.3. Electroforesis bidimensional

5.3.1. Primera dimensión o isoelectroenfoque

Para las muestras del lisado de proteínas solubles se tomaron alícuotas de 70 µg, mientras que para las proteínas de membrana se tomaron 150 µg. Ambas fueron solubilizadas en 300 µL del tampón de rehidratación 2DE. Las proteínas solubles fueron aplicadas a tiras de gel de acrilamida con un gradiente lineal inmovilizado de pH 4,0 - 7,0 (*IPG strips pH 4.0 – 7.0*, BioRad), mientras que para las proteínas de membrana se usaron gradientes lineales de pH 3,0 – 10,0. En ambos casos las tiras presentaban 17 cm de longitud y se usó un sistema para el enfoque isoelectro *Protean IEF cell system* (BioRad), en el que fueron primero rehidratadas activamente a 50 V durante toda la noche y a una temperatura constante de 20°C, seguido por un protocolo de isoelectroenfoque (IEF, *Isoelectrofocusing*) consistente en tres saltos de voltaje: 1) 300 V durante 45 minutos, 2) un ascenso en gradiente del voltaje hasta los 3.500 V durante 22,45 horas y 3) un último paso de 5.000 V durante 30 minutos, sin que se sobrepasase un máximo de 99 µA por gel en ningún momento. Tras este proceso, las tiras de gel con las proteínas incluidas y separadas por sus puntos isoelectro fueron equilibradas primero durante 15 minutos en un tampón de equilibrio (0,12 M Tris-acetato, 6 M urea, 30% glicerol, 5% SDS, pH 7,0), conteniendo 52 mM de DTT y 15 minutos en el mismo tampón, pero conteniendo 135 mM de iodoacetamida en vez de DTT.

5.3.2. Segunda dimensión o SDS-PAGE

Se usaron geles de poliacrilamida al 12% (protocolo A.3. del anexo A, página 234) para llevar a cabo la segunda dimensión de la electroforesis bidimensional en un sistema de electroforesis *Protean II XI cell* (BioRad). La tira *IPG strip* con las proteínas resueltas por sus puntos isoelectro se depositó en el extremo superior del gel de poliacrilamida al 12% y se llevó a cabo una SDS-PAGE estándar desarrollada a 70 mA por gel en un tampón de electroforesis (25 mM Tris-HCl, 192 mM glicina, 0,1% SDS a pH 8,3).

5.3.3. Tinción de proteínas en gel de electroforesis

Tras la electroforesis bidimensional, las proteínas incluidas en los geles de poliacrilamida fueron teñidas mediante una tinción de plata compatible con espectrometría de masas [470], para la que se siguió el protocolo A.4. descrito en el anexo A, página 235.

5.3.4. Análisis de imagen

Para digitalizar la imagen obtenida tras la tinción de los geles se usó un densitómetro calibrado GS-800 (BioRad). En el caso de las proteínas procedentes de la extracción total de proteínas solubles, fueron superpuestas de manera inequívoca 145 bandas o *spots* proteicos de distintos experimentos individuales que se usaron en la normalización de la intensidad media presentada por las mismas tras su tinción, utilizándose el software *PDQuest 2D analysis v. 7.1.0* (BioRad). En el caso de las proteínas de membrana, el número de bandas superpuestas en la normalización de la intensidad media fue de 62.

5.4. Electroforesis bidimensional diferencial (DIGE)

5.4.1. Marcaje de proteínas, primera y segunda dimensión electroforética

Tanto en el marcaje de las proteínas como en el análisis de imagen se siguieron los protocolos propuestos por el fabricante (GE Healthcare) (protocolo A.5. descrito en el anexo A, página 236). En resumen, se tomaron 50 µg del extracto de proteínas solubles y la misma cantidad de la fracción enriquecida en proteínas de membrana de cada línea celular (cuatro extractos de cuatro réplicas de la línea resistente y cuatro de la línea celular sensible a colistina) y fueron marcados, según el diseño experimental resumido en la tabla 3 (página siguiente), con 400 pmol de los marcadores fluorescentes Cy3 ó Cy5 disueltos en dimetilformamida al 99,8% (Sigma) e incubación de 30 minutos sobre hielo en la oscuridad. La reacción de marcaje fue parada mediante adición de 10 µL de lisina 10 mM (Sigma), incubándose las muestras durante 10 minutos adicionales. Un estándar interno se elaboró por combinación de cantidades semejantes de los cuatro extractos R y los cuatro extractos

S y este pool de proteínas fue marcado con el fluorocromo Cy2. Tras la reacción de marcaje, los extractos R, S y el estándar interno fueron combinados en un mismo vial de acuerdo al diseño experimental descrito en la tabla 3, siendo separadas las proteínas en ellos presentes mediante una electroforesis bidimensional en la que tanto los pasos de isoelectroenfoque como los de SDS-PAGE se desarrollaron como se describe en el apartado 5.3.1 y 5.3.2 de este capítulo.

Tabla 3. Diseño experimental de los ensayos DIGE llevados a cabo para los estudios comparativos entre cepas sensibles y resistentes a colistina en *A. baumannii*

	4 Cepas sensibles S ₁₋₄ (50 µg)	4 Cepas resistentes R ₁₋₄ (50 µg)	Estándar interno (1/8 de cada muestra) (50 µg)
Extractos totales de proteínas solubles			
Gel 1	S ₁ - Cy5	R ₄ - Cy3	S ₁₋₄ + R ₁₋₄ - Cy2
Gel 2	S ₃ - Cy3	R ₂ - Cy5	S ₁₋₄ + R ₁₋₄ - Cy2
Gel 3	S ₂ - Cy5	R ₁ - Cy3	S ₁₋₄ + R ₁₋₄ - Cy2
Gel 4	S ₄ - Cy3	R ₃ - Cy5	S ₁₋₄ + R ₁₋₄ - Cy2
Fracciones enriquecidas en proteínas de membrana			
Gel 1	S ₁ - Cy5	R ₄ - Cy3	S ₁₋₄ + R ₁₋₄ - Cy2
Gel 2	S ₃ - Cy3	R ₂ - Cy5	S ₁₋₄ + R ₁₋₄ - Cy2
Gel 3	S ₂ - Cy5	R ₁ - Cy3	S ₁₋₄ + R ₁₋₄ - Cy2
Gel 4	S ₄ - Cy3	R ₃ - Cy5	S ₁₋₄ + R ₁₋₄ - Cy2

5.4.2. Análisis de imagen cuantitativo

Los geles fueron escaneados haciendo uso de un escáner de fluorescencia Typhoon 9400 (GE Healthcare), para capturar la imagen resultante de la fluorescencia emitida por los fluorocromos Cy2, Cy3 y Cy5 unidos a las proteínas incluidas en cada gel. La imagen procedente de la señal Cy2 fue escaneada usando luz de excitación de 488 nm y un filtro de emisión 520BP40; la de la señal Cy3 se obtuvo con luz de excitación de 532 nm y filtro de emisión 580BP30 y la de la señal Cy5 con luz de 633 nm y filtro de emisión 670BP30, siendo todos los geles escaneados a una resolución de 100 µm. Los niveles de expresión fueron determinados usando el programa *DeCyder 5.01* (GE Healthcare), con el que las imágenes fueron procesadas usando el módulo de análisis diferencial (DIA) presente en el mismo. El número de *spots* estimado para cada procedimiento de co-detección fue

establecido en 1500, siendo co-detectados automáticamente los *spots* de cada gel y generándose parejas de imágenes 2-DE en las que cada muestra quedaba intrínsecamente unida a su estándar interno. Todas las imágenes fueron normalizadas tras la substracción del ruido de fondo (*background*) y la expresión diferencial de proteínas entre dos muestras en cada gel estuvo basada en el ratio del logaritmo de la abundancia estandarizada del volumen del *spot* descrito por la señal Cy3 frente al descrito por la señal Cy5 dividido por el descrito por la señal Cy2.

Todos los resultados de los procesados de imagen realizados en el módulo DIA se importaron al módulo de análisis de la variación biológica (BVA) que también presenta el programa y con el que el diseño experimental y la relación entre las muestras fueron asignadas. Cada imagen individual Cy3 ó Cy5 se asignó a una condición experimental dada (sensible o resistente a colistina), de acuerdo al diseño experimental realizado (tabla 3, página anterior). Todas las imágenes Cy2 se clasificaron como pertenecientes al estándar interno de cada gel y se usaron para realizar la comparación por superposición gel a gel de los mapas proteicos descritos por los *spots* presentes en cada muestra con el descrito por los *spots* presentes en estos estándares internos. El gel con el mayor número de *spots* se asignó como gel modelo (*master gel*) y la comparación por superposición entre geles se desarrolló usando el patrón descrito por el estándar interno de cada pareja de imágenes. El proceso de comparación por superposición fue además revisado mediante la confirmación manual de los *spots* con potencial interés.

El grado de diferencia en la abundancia estandarizada entre grupos de *spots* proteicos se expresa como el ratio medio, de manera que una diferencia mínima de 2 en el ratio medio, tanto por encima como por debajo, se estimó como una diferencia significativa. Además, se desarrolló un análisis estadístico *t* de *Student* para cada conjunto de *spots* superpuestos, comparándose la media y la desviación estándar de la abundancia proteica para cada *spot* dado. Así, las proteínas que diferían en un valor superior a 2 respecto al ratio medio y con un valor *p* menor o igual a 0,05, estimado tras el análisis estadístico, fueron consideradas como proteínas de interés para su posterior identificación.

5.4.3. Tinción de proteínas totales y digitalización

Tras digitalizar las imágenes, tal como se describe en el apartado anterior, se realizó una tinción de las proteínas totales (marcadas y no marcadas con los fluorocromos CyDye), presentes en cada gel DIGE usándose el protocolo de tinción de plata compatible con espectrometría de masas descrito en el anexo A (protocolo A.4., página 235). De la misma manera, el patrón de proteínas resultante fue posteriormente digitalizado usando un densitómetro calibrado GS-800 (BioRad).

5.5. Digestión enzimática de las proteínas incluidas en el gel y extracción de los péptidos

Los *spots* proteicos de interés fueron manualmente escindidos de los geles teñidos con plata y digeridos en una placa *ZipPlate* de 96 pocillos depositada sobre un colector de soluciones accionado por vacío (*Multiscreen Vacuum Manifold*, Millipore Ibérica, Madrid). Las bandas de gel o *spots* fueron desteñidos y las proteínas incluidas fueron reducidas, alquiladas y digeridas con tripsina porcina modificada (*Trypsin Sequence grade*, Promega, Alcobendas, Madrid), tras lo que los péptidos resultantes fueron eluidos con un volumen de entre 15 y 25 μ L de ácido fórmico al 1,0% en metanol al 60% para los análisis de ESI MS/MS ó TFA 0,1% en acetonitrilo al 50% para los de MALDI TOF MS, usándolos inmediatamente en estos análisis o conservándolos a -20°C hasta su utilización. El protocolo de desteñido de plata y de reducción/alquilación previos a la digestión triptica, así como el de digestión y extracción de los péptidos tripticos se encuentran explicados en el anexo A (protocolo A.6., página 238).

5.6. Marcaje de iTRAQ

5.6.1. Digestión triptica y marcaje con los reactivos iTRAQ

Se siguió el protocolo general propuesto por el fabricante (Applied Biosystems, Foster City, CA, EEUU) para la digestión de las proteínas y el marcaje de los péptidos resultantes con

los reactivos iTRAQ, también descrito en el anexo A (protocolo A.7., página 244). Todos los reactivos usados fueron los suministrados dentro del kit de iTRAQ, excepto en los casos en los que se indica otra procedencia. Resumidamente, los sedimentos proteicos resultantes tras el enriquecimiento y purificación de proteínas mediante el uso del kit *Ready-Prep 2-D cleanup kit* (BioRad, Hercules, CA, EEUU) (protocolo A.1. del anexo A, página 229) procedentes de las extracciones de proteínas de membrana de dos cultivos de células bacterianas sensibles a colistina (S1 y S2) y los procedentes de dos cultivos de células bacterianas resistentes al mismo antibiótico (R1 y R2), fueron disueltos en 60 μL de tampón de dilución (bicarbonato de trietilamonio 0,5 M). Tras medir la concentración de proteínas por el método del ácido bicinocnínico (protocolo A.2. del anexo A, página 231), se tomaron 100 μg de las mismas para proceder a su digestión enzimática. Esta cantidad de proteínas fue llevada hasta un volumen de 20 μL con el mismo tampón de dilución y se le añadió 2 μL de agente desnaturizante (SDS al 2%) y 2 μL de agente reductor [30 mM de tris-(2-carboxietil)fosfina], incubándolas durante una hora a 60°C. Las muestras fueron entonces llevadas a temperatura ambiente, se les añadió 1 μL del reactivo bloqueante de los grupos sulfhidrilo presentes en las cisteínas [200 mM de metanotiosulfonato de metilo (MMTS), en isopropanol], dejándolos en incubación a temperatura ambiente durante 10 minutos, tras los que se añadió 10 μL de una solución de tripsina (Promega, Madison, WI, EEUU) a una concentración de 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ en agua Milli-Q para incubarlos a 37°C durante toda la noche. Cada uno de los viales de reactivo iTRAQ (114, 115, 116 y 117), fue disuelto en 70 μL de etanol y adicionado dentro de cada vial de muestra según el diseño experimental descrito en la figura 18, dejándolos en incubación a temperatura ambiente durante una hora. Transcurrido este tiempo, las soluciones de péptidos marcados fueron mezcladas todas juntas en un mismo vial

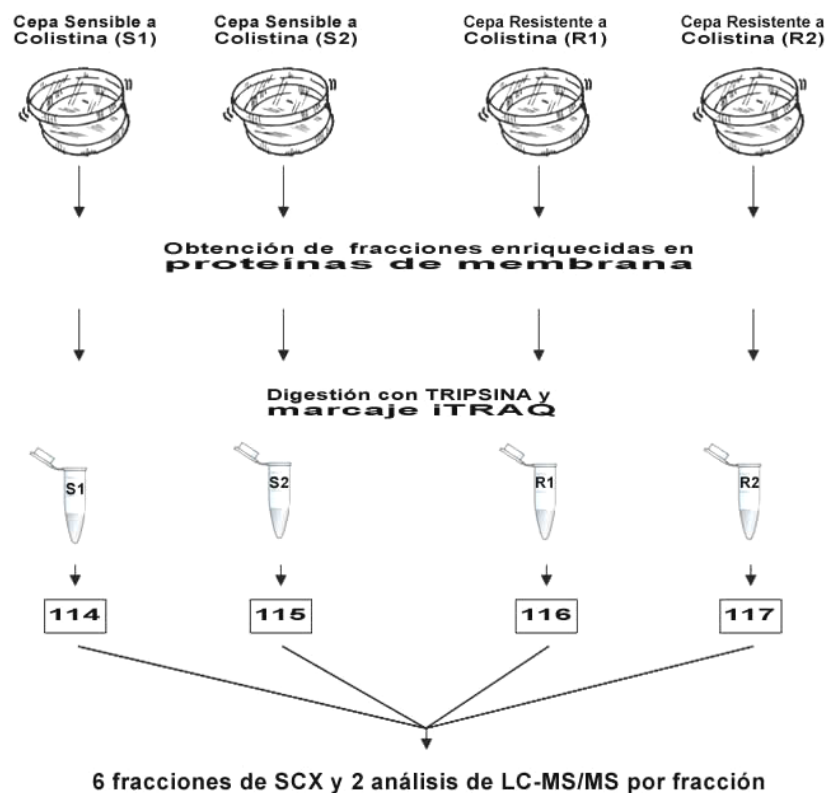


Figura 18. Diseño experimental seguido en el ensayo de iTRAQ. 100 µg de proteínas de las fracciones enriquecidas en proteínas de membrana procedentes de cada cepa bacteriana fueron digeridas con tripsina y marcadas con los reactivos de iTRAQ. Los péptidos marcados fueron combinados en un mismo vial y fraccionados por cromatografía de intercambio catiónico (SCX). Cada fracción de SCX se analizó por LC-MS/MS y los datos se combinaron para hacer el análisis estadístico.

5.6.2. Fraccionamiento peptídico por cromatografía de intercambio catiónico y desalado por cromatografía en fase reversa

El pool de péptidos marcados fue separado en 6 fracciones por cromatografía de intercambio catiónico y las fracciones resultantes desaladas antes de llevar a cabo su análisis de MS/MS. Resumidamente, la muestra fue diluida hasta 10 veces su volumen con el tampón de carga (10 mM de KH_2PO_4 en acetonitrilo al 25%, pH 3,0), el pH de la muestra se ajustó hasta un valor comprendido entre 2,5 y 3,3 y se cargó completamente en un cartucho para el intercambio catiónico de 200 µL y de 4,0 mm x 15 mm, con partículas POROS® 50 HS de 50 µm de tamaño (Applied Biosystems). Las proteínas fueron eluidas en seis fracciones con 1 mL del mismo tampón de carga, pero conteniendo

concentraciones incrementadas de KCl (25, 50, 100, 150, 250 y 375 mM) a pH 3,0 (protocolo A.8. descrito en el anexo A, página 246). Cada una de las seis fracciones resultantes fue desalada manualmente por cromatografía en fase reversa, haciendo uso de otro cartucho que portaba una membrana C18 (*Spec 3 mL C18 cartridges*, Varian Inc., Palo Alto, CA, EEUU) (protocolo A.9. descrito en el anexo A, página 248), secadas *in vacuo* y reconstituidas en 10 μ L de TFA al 0,1%.

5.7. Análisis por espectrometría de masas y búsqueda en bases de datos

5.7.1. MALDI TOF MS

Un volumen de 2,5 μ L de la muestra de péptidos resultante de la digestión de proteínas incluidas en geles de poliacrilamida se depositó sobre una placa de MALDI *Mass.Spec.Turbo 192 Type 1 peptide chips* (Qiagen, Barcelona), que ya presentaba incluida la matriz de ácido α -ciano-4-hidroxicinnámico (CHCA) y los puntos de calibración externa (*Sequazyme Peptide Mass Standards kit*, Applied Biosystems, Foster City, CA, EEUU), predepositados en ciertos puntos estratégicos de la misma. Las muestras se dejaron secar durante 3 minutos hasta la adsorción de los péptidos. Seguidamente, cada muestra de péptidos depositada fue lavada durante 5 segundos con 1 μ L de la solución de finalización dispensada con la placa de MALDI (Qiagen), dejándolas secar al aire tras este procedimiento. Esta solución permite eliminar, mediante un proceso de recristalización, los aductos de matriz, sodio y potasio, permite que tenga lugar una incorporación reproducible y bien definida del analito dentro de la matriz y elimina del espectro los picos correspondientes a la matriz, lo que incrementa significativamente la señal específica. El análisis de MALDI TOF MS se llevó a cabo en un equipo *Voyager DE-STR* (Applied Biosystems, Foster City, CA, EEUU), usando un láser de nitrógeno a 337 nm y operado en modo reflector, con un voltaje de aceleración de 20 kV. Las muestras se analizaron en un intervalo de valores m/z entre los 800 y los 3.000 y fueron calibradas externamente mediante los patrones predepositados en la placa (Des-Arg bradiquinina $m/z = 904,4$; Angiotensina I $m/z = 1.296,6$; Glu1-Fibrinopéptido B $m/z = 1.570,7$ y Neurotensina $m/z = 1.672,9$) e internamente mediante los picos resultantes de la autólisis de la tripsina ($m/z = 842,5$; $m/z = 1.045,5$; $m/z = 2.211,1$ y $m/z = 2.225,1$). La

lista de picos fue generada con el programa *MoverZ* (Knexus Edition, Genomic Solutions, Ann Arbor, MI, EEUU), y los picos monoisotópicos con una relación señal/ruido mayor de 3 fueron seleccionados, eliminándose los pertenecientes a los contaminantes comunes (péptidos trípticos derivados de muchas de las queratinas humanas y de la autólisis de tripsina) gracias al programa *Peak Erazor v 2.0.1* (Lighthouse data, Odense, Dinamarca).

5.7.2. nanoLC-MS/MS

5.7.2.1. Análisis de los péptidos procedentes de las proteínas incluidas en geles de electroforesis

Las muestras de péptidos trípticos resultantes de la digestión en gel que no ofrecieron una identificación satisfactoria mediante su análisis por MALDI TOF MS se analizaron por espectrometría de masas en tándem (MS/MS). Para ello se utilizó un equipo *Q-Star Pulsar* (Applied Biosystems), provisto de una fuente de ionización por electrospray (*nanoESI*, Proxeon Biosystems, Odense, Dinamarca), procediendo tanto por inyección directa de la muestra en la fuente de ionización, como por fraccionamiento previo de los péptidos presentes en la misma mediante cromatografía líquida en escala nano (*nanoLC*), gracias al empleo de un equipo de HPLC *Ultimate II system* (LC Packings, Bannockburn, IL, EEUU), conectado en línea con el equipo de MS/MS. En el modo de inyección directa, tras ser capturado el primer espectro de MS, tanto los iones doble- como los triplemente cargados fueron seleccionados para su posterior fragmentación. En los análisis de nanoLC-MS/MS la mezcla de péptidos trípticos fue fragmentada mediante una cromatografía en fase reversa usando columnas *Atlantis dC18 NanoEase*, de 75 μm x 150 mm (Waters, Mildford, MA, EEUU) acopladas al equipo de HPLC, mediante un gradiente lineal del 5 al 50% de acetonitrilo en ácido fórmico al 0,1% durante 30 minutos, durante el que los péptidos fueron penetrando directamente en la fuente de electrospray para su ionización. Se utilizó un voltaje de electrospray de 2.400 V para ionizar los péptidos que, tras este fenómeno, iban penetrando en el analizador, siendo seleccionados para su fragmentación (MS/MS) en un modo de adquisición IDA (*information-dependent acquisition*), el cual permite maximizar la información generada contenida en cada análisis de LC-MS/MS único. La lista de picos peptídicos se generó desde los datos nativos usando el programa *Analyst QS 1.1* (Applied

Biosystems), que la iba enviando mediante el *script 1.6 b21* al motor de búsqueda MASCOT (MatrixScience, Boston, MA, EEUU) para su análisis comparativo con los espectros teóricos presentes en las bases de datos después de haber calculado el centroide y filtrado isotópicamente los espectros de fragmentación MS/MS, considerándose sólo los estados de carga +2, +3 y +4 del ión precursor.

5.7.2.2. Análisis de los péptidos procedentes del experimento iTRAQ

Un volumen de 4 μ L de cada una de las 6 fracciones de péptidos obtenidas según el procedimiento explicado en el apartado 5.6.2 de este mismo capítulo, se separó por cromatografía en fase reversa usando una columna *Atlantis dC18 NanoEase*, de 75 μ m x 150 mm (Waters), acoplada al equipo de HPLC *Ultimate II nanoLC* (LC Packings – Dionex, Sunnyvale, CA, EEUU). Los péptidos fueron eluidos con un gradiente de entre el 5% y el 50% de acetonitrilo en ácido fórmico al 0,1% de 180 minutos de duración y a razón de 0,2 μ L por minuto, entrando directamente a la fuente de electrospray (*nanoESI source*, Proxeon), acoplada al equipo de MS/MS (*Q-Star Pulsar*, Applied Biosystems). Cada fracción de péptidos fue analizada por duplicado con el espectrómetro de masas operando en modo positivo, con un voltaje de electrospray de 2.400 V y un rango de valores m/z entre los 350 y los 1.700. Los datos se adquirieron en modo IDA, siendo considerados sólo los estados de carga +2, +3 y +4 del ión precursor y los 3 péptidos cargados más abundantes por encima de las 20 cuentas fueron seleccionados para su fragmentación, siendo dinámicamente excluidos durante 60 segundos con una tolerancia de masas de 50 mmu.

5.7.3. Búsquedas en bases de datos

5.7.3.1. Identificación de las proteínas procedentes de los geles de electroforesis

Tanto la identificación de proteínas a partir de los péptidos analizados por MALDI TOF MS como por LC-MS/MS, se realizó empleando el motor de búsqueda MASCOT (Matrix Science). En las búsquedas realizadas por PMF a partir de los péptidos analizados por MALDI TOF MS se empleó la base de datos del Centro Nacional para la Información

Bioteconológica de los Estados Unidos de América (NCBIInr, *National Center for Biology Information non-redundant*) restringida a las secuencias polipeptídicas de las proteínas descritas en Bacteria (Eubacteria), mientras que para las búsquedas realizadas a partir de los péptidos secuenciados por LC-MS/MS se usó una base de datos de elaboración propia en la que se encontraban presentes todas las secuencias polipeptídicas de las proteínas descritas para el género *Acinetobacter* presentes en la base de datos NCBIInr (15.949 secuencias, elaborada el día 16 de Febrero de 2007). En el proceso de búsqueda se establecieron como parámetros hasta un posible error en la posición de corte realizada por la tripsina, la carbamidometilación de cisteína como modificación fija y como posibles modificaciones variables la deamidación de asparagina y glutamina y la oxidación de la metionina. La tolerancia de masas se estableció en 50 ppm para las búsquedas derivadas del análisis de MALDI TOF MS, mientras que para las búsquedas basadas en LC-MS/MS esta tolerancia se estableció en 0,15 Da, tanto para los datos de MS como para los de MS/MS. En todos los casos, el motor de búsqueda estableció un valor estadístico de probabilidad o *score* significativo (a una $p > 0,05$) como condición para una identificación positiva.

Las búsquedas por homología se realizaron usando la herramienta bioinformática de comparación BLAST, disponible en <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi>. Para los nombres de las proteínas identificadas fueron elegidos los propuestos por la herramienta bioinformática *Proxeon v. 1.2.4* (*Proxeon Bioinformatics A/S*, disponible en <http://www.proxeon.com/home/index.html>). Para la interpretación de las diferencias en la expresión de proteínas participantes en el metabolismo celular se utilizó la herramienta bioinformática *KEGG pathways* disponible en <http://www.genome.ad.jp/kegg/pathway.html>.

5.7.3.2. Identificación y cuantificación en el análisis iTRAQ

Tanto la identificación como la cuantificación de las proteínas detectadas fue desarrollada por medio del programa *Protein Pilot v. 2.0.1* (Applied Biosystems) usando el algoritmo *Paragon* [471]. Los datos se procesaron realizando una búsqueda contra una base de datos de elaboración propia que contenía todas las proteínas del género *Acinetobacter* junto a todas las queratinas humanas presentes en la base de datos NCBIInr además de sus secuencias reversas (36.342 entradas, elaborada el día 23 de Enero de 2008). En los parámetros de

búsqueda se estableció como modificación fija la cisteína marcada con tiosulfonato de metilmetano (MMTS-Cys), mientras que otras restricciones como la tolerancia de masas peptídicas en modo MS y MS/MS, la eficiencia de la tripsina, así como alguna otra modificación de residuos aminoacídicos, fueron funciones determinadas por el programa. La identificación de las proteínas está basada en el *ProtScore*, con una línea de corte fijada en 1,3, lo que significa un nivel de confianza del 95%. Para la cuantificación, el programa excluye los péptidos con un nivel de confianza por debajo del 1%, los péptidos compartidos por proteínas distintas o los péptidos cuyos espectros podían ser usados en la identificación de una proteína distinta al derivar en otra secuencia peptídica (fenómeno conocido como superposición o solapamiento de precursor).

6. RESULTADOS

6.1. Visión global del proteoma de *A. baumannii* ATCC 19606 mediante 2DE

Con el fin de caracterizar el proteoma expresado en condiciones normales de crecimiento por parte de la cepa de referencia ATCC 19606 de *A. baumannii* y alcanzar a tener una visión global de cuáles son las proteínas expresadas por este microorganismo, se desarrollaron múltiples experimentos individuales en los que se separaron por 2DE las proteínas presentes en dos compartimentos celulares distintos: 1) aquellas que son solubles en el buffer de lisis y en el de rehidratación de 2DE utilizados durante su extracción y separación electroforética y 2) aquellas obtenidas tras llevar a cabo un protocolo con el que se extrajo una fracción proteica enriquecida en proteínas de membrana, las cuales también fueron separadas por 2DE (ver materiales y métodos, página 81).

Además de alcanzarse el primero de los objetivos planteados en esta tesis, estos ensayos permitieron optimizar el proceso de extracción y posterior separación de las proteínas expresadas por *A. baumannii* antes de comenzar con los análisis de proteómica diferencial cuantitativa planteados por los siguientes objetivos.

6.1.1. Patrón proteico constituido por las proteínas solubles

El extracto de proteínas totales solubles en el buffer de lisis y de rehidratación de 2DE fue fraccionado por electroforesis bidimensional en geles de poliacrilamida al 12% de 16 cm x 20 cm de tamaño y en un rango de pH entre 4,0 y 7,0 (ver materiales y métodos, página 81). Usando geles de distintos experimentos individuales se pudieron superponer, de manera inequívoca, 145 bandas o *spots* proteicos. Estos mismos *spots* fueron extraídos y sometidos a digestión enzimática y al análisis por espectrometría de masas, seguido de la búsqueda en bases de datos para su identificación. En la figura 19 (página siguiente), se muestra un gel de electroforesis bidimensional representativo en el que se señalan estos 145 *spots* proteicos analizados.

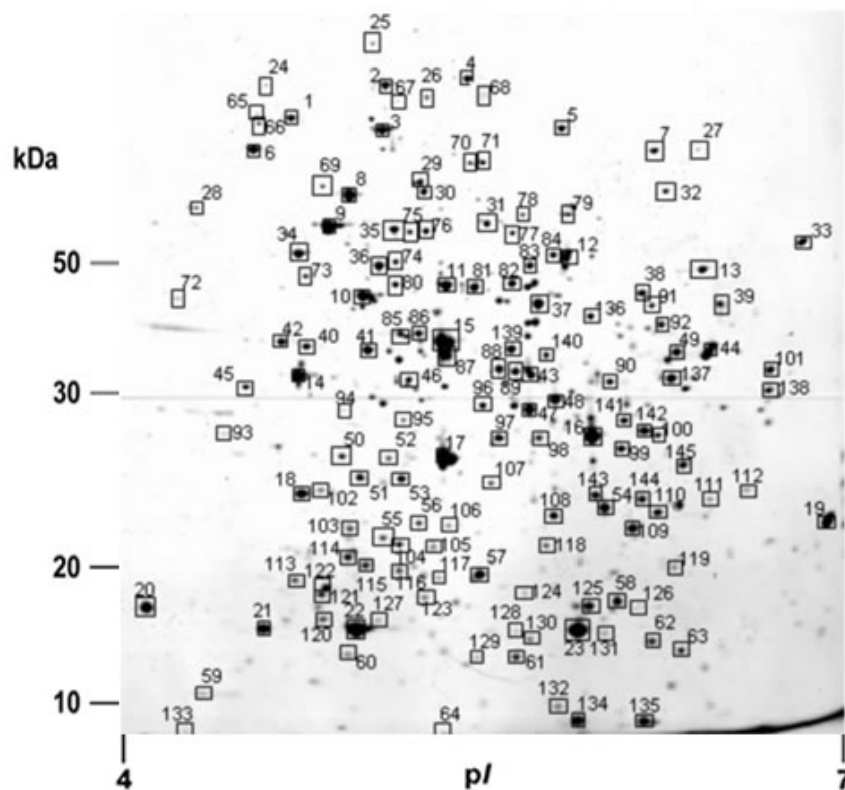


Figura 19. 70 μg de proteínas del extracto de proteínas totales o solubles fueron separadas por 2DE en gels de poliacrilamida al 12% de 16 cm x 20 cm de tamaño y en un rango de pH de 4,0 a 7,0. Las 145 bandas o *spots* señalados fueron superpuestos en gels de experimentos independientes y extraídos para ser sometidos a la digestión enzimática y al análisis por espectrometría de masas, seguido de la búsqueda en bases de datos para su identificación.

De los 145 *spots* analizados, 119 (el 82%) derivaron en identificaciones satisfactorias, de las que 114 se correspondieron con proteínas únicas. En la tabla 4 (página siguiente), aparecen estas proteínas distribuidas en función de los procesos biológicos en los que participan, junto con los pesos moleculares y puntos isoeléctricos teóricos asignados a cada una de ellas, la localización celular prevista, así como con el porcentaje de cobertura, número de péptidos que se detectó por proteína identificada y el valor de *score* asignado a cada identificación tras emplear el algoritmo Mowse que incorpora el motor de búsqueda MASCOT de matrixscience.com.

Tabla 4. Distribución en función de los procesos biológicos en los que participan las proteínas presentes en los extractos de proteínas totales identificadas a partir de los *spots* detectados en experimentos independientes de 2DE. La numeración de la primera columna (#) coincide con la señalada en el gel de la figura 19 (página anterior); la presencia de un asterisco (*) a la derecha de este número indica que su identificación se obtuvo por análisis de MALDI TOF MS y la presencia de una letra indica que se identificó más de una proteína en ese *spot*. El PM y pI se corresponden con los pesos moleculares y puntos isoeléctricos teóricos, respectivamente. En la columna dedicada al compartimento celular en el que se localizan las proteínas (Compart. celular), los códigos se refieren a: C = Citosol, MC = Membrana citoplasmática, ME = Membrana extracelular y P = Periplasma. En la columna dedicada al porcentaje de cobertura alcanzado (%Cob.), el valor entre paréntesis (#pep), indica el número de péptidos detectados experimentalmente que se corresponden con las secuencias y la relación m/z teórica de los péptidos descritos para esa proteína en la base de datos. La última columna (S_c), se refiere al *score* estadístico asignado a cada identificación por el algoritmo incorporado en el motor de búsqueda utilizado.

#	PM	pI	Descripción	Compart. celular	NCBI nr (gi)	%Cob. (#pep)	S_c
Formación del pilus o fimbria							
52*	36839	6.82	<i>CsuE hypothetical secreted protein</i>	-	37933551	30 (5)	83
59*	18807	5.25	<i>CsuA/B uncharacterized secreted protein</i>	-	37933546	33 (6)	87
Transporte, porinas, proteínas OMP, comunicación, regulación							
36*	49921	5.20	<i>hypothetical protein AIS_1295; type VI secretion system protein ImpC</i>	-	126641341	39 (11)	143
46b*	36939	5.42	<i>outer membrane protein A</i>	ME	129307154	31 (9)	79
103*	27176	4.98	<i>response regulator (activator) in two-component regulatory system with RstB (OmpR family)</i>	C	50083946	47 (9)	112
111*	22550	7.93	<i>two-component response regulator (OmpR family)</i>	C	126643237	34 (8)	94
Expresión génica, biosíntesis de proteínas, plegamiento y división celular							
3*	73796	4.90	<i>protein chain elongation factor EF-G GTP-binding</i>	C	126640918	55 (31)	247
6*	64453	4.74	<i>molecular chaperone DnaK</i>	C	126642981	44 (22)	301
8*	52659	5.57	<i>30S ribosomal protein S1</i>	C	126641617	29 (12)	109
9*	50038	4.71	<i>chaperone Hsp60</i>	C	126642698	65 (24)	323
15*	33152	4.78	<i>protein chain elongation factor EF-Tu</i>	C	126640368	36 (10)	112
17a*	30805	5.27	<i>protein chain elongation factor EF-Ts</i>	C	126642362	32 (9)	88
26*	92706	5.17	<i>ATP-dependent protease, Hsp 100</i>	C	126641234	30 (21)	189
28*	46410	4.46	<i>transcription termination/ antitermination L factor</i>	-	126640415	24 (10)	126
29	60509	5.11	<i>prohyl-tRNA synthetase</i>	C	126388727	31 (29)	426
34	39843	4.61	<i>trigger factor septum formation molecular chaperone</i>	-	126386432	26 (7)	269
40	38545	4.96	<i>cell division proteintubulin-like GTP-binding protein and GTPase</i>	C, MC	126389222	54 (29)	456
46a*	34695	5.01	<i>RNA polymerase alpha subunit</i>	C	126643071	58 (15)	170
58	11581	9.52	<i>50S ribosomal protein L23</i>	C	126388977	20 (2)	117
61*	18536	5.40	<i>peptidyl-prolyl cis-trans isomerase precursor</i>	C	50085061	57 (10)	102
66	84990	4.78	<i>phenylalanyl-tRNA synthetase, beta subunit</i>	C	126386555	36 (46)	585
69	72049	4.89	<i>chaperone Hsp90, heat shock protein C 62.5</i>	C	49529563	20 (22)	336
71a	74956	5.20	<i>methionyl-tRNA synthetase</i>	C	126386720	39 (40)	355
73	48108	4.93	<i>aspartyl/ glutamyl-tRNA(Asn/ Gln) amidotransferase subunit B</i>	C	126388698	15 (5)	78
84	42982	4.98	<i>aspartyl/ glutamyl-tRNA(Asn/ Gln) amidotransferase subunit A</i>	C	126388697	17 (6)	222
86*	33152	4.78	<i>protein chain elongation factor EFTu</i>	C	126640368	29 (7)	85
87b*	43213	5.20	<i>protein chain elongation factor EF-Tu, possible GTP-binding factor (duplicate of tufA)</i>	C	50083572	32 (8)	87

#	PM	pI	Descripción	Compart. celular	NCBI nr (gi)	%C ob. (#pep)	Sc
114*	19327	4.78	<i>elongation factor P</i>	C	126642455	30 (6)	83
123	17204	5.01	<i>DnaK suppressor protein</i>	-	126386225	64 (12)	234
130	17333	5.77	<i>ATP-dependent Clp protease proteolytic subunit (Endopeptidase Clp)</i>	C	126386433	45 (12)	237
Otros procesos metabólicos							
Descomposición del H₂O₂							
22	18316	4.96	<i>Alkyl hydroperoxide reductase, C22 subunit</i>	C	126387137	18 (3)	107
71b	74480	5.12	<i>Catalase</i>	C	126386369	15 (15)	126
Antioxidante							
23	24207	5.88	<i>superoxide dismutase</i>	P	126388267	17 (11)	136
128	24207	5.88	<i>superoxide dismutase [Fe]</i>	P	126388267	4 (2)	53
Síntesis de ATP							
10*	44460	5.21	<i>membrane-bound ATP synthase F1 sector, beta-subunit</i>	C, MC	126640256	69 (24)	311
11*	55534	5.29	<i>ATP synthase subunit A</i>	C	162286757	36 (17)	217
81a*	55534	5.29	<i>F0F1 ATP synthase subunit alpha</i>	C	162286757	21 (11)	108
Metabolismo de cofactores y vitaminas							
12a*	25504	5.97	<i>hypothetical protein A1S_2187</i>	-	126642232	40 (7)	83
54	24510	5.39	<i>hypothetical protein A1S_2674</i>	-	126388592	13 (3)	116
94	37580	5.04	<i>delta-aminolevulinic acid dehydratase</i>	-	126386840	37 (17)	279
Cadena transportadora de electrones							
18	20716	4.70	<i>electron transfer flavoprotein alpha-subunit</i>	-	126388546	33 (7)	114
19*	23108	5.20	<i>electron transfer flavoprotein beta-subunit</i>	-	126642663	43 (7)	123
91*	44089	6.23	<i>NADH dehydrogenase I chain F</i>	C, MC	126640814	34 (10)	125
Síntesis de la pared celular							
85	44845	4.93	<i>UDP-N-acetylglucosamine 1-carboxyvinyltransferase (Enolpyruvatetransferase) (UDP-N acetylglucosamine enolpyruvyl transferase)(EPT)</i>	-	49529866	8 (3)	101
96	31246	5.17	<i>putative UDP-glucose 4-epimerase</i>	-	126386062	28 (7)	218
100	29146	5.11	<i>UTP-glucose-1-phosphate uridylyltransferase</i>	-	126386059	10 (3)	115
Ruta de las pentosas fosfato							
62	22103	5.81	<i>bifunctional protein [Includes: 4-hydroxy-2-oxoglutarate aldolase (2-keto-4-hydroxyglutarate aldolase) (KHG-aldolase)]</i>	C	49529757	15 (2)	44
93	36537	4.77	<i>transaldolase</i>	-	126387994	29 (9)	264
99*	34566	5.67	<i>ribose-phosphate pyrophosphokinase</i>	C	126640885	38 (9)	112
117	16382	4.94	<i>ribose-5-phosphate isomerase</i>	-	126387844	21 (4)	55
Metabolismo del Nitrógeno							
25	113472	5.00	<i>carbamoyl-phosphate synthase, large subunit</i>	C	126388602	43 (63)	1431
35	29023	5.11	<i>glutamine synthetase</i>	C	126388273	27 (8)	298
75	29023	5.11	<i>glutamine synthetase</i>	C	126388273	10 (3)	32
125	18356	5.10	<i>putative carbonic anhydrase</i>	C	126386918	34 (7)	157
Glicolisis/Gluconeogénesis							
30	62480	5.27	<i>phosphoenolpyruvate carboxykinase</i>	C	126388586	50 (35)	345
41	43112	5.12	<i>Enolase</i>	C	126387827	13 (5)	108
45	35540	4.47	<i>phosphoglycerate kinase</i>	C	126387472	6 (2)	107
48	34182	5.46	<i>fructose-1,6-bisphosphate aldolase, class II</i>	-	126387473	26 (26)	310
76*	52200	5.20	<i>phosphoglycerate mutase III, cofactor independent</i>	C	126640323	19 (8)	110
Metabolismo de ácidos grasos							
7	78334	5.82	<i>fatty oxidation complex alpha subunit</i>	-	49529577	4 (2)	67

#	PM	pI	Descripción	Compart. celular	NCBI nr (gi)	%C ob. (#pep)	Sc
12b*	51884	5.43	<i>putative acetyl-CoA hydrolase/transferase</i>	-	126643239	21 (8)	76
78*	61503	5.41	<i>acyl-CoA dehydrogenase</i>	C	126642910	23 (11)	139
105	22491	4.93	<i>putative oxoacyl-(acyl carrier protein) reductase</i>	C	126386031	22 (4)	186
109*	28797	5.61	<i>NADH-dependent enoyl-ACP reductase</i>	MC	126640605	36 (9)	138
Metabolismo del piruvato							
1	64889	5.34	<i>dihydrolipoamide S-acetyltransferase E2 component of the pyruvate dehydrogenase complex</i>	C	126389218	18 (18)	130
5	73653	5.40	<i>hypothetical protein (MaeB)</i>	-	126388262	9 (5)	155
13	42487	5.64	<i>dihydrolipoamide dehydrogenase</i>	C	126388632	30 (26)	363
17b*	35358	5.20	<i>malate dehydrogenase</i>	-	152032571	47 (14)	171
20	42487	5.64	<i>dihydrolipoamide dehydrogenase</i>	C	126388632	8 (4)	31
51b	32458	5.00	<i>malate dehydrogenase</i>	-	126388924	29 (7)	53
68*	99184	5.58	<i>pyruvate decarboxylase E1 component of the pyruvate dehydrogenase complex</i>	-	126643335	29 (22)	197
Metabolismo de nucleótidos							
33*	46303	6.22	<i>IMP dehydrogenase</i>	-	126643328	33 (12)	122
50	27475	4.84	<i>thioredoxin reductase</i>	C	126386809	27 (8)	58
67a	71225	4.97	<i>polyribonucleotide nucleotidyltransferase</i>	C	126640439	35 (35)	547
79	57576	5.40	<i>CTP synthase</i>	-	126387829	13 (7)	246
88	37702	5.46	<i>carbamoyl-phosphate synthase small chain</i>	-	126388601	19 (8)	88
101b	30426	6.39	<i>aspartate carbamoyltransferase catalytic subunit</i>	C	126387122	11 (2)	66
104	20631	4.83	<i>adenylate kinase</i>	C	126386957	60 (10)	173
115*	20586	4.79	<i>phosphoribosylaminoimidazole-succinocarboxamide synthase</i>	-	126643432	43 (10)	108
Ciclo del TCA							
2*	95400	4.90	<i>aconitate hydratase 2</i>	-	126642171	67 (12)	105
4	100644	5.01	<i>aconitate hydratase</i>	C	50086100	4 (4)	174
14	36928	4.90	<i>succinyl-CoA synthetase subunit beta chain</i>	-	126388633	25 (6)	304
16	25048	5.07	<i>succinyl-CoA synthetase alpha chain</i>	-	126388634	31 (5)	227
32*	64505	6.07	<i>succinate dehydrogenase flavoprotein subunit</i>	MC	126642744	47 (20)	221
38	45221	5.76	<i>fumarase C</i>	C	126387915	18 (9)	151
67b	95400	4.99	<i>aconitate hydratase</i>	-	50085482	36 (36)	275
77	51438	5.29	<i>NAD-linked malate dehydrogenase</i>	-	126386125	39 (19)	429
82*	51495	5.53	<i>fumarate hydratase</i>	-	126640553	42 (15)	137
87a*	41025	5.41	<i>isocitrate dehydrogenase</i>	C	126642511	32 (10)	109
98	30804	5.78	<i>succinyl-CoA synthetase alpha chain</i>	-	49531888	18 (5)	102
Metabolismo de aminoácidos							
24	92941	4.88	<i>aminopeptidase N</i>	C, MC	126388021	26 (33)	337
37	40519	6.22	<i>serine hydroxymethyltransferase</i>	C	126388232	24 (6)	236
39*	46736	6.10	<i>L-2,4-diaminobutyrate:2-ketoglutarate 4-aminotransferase</i>	C	126642490	36 (14)	145
42*	40880	5.10	<i>aspartate aminotransferase A</i>	-	126642544	44 (12)	149
43a*	29637	5.40	<i>succinylornithine transaminase</i>	C	126643147	52 (9)	93
43b*	40671	5.32	<i>threonine synthase, pyridoxal-5'-phosphate-dependent enzyme</i>	-	50083540	39 (12)	90
44	33691	5.86	<i>D-3-phosphoglycerate dehydrogenase</i>	C	126389051	10 (3)	94
47*	28969	5.08	<i>acetohydroxy acid isomerase</i>	C	126640616	46 (7)	87
51a	26227	5.27	<i>putative intracellular protease/amidase</i>	C	126388679	33 (11)	81
53	25896	5.31	<i>dihydrodipicolinate synthase</i>	C	126389314	46 (15)	236

#	PM	pI	Descripción	Compart. celular	NCBI nr (gi)	%C ob. (#pep)	Sc
56*	29761	5.17	<i>putative tetrahydropyridine-2-carboxylate N-succinyltransferase</i>	C	126642574	69 (14)	178
81b*	42075	5.08	<i>NAD-dependent aldehyde dehydrogenases</i>	C	126642488	30 (9)	96
83	45831	5.54	<i>succinylglutamic semialdehyde dehydrogenase</i>	MC	126389029	11 (5)	231
89*	31973	6.40	<i>methionine adenosyltransferase</i>	C	126641564	58 (12)	155
92	39786	5.81	<i>gamma-glutamyl phosphate reductase</i>	C	126386444	17 (7)	224
95	35542	5.14	<i>3-phosphoserine aminotransferase</i>	C	126388536	13 (5)	170
97	35454	5.36	<i>subunit of cysteine synthase A and O-acetylserine sulphydrolase A, PLP-dependent enzyme</i>	-	49530795	10 (3)	136
101a	30590	6.31	<i>branched-chain amino acid transferase</i>	-	126388812	16 (4)	125
107	28151	5.01	<i>acetylglutamate kinase</i>	-	126386822	43 (12)	206
108	23384	5.48	<i>dihydrodipicolinate reductase</i>	C	126389333	57 (13)	300
113*	25759	4.54	<i>tryptophan synthase alpha chain</i>	-	126642894	50 (10)	127
121*	26181	4.96	<i>1-(5-phosphoribosyl)-5-[(5-phosphoribosylamino)methylideneamino]imidazole-4-carboxamide isomerase</i>	C	126643246	52 (10)	145
Otros							
21	19331	4.68	<i>inorganic pyrophosphatase</i>	C	49529493	21 (3)	101
27*	70250	6.33	<i>Phenylacetic acid degradation protein paaN</i>	C	126641381	30 (11)	102
31*	56080	5.34	<i>isocitrate lyase</i>	C	126641058	38 (18)	167
49*	32277	5.91	<i>WecE protein</i>	C	126640168	28 (6)	95
118	24871	4.97	<i>ferredoxin--NADP+ reductase</i>	-	126388218	45 (11)	309
Sin anotación							
55	19230	5.25	<i>putative dienelactone hydrolase</i>	-	126389321	24 (6)	46
57	9260	4.53	<i>hypothetical protein A1S_0323</i>	-	126386289	24 (3)	144

Aunque de manera rutinaria todos los *spots* proteicos fueron sometidos al análisis de MALDI TOF MS e identificación a partir de PMF, aquellos para los que no se obtuvo una identificación satisfactoria por esta técnica, así como aquellos otros cuya identificación por PMF se quiso verificar, fueron sometidos al análisis de LC-MS/MS. Así, la mayoría de las identificaciones presentadas en la tabla 4 se obtuvieron por esta técnica, quedando 45 de los 119 *spots* identificados a partir de PMF tras análisis por MALDI TOF MS. En el apartado B.1 del anexo B (página 250) se muestran los espectros de MALDI TOF o huellas peptídicas a partir de las cuales se identificaron estas proteínas, señalándose los péptidos trípticos cuyas relaciones m/z se correspondieron con las de los péptidos de los espectros teóricos presentes en la base de datos. Por otra parte, 68 fueron las proteínas identificadas a partir de los espectros de fragmentación peptídica obtenidos por LC-MS/MS. En estos casos, las identificaciones se obtuvieron tras secuenciación de 2 o más péptidos por proteína.

Hay que señalar que, en algunos casos (10 de las 119 identificaciones, en concreto las correspondientes con los *spots* #12, #17, #43, #46, #51, #67, #71, #81, #87 y #101), se

detectaron dos proteínas por *spot*, al mismo tiempo que, en otros casos (5 de las 119 identificaciones obtenidas), la misma proteína pudo ser identificada en más de un *spot* proteico. En concreto, este último fenómeno se observó en las proteínas identificadas en las parejas de *spots* #23 y #128; #35 y #75; #86 y #15; #11 y #81a y, por último, #13 y #20.

En una representación de los valores de pI teóricos frente a los de PM teóricos de las proteínas identificadas, se puede observar cuál es el rango de valores entre los que se encuentran estas proteínas. La figura 20 muestra este hecho.

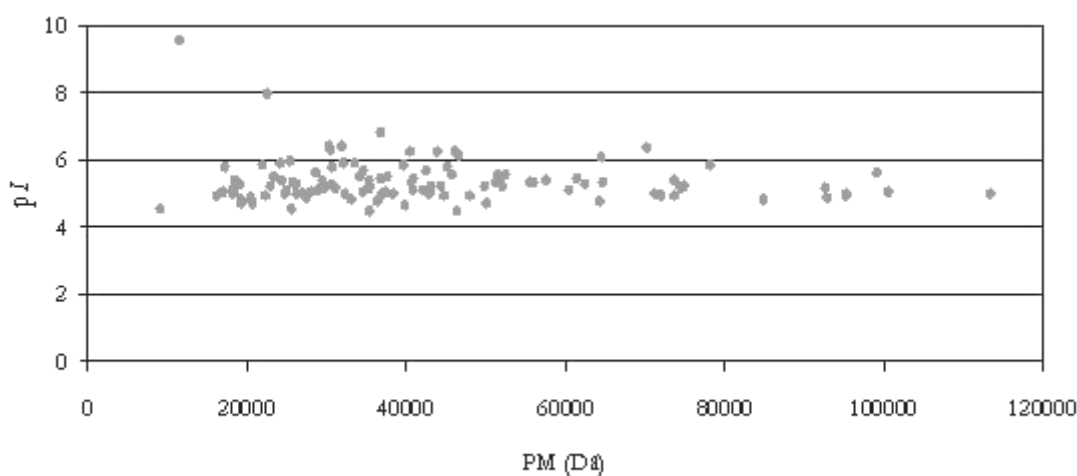


Figura 20. Distribución de los valores de pI teórico frente a los de PM teórico de las proteínas identificadas presentes en la tabla 4 (página 99).

La distribución de pesos moleculares teóricos presentados por las proteínas identificadas muestra como la mayoría de las mismas se concentra entre los 10 y 80 kDa. La proteína identificada con menor peso molecular teórico (9.260 Da) correspondió a la presente en el *spot* #57, ambigüamente descrita como *hypothetical protein A1S_0323*. La discordancia observada entre este valor de PM y la posición de este *spot* en el gel (figura 19, página 98) puede explicarse atendiendo a que, aunque esta anotación era la presente cuando se realizó este análisis, fue poco después actualizada y sustituida en la base de datos por la entrada gi|193076172, también descrita como *hypothetical protein A 1S_0323* y que, con una adición de 27 aminoácidos a la secuencia polipeptídica descrita previamente, aumenta su peso molecular teórico hasta los 12.059 Da y su pI a 4,93, valores que se ajustan con más precisión al resultado experimental observado. Así, la siguiente proteína con menor peso

molecular teórico se corresponde con la identificada en el *spot* #58 descrita como *50S ribosomal protein L23* con 11.581 Da de PM y que, ahora sí, representa la proteína de menor PM identificada en este experimento. En el otro extremo, la de mayor peso molecular teórico (113.472 Da) fue la presente en el *spot* #25, descrita como *carbamoyl-phosphate synthase, large subunit*, siendo también la que con mayor valor de *score* se identificó por LC-MS/MS.

Por otra parte, la proteína con menor punto isoelectrico teórico (4,46) observada entre las 114 proteínas únicas identificadas, correspondió a la proteína presente en el *spot* #28 y descrita como *transcription termination/antitermination L factor*, mientras que las de mayor punto isoelectrico teórico presentaron valores de *pI* por encima del rango de pH analizado. Así, las proteínas presentes en los *spots* #111 y #58, descritas como *two-component response regulator* y *50S ribosomal protein L23*, presentaron valores de *pI* teóricos iguales a 7,93 y 9,52 respectivamente. Como cabía esperar, en la distribución de valores de *pI* teóricos presentados por las proteínas identificadas, se puede observar como la mayoría de las mismas se encuentra entre valores de *pI* de 4,5 y 7,0, con más del 45% de las proteínas presentando un valor de *pI* entre 5,0 y 5,5 (figura 20, página anterior).

La predicción de la localización celular de las proteínas identificadas se realizó con la herramienta PSORTb (disponible en <http://www.psort.org/>) y se puede observar en la figura 21 (página siguiente). Según esta predicción, a un alto porcentaje de las proteínas detectadas en este experimento (el 35%, 43 de las 119 proteínas identificadas), no se le asigna, a partir de sus secuencias aminoacídicas, una anotación prevista referente a la localización o componente celular al que pertenecen. A una de la proteínas identificadas, presente en el *spot* #23 y #128 y descrita como *superoxide dismutase*, se le asignó una localización periplasmática y la proteína presente en el *spot* #46b, descrita como *outer membrane protein A*, tiene asignada su localización en la membrana externa. Siete de las proteínas identificadas (el 6%) se localizan en la membrana citoplasmática, en concreto las detectadas en los *spots* #40, *cell division proteintubulin-like GTP-binding protein and GTPase*; #10, *membrane-bound ATP synthase F1 sector, beta-subunit*; #24, *aminopeptidase N*; #32, *succinate dehydrogenase flavoprotein subunit*; #83, *succinylglutamic semialdehyde dehydrogenase*; #91, *NADH dehydrogenase I chain F* y #109, *NADH-dependent enoyl-ACP reductase*. Junto a cuatro de estas últimas proteínas, a las que se les asigna más de una localización probable - en concreto las

presentes en los *spots* #40, #10, #32 y #91, simultaneando una localización citoplasmática junto a la de membrana - 70 de las 119 proteínas identificadas (el 57%), son las que se presentan localizadas en el citoplasmática celular.

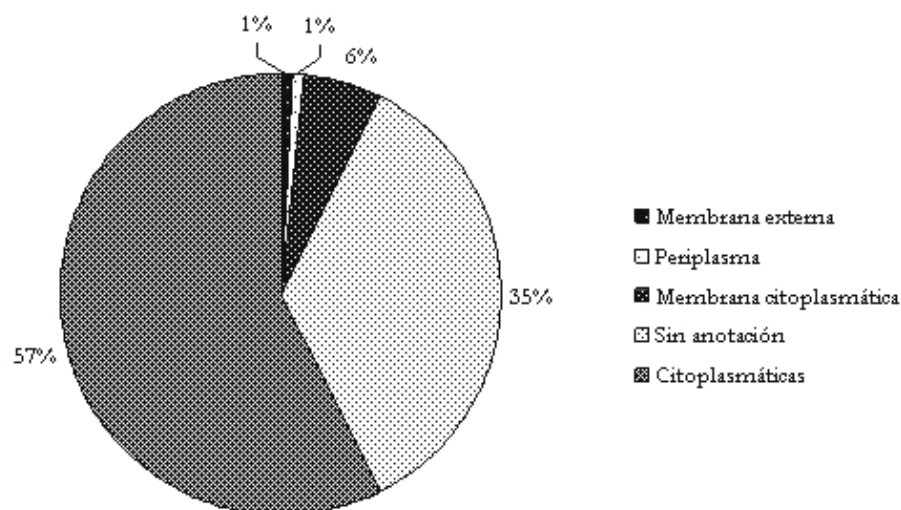


Figura 21. Distribución de las localizaciones celulares que presentan las proteínas identificadas mostradas en la tabla 4 (página 99).

En cuanto a los procesos biológicos con los que se relaciona a las proteínas identificadas, a 88 de las 119 proteínas se las asocia con distintos procesos metabólicos, entendidos estrictamente como el conjunto de reacciones químicas y rutas metabólicas - tanto del anabolismo como del catabolismo - por las que las células llevan a cabo la transformación de sustancias químicas, incluyendo tanto la transformación de pequeñas moléculas, como otros procesos macromoleculares tales como la degradación o la cadena de transporte electrónico. A 23 de las 119 proteínas se las relaciona con la expresión génica, la biosíntesis de proteínas y la división celular; 4 en el transporte, actuando en sistemas de secreción (*spot* #36, *hypothetical protein A1S_1295*; *type VI secretion system protein ImpC*) o constituyendo poros, canales iónicos o porinas (*spot* #46b, *outer membrane protein A*), o en la comunicación celular, al actuar en el procesamiento de la información procedente del medioambiente como transductores de señales (*spot* #103, *response regulator (activator) in two-component regulatory system with RstB (OmpR family)*) y *spot* #111, *two-component response regulator (OmpR family)*); dos proteínas identificadas se relacionan con la formación del pilus o fimbria (*spot* #52, *CsuE*

hypothetical secreted protein y *spot #59, CsuA/B uncharacterized secreted protein*) y, por último, tan solo dos proteínas no pudieron ser asignadas a un proceso biológico concreto (*spot #55, putative dienelactone hydrolase* y *spot #57, hypothetical protein A1S_0323*). En porcentajes, esta distribución de las funciones presentadas por las proteínas identificadas es la que muestra la figura 22.

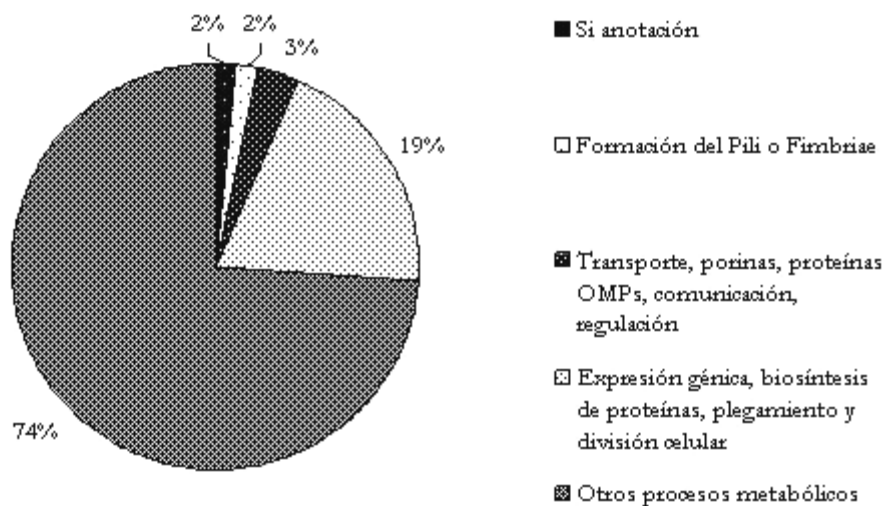


Figura 22. Distribución de los procesos biológicos con los que se relaciona a las proteínas identificadas presentes en la tabla 4 (página 99).

6.1.2. Patrón proteico constituido por las proteínas de membrana

Al igual que en el caso de las proteínas totales o solubles, también se separaron por 2-DE y se sometieron al análisis por MALDI TOF MS y LC-MS/MS a las proteínas presentes en una fracción enriquecida en proteínas de membrana. Estas proteínas fueron primero separadas por sus puntos isoeléctricos en tiras de IPG con un gradiente inmovilizado de pH de 3,0 a 10,0 para, seguidamente, separarlas por sus pesos moleculares mediante SDS-PAGE en geles al 12% de acrilamida de 16 cm x 20 cm de tamaño. Utilizando geles de experimentos individuales se pudieron superponer 62 *spots* proteicos que fueron extraídos para someterlos a la digestión enzimática e identificación por análisis de MALDI TOF MS o LC-MS/MS. La figura 23 (página siguiente) muestra un gel 2-DE representativo en el que se pueden observar las 62 bandas proteicas analizadas en esta fracción de proteínas.

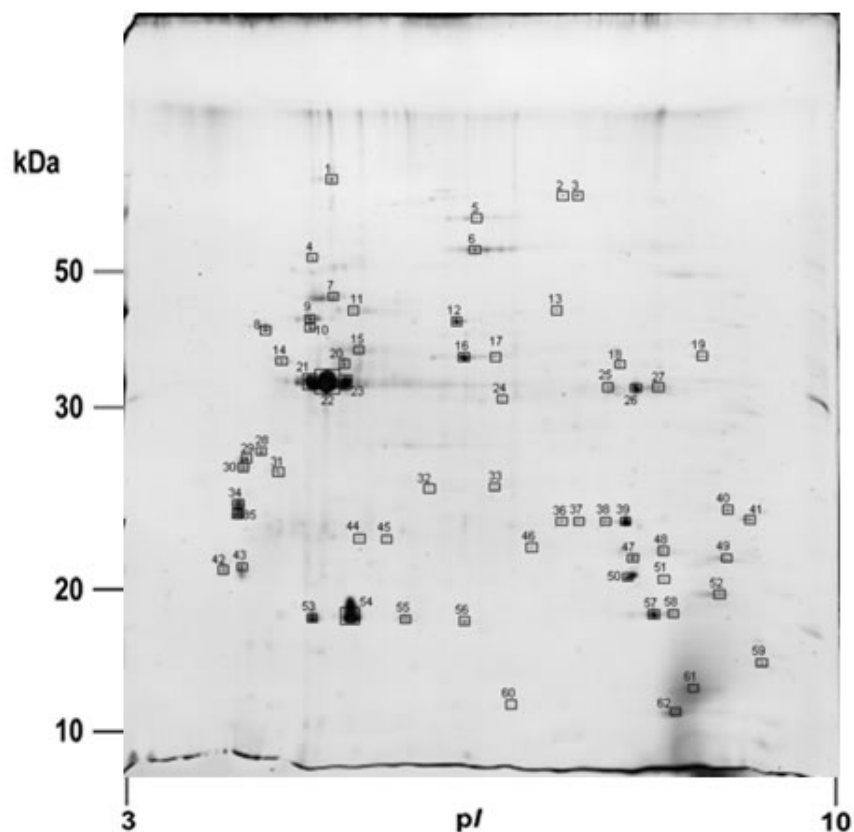


Figura 23. 150 μ g de proteínas de la fracción enriquecida en proteínas de membrana fueron separadas por 2-DE en un rango de pH de 3,0 a 10,0 y en geles desnaturalizantes de poliacrilamida al 12% de 16 cm x 20 cm de tamaño. Las 62 bandas o *spots* señalados fueron superpuestos en geles de experimentos independientes y extraídos para ser sometidos a digestión enzimática y análisis por espectrometría de masas, seguido de la búsqueda en bases de datos para su identificación.

De los 62 *spots* analizados, 26 (el 42%) derivaron en identificaciones satisfactorias, en 3 de los *spots* (#13, #20 y #62) se detectaron dos proteínas por *spot* y en los cuatro grupos de *spots* #11, #2, #23 y #50; #15 y #20b; #28, #29 y #30 y, por último, #34 y #35, se identificó una misma proteína en cada una de ellos (*outer M protein A*; *protein chain elongation factor EF-Tu*; *34 kDa Outer M Protein* y *putative outer M protein*, respectivamente). De esta manera, aunque la tabla 5 de resultados (página siguiente), muestra las 29 identificaciones obtenidas, 22 de las mismas se corresponderían con proteínas únicas. En esta tabla aparecen las identificaciones proteicas distribuidas en función de los procesos biológicos en los que participan, junto con los pesos moleculares y puntos isoeléctricos teóricos asignados a cada una de ellas, la localización celular prevista, así como el porcentaje de cobertura, número de péptidos que se detectó por proteína identificada y el valor de *score*

asignado a cada identificación tras emplear el algoritmo Mowse que incorpora el motor de búsqueda MASCOT de matrixscience.com.

Tabla 5. Distribución en función de los procesos biológicos en los que participan las proteínas presentes en la fracción enriquecida en proteínas de membrana identificadas a partir de los *spots* detectados en experimentos independientes de 2DE. La numeración de la primera columna (#), coincide con la señalada en el gel de la figura 23 (página anterior); la presencia de un asterisco (*) a la derecha de este número indica que su identificación se obtuvo por análisis de MALDI TOF MS y la presencia de una letra indica que se detectó más de una proteína en ese *spot*. El PM y pI se corresponden con los pesos moleculares y puntos isoeléctricos teóricos, respectivamente. En la columna dedicada al compartimento celular en el que se localizan las proteínas (Compart. celular), los códigos se refieren a: C = Citosol, MC = Membrana citoplasmática y ME = Membrana externa. En la columna dedicada al porcentaje de cobertura alcanzado (%Cob.), el valor entre paréntesis (#pep), indica el número de péptidos detectados experimentalmente que se corresponden con las secuencias y la relación m/z teórica de los péptidos descritos para esa proteína en la base de datos. La última columna (S_c), indica el *score* estadístico asignado a cada identificación por el algoritmo incorporado en el motor de búsqueda utilizado.

#	PM	pI	Descripción	Compart. celular	NCBIInr (gi)	%Cob. (#pep)	S_c
Expresión génica, biosíntesis de proteínas, plegamiento y división celular							
14*	38545	4.96	<i>cell division protein FtsZ</i>	-	126643338	23 (6)	88
15	33152	4.78	<i>protein chain elongation factor EF-Tu</i>	C	126386252	23 (7)	450
18	37622	6.15	<i>heat shock protein Hsp40; molecular chaperone DnaJ</i>	C	126389334	14 (4)	153
20b	33152	4.78	<i>protein chain elongation factor EF-Tu</i>	C	126386252	15 (5)	215
Otros procesos metabólicos							
9	44460	5.21	<i>M-bound ATP synthase F1 sector, beta-subunit</i>	-	126386140	64 (20)	827
13b	51612	6.23	<i>Inosine-5'-monophosphate dehydrogenase</i>	-	38720	10 (5)	159
19	23108	5.20	<i>electron transfer flavoprotein beta-subunit</i>	-	126388547	25 (4)	128
26*	38096	7.02	<i>D-ala-D-ala-carboxypeptidase; penicillin-binding protein 5 (precursor)</i>	MC	126642471	17 (4)	78
27	38096	7.02	<i>D-ala-D-ala-carboxypeptidase; penicillinbinding protein 5 (precursor)</i>	MC	126388355	26 (9)	197
56	16998	6.74	<i>xanthine phosphoribosyltransferase</i>	-	126388934	16 (3)	140
Transporte, porinas, proteínas OMP, comunicación, regulación							
1	92497	5.17	<i>putative outer M protein</i>	ME	126387898	10 (7)	169
5	67700	6.08	<i>putative outer M copper receptor (OprC)</i>	ME	126386155	16 (7)	299
11*	36939	5.42	<i>outer M protein A</i>	ME	129307154	28 (9)	92
13a	44818	5.79	<i>putative protein (DcaP-like)</i>	ME	126388668	16 (5)	202
20a	43033	5.29	<i>putative glucose-sensitive porin (OprB-like)</i>	ME	126388757	54 (19)	780
21*	36939	5.42	<i>outer M protein A</i>	ME	129307154	31 (11)	118
22*	37342	5.13	<i>outer M protein A</i>	ME	126642864	45 (20)	172
23*	36939	5.42	<i>outer M protein A</i>	ME	129307154	29 (11)	125
28	32095	4.77	<i>34 kDa Outer M Protein</i>	ME	82654966	12 (3)	83
29	32095	4.77	<i>34 kDa Outer M Protein</i>	ME	82654966	20 (7)	354
30*	32095	4.77	<i>34 kDa Outer M Protein</i>	ME	82654966	32 (8)	99
34	24757	4.50	<i>putative outer M protein</i>	ME	72535025	32 (10)	412
35*	24757	4.50	<i>putative outer M protein</i>	-	72535025	31 (7)	89
36	24010	5.32	<i>putative transport protein</i>	ME	126387170	15 (3)	110
47	38397	5.32	<i>Outer M protein omp38</i>	ME	40287452	10 (3)	79
50*	36939	5.42	<i>outer M protein A</i>	ME	129307154	32 (10)	97

#	PM	pI	Descripción	Compart. celular	NCBIInr (gi)	%Cob. (#pep)	Sc
52	22529	9.30	<i>putative outer M protein</i>	ME	126386818	52 (16)	536
62b	9720	7.98	<i>outer M lipoprotein</i>	-	126386828	67 (4)	198
Sin anotación							
62a	15994	8.83	<i>putative hemolysin</i>	-	126387251	52 (7)	230

En este caso, 9 de las identificaciones fueron obtenidas por análisis de MALDI TOF MS e identificación a partir de PMF (en concreto las detectadas en los *spots* #11; #14; #21; #22; #23; #26; #30; #35 y #50) y estos espectros debidamente anotados se encuentran en el apartado B.2 del anexo B (página 295). El resto de las proteínas fueron identificadas por búsqueda en la base de datos a partir de 3 o más péptidos tras la obtención de sus secuencias aminoacídicas por análisis de LC-MS/MS.

La figura 24 muestra la distribución de las proteínas identificadas al representar los valores de pI teóricos frente a los de PM teóricos. La proteína identificada con el menor PM teórico (9.720 Da), fue la detectada en el *spot* #62b, *outer M lipoproteína* y con el mayor PM teórico (92.497 Da), fue la detectada en el *spot* #1, *putative outer M protein*. Por otra parte, con el menor valor de pI teórico (4,50), se detectó a la proteína presente en el *spot* #34 y #35*, *putative outer M protein*, mientras que a la detectada en el *spot* #52, también descrita como *putative outer M protein*, se le asigna el mayor valor de pI observado en este análisis (9,23).

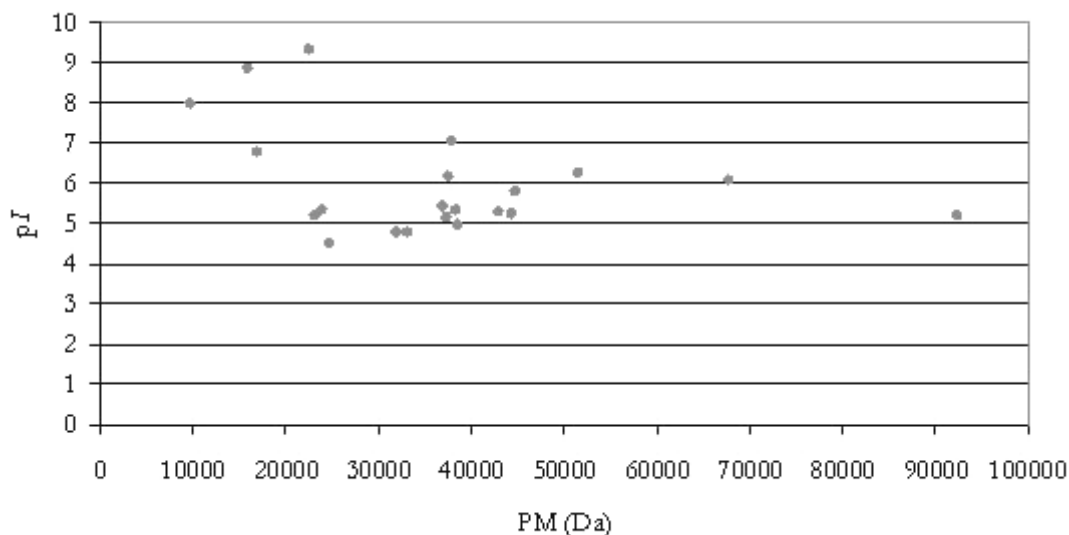


Figura 24. Distribución de los valores de pI teórico frente a los de PM teórico de las proteínas identificadas presentes en la tabla 5 (página anterior).

En cuanto a la localización celular prevista para las proteínas de la fracción enriquecida en proteínas de membrana presentes en la tabla 5 (página 108) y como se muestra en la figura 25, el 55% aparece localizado en la membrana externa; 2 de los *spots* (#26* y #27), presentan a la proteína *D-ala-D-ala-carboxypeptidase; penicillin-binding protein 5 (precursor)*, localizada en la membrana citoplasmática; 3 de los *spots* presentaron proteínas localizadas en el citoplasma celular, en concreto en los *spots* #15 y #20b se detectó a la proteína *protein chain elongation factor EF-Tu* y en el *spot* #18 a la *heat shock protein Hsp40; molecular chaperone DnaJ* y, por último, a 8 de las proteínas identificadas (el 28%) no les fue asignada ninguna localización celular concreta.

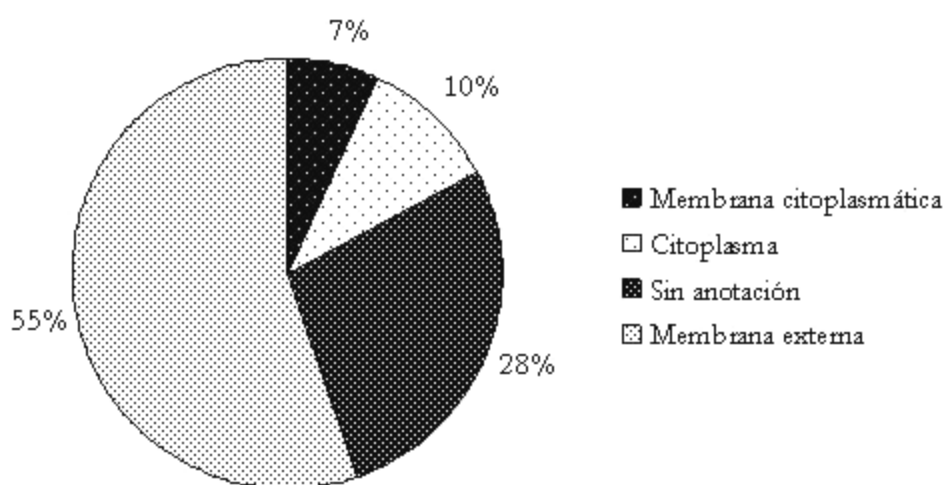


Figura 25. Distribución de las localizaciones celulares que presentan las proteínas identificadas mostradas en la tabla 5 (página 108).

Cuatro fueron las proteínas relacionadas con la expresión génica (*spot* #15 y #20b, descritas como *protein chain elongation factor EF-Tu* en ambos casos), la biosíntesis de proteínas (*spot* #18, *heat shock protein Hsp40; molecular chaperone DnaJ*) y la división celular (*spot* #14, *cell division protein FtsZ*); seis están relacionadas con otros procesos metabólicos, en concreto las detectadas en los *spots* #9, *M-bound ATP synthase F1 sector, beta-subunit*; #13b, *Inosine-5'-monophosphate dehydrogenase*; #19, *electron transfer flavoprotein beta-subunit*; #26 y #27, *D-ala-D-ala-carboxypeptidase; penicillin-binding protein 5 (precursor)* y, por último, #56, *xanthine phosphoribosyltransferase*, constituyen este grupo de proteínas. La mayor parte de las proteínas detectadas (18 de las 29), se relacionaron con el transporte a través de membrana, actuando como porinas, integradas a la membrana externa dentro del conjunto de proteínas con

dominios OMP (de *outer-membrane protein*) y participando en la comunicación y regulación de procesos biológicos. Tan sólo la proteína detectada en el *spot #62a, putative hemolisin* quedó sin una asignación funcional concreta. La distribución en porcentajes de estos procesos biológicos con los que se relaciona a las proteínas identificadas, se muestra en la figura 26.

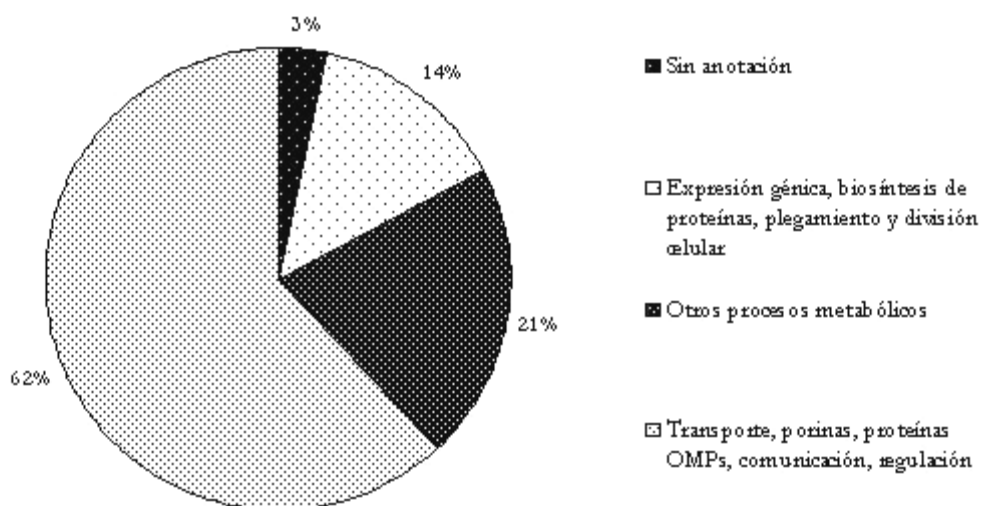


Figura 26. Distribución de los procesos biológicos con los que se relaciona a las proteínas identificadas presentes en la tabla 5 (página 108).

6.2. Proteómica de expresión diferencial cuantitativa entre *A. baumannii* sensible y resistente a colistina

Con el fin de realizar un análisis proteómico diferencial estrictamente relacionado a la resistencia al antibiótico colistina, se indujo en la cepa de referencia ATCC 19606 de *A. baumannii* sensible a colistina un incremento de hasta 18 veces en su resistencia al antibiótico mediante crecimiento bajo la presión ejercida por el mismo (ver Materiales y Métodos, página 81). Las tecnologías DIGE e iTRAQ fueron empleadas para investigar las diferencias en la expresión proteica entre las cepas sensibles y resistentes a colistina.

6.2.1. Análisis por gel de electroforesis diferencial (DIGE)

En los experimentos DIGE fue analizado tanto el extracto de proteínas totales o solubles (figura 27a, página siguiente), como la fracción enriquecida en proteínas de membrana (figura 27b, página siguiente). Las muestras participantes en estos análisis fueron marcadas y combinadas según el diseño experimental mostrado en la tabla 3 de la página 86.

En el primero de los casos (proteínas del extracto total o soluble), 42 proteínas de interés - es decir, aquellas que presentaron una variación en los valores del ratio medio de expresión por encima de 2 ó por debajo de -2 confirmadas en 6 de los 12 geles ($p < 0.05$) - pudieron ser detectados, de los que 24 fueron satisfactoriamente identificadas por análisis de MALDI-TOF MS PMF ó LC-MS/MS y usando el motor de búsqueda MASCOT. De la misma manera, en la fracción de proteínas de membrana, 22 proteínas diferencialmente expresadas fueron detectadas, de las que 11 fueron identificadas por las mismas técnicas de MS.

En 2 de los *spots* se detectaron dos proteínas en cada uno de ellos (en concreto en los *spots* #285 y #1272) y en la pareja de *spots* #285b y #286 se identificó la misma proteína (*Isocitrate dehydrogenase*). En total, 34 proteínas únicas se asocian a la generación del fenotipo de *A. baumannii* resistente a colistina en este estudio (tabla 6, página 114).

Tabla 6. Distribución en función de los procesos biológicos en los que participan las proteínas diferencialmente expresadas en *A. baumannii* sensible y resistente a colistina. La numeración de la primera columna (#), coincide con la señalada en los geles mostrados en la figura 27 (página anterior); la presencia de una M o una T a la derecha de este número indica su procedencia del análisis de las proteínas de la fracción enriquecida en proteínas de membrana (figura 27b) o del extracto total (figura 27a), respectivamente; la presencia de una “a” o una “b” indica que se identificó más de una proteína en ese *spot* y la presencia de un asterisco (*) a la derecha de este número indica que su identificación se obtuvo por análisis de MALDI TOF MS. El PM y pI se corresponden con los pesos moleculares y puntos isoeléctricos teóricos, respectivamente. En la columna dedicada al compartimento celular en el que se localizan las proteínas (Compart. celular), los códigos se refieren a: C = Citosol, MC = Membrana citoplasmática y ME = Membrana externa. En la columna dedicada al porcentaje de cobertura alcanzado (%Cob.), el valor entre paréntesis (#) indica el número de péptidos detectados experimentalmente que se corresponden con las secuencias y la relación m/z teórica de los péptidos descritos para esa proteína en la base de datos. La columna Sc indica el *score* estadístico asignado a cada identificación por el algoritmo incorporado en el motor de búsqueda utilizado. La última columna (Ri') indica el ratio medio de expresión (resistente/sensible), observado para cada proteína.

#	PM	pI	Descripción	Compart. celular	NCBI nr (gi)	%Cob. (#)	Sc	Ri'
Respuesta a estrés por shock osmótico								
1436M	16557	4.8	Putative signal peptide (OsmY)	-	126386984	7 (1)	51	2.36
Formación del pilus o fimbria								
218M	92841	6.0	<i>CsuD</i> P pilus assembly protein, porin PapC	ME	126642259	5 (4)	153	3.06
1578M	18807	5.2	<i>CsuA/B</i> Uncharacterized secreted protein	-	126642263	7 (1)	70	3.04
Transporte, porinas, proteínas OMP								
1085M	37793	5.2	Outer membrane protein HMP	ME	21666310	7 (2)	78	2.88
885M	38397	5.3	Outer membrane protein A	ME	40287452	14 (5)	146	-3.18
1384M*	26290	4.7	Outer membrane protein A	ME	109675218	19 (5)	84	-2.86
1556M*	25581	4.5	Putative outer membrane protein (CarO)	ME	72535027	25 (5)	85	-2.35
Expresión génica, biosíntesis de proteínas y plegamiento								
1033M	27507	9.0	30S ribosomal protein S2	C	49531348	8 (3)	113	2.59
295T	79089	5.0	Protein chain elongation factor EF-G	C	49530070	21 (15)	161	3.17
1402T	43213	5.2	Protein chain elongation factor EF-Tu	C	49529548	5 (2)	64	-3.37
1521T	15472	10.9	50S Ribosomal protein L15	-	126388961	33 (4)	128	-3.33
1263T	27964	10.3	30S Ribosomal protein S3	C	49532185	21 (5)	194	3.13
1272Ta	22047	10.3	30S Ribosomal protein S3	C	126388974	32 (7)	295	4.78
620T	57193	4.9	Chaperone Hsp60 (GroEL)	C	126642698	21 (14)	281	-9.41
650T	57193	4.9	Co-Chaperone Hsp60 (GroEL)	C	126642699	11 (7)	77	-6.86
667T	69563	4.7	Chaperone Hsp70 (DnaK)	C	126642981	15 (11)	178	-3.13
765M	31301	5.9	Putative signal peptide (chaperone HsiJ)	-	126386961	16 (3)	52	-2.69
1028T	37200	5.0	Glycyl-tRNA synthetase alpha chain	C	126643133	18 (7)	188	5.72
1086M	23242	6.7	Leader peptidase	MC	126388440	20 (4)	112	3.45
Otros procesos metabólicos								
Resistencia a aminoglicósidos								
1538T*	16685	5.5	<i>aac(60)-Ic</i> gene product	-	847647	28 (4)	61	-4.83
Descomposición del H₂O₂								
1075T	30322	4.7	Putative iron-dependent peroxidase	-	126387550	13 (4)	105	-4.37
Metabolismo del nitrógeno								
1636T	10529	5.1	Nitrogen assimilation regulatory protein P-II 2	MC	126386195	40 (3)	125	-8.32

#	PM	pI	Descripción	Compart. celular	NCBIInr (gi)	%Cob. (#)	Sc	Ri'
Metabolismo de aminoácidos								
877T	40519	6.2	<i>Serine hydroxymethyltransferase</i>	C	126388232	12 (4)	140	-3.61
Glicólisis/Gluconeogénesis								
1272Tb	26508	4.7	<i>Triosephosphate Isomerase</i>	C	126386296	30 (6)	291	4.78
Metabolismo de ácidos grasos								
644T	49207	5.7	<i>3-Hydroxyacyl-CoA dehydrogenase</i>	-	126387273	34 (16)	605	3.16
Ciclo del TCA								
285Tb	82876	5.3	<i>Isocitrate dehydrogenase</i>	C	126642513	13 (10)	114	3.21
286T	82876	5.3	<i>Isocitrate dehydrogenase</i>	C	126642513	17 (17)	234	3.3
Metabolismo del piruvato								
284T	73653	5.4	<i>MaeB hypothetical protein</i>	-	126388262	14 (9)	326	3.16
285Ta	82788	5.3	<i>putative bifunctional protein (MaeB)</i>	-	49531362	10 (10)	268	3.21
Metabolismo de vitaminas y cofactores								
1355T	18059	6.0	<i>Putative ubiquinone biosynthesis protein</i>	-	126388063	55 (10)	293	-3.32
1275T	22793	4.8	<i>Thiamine biosynthesis protein</i>	-	126388190	20 (4)	190	7.47
1188T	29293	5.0	<i>Molybdopterin biosynthesis protein</i>	C	126388075	11 (2)	56	-3.4
Sin anotación								
1135T*	27170	5.6	<i>Hypothetical protein A1S_1372</i>	-	126641418	36 (5)	95	-4.94
1468T	18057	6.1	<i>Hypothetical protein A1S_3155</i>	-	126389054	37 (7)	238	-5.91
1385M	19383	4.9	<i>Conserved hypothetical Protein</i>	-	49531733	5 (1)	62	-2.95

Entre estas proteínas, 4 de las mismas (#1384M*, #1556M*, #1538T* y #1135T*) fueron identificadas a partir de su huella peptídica obtenida por MALDI TOF MS, y sus espectros anotados se muestran en el apartado B.3 del anexo B (página 304). Por otra parte, las detectadas en los *spots* #1436M, #1578M y #1385M fueron identificadas por LC-MS/MS a partir de un sólo péptido, para los que también se muestra, en el apartado B.4 del mismo anexo B (página 308), el espectro de fragmentación (espectro MS/MS) a partir del cual fue secuenciado ese péptido e identificada cada una de estas proteínas.

Tal como se muestra en la figura 28 (página siguiente), el 40% de las proteínas identificadas y cuantificadas en este análisis (14 de las 35 proteínas) se encuentran localizadas en el citoplasma; 5 proteínas (el 14%) están ubicadas en la membrana externa; 2 (el 6%) en la membrana citoplasmática y, finalmente, 14 (el 40%) no tienen prevista una asignación concreta referente a la localización celular en el que se encuentran localizadas.

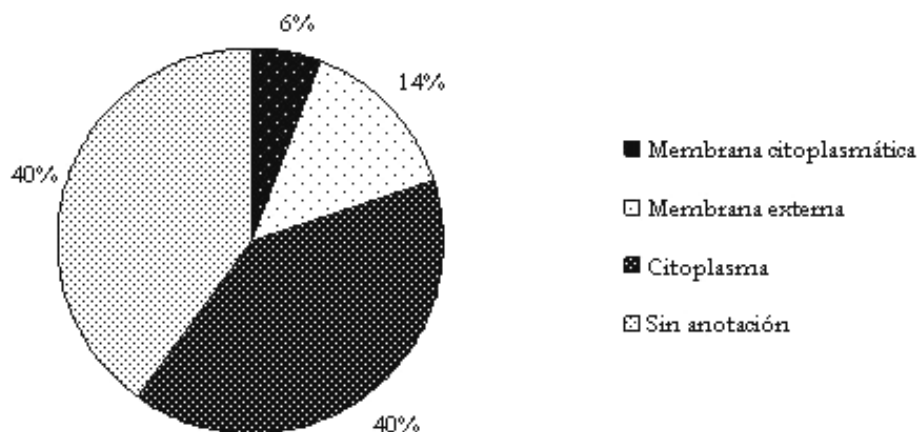


Figura 28. Distribución de las localizaciones celulares en las que se encuentran las proteínas identificadas mostradas en la tabla 6 (página 114).

Aplicando el criterio de considerar significativa una diferencia en el ratio medio de expresión por encima de 2 o por debajo de -2, se encontraron 18 proteínas con una expresión disminuida y 17 aumentada en la cepa resistente a colistina. Entre estas proteínas, un número importante (14 de las mismas) está directamente relacionado con eventos metabólicos tales como la asimilación de nitrógeno o el ciclo de los ácidos tricarbóxicos, 11 proteínas se relacionan con la expresión génica y la biosíntesis de proteínas y, con una menor extensión, otras 2 se relacionan con funciones celulares como las llevadas a cabo por el sistema de proteínas chaperonas o la inducción de la formación del pilus o fimbria, relacionada con la formación de biopelículas y virulencia [472]; 4 de las proteínas identificadas son proteínas de la membrana externa que actúan como porinas y, finalmente, la proteína *OsmY*, directamente relacionada con el estrés osmótico y asociada al mecanismo de acción de la colistina [473-475]. Esta distribución del conjunto de procesos biológicos desempeñados por las proteínas identificadas en este análisis se puede apreciar en la figura 29 (página siguiente).

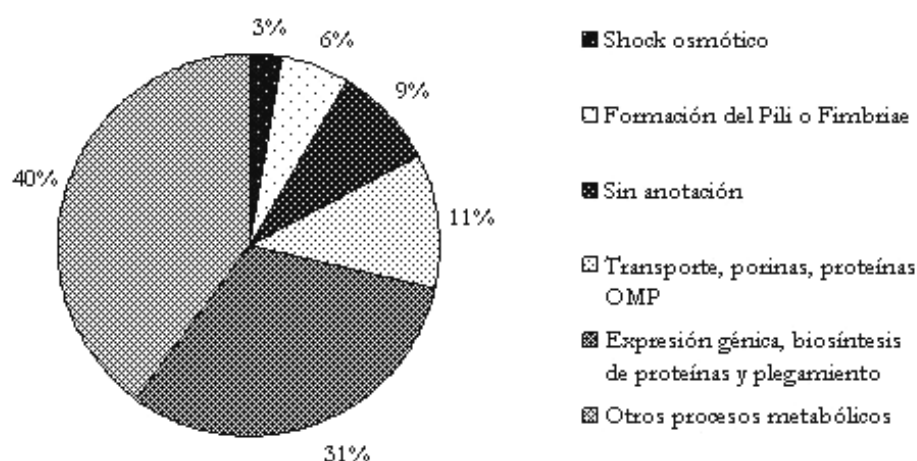


Figura 29. Distribución de los procesos biológicos con los que se relaciona a las proteínas identificadas presentes en la tabla 6 (página 114).

Entre las proteínas metabólicas diferencialmente expresadas en este análisis destaca la regulación a la baja en la cepa resistente de la expresión de proteínas relacionadas con la asimilación de nitrógeno (#1636T, *Nitrogen assimilation regulatory protein P-II 2*), la N-acetiltransferasa involucrada en la inactivación por acetilación en posición 6' de aminoglicósidos como la amikacina, kanamicina, netilmicina y tobramicina [476] (#1538T*, *aac(60)-I_k gene product*), una peroxidasa dependiente de hierro (#1075T, *Putative iron-dependent peroxidase*), una enzima clave en la biosíntesis de la glicina (#877T, *Serine hydroxymethyltransferase*) típica de la respuesta severa [477], otra también clave en la biosíntesis de *molybdopterin*, cofactor de óxido-reductasas (#1188T, *Molybdopterin biosynthesis protein*) y una proteína involucrada en la biosíntesis de ubiquinona, lípido soluble componente de las cadenas de transporte electrónico unidas a membrana (#1355T, *Putative ubiquinone biosynthesis protein*). Entre las proteínas metabólicas cuya expresión se encuentra aumentada en la cepa resistente, destaca la proteína involucrada en la biosíntesis de tiamina (#1275T, *Thiamine biosynthesis Protein*), cofactor en las descarboxilaciones metabólicas en su forma bifosfato y como señal de crecimiento óptimo en *E. coli* bajo restricción de aminoácidos en su forma trifosfato [478], la enzima triosafosfato-isomerasa (#1272Tb, *Triosephosphate Isomerase*), una enzima del ciclo de los ácidos tricarbóxicos (encontrada en los spots #285Tb y #286T, *Isocitrate dehydrogenase*), enzimas málicos que catalizan la descarboxilación de malato unido a la reducción de nucleótidos adenina (#285Ta y #284T,

descritas como *putative bifunctional protein (MaeB)* y *MaeB hypothetical Protein*, respectivamente) y, finalmente, una enzima involucrada en la producción de equivalentes redox por transformación de sustratos hidroxilados en productos ketoacil-CoA con formación de NADH (#644T, *3-Hydroxyacyl-CoA dehydrogenase*). En la figura 30 se puede observar la distribución de estas proteínas ordenadas de menor a mayor valor de *ratio*.

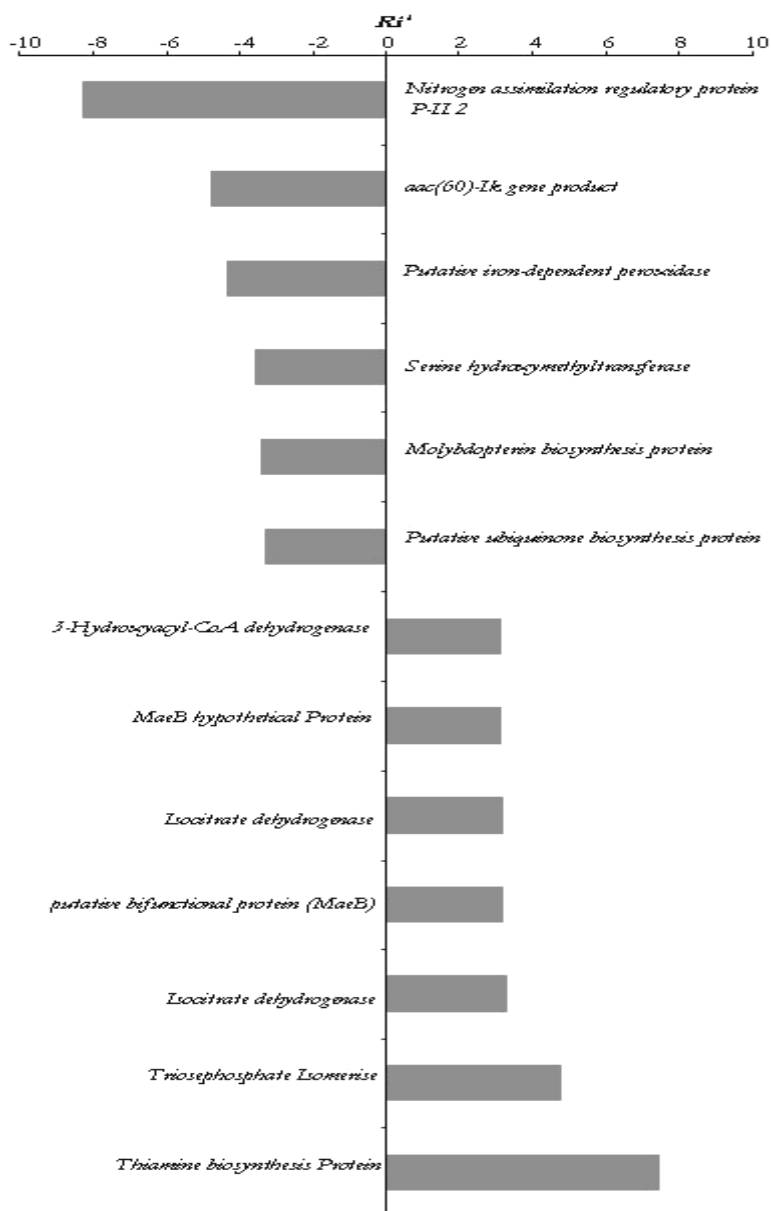


Figura 30. Proteínas relacionadas con distintos procesos metabólicos diferencialmente expresadas entre las cepas sensibles y resistentes a colistina.

Por otra parte, entre las proteínas relacionadas con la expresión génica, biosíntesis de proteínas y plegamiento, destaca la expresión disminuida en la cepa resistente de proteínas chaperonas (*Chaperone* y *co-chaperone Hsp60 (GroEL)*) detectadas en los *spots* #620T y #650T respectivamente, *Chaperone Hsp70 (DnaK)* en el *spot* #667T y *Putative signal peptide (chaperone HspJ)* en el #765M, de una proteína participante del proceso de traducción (#1402T, *Protein chain elongation factor EF-Tu*) y uno de los componentes de la subunidad 50S del ribosoma (#1521T, *50S Ribosomal protein L15*). En cuanto a la misma clase de proteínas con expresión aumentada en la cepa resistente es destacable la presencia de la cadena alfa de la glicil-tRNA sintetasa (#1028T, *Glycyl-tRNA synthetase alpha chain*), proteínas constituyentes de la subunidad 30S ribosomal (*30S Ribosomal protein S3* detectada en los *spots* #1263T y #1272Ta y la proteína *30S ribosomal protein S2* detectada en el *spot* #1033M), así como del proceso de traducción (#295T, *Protein chain elongation factor EF-G*). En la figura 31 se muestra la distribución de estas proteínas ordenadas de menor a mayor valor de *ratio*.

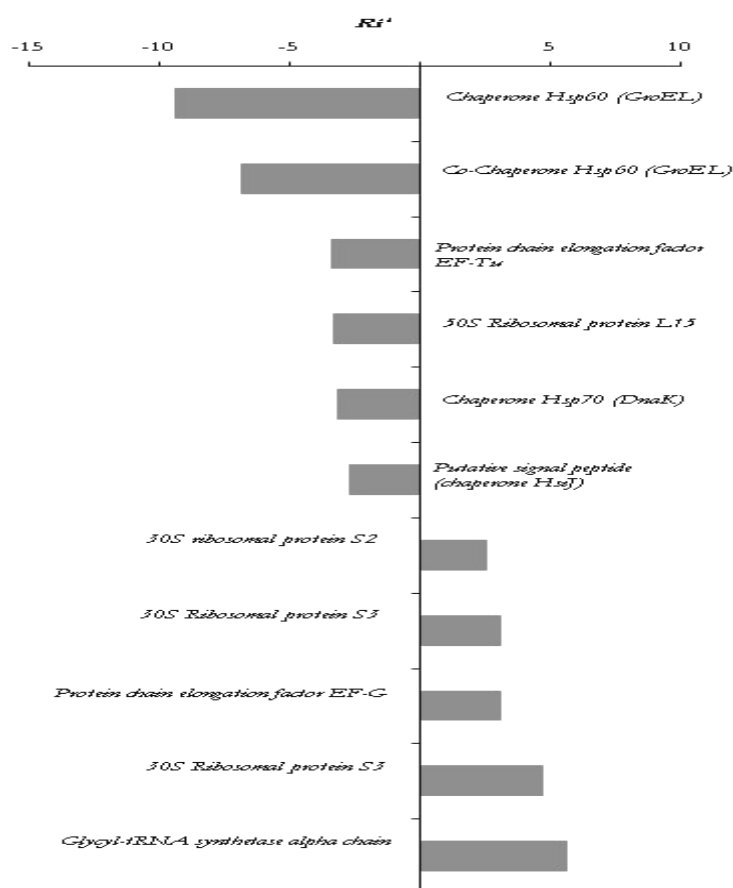


Figura 31. Proteínas diferencialmente expresadas entre la cepa resistente y sensible a colistina relacionadas con la expresión génica, biosíntesis y plegamiento de proteínas.

Entre las proteínas diferencialmente expresadas en este análisis relacionadas con el transporte a través de membrana, actuando como porinas o con dominios OMP es relevante la disminuida expresión en la cepa resistente de proteínas porinas (*Outer membrane protein A* detectada en los *spots* #885M y #1384M*) y de una proteína descrita como facilitadora de la entrada en la célula del antibiótico imipenem, produciendo resistencia al mismo cuando su expresión es defectiva [406] (#1556M*, *Putative outer membrane protein (CarO)*). En contraste, una proteína porina modificable por calor se encuentra expresada al alza en la cepa resistente (#1085M, *Outer membrane protein HMP*). La figura 32 muestra esta distribución de proteínas ordenadas de menor a mayor valor de *ratio*.

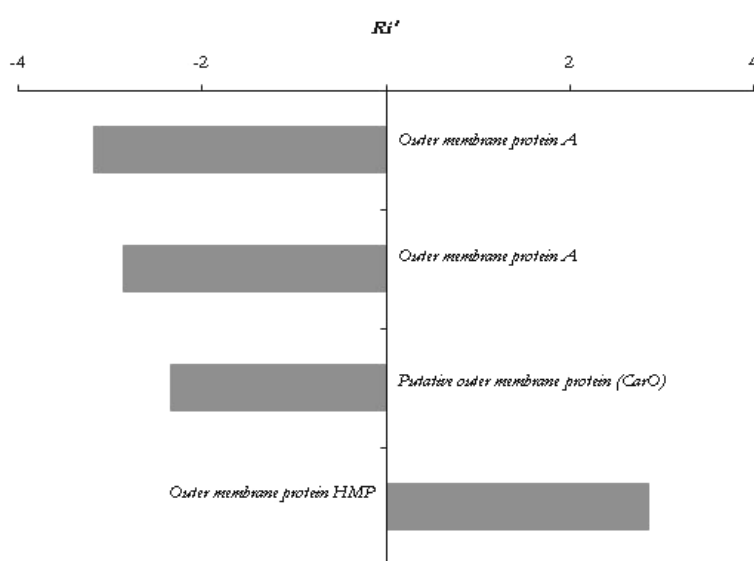


Figura 32. Proteínas diferencialmente expresadas entre la cepa resistente y sensible a colistina relacionadas con el transporte a través de membrana, porinas, y proteínas con dominios OMP.

A parte de estos grupos de proteínas comentados hay que resaltar la expresión aumentada en la cepa resistente de proteínas relacionadas con la síntesis del pilus o fimbria (*CsuD P pilus assembly protein porin PapC* y *CsuA/B Uncharacterized secreted protein* detectadas en los *spots* #218M y #1578M, respectivamente) y de una proteína asociada al mecanismo de acción de la colistina y cuya expresión está directamente relacionada a la respuesta frente a estrés osmótico (#1436M, *Putative signal peptide (OsmY)*) [473-475].

6.2.2. Análisis por marcaje con isótopos isobáricos estables (iTRAQ)

El análisis de iTRAQ fue llevado a cabo para investigar diferencias cuantitativas en la expresión de proteínas por parte de la cepa sensible y resistente a colistina en la fracción enriquecida en proteínas de membrana. La razón por la que este estudio se centró en este compartimento celular tiene que ver con el intento de salvar las limitaciones presentadas por los métodos basados en geles de electroforesis, especialmente a la hora de resolver proteínas de elevada hidrofobicidad como las presentes en esta fracción proteica y para las que una aproximación *off-gel* se hace más aconsejable.

Cada muestra de proteínas fue digerida con tripsina, marcada con los reactivos iTRAQ y analizada por LC-MS/MS después del fraccionamiento de los péptidos por cromatografía de SCX. A diferencia de otros métodos de marcaje isotópico, los marcadores iTRAQ son isobáricos, ofreciendo la misma relación m/z para el mismo péptido en el primer estado de MS a pesar de la presencia de los marcadores 114, 115, 116 ó 117 en la versión de cuatro reactivos utilizada. Sin embargo, en el análisis de MS/MS, los iones peptídicos son fragmentados con la conveniente energía de colisión derivando en los productos iónicos resultantes entre los que se encuentran los iones reporte con relación m/z de 114,1 a 117,1 introducidos, junto a los fragmentos peptídicos cuyas secuencias aminoacídicas pueden ser deducidas. Así, en este método, el espectro de MS/MS es usado tanto para la identificación de las proteínas como para la cuantificación de las mismas.

Cada una de las 6 fracciones obtenidas por cromatografía de intercambio catiónico (SCX) fue inyectada por duplicado en el espectrómetro de masas para ser luego agrupados, en el análisis llevado a cabo por el programa *Protein Pilot*TM, los resultados obtenidos a partir de estas réplicas técnicas de cada fracción de SCX. La figura 33 (página siguiente) muestra el número de péptidos únicos obtenido por fracción de SCX, mostrándose el porcentaje de péptidos únicos detectados por réplica y el porcentaje de solapamiento observado entre los péptidos secuenciados a partir de cada réplica técnica. Así, una media del 15% de los péptidos secuenciados fueron aportados gracias al análisis de la segunda réplica técnica, poniéndose de manifiesto la utilidad que tiene la realización de inyecciones múltiples de cada muestra con el fin de aumentar el número total de péptidos secuenciados por fracción y así el porcentaje de cobertura alcanzado con éstos por proteína identificada.

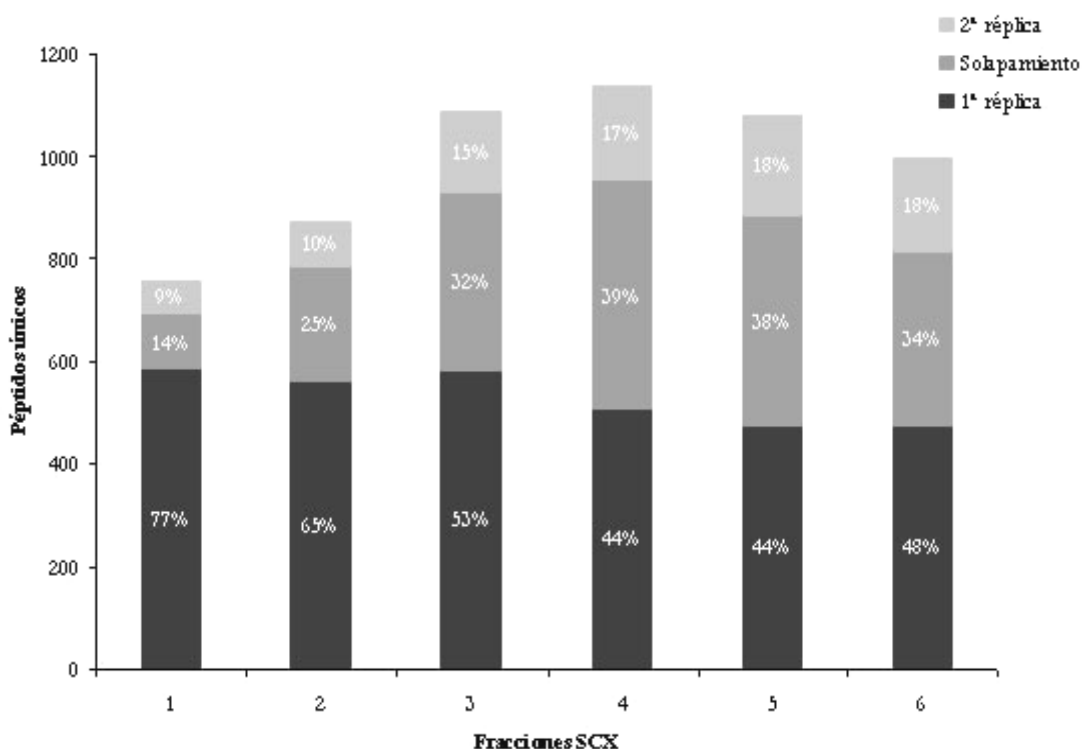


Figura 33. Número de péptidos únicos obtenido y solapamiento observado entre los péptidos secuenciados a partir de cada réplica técnica realizada por fracción de SCX.

En la búsqueda por comparación de los espectros de MS/MS obtenidos experimentalmente con los espectros teóricos presentes en la base de datos llevada a cabo por el algoritmo de búsqueda *Paragon*TM (incorporado en el programa *Protein Pilot*TM 2.0.1), se detectaron, después de la agrupación de las distintas especies proteicas - esto es, las entradas redundantes y las proteínas homólogas llevada a cabo por el algoritmo *Pro Group*TM, incorporado también en el mismo programa - 360 proteínas con un nivel de confianza del 95% (tabla B1 del apartado B.5 del anexo B, página 310), siendo la contribución de falsos positivos del 0% estimada gracias a la presencia de las secuencias polipeptídicas reversas en la base de datos usada en este análisis. Entre las proteínas identificadas, 9 lo son a partir de la secuencia de un solo péptido y, para estas proteínas, se muestra, en el apartado B.6 del mismo anexo B (página 345), la secuencia deducida a partir de los espectros de masas también mostrados del ión precursor seleccionado y el derivado de la fragmentación del mismo.

Para la cuantificación, las áreas descritas por los picos pertenecientes a los marcadores iTRAQ (m/z 114,1 – 117,1) fueron determinadas y, tras normalización de las cantidades de muestra, la expresión diferencial entre las cepas sensibles y resistentes a colistina se evaluó para el análisis de los ratios 116/114 y 117/115 (correspondientes a R1/S1 y R2/S2 respectivamente, en el diseño experimental seguido y descrito en la figura 18, página 90).

De las 360 proteínas identificadas, a 313 (el 87%) se les cuantificó todos los valores de *ratio* medio, presentando asociado un valor de p tras el análisis estadístico *t-Student* y un factor de error (EF, *error factor*) por *ratio* cuantificado. La expresión diferencial se consideró significativa para valores del *ratio* 116/114 y 117/115 por debajo de 0,8 y por encima de 1,25 con un valor de $p < 0,05$ y un EF < 2 en ambos análisis comparativos. Aplicando estos criterios, la comparación 116/114 resultó en 51 proteínas diferencialmente expresadas entre las muestras sensibles y resistentes, mientras que la comparación 117/115 produjo 42 proteínas diferencialmente expresadas. En total, 25 proteínas aparecieron en común diferencialmente expresadas en ambos análisis comparativos. En la tabla 7 (página siguiente) se ordenan en función de los procesos biológicos con los que se relacionan las proteínas diferencialmente expresadas en cada análisis comparativo (116/114 y 117/115), mostrándose únicamente para las 25 proteínas comunes a ambos análisis comparativos la media aritmética de los ratios medios reportados.

Entre las 68 proteínas mostradas en la tabla 7, un número importante - 16 de las mismas (el 23%) - no presenta una anotación funcional concreta; el 30% (20 de las 68 proteínas), se relaciona con distintos procesos metabólicos; el mismo porcentaje de proteínas (31%, es decir, 21 de las 68 proteínas) participa en el transporte de sustancias a través de membrana y en la comunicación, actuando como porinas y con dominios OMP; 10 proteínas (el 15%) participan en procesos de expresión génica y biosíntesis de proteínas; una de las proteínas se relaciona con la formación de biopelículas (#147, *baemin storage system HmsR protein*) y, por último, otra proteína (#57, *Putative ClpA/B-type chaperone*) tiene su expresión relacionada con la protección frente a condiciones de estrés oxidativo y shock térmico, jugando un importante papel en la supervivencia de las células en división lenta o con crecimiento ralentizado. Esta distribución de los procesos biológicos con los que se relaciona a las proteínas diferencialmente expresadas mostradas en la tabla 7 es la que representa la figura 34 (página 126).

Tabla 7. Distribución en función de los procesos biológicos en los que participan las proteínas diferencialmente expresadas en *A. baumannii* sensible y resistente a colistina. La numeración de la primera columna (#) es la que asigna el programa *Protein Pilot*TM a cada grupo de proteínas identificada en función del *Unused ProtScore* y coincide con el resto de tablas y figuras asociadas a este experimento. En la columna dedicada al compartimento celular en el que se localizan las proteínas (Compart. celular), los códigos se refieren a: C = Citosol, MC = Membrana citoplasmática; ME = Membrana externa, E = Extracelular y P = Periplasma. Las columnas R116/114 y R117/115 indican los valores del ratio medio obtenido por cada proteína. Las dos columnas (95% IC) indican el intervalo de confianza a un 95% dentro del que se encuentra cada valor de ratio medio obtenido. La columna “R med.” muestra la media aritmética entre los valores de los ratios medios obtenidos para cada una de las 25 proteínas comunes a ambos análisis comparativos.

#	Descripción	Compart. Celular	NCBIInr (gi)	R 116/114	95% IC	R 117/115	95% IC	R med.
Respuesta a estrés								
57	<i>Putative ClpA/B-type chaperone</i>	C	126641353	1.91	(1.7, 2.1)	1.69	(1.5, 2.0)	1.80
Formación de biopelículas								
147	<i>haemin storage system HmsR protein</i>	MC	126642205	-	-	1.82	(1.1, 2.8)	-
Expresión génica y biosíntesis de proteínas								
12	<i>50S ribosomal protein L2</i>	-	160419217	-	-	1.39	(1.2, 1.5)	-
23	<i>Putative signal peptide</i>	-	126641077	0.48	(0.4, 0.5)	0.37	(0.3, 0.4)	0.43
30	<i>30S ribosomal protein S2</i>	C	61215533	1.67	(1.2, 2.3)	-	-	-
48	<i>30S ribosomal protein S3</i>	C	152060837	-	-	1.43	(1.2, 1.5)	-
62	<i>DNA-directed RNA polymerase subunit beta'</i>	C	160177568	-	-	1.39	(1.2, 1.5)	-
88	<i>50S ribosomal protein L16</i>	C	126643089	0.64	(0.6, 0.7)	-	-	-
101	<i>50S ribosomal protein L20</i>	C	60390407	0.55	(0.4, 0.6)	-	-	-
122	<i>50S ribosomal protein L1</i>	-	160166883	1.35	(1.1, 1.5)	-	-	-
126	<i>Host factor I for bacteriophage Q beta replication</i>	C	50085463	0.47	(0.4, 0.5)	0.42	(0.4, 0.5)	0.44
349	<i>30S ribosomal protein S17</i>	C	126643087	2.16	(1.7, 2.6)	-	-	-
Transporte, porinas, proteínas OMP, comunicación								
1	<i>Outer membrane protein omp38 precursor</i>	ME	75438841	0.58	(0.5, 0.6)	0.34	(0.3, 0.4)	0.46
4	<i>34 kDa Outer Membrane Protein</i>	ME	82654966	0.71	(0.6, 0.7)	0.65	(0.6, 0.7)	0.68
5	<i>Putative outer membrane protein</i>	ME	126640934	0.78	(0.7, 0.8)	0.48	(0.4, 0.5)	0.63
8	<i>RND family drug transporter</i>	ME	88758806	1.26	(1.1, 1.3)	-	-	-
10	<i>hypothetical protein A1S_1295</i>	-	126641341	0.73	(0.6, 0.8)	-	-	-
18	<i>Putative long-chain fatty acid transport protein</i>	ME, E	126642803	0.60	(0.5, 0.6)	0.59	(0.5, 0.6)	0.59
19	<i>RND family drug transporter</i>	MC	88758802	-	-	1.55	(1.4, 1.7)	-
24	<i>Putative outer membrane protein</i>	ME	72535027	0.49	(0.4, 0.5)	0.27	(0.2, 0.3)	0.38
29	<i>RND family drug transporter</i>	MC, ME	88758800	1.61	(1.4, 1.7)	-	-	-
32	<i>OmpA/MotB</i>	ME	126641241	0.43	(0.4, 0.5)	0.40	(0.3, 0.5)	0.41
34	<i>Putative glucose-sensitive porin (OprB-like)</i>	ME	126642873	0.55	(0.5, 0.6)	0.57	(0.5, 0.6)	0.56
36	<i>putative membrane protease subunit</i>	-	126642789	-	-	0.70	(0.6, 0.7)	-
50	<i>RND superfamily-like exporters</i>	MC	126640221	2.56	(1.6, 4.2)	3.09	(1.9, 5.0)	2.82
82	<i>Putative outer membrane protein</i>	ME	126642177	0.71	(0.6, 0.8)	0.56	(0.4, 0.7)	0.64
113	<i>Putative membrane protein</i>	MC	126640829	0.59	(0.5, 0.6)	0.63	(0.6, 0.7)	0.61
116	<i>Putative ABC transporter ATP-binding protein</i>	C	126643230	4.48	(2.6, 7.7)	3.39	(2.5, 4.6)	3.93
123	<i>Preprotein translocase subunit SecA</i>	MC, C	162286722	2.31	(1.8, 3.0)	1.59	(1.1, 2.2)	1.95
148	<i>Transport protein of outer membrane lipoproteins</i>	MC	126642648	-	-	0.59	(0.4, 0.7)	-
156	<i>Omp38 precursor</i>	ME	148839593	0.56	(0.5, 0.6)	0.33	(0.3, 0.4)	0.44

#	Descripción	Compart. Celular	NCBI nr (gi)	R 116/114	95% IC	R 117/115	95% IC	R med.
359	<i>Putative mechanosensitive ion channel</i>	MC	126642124	0.58	(0.5, 0.6)	-	-	-
46	<i>organic solvent tolerance protein precursor</i>	ME	126641591	-	-	0.79	(0.6, 0.9)	-
Otros procesos metabólicos								
Descomposición del H₂O₂								
63	<i>Catalase</i>	C	126641432	1.81	(1.5, 2.2)	1.36	(1.2, 1.6)	1.58
Antioxidante								
83	<i>Cu/Zn superoxide dismutase</i>	P	126643158	-	-	0.70	(0.6, 0.7)	-
Metabolismo del piruvato								
162	<i>L-lactate dehydrogenase FMN linked</i>	-	126640182	-	-	1.44	(1.2, 1.7)	-
Ruta de las pentosas fosfato								
231	<i>glucose dehydrogenase</i>	P	126642872	0.74	(0.6, 0.8)	-	-	-
Metabolismo de ácidos grasos								
52	<i>putative acyl-CoA dehydrogenase</i>	-	126642371	0.77	(0.7, 0.8)	-	-	-
99	<i>Putative acyl-CoA dehydrogenase</i>	-	126642370	0.56	(0.4, 0.8)	0.66	(0.6, 0.8)	0.61
Metabolismo del nitrógeno								
54	<i>glutamine syntbetase</i>	C	50085541	0.70	(0.5, 0.8)	-	-	-
150	<i>D-amino acid dehydrogenase small subunit</i>	MC	126640202	1.96	(1.7, 2.1)	-	-	-
Metabolismo de aminoácidos								
84	<i>Phenylacetate-CoA oxygenase/reductase PaaK subunit</i>	-	126641386	3.68	(2.7, 5.0)	2.95	(2.2, 3.9)	3.31
315	<i>glucosamine-fructose-6-phosphate aminotransferase</i>	C	126643402	1.38	(1.1, 1.6)	-	-	-
Síntesis de ATP								
129	<i>membrane-bound ATP synthase F1 sector, epsilon-subunit</i>	MC, C	126640257	1.57	(1.3, 1.8)	-	-	-
222	<i>F0F1 ATP synthase subunit A</i>	MC	126640249	0.73	(0.6, 0.8)	-	-	-
Ciclo del TCA								
249	<i>dihydrolipoamide succinyltransferase component of 2-oxoglutarate dehydrogenase complex (E2)</i>	C	126642747	-	-	0.52	(0.4, 0.6)	-
313	<i>succinate dehydrogenase, hydrophobic subunit</i>	MC	50085919	0.58	(0.4, 0.6)	-	-	-
Metabolismo de vitaminas y cofactores								
280	<i>Glutamate-1-semialdehyde aminotransferase</i>	C	126642500	1.57	(1.2, 2.1)	1.64	(1.0, 2.6)	1.61
335	<i>Hypothetical protein A1S_3482</i>	-	155029703	2.53	(1.7, 3.8)	3.27	(2.1, 5.1)	2.90
Cadena transportadora de electrones								
13	<i>cytochrome d terminal oxidase polypeptide subunit I</i>	MC	126641969	0.73	(0.6, 0.8)	-	-	-
33	<i>cytochrome o ubiquinol oxidase subunit II</i>	MC	126642211	0.70	(0.6, 0.7)	-	-	-
73	<i>NADH dehydrogenase I chain F</i>	MC, C	126640814	1.26	(1.1, 1.3)	-	-	-
127	<i>Electron transfer flavoprotein beta-subunit</i>	-	126642663	2.85	(2.1, 3.9)	1.88	(1.5, 2.4)	2.36
Sin anotación								
17	<i>putative signal peptide</i>	P	126643195	0.68	(0.6, 0.7)	-	-	-
21	<i>hypothetical protein A1S_1462</i>	-	126641508	-	-	0.77	(0.7, 0.8)	-
35	<i>Peptidoglycan-associated lipoprotein precursor</i>	ME	126642630	0.76	(0.7, 0.8)	0.68	(0.6, 0.7)	0.72
85	<i>putative lipoprotein</i>	MC	126641128	1.53	(1.2, 1.9)	-	-	-

#	Descripción	Compart. Celular	NCBIInr (gi)	R 116/114	95% IC	R 117/115	95% IC	R med.
97	<i>putative lipoprotein precursor (VacJ) transmembrane</i>	ME	126640689	-	-	0.67	(0.5, 0.7)	-
107	<i>Putative peptidoglycan-binding LysM</i>	-	126640876	0.28	(0.2, 0.4)	0.66	(0.6, 0.7)	0.47
106	<i>Putative signal peptide</i>	-	126643355	0.56	(0.5, 0.6)	0.48	(0.4, 0.5)	0.52
124	<i>putative signal peptide</i>	-	126643165	-	-	0.68	(0.6, 0.7)	-
130	<i>putative signal peptide</i>	-	126641187	-	-	0.66	(0.5, 0.7)	-
137	<i>hypothetical protein A1S_1574</i>	-	126641619	-	-	0.73	(0.6, 0.8)	-
170	<i>hypothetical protein ACLAD2690</i>	-	50085756	0.58	(0.4, 0.7)	-	-	-
171	<i>hypothetical protein A1S_2721</i>	MC	126642752	0.78	(0.6, 0.8)	-	-	-
193	<i>hypothetical protein A1S_2757</i>	-	126642788	0.68	(0.5, 0.8)	-	-	-
219	<i>hypothetical protein A1S_0137</i>	-	126640240	-	-	0.64	(0.5, 0.7)	-
264	<i>hypothetical protein A1S_1293</i>	-	126641339	1.32	(1.2, 1.4)	-	-	-
335	<i>Hypothetical protein A1S_3482</i>	-	155029703	2.53	(1.7, 3.8)	3.27	(2.1, 5.1)	2.90

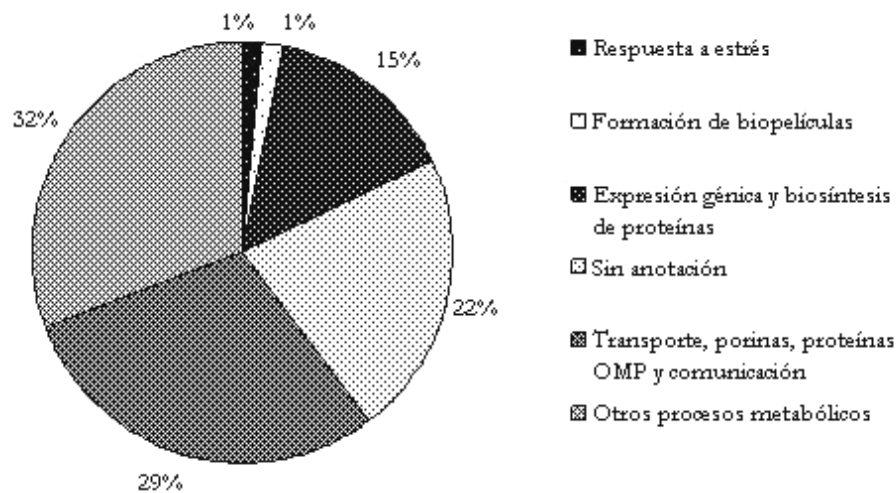


Figura 34. Distribución de los procesos biológicos con los que se relaciona a las proteínas identificadas presentes en la tabla 7 (página 124).

La distribución de las localizaciones celulares en las que se ubican las proteínas diferencialmente expresadas en estos análisis presentes en la tabla 7 se muestra en la figura 35 (página siguiente). Como se puede apreciar, un número elevado de las mismas (21 proteínas, el 30%) no presenta una localización celular concreta prevista por la herramienta PSORTb (disponible en <http://www.psort.org/>); el 23% (17 proteínas) se encuentra localizado en la membrana citoplasmática, aunque 3 de ellas se co-localizan tanto en la membrana como en el citoplasma (#73, *NADH dehydrogenase I chain F*; #123, *Preprotein translocase subunit SecA* y #129, *membrane-bound ATP synthase F1 sector, epsilon-subunit*) y una se presenta localizada en la membrana externa además de en la citoplasmática (#29, *RND*

family drug transporter); a 14 proteínas se les prevé localizadas en la membrana externa (el 19%), aunque a una de ellas (#18, *Putative long-chain fatty acid transport protein*) se le predice además una localización extracelular. Sumando los porcentajes de las proteínas presentes en ambas membranas, el 42% de las proteínas se localiza en una de estas estructuras membranales. En el citoplasma celular aparecen localizadas 14 de las 68 proteínas mostradas (el 20% de las proteínas) y, finalmente, 3 de las proteínas (un 4%), presentan una localización prevista en el periplasma, en concreto las proteínas #17, *putative signal peptide*; #83, *Cu/Zn superoxide dismutase* y #231, *glucose dehydrogenase*.

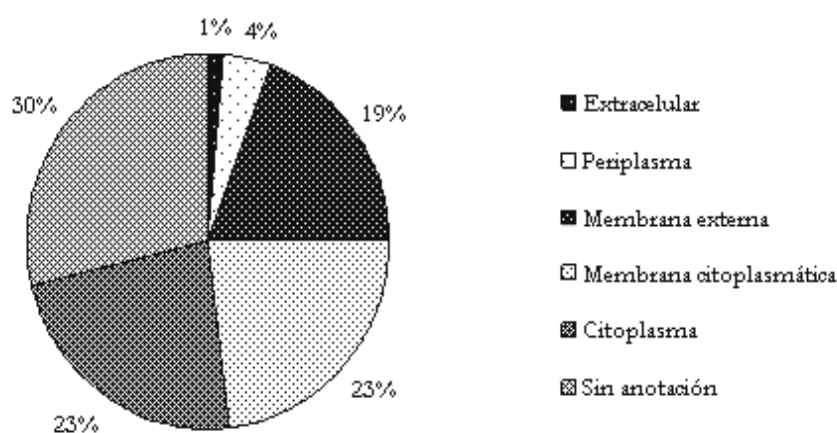


Figura 35. Distribución de las localizaciones celulares que presentan las proteínas identificadas mostradas en la tabla 7 (página 124).

Teniendo en cuenta al conjunto de proteínas detectadas en este análisis presentes en la tabla B1 del apartado B.5. del anexo B, entre estas 360 proteínas, 89 (el 23%) tienen una localización citoplasmática, aunque a 12 de estas proteínas se les prevé localizaciones múltiples, asignándoseles una localización tanto en el citoplasma como en la membrana citoplasmática. En la membrana citoplasmática se localizan 103 de las proteínas identificadas (el 27%), aunque, aparte de las 12 comentadas anteriormente con una localización citoplasmática compartida, a 3 se les prevé una localización tanto en la membrana citoplasmática como en la externa y a una de las mismas se le predice también una localización periplasmática (proteína #28, *hypothetical protein A1S_0505*). Además, otra de estas proteínas localizadas en la membrana citoplasmática tiene también asignada una

localización extracelular (proteína #247, *D-ala-D-ala-carboxypeptidase; penicillin-binding protein 5 (precursor)*). 42 son las proteínas cuya localización celular está prevista en la membrana externa (el 11%), aunque, aparte de las 3 comentadas anteriormente - co-localizadas en la membrana citoplasmática y externa (proteínas #29, #297 y #28 descritas como *RND family drug transporter; two component signal transduction system kinase sensor component* y *hypothetical protein A1S_0505*, respectivamente) - 2 se localizan también en el medio extracelular, en concreto las proteínas #18, *putative long-chain fatty acid transport protein* y #198, *hypothetical protein A1S_2866*. En total, las proteínas de membrana – tanto citoplasmática como externa - constituyen el 38% de las proteínas identificadas. A 12 proteínas (el 3%) se las localiza en el periplasma a parte de la comentada anteriormente cuya localización prevista simultanea la membrana citoplasmática, la externa y el periplasma. Una localización extracelular se le predice a 6 proteínas (el 2%), en concreto las proteínas #18, #198 y #309 descritas como *putative long-chain fatty acid transport protein; hypothetical protein A1S_2866* y *Fimbrial protein* respectivamente, prediciéndosele además, una localización secundaria en la fimbria a la última de ellas. Por último, 126 de las 360 identificadas (el 34%), fueron las proteínas sin una localización concreta prevista por esta herramienta bioinformática. Esta distribución en porcentajes se puede observar en la figura 36.

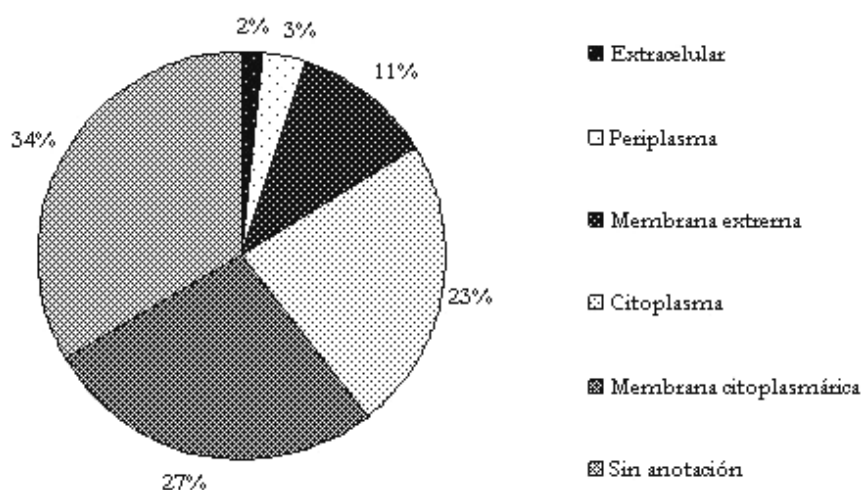


Figura 36. Distribución de las localizaciones celulares que presentan las proteínas identificadas mostradas en la tabla B1 del apartado B.5 del anexo B (página 310).

Entre las 52 proteínas diferencialmente expresadas en el análisis 116/114, 32 (el 61%), presentaron *ratios* medios por debajo de 0,8 (entre 0,28 y 0,78), indicando una expresión disminuida en la cepa resistente, mientras que 20 (el 38%) presentan *ratios* medios por encima de 1,25 (entre 1,26 y 4,48), indicando expresión aumentada en la cepa resistente. En el análisis 117/115, de las 42 proteínas diferencialmente expresadas, 27 (el 64%) presentan su expresión regulada a la baja (*ratios* medios entre 0,27 y 0,79) y 15 (el 35%), son las proteínas que presentan aumentada su expresión en la cepa resistente (*ratios* medios entre 1,36 y 3,39). Finalmente, entre las 25 proteínas comunes a ambos análisis comparativos, 9 (el 36%) presentaron *ratios* medios resistente/sensible por encima de 1,25 (entre 1,58 y 3,93) en ambos análisis, indicando una expresión aumentada, mientras que las 16 proteínas restantes (el 64%), presentaron *ratios* medios resistente/sensible por debajo de 0,8 (entre 0,38 y 0,72), indicando una expresión disminuida en la cepa resistente.

Tal como se muestra en la figura 37 los *ratios* medios 116/114 y 117/115 para las 25 proteínas diferencialmente expresadas comunes a ambos análisis, se mostraron concordantes entre sí.

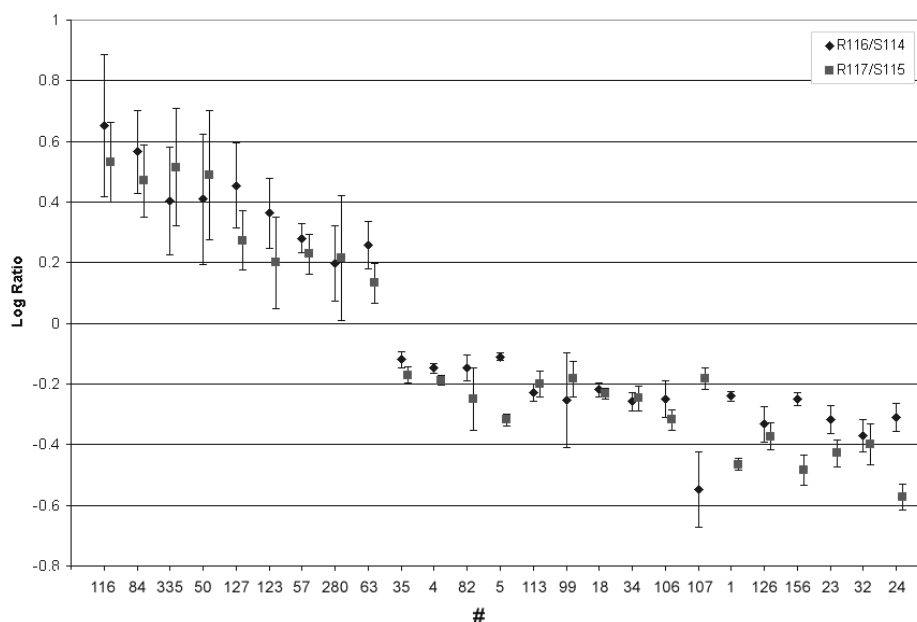


Figura 37. Representación en escala logarítmica de los valores de los ratios 116/114 y 117/115 para las 25 proteínas comunes diferencialmente expresadas en ambos análisis. Las barras de error son logarítmicas. El eje de valores x se corresponde con la numeración asignada a cada proteína en la columna (#) de la tabla 7 (página 124).

En la figura 38 se muestran las proteínas diferencialmente expresadas presentes en la tabla 7 (página 124) relacionadas con distintos eventos metabólicos y ordenadas de menor a mayor valor de la media aritmética de los *ratios* medios obtenidos en los análisis 116/114 y 117/115, seguido de los valores del *ratio* medio obtenidos por las proteínas cuantificadas de manera exclusiva a la comparación 116/114 y de los mismos valores para la comparación 117/115.

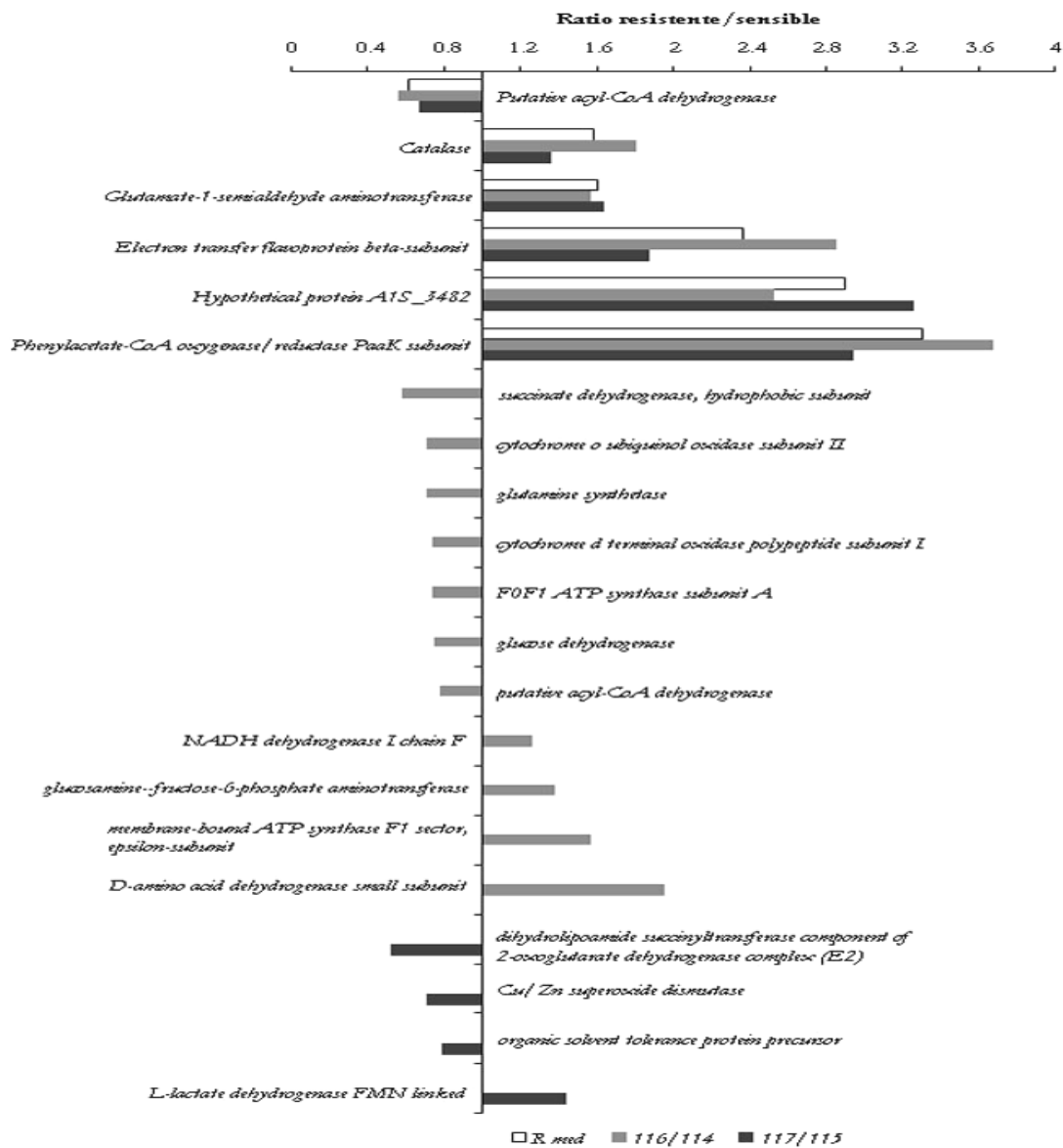


Figura 38. Proteínas relacionadas con distintos procesos metabólicos diferencialmente expresadas entre la cepa sensible y resistentes a colistina

Como se puede observar, entre las proteínas comunes a ambos análisis con expresión disminuida en la cepa resistente, la de menor valor en la media aritmética fue la proteína #99, *Putative acyl-CoA dehydrogenase*. En el mismo sentido, pero exclusivamente al análisis 116/114 aparece, redundantemente y también con expresión disminuida en la cepa resistente, la misma proteína #52, *putative acyl-CoA dehydrogenase*. También con uno de los valores más bajos para el *ratio* medio 116/114 aparecen otras deshidrogenasas (#313, *succinate dehydrogenase, hydrophobic subunit* y #231, *glucose dehydrogenase*), seguidas de 2 subunidades de las oxidasas de citocromos o y d (#33, *cytochrome o ubiquinol oxidase subunit II* y #13, *cytochrome d terminal oxidase polypeptide subunit I*), de la sintetasa de glutamina (#54, *glutamine synthetase*) y de la subunidad A de la ATP sintasa (#222, *F0F1 ATP synthase subunit A*). En el margen inferior de la misma figura se encuentran las proteínas cuantificadas exclusivas al análisis 117/115, entre las que la de menor valor de *ratio* medio es un componente del complejo deshidrogenasa de 2-oxoglutarato (#249, *dihydrolipoamide succinyltransferase component of 2-oxoglutarate dehydrogenase complex (E2)*), seguida de la superóxido dismutasa dependiente de Cu/Zn (#83, *Cu/Zn superoxide dismutase*) y del precursor de una proteína de tolerancia frente a disolventes orgánicos (#46, *organic solvent tolerance protein precursor*). Con expresión aumentada en la cepa resistente, la que mayor valor presenta en la media aritmética de los *ratios* medios de ambos análisis comparativos fue la subunidad *PaaK* de la oxigenasa/reductasa de fenilacetato de CoA (#84, *Phenylacetate-CoA oxygenase/reductase PaaK subunit*), seguida de una proteína ambiguamente denominada como *Hypothetical protein A1S_3482* (proteína #335), pero con cierta homología con una glicosiltransferasa participante en la formación del LPS en la eubacteria *Thermus thermophilus*. La siguiente sería la subunidad beta de una de las proteínas participantes de la cadena transportadora de electrones (#127, *Electron transfer flavoprotein beta-subunit*) seguida de una proteína participante en el metabolismo del glutámico (#280, *Glutamate-1-semialdehyde aminotransferase*) y, por último, de otra proteína (#63, *Catalase*) de alta analogía con la hidroperoxidasa de tipo II (HP II) que cataliza la conversión del peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno molecular, protegiendo a la célula de los efectos tóxicos de los peróxidos generados durante condiciones de estrés oxidativo. De manera exclusiva a la comparación 116/114, destaca una deshidrogenasa también participante en el metabolismo de aminoácidos (#150, *D-amino acid dehydrogenase small subunit*), seguida por una de las subunidades de la ATP sintasa unida a membrana (#129, *membrane-bound ATP synthase F1 sector, epsilon-subunit*), otra enzima implicada en la ruta biosintética de hexosamina (#315, *glucosamine-fructose-6-phosphate*

aminotransferase) y otra deshidrogenasa (#73, *NADH dehydrogenase I chain F*), mientras que, exclusiva a la comparación 117/115, aparece otra deshidrogenasa (#162, *L-lactate dehydrogenase FMN linked*).

Entre las proteínas relacionadas con el transporte pasivo a través de membrana como las porinas, proteínas con dominios OMP, las que llevan a cabo un transporte activo y las que participan en la comunicación celular actuando como transductores de señales procedentes del medio extracelular, destaca la expresión disminuida, en la cepa resistente, de todas las proteínas con dominios OMP y porinas cuantificadas en ambos análisis comparativos, al mismo tiempo que aparecen reguladas al alza las proteínas que llevan a cabo un transporte activo de sustancias a través de la membrana. De manera más concreta, la proteína con menor valor en la media aritmética de los ratios medios obtenidos en ambos análisis comparativos fue la proteína #24, identificada como *Putative outer membrane protein*, seguida por la #32, *OmpA/MotB*, la #156 y #1 identificadas ambas como *Outer membrane protein Omp38 precursor*, una porina sensible a la glucosa (#34, *Putative glucose-sensitive porin (OprB-like)*), una proteína transportadora de ácidos grasos de cadena larga (#18, *Putative long-chain fatty acid transport protein*), otras 3 proteínas putativas de membrana (#113, *Putative membrane protein*) y las proteínas #5 y #82, descritas como *Putative outer membrane protein*) y, por último, la proteína #4, *34 kDa Outer Membrane Protein*. De manera exclusiva al análisis 116/114 también aparece, con expresión disminuida en la cepa resistente, una de las proteínas constituyentes de canales iónicos mecanosensitivos (#359, *Putative mechanosensitive ion channel*) y una proteína ambiguamente descrita como *hypothetical protein A1S_1295* (proteína #10), pero con alta homología con una proteína que participa en procesos de secreción, en concreto la tipo VI de la familia EypB descrita en *Acinetobacter radioresistance SK82*. Exclusivas al análisis 117/115 aparece disminuida en la cepa resistente una proteína transportadora de lipoproteínas de la membrana externa (#148, *Transport protein of outer membrane lipoproteins*) y una subunidad de una potencial proteasa de membrana (#36, *putative membrane protease subunit*). Entre las proteínas de esta clase, reguladas al alza en la cepa resistente, la que mayor valor presentó en la media aritmética entre los ratios medios obtenidos en ambos análisis, fue uno de los miembros de la familia ABC de transportadores activos (#116, *Putative ABC transporter ATP-binding protein*), seguido de otro de los miembros pertenecientes a la familia RND de bombas de expulsión (#50, *RND superfamily-like exporters*) y una de las subunidades de una pre-proteína con actividad

translocasa (#123, *Preprotein translocase subunit SecA*). De manera exclusiva a los análisis 116/114 y 117/115 aparecen, con expresión aumentada en la cepa resistente, otros transportadores activos pertenecientes a la familia RND de bombas de expulsión (#29 y #8 en el análisis 116/114 y #19 en el 117/115, descritas todas como *RND family drug transporter*). En la figura 38 aparece la distribución de estas proteínas ordenadas de menor a mayor valor de la media aritmética de los *ratios* medios obtenidos en ambos análisis, seguida por los valores del *ratio* medio 116/114 y por los del *ratio* medio 117/115.

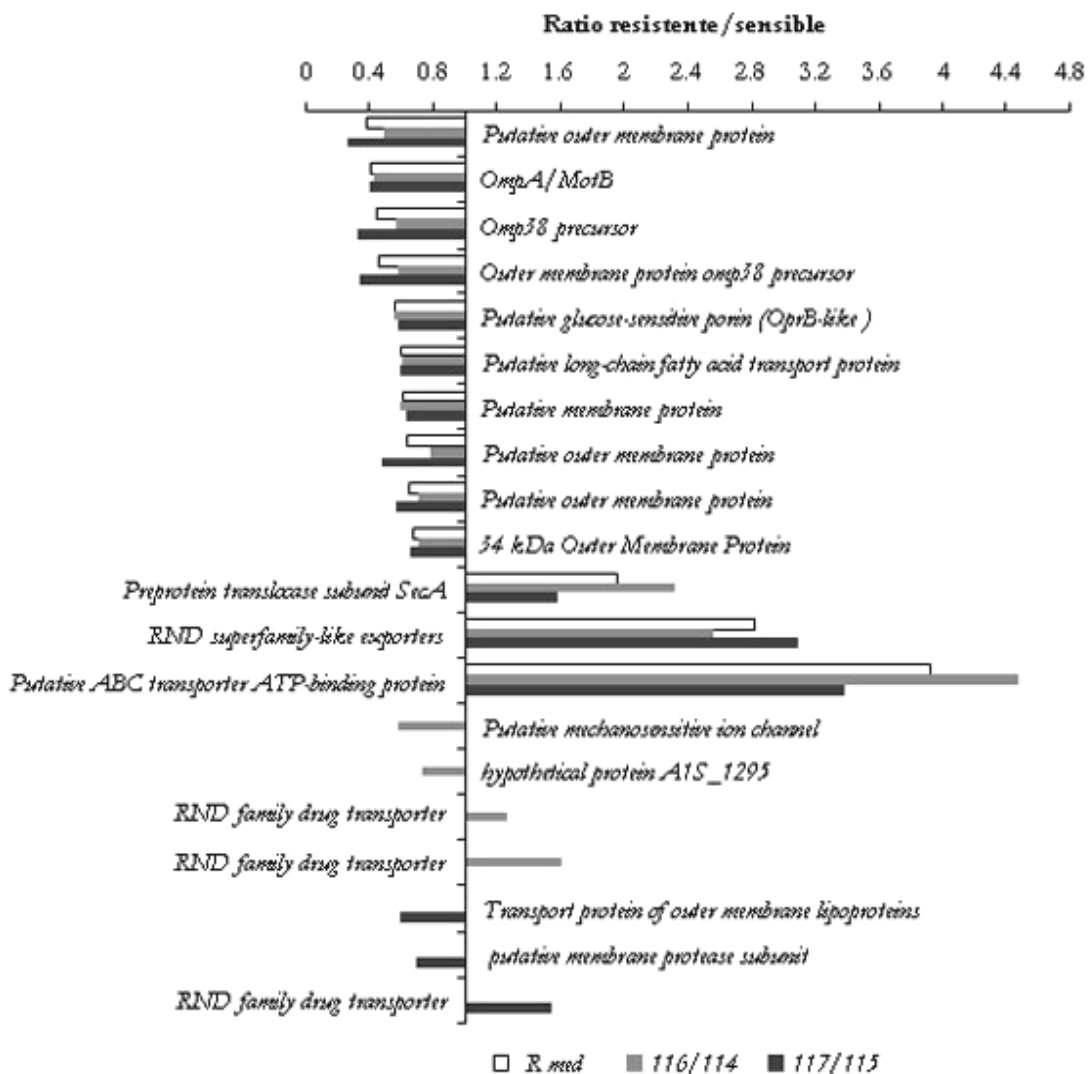


Figura 38. Proteínas relacionadas con la comunicación y el transporte a través de membrana, porinas y proteínas con dominios OMP diferencialmente expresadas entre las cepas resistente y sensible a colistina.

Entre las proteínas relacionadas con la expresión génica y biosíntesis de proteínas, dos se presentaron diferencialmente expresadas en ambos análisis cuantitativos, presentándose ambas con una expresión disminuida en la cepa resistente a colistina. Una de estas proteínas (#126, *Host factor I for bacteriophage Q beta replication*) tiene un dominio Hfq cerca de su extremo N-terminal, actuando como chaperona al promover la unión de pequeñas moléculas de RNA con sus moléculas de mRNA homólogas [479]. La otra, #23 *Putative signal peptide*, presenta alta homología con la chaperona HsiJ presente en otras bacterias. De manera exclusiva al análisis 116/114 aparecen también, con expresión disminuida en la cepa resistente, dos componentes de la subunidad 50S ribosomal (#101, *50S ribosomal protein L20* y #88, *50S ribosomal protein L16*). En cuanto a las proteínas con expresión aumentada en la cepa resistente y de manera exclusiva a la comparación 116/114, se encuentran dos componentes de la subunidad 30S ribosomal (#30, *30S ribosomal protein S2* y #349, *30S ribosomal protein S17*) y otro de la subunidad 50S (#122, *50S ribosomal protein L1*). Por otra parte, exclusivamente al análisis 117/115 se presentaron otros dos componentes de ambas subunidades ribosomales (#48, *30S ribosomal protein S3* y #12, *50S ribosomal protein L2*) y una proteína participante en el proceso de transcripción del DNA a RNA. La figura 39 (página siguiente) muestra estas proteínas diferencialmente expresadas en ambos análisis comparativos relacionadas con estos procesos biológicos y ordenadas de menor a mayor valor del ratio medio obtenido en ambos análisis cuantitativos.

A parte de las proteínas comentadas, otra proteína con expresión aumentada en la cepa resistente en ambos análisis cuantitativos está relacionada con la protección de la célula frente a condiciones de estrés, controlando la agregación y desnaturalización de estructuras celulares vitales (#57, *Putative ClpA/B-type chaperone*). Además, otra proteína diferencialmente expresada, pero de manera exclusiva al análisis 117/115, se presenta regulada al alza en la cepa resistente y se relaciona con la formación de biopelículas (#147, *haemin storage system HmsR protein*).

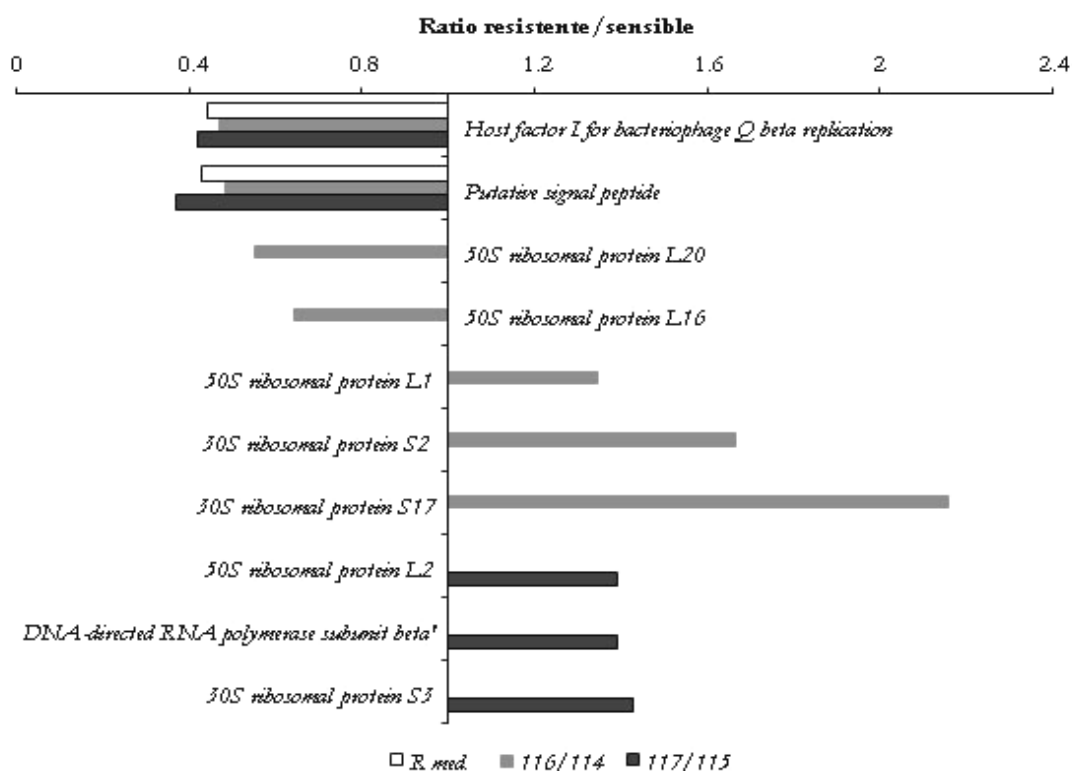


Figura 39. Proteínas diferencialmente expresadas entre la cepa resistente y sensible a colistina relacionadas con la expresión génica y biosíntesis de proteínas.

Tras computar los valores de pI y PM teóricos para las 360 proteínas identificadas mediante la herramienta *Compute pI/Mw* (disponible en http://www.expasy.ch/tools/pi_tool.html) y representarlos gráficamente, se puede observar cuál es el rango de valores entre los que se encuentran estas proteínas (figura 40, página siguiente).

El menor valor de PM teórico obtenido fue de 1.352 Da y el mayor de 155.050 Da, mientras que para los valores de pI el menor fue de 4,44 y el mayor de 11,63.

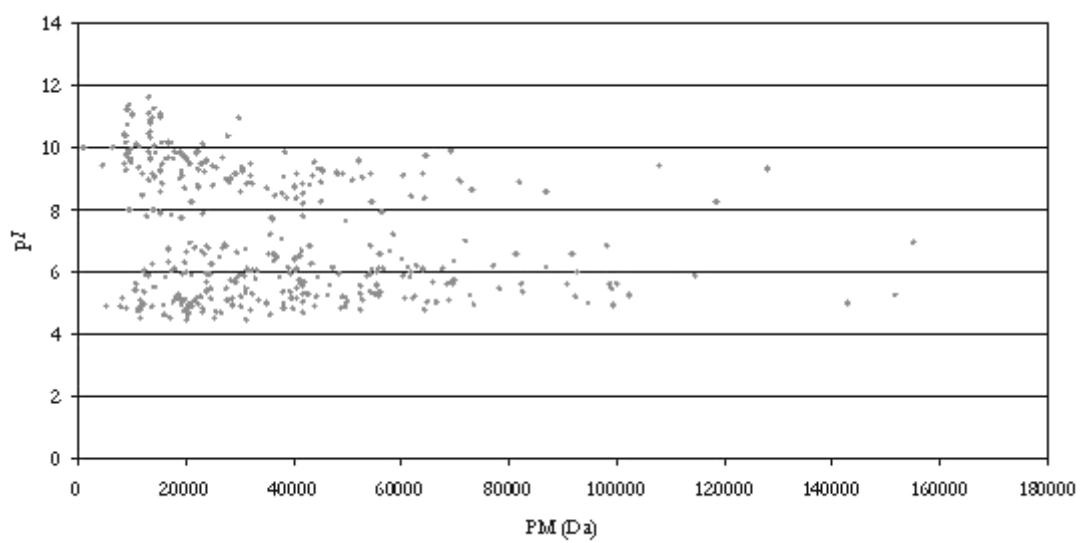


Figura 40. Distribución de los valores de pI teóricos frente a los de PM teóricos de las proteínas identificadas presentes en la tabla B1 del apartado B.5 del anexo B (página 310).

7. DISCUSIÓN

Al margen de los resultados estrictamente proteómicos presentados en esta tesis, el laboratorio de Biología Físico-Química del CIB-CSIC, Madrid, con el que se ha colaborado estrechamente durante esta investigación, caracterizó el *fitness* o adaptabilidad biológica y las diferencias en el metabolismo global desarrolladas por el clon bacteriano resistente a colistina [297]. En primer lugar, se realizaron experimentos de competitividad *in vitro* en presencia de la cepa sensible al antibiótico, mostrándose como la resistente era prácticamente desplazada tras sólo seis días después de la eliminación de la presión antibiótica [297]. Este hecho puede ser debido a 1) un descenso en el *fitness* de la cepa resistente en ausencia de colistina, 2) al desarrollo de un fenotipo inherentemente inestable asociado a la resistencia a colistina y que es fácilmente revertido en ausencia de la presión del antibiótico y 3) a una mezcla de estos dos aspectos mencionados. Para clarificar este hecho, la cepa resistente fue cultivada en ausencia del antibiótico y, en diferentes momentos de su crecimiento, fue expuesta a dos concentraciones distintas de la droga (8 y 32 μM) [297]. Se observó un decaimiento en la resistencia aunque sin alcanzarse nunca un valor igual a cero en su actividad, lo que sugiere a la opción 3, mencionada anteriormente, como la más probable. Otros indicadores del descenso de *fitness* biológico experimentado por la cepa resistente en ausencia del antibiótico fue el largo tiempo de generación (62 minutos frente a los 40 minutos que presentó la cepa salvaje) y el incremento en su susceptibilidad a la lisis promovida por detergente (LD_{50} de 0.005% para la cepa resistente y >0,1% en Tritón X-100 para la salvaje), circunstancia también observada en *Pseudomonas aeruginosa* resistente a colistina [480]. Con el fin de explorar los cambios en el metabolismo global, se examinó también la habilidad presentada por ambas cepas bacterianas para crecer en presencia de distintas moléculas como fuente única de carbono, haciendo uso de microplacas GN2 en las que se analizaron 95 sustratos distintos como fuente única de carbono en un ensayo simultáneo. La diferencia más remarcable entre la cepa susceptible y la resistente a colistina fue el significativo incremento en el crecimiento de la resistente en presencia de citrato [297].

7.1. Aproximación al proteoma de *A. baumannii* a través de 2DE convencional

La 2DE clásica y la técnica DIGE están basadas en el análisis de imagen de los patrones de expresión proteica seguido de la identificación por espectrometría de masas y constituyen aproximaciones de uso estándar en los estudios de proteómica. Aunque sus principales beneficios residen en su resolución y capacidad para separar distintas isoformas proteicas, estas técnicas son poco útiles en los análisis de proteínas hidrofóbicas, muy ácidas o alcalinas, así como de muy pequeño o gran tamaño [481].

Los análisis de 2DE convencional llevados a cabo en este estudio no tuvieron como objetivo la medición de diferencias cuantitativas en la expresión de proteínas, siendo sus únicas funciones las de optimizar los procesos de extracción y separación de proteínas seguido de la digestión enzimática e identificación por espectrometría de masas y búsqueda en bases de datos, así como el análisis descriptivo de los proteomas constituidos por la fracción de proteínas solubles o totales y por la enriquecida en proteínas de membrana en la cepa de referencia ATCC 19606 de *A. baumannii*.

De los proteomas descritos por análisis de 2DE convencional en el presente trabajo de investigación, el suscrito a la fracción de proteínas totales o solubles fue más productivo en el número de proteínas detectadas e identificadas, siendo la mayoría de ellas participantes en el metabolismo energético de la bacteria seguidas por proteínas que actúan en la expresión génica, división celular y biosíntesis y plegamiento de proteínas, para llegar a las representadas en menor proporción, es decir, aquellas que participan en el transporte a través de membrana, porinas, proteínas con dominios OMP, participantes en la comunicación y regulación de distintos procesos biológicos y las que actúan en la formación del pilus y fimbria. Entre los procesos del metabolismo energético representados destaca el metabolismo de aminoácidos por ser al que pertenece la mayoría de las proteínas metabólicas identificadas, seguido del ciclo del TCA, el metabolismo de nucleótidos, el del piruvato, el de ácidos grasos, la glicolisis y gluconeogénesis, el metabolismo del nitrógeno, el de las pentosas fosfato, la síntesis de la pared celular, la cadena de transporte electrónico, el metabolismo de vitaminas y cofactores, la síntesis de ATP y la descomposición del H₂O₂. Por su parte, el análisis de la fracción enriquecida en proteínas de membrana fue, en

comparación con el anterior, escaso en el número de proteínas detectadas e identificadas mediante 2DE convencional, estando mayoritariamente relacionadas con procesos de transporte a través de membrana, porinas, proteínas con dominios OMP y participantes en la comunicación y regulación de distintos procesos biológicos, seguidas de las relacionadas con distintas reacciones del metabolismo bacteriano y, por último, las que actúan en la expresión génica, división celular y biosíntesis y plegamiento de proteínas.

La complementariedad de los resultados obtenidos a partir de estas dos fracciones proteicas es manifiesta al tener en cuenta el bajo solapamiento observado entre las identificaciones obtenidas, encontrándose una única proteína identificada comúnmente a partir de ambas fracciones proteicas. Se trata de la proteína descrita como *Outer membrane protein A* (gi|129307154) y detectada en el *spot #46b** del extracto de proteínas totales o solubles (figura 19 y tabla 4, páginas 98 y 99 respectivamente) y en los *spots #11*, 21*, 23* y 50** del extracto enriquecido en proteínas de membrana (figura 23 y tabla 5, páginas 107 y 108 respectivamente). Así, la especificidad que presentan ambos procesos de extracción proteica es relevante al observarse como un 57% de las proteínas detectadas en el extracto de proteínas totales o solubles tiene una localización citoplasmática y un 6% en la membrana celular, frente al 62% de las proteínas de la fracción enriquecida en proteínas de membrana localizadas en la membrana citoplasmática o externa y el 10% en el citoplasma celular. El hecho de que este 10% se corresponda con proteínas citoplasmáticas debe entenderse como producto de la contaminación de esta fracción por proteínas citosólicas que persisten en este extracto a pesar de los numerosos lavados del *pellet* constituido por las estructuras membranales, llevados a cabo durante este proceso de extracción proteica.

En cuanto a las distribuciones de los valores de *pI* y *PM* teóricos se observa una mayor homogeneidad en el caso de las proteínas procedentes del extracto de proteínas totales o solubles, al presentarse la mayoría de las mismas localizadas en un estrecho intervalo de *pI* (4,00 – 7,00), de acuerdo al gradiente de pH inmovilizado de las tiras IPG utilizadas en este procedimiento, frente al intervalo de *pI* (4,00 – 9,00) en el que se encuentra la mayoría de las proteínas identificadas a partir de la fracción enriquecida en proteínas de membrana, aún cuando el intervalo de pH inmovilizado en las tiras de IPG utilizadas para su fraccionamiento fue de 3,00 a 10,00. El intervalo de valores teóricos de *PM* descrito por las proteínas identificadas a partir del extracto de proteínas totales es más amplio que el

descrito por las proteínas presentes en la fracción enriquecida en proteínas de membrana, observándose proteínas desde los 9 hasta los 110 kDa en el primero de los casos, frente a proteínas con valores de PM entre los 10 y 90 kDa en el segundo. En ambos casos se observa como la mayoría de las proteínas identificadas constituyen un conjunto bien delimitado entre valores de *pI* teórico 4,00 y 7,00 y de PM también teórico entre los 20 y 50 kDa.

7.2. Análisis cuantitativo

7.2.1. Proteoma caracterizado por análisis DIGE

La comprensión del genoma del género *Salmonella* ha permitido llegar a la conclusión de que el número de dianas letales para el desarrollo de drogas es menor del esperado debido a la robustez de su metabolismo [482], un hecho que podría ser extrapolado a *A. baumannii*. Así, más que la exploración de dianas bactericidas [483, 484], es más apropiado llevar a cabo un enfoque en los mecanismos de adaptación que permiten a la bacteria superar la acción del antibiótico. En este área, las técnicas proteómicas son útiles en la obtención de una visión global de cuáles son las adaptaciones fisiológicas, pudiendo permitir la identificación de proteínas bacterianas que, por prevención de la resistencia antibiótica, expandan el arsenal convencional de antimicrobianos [485-487].

En el caso específico de la colistina, actualmente el último recurso en la terapia antibiótica contra las infecciones producidas por *A. baumannii* multirresistente, caracterizaciones microbiológicas preliminares del fenotipo resistente [297] sugieren que dos factores, un *fitness* o adaptabilidad biológica reducida y una inestabilidad intrínseca, pueden ser responsables del desfase de la cepa resistente en ausencia de la presión ejercida por el antibiótico [297]. Con el fin de obtener un conocimiento más profundo en este fenómeno a nivel de la expresión de proteínas, se investigaron las diferencias en la expresión de proteínas entre las cepas sensibles y resistentes a colistina, adoptándose una aproximación reduccionista con el fin de evitar las limitaciones impuestas por los estudios basados en aislados clínicos y para definir un perfil de expresión proteico específico a la adquisición de

resistencia a colistina. En las siguientes subsecciones se relatan las diferencias en la expresión de proteínas reveladas por los análisis DIGE.

7.2.1.1. Arquitectura de la membrana y permeabilidad

Entre las proteínas diferencialmente expresadas anotadas por los análisis DIGE, se incluyen 3 porinas de la membrana externa, proteínas formadoras de canales que permiten la entrada de antibióticos dentro del periplasma. Las 3 proteínas pertenecen a la familia de proteínas OmpA y solamente una (#885M, *Outer membrane protein A*), tiene un valor de PM y pI teórico consistente con la teoría (tabla 6. página 114). Curiosamente, esta misma proteína también fue detectada dentro del conjunto de proteínas anotadas como #1 en los resultados del análisis de iTRAQ, tal como se puede observar en la tabla B1 del apartado B.5. del anexo B (página 310). La trascendencia que tiene la observación de esta y otras concordancias entre los resultados obtenidos por ambas técnicas cuantitativas se discute en el apartado 7.2.3 de este mismo capítulo. Las otras dos proteínas (#1085M, *Outer membrane protein HMP* y #1384M*, *Outer membrane protein A*), pueden ser degradaciones de una especie proteica preexistente o, quizás, de un procesado proteico defectuoso resultante de un sistema de proteínas chaperonas perjudicado (explicado más abajo). Una de ellas está anotada como una proteína modificable por calor (*spot #1085M*), y se la ha descrito como la porina más abundante [209, 408]. La expresión alterada de porinas se ha relacionado con la resistencia contra los carbapenemes (incluido imipenem) en *A. baumannii* [355, 408, 410]. La colistina, por otra parte, no parece requerir de porinas para pasar a través de la membrana externa, alcanzando el espacio periplasmático a través de un mecanismo de captación autopromovido que implica el reordenamiento de la estructura de la membrana externa [474]. Sin embargo, en *S. typhimurium* se ha descrito la expresión diferencial de porinas asociada a la resistencia a colistina [488], así como en *A. baumannii*, para el que se han observado niveles disminuidos en la expresión de OmpW [487]. Además, el incremento en permeabilidad de la membrana externa asociada a la resistencia a colistina se ha descrito para *Pseudomonas* [480] y *E. coli* [489], con alguna controversia en el último de los casos [490].

Curiosamente, la proteína detectada en el *spot #1556M**, *Putative outer membrane protein (CarO)*, se ha relacionado como facilitadora de la entrada de imipenem y con la resistencia a

este fármaco cuando su expresión es deficiente [406]. En el caso del presente estudio, sin embargo, cuando las dos cepas se ensayaron para la sensibilidad a imipenem en un test en disco de difusión realizado por el laboratorio de Biología Físico-Química del CIB-CSIC, Madrid, se observaron halos de tamaño similar (resultados no publicados). Una explicación plausible para explicar la similar sensibilidad a esta droga por parte de las dos cepas bacterianas es la existencia de una ruta alternativa para el influjo de imipenem en la cepa resistente, aumentando la permeabilidad de la membrana externa a pesar de la deficiencia de CarO. De hecho, el LD₅₀ para Triton X-100 necesario para lisar las células de la cepa resistente, sugiere un empaquetamiento de LPS defectivo en la membrana. Esto podría, en principio, ser debido a una pérdida de carga negativa causada por la unión del ión Mg²⁺ a moléculas de LPS vecinas y/o a la pérdida de palmitoilación del lípido A [491] (ver más abajo). Un incremento de la permeabilidad de la membrana externa también puede ser una de las causas de la alta susceptibilidad a los antibióticos descrita para cepas de *A. baumannii* resistente a colistina [492]. Esta misma proteína (#1556M*, *Putative outer membrane protein (CarO)*) también fue detectada dentro del grupo de proteínas anotado como #24 en los resultados del análisis iTRAQ, tal como se puede observar en la tabla B1 del apartado B.5. del anexo B (página 310). La trascendencia que tiene esta y otras concordancias entre las proteínas identificadas y/o cuantificadas en ambos análisis se discute en el apartado 7.2.3 de este mismo capítulo.

De comparable interés es la identificación de la proteína CsuA/B (#1578M, *CsuA/B Uncharacterized secreted protein*), involucrada en la formación de la fimbria y su proteína acomodadora CsuD (#218M, *CsuD P pilus assembly protein, porin PapC*) codificada por el mismo operón [472] y además probablemente unida a una regulación al alza concomitante. La formación de la fimbria, que mejora la habilidad de la bacteria para adherirse a las superficies, está considerada un factor de virulencia [211], en sintonía con la habilidad de *Acinetobacter* para colonizar un amplio rango de medios y la capacidad para formar biopelículas [493]. Sin embargo, la cepa resistente mostró una escasa habilidad para la formación de biopelículas al comparársela con la cepa salvaje tal como mostraron los ensayos realizados por el grupo de investigación del CIB-CSIC, Madrid (resultados no publicados).

El pilar de la resistencia a colistina en *Enterobacteriaceae* [494, 495] se basa en la remodelación del LPS, el mayor componente de la cara externa de la membrana, con el fin de prevenir la asociación de la droga con el LPS y su posterior translocación al otro lado de la membrana externa dentro del espacio periplasmático [496]. En una cepa resistente, el mecanismo de captación auto-promovido está perjudicado mayoritariamente por conjugación de unidades adicionales de ácido palmítico, causando un incremento en la hidrofobicidad del LPS [491] y/o por esterificación de grupos fosfato en el lípido A, causando un descenso en la carga negativa. Respecto al hecho de que no se identificaran proteínas directamente relacionadas con esta modificación del LPS, es interesante el significado obtenido tras una búsqueda de homología por BLAST del genoma anotado de *A. baumannii* ATCC 17978 [4], usando las enzimas involucradas en la modificación del LPS en *P. aeruginosa* y *S. typhimurium* como referencia. En este análisis no fue encontrado en *A. baumannii* ningún homólogo para PagP (una transferasa de palmitoil que incorpora un ácido palmítico adicional en el lípido A), como cabría esperar dada la estrecha y restringida distribución de este enzima [491]. Por otra parte, dos proteínas hipotéticas de *A. baumannii* (gi|49530287 y gi|126388544), homólogas a ArnT (*4-amino-4-deoxy-L-arabinose lipid A transferase*, que cataliza la esterificación de la 4-amino-4-deoxi-L-arabinosa en el grupo fosfato 4' del núcleo del lípido A [435] y dos genes ortólogos de *A. baumannii* (gi|126388667 y gi|126642783) para EptA (una transferasa que incorpora un residuo etanolamina dentro del grupo fosfato 1' del lípido A), sí fueron encontrados. La existencia de un descenso enzimático del carácter aniónico del LPS podría ser consistente con el patrón de resistencia inducida en la cepa de *A. baumannii*. Además, no se puede descartar que otras modificaciones en el LPS de *A. baumannii* y/o de su sistema de regulación estén involucrados en la resistencia a colistina a unos niveles de expresión por debajo del límite de detección de los análisis DIGE. En este aspecto, un estudio sobre la resistencia a polimixinas en *Salmonella typhimurium* [488] tampoco encontró, por electroforesis bidimensional, enzimas directamente relacionadas con la modificación del LPS.

Uno de los hallazgos de mayor relevancia en el perfil proteómico de resistencia a colistina es la expresión aumentada de la proteína identificada en el *spot* #1436M, *Putative signal peptide (OsmY)*, inadecuadamente anotada de esta manera, pero con homología significativa con la proteína OsmY, una pequeña proteína periplasmática [497] cuya inducción está asociada al shock hiperosmótico y a la actividad de las polimixinas en *E. coli* [473-475, 498].

Marcador de estrés relacionado con la continua presencia externa del antibiótico, la clase de proteínas OsmY se define por su papel proporcionando mecanismos que restauran, a veces parcialmente, la homeostasis celular, de manera que la bacteria pueda sobrevivir bajo condiciones severas. Además, para la proteína OsmY, al igual que para las polimixinas, se le sugiere un papel como proveedor de conexiones entre la cara periplasmática de la membrana interna y la externa [474, 498]. Si esto es así, la regulación al alza de OsmY puede concurrir con la presencia de colistina (polimixina E), y, de ese modo, prevenir la estasis prolongada y muerte celular. Además, mientras que se ha demostrado como las polimixinas promueven el intercambio de fosfolípidos entre estas dos monocapas [499, 500], con consecuente pérdida de la simetría de membrana, su participación en un proceso similar no se ha descrito para OsmY. Curiosamente, la expresión de OsmY en *E. coli* está íntimamente asociada con RpoS [501, 502], un factor sigma alternativo de la RNA polimerasa y regulador principal de la resistencia al estrés y de la supervivencia en condiciones de estasis [503], y que, en *S. typhimurium*, está regulado al alza en presencia de colistina [355] y otros tipos de estrés. Sin embargo, este factor sigma no ha sido descrito en *Acinetobacter* [332], haciendo las comparaciones entre *Acinetobacter* y otras *Enterobacteriaceae* algo arriesgadas. Esta misma proteína (*Putative signal peptide (OsmY)*) fue también detectada dentro del conjunto de proteínas #133 mediante el análisis iTRAQ (tabla B1 del apartado B.5. del anexo B, página 310).

7.2.1.2. Biosíntesis y plegamiento de proteínas

Los resultados de los análisis DIGE también revelaron variaciones en los niveles de expresión de proteínas involucradas en la biosíntesis de proteínas. Así, en la fracción enriquecida en proteínas de membrana se observó una expresión aumentada de la proteína ribosomal S2 (#1033M, *30S ribosomal protein S2*) por parte de la cepa resistente a colistina. Esta expresión incrementada, que persiste después de lavados repetidos de la fracción de proteínas de membrana con el fin de eliminar la contaminación por proteínas citoplasmáticas, puede estar relacionada con la expresión, también aumentada, de la proteína detectada en el *spot* #1086M, *Leader peptidase*, componente de la señal de reconocimiento o SRP (*signal recognition particle*), de las proteínas nacientes desde el ribosoma e involucrada en la correcta secreción proteica. Curiosamente, en *E. coli* se demostró que esta proteína S2 ribosomal, perteneciente a la subunidad 30S del ribosoma, interacciona

con la partícula 4.5 S RNA del SRP, junto a otras proteínas ribosomales de esta subunidad [504]. Dado que ambas proteínas (el componente SRP y la proteína S2 ribosomal), se encontraron, en este caso, con expresión aumentada en la cepa resistente, el hallazgo puede interpretarse como la tentativa por parte de la célula de asegurarse, en lo posible, una translocación apropiada de moléculas periplasmáticas a través de la membrana interna. Esto podría prevenir o minimizar el efecto del gasto energético producido por los ciclos metabólicos y como resultado de la regulación a la baja del sistema de proteínas chaperonas (ver más abajo), lo que causa defectos en el plegamiento de proteínas y un deterioro general de la biosíntesis. De la misma manera, en *Listeria monocytogenes* la expresión aumentada de esta proteína (*leader peptidase*), se asocia con la invasión de las células del hospedador, asegurando un procesamiento correcto de los factores de virulencia [505]. Estas dos proteínas comentadas (#1033M, 30S ribosomal protein S2 y #1086M, Leader peptidase) fueron también detectadas a partir del análisis iTRAQ dentro del conjunto de proteínas #30 y #44 respectivamente (tabla B1 del apartado B.5. del anexo B).

Tal como se desprende de los análisis del metabolismo global realizados por el laboratorio de Biología Físico-Química del CIB-CSIC, Madrid, el fenotipo resistente a colistina en *A. baumannii* también se caracteriza por presentar un tiempo de generación más largo que el de la cepa salvaje. Así, tras un crecimiento continuo durante meses en presencia de colistina, el tiempo de generación de la cepa resistente es de 62 minutos, frente a los 40 minutos de la cepa salvaje [297]. El crecimiento bacteriano está unido directamente a la síntesis de proteínas y a la cantidad de ribosomas activos [506]. En este sentido, también fue revelado por los resultados del análisis DIGE que la resistencia a colistina conduce a la presencia de niveles desbalanceados de los factores de elongación EF-G (#295T, Protein chain elongation factor EF-G) y EF-Tu (#1402T, Protein chain elongation factor EF-Tu), con expresión aumentada y disminuida respectivamente, y de proteínas ribosomales como la proteína L15 (#1521T, 50S Ribosomal protein L15), un componente del ensamblaje tardío de la subunidad 50S ribosomal e involucrada en la integración del componente 5S rRNA dentro del ribosoma [506]. Aunque L15 no juega un papel esencial en la biosíntesis de proteínas [507] – tal como queda evidenciado por la existencia de cepas de *E. coli* carentes de esta proteína – sí se ha constatado un incremento, en un factor de 2, en el tiempo de generación frente a su expresión defectiva [508], en concordancia con nuestros resultados. Otra proteína ribosomal, en este caso con expresión aumentada en la cepa resistente, fue identificada en

dos *spots* (#1263T, y #1272Ta, *30S Ribosomal protein S3*), co-migrando con la enzima trifosfato isomerasa (#1272Tb, *Triosephosphate Isomerase*) en el segundo de los casos. Dado que no se han descrito modificaciones posttraduccionales para S3 ni para ninguna de las otras proteínas ribosomales diferencialmente expresadas (S2 y L15) [509], se podría conjeturar un ajuste de menor importancia en la expresión de S3 como causa de su doble aparición. Dado que ambas (S2 y S3), pertenecen a la etapa del ensamblaje tardío de la subunidad menor del ribosoma – siendo la presencia de S2 indispensable para la posterior integración de S3 dentro del mismo [510] – sus expresiones aumentadas pueden contribuir al ajuste fino en los últimos pasos del proceso de traducción de proteínas. La misma proteína S2 fue detectada dentro del grupo de proteínas #30 del análisis iTRAQ (tabla B1 del apartado B.5. del anexo B) y una isoforma de la proteína S2 y otra de la S3 también fueron detectadas y cuantificadas en el mismo rango de magnitud como representantes de los grupos de proteínas #30 y #48 del análisis iTRAQ (tabla 7, página 124).

Una expresión disminuida de la mayoría de las proteínas chaperonas es otra de las observaciones remarcables observadas en el análisis DIGE, destacando el descenso significativo de la proteína Hsp60 (GroEL) (#620T y #667T, *Chaperone Hsp60 (GroEL)*), Hsp70 (DnaK) (#667T, *Chaperone Hsp70 (DnaK)*) y la proteína HslJ (#765M, *Putative signal peptide (chaperone HslJ)*). La expresión disminuida de estas proteínas debe traducirse en la existencia de efectos adversos sobre la biosíntesis de proteínas, sumado al de la perturbación observada en los niveles de expresión de las proteínas ribosomales discutida anteriormente. Así, a pesar del efecto de pérdida de permeabilidad sobre la membrana interna producido por la colistina [511, 512], en sí misma no tendría por qué producir un descenso de la adaptabilidad biológica o *fitness* en *A. baumannii*, pero la regulación a la baja del sistema de proteínas chaperonas sí causará un gasto inútil de recursos en la biosíntesis de proteínas (con plegamientos inacabados, no funcionales, etc...) y un deterioro global de la homeostasis bacteriana. Esto tiene lugar mayoritariamente de una manera inespecífica, en contraste con la pirrocoricina, otro péptido antimicrobiano que mata a *E. coli* por inhibición de la actividad ATPasa de DnaK, previniendo así el plegamiento asistido por chaperona [513].

La proteína comentada anteriormente y detectada en el *spot* #765M, *Putative signal peptide (chaperone HslJ)*, muestra, tras una búsqueda de homología por análisis de BLAST, gran

semejanza con el *meta* dominio asociado con la movilidad bacteriana, así como con la chaperona HslJ de otras bacterias. Tal como indica su nombre, *Acinetobacter* no es móvil, sin embargo, movimientos de sacudida asociados a la presencia de fimbria, sí se han descrito en *A. calcoaceticus* [514]. Con todo, dados los datos disponibles actualmente, no se le puede dar una explicación tan obvia a la expresión disminuida de esta proteína en la cepa resistente a colistina. Esta misma proteína (*Putative signal peptide (chaperone HslJ)*) lidera el grupo de proteínas #23 detectado mediante análisis iTRAQ, en el que también es cuantificada a la baja con el mismo rango de magnitud en la cepa resistente (tabla 7, página 124). La trascendencia que tiene la concordancia existente entre los resultados obtenidos por ambas técnicas para este y otros casos, se discute en el apartado 7.2.3 de este mismo capítulo.

7.2.1.3. Metabolismo

Los resultados del análisis DIGE también han revelado un elevado número de enzimas metabólicas con expresión alterada. Con el fin de complementar a los datos proteómicos, el perfil metabólico de la cepa se obtuvo mediante un sistema de microplacas GN2 con el que, el laboratorio de Biología Físico-Química del CIB-CSIC, Madrid, analizó la capacidad de crecimiento de las bacterias sobre una amplia gama de fuentes de un solo carbono [297]. En estos ensayos, la diferencia más significativa observada entre las cepas sensible y resistente a colistina fue la habilidad incrementada de la última para crecer utilizando citrato como fuente de un solo carbono, con un crecimiento modestamente superior en esta fuente de carbono que para la cepa salvaje, mientras que para otros análogos del ácido cítrico las diferencias entre ambas cepas bacterianas son considerablemente menores [297]. Esto sugeriría que la cepa confía en el ciclo de los ácidos tricarbónicos o TCA (*tricarboxilic acid*) para sus requerimientos metabólicos en concordancia con 1) la existencia de mecanismos de simporte funcional citrato-protón en el genoma de *Acinetobacter* (gi|126386938 y gi|126641054, descritas como *citrate transporter*) [515] y 2) el hallazgo por DIGE de la expresión aumentada de la isocitrato dehidrogenasa (en los *spots* #285Tb y #286T, *Isocitrate dehydrogenase*) [516], en la cepa resistente. Otra enzima cuya regulación al alza en esta misma cepa puede ser significativa dentro de este mismo contexto es la proteína detecta en el *spot* #644T y descrita como *3-Hydroxyacyl-CoA dehydrogenase*, enzima involucrada en la producción de equivalentes redox por transformación de sustratos

hidroxilados dentro de los productos ketoacil-CoA con formación de NADH. Este enzima presenta una alta homología con la 3-hidroxi-butiril-CoA dehidrogenasa, que produce acetil-CoA del catabolismo tanto de ácidos grasos, como de aminoácidos como lisina o triptófano. El acetil-CoA así generado cebaría también el ciclo del TCA, o sería empleado en rutas anabólicas.

También es destacable la expresión aumentada en la cepa resistente de las proteínas presentes en los *spots* #284T, *MaeB hypothetical Protein* y #285Ta, *putative bifunctional protein (MaeB)*, enzimas málicas con alta homología con otras enzimas málicas bacterianas unidas a la reducción de nucleótidos adenina. Su papel en el presente contexto podría sugerir una vía con la que desviar parte del malato generado en el ciclo del TCA a la producción de piruvato que, de hecho, podría alimentar la ruta gluconeogénica.

Un aumento funcional del ciclo del TCA puede incrementar, presumiblemente, los niveles de oxoglutarato, lo cual, junto con la glutamina, es interpretado por la célula con el fin de regular la asimilación de nitrógeno y ajustar así su captación. Los experimentos DIGE muestran una acusada disminución del nivel de expresión de la proteína detectada en el *spot* #1636T, *Nitrogen assimilation regulatory protein P-II 2*, en la cepa resistente a colistina. Este sistema está formado por dos proteínas pequeñas, GlnK y GlnB, que controlan el balance de asimilación de nitrógeno y carbono para evitar gastos de energía metabólica [517]. Esta regulación está mediada a través de la actividad de AmtB, una proteína de membrana que actúa como poro de amonio y que se hace inactiva por unión a la proteína GlnK, previniéndose la captación de amonio y su eventual incorporación en la síntesis de glutamina [518]. En la cepa resistente, una disminución de GlnK favorecería la síntesis de glutamina en sintonía con el presumible aumento de los niveles de oxoglutarato esperado de un ciclo del TCA incrementado. En concordancia, la enzima *glutamine synthetase*, también involucrada en el metabolismo del nitrógeno, fue identificada y cuantificada en el análisis comparativo 116/114 liderando el grupo de proteínas #54 a partir del análisis iTRAQ y presentándose también con expresión disminuida en la cepa resistente a colistina (tabla 7, página 124).

La expresión aumentada en la cepa resistente a colistina de la subunidad alpha de la glicil-tRNA sintetasa (*spot* #1028T, *Glycyl-tRNA synthetase alpha chain*), una de las pocas tRNA

sintetasas con dos, en vez de una sola, cadena polipeptídica, sorprende dada la ausencia de una regulación al alza concomitante de otras tRNA sintetasas. Una posible explicación sería la necesidad de mantener niveles adecuados de glicil-tRNA para la biosíntesis de proteínas de cara a una carencia del aminoácido glicina. Esta carencia podría estar causada por la disminuida expresión detectada, en la cepa resistente, del enzima identificado en el *spot* #877T, *Serine hydroxymethyltransferase*, enzima clave de la biosíntesis de glicina y típica de la respuesta estricta [477]. Dado el papel de la glicina en el metabolismo de los fragmentos de un solo carbono, su carencia podría afectar, entre otros procesos, a la biosíntesis de purinas y glutation, con consecuencias perjudiciales sobre el metabolismo global.

Otro hallazgo de estos análisis con significado metabólico es la expresión disminuida, en la cepa resistente, de la proteína detectada en el *spot* #1355T, *Putative ubiquinone biosynthesis protein*, involucrada en la biosíntesis de ubiquinona, lípido soluble componente de las cadenas transportadoras de electrones unidas a membrana. Como los niveles de ubiquinona están directamente relacionados con el contenido de oxígeno en el medio [519] y, dado el carácter aeróbico de *Acinetobacter*, un déficit en ubiquinona afectará severamente la capacidad metabólica de la bacteria, resultando en una producción incrementada de metabolitos dañinos de oxígeno [519]. Esto estaría además acompañado de la expresión disminuida de la proteína presente en el *spot* #1075T, *Putative iron-dependent peroxidase*, y un incremento, por tanto, en especies peróxido. La escasez de glicina comentada anteriormente con la resultante depleción de los niveles de glutation podría comprometer la eliminación de tales especies reactivas de oxígeno (ROS, *reactive oxygen species*) y contribuir al descenso de la adaptabilidad metabólica o *fitness* de la cepa resistente. Han sido descritos antibióticos que impulsan la producción de ROS en otras bacterias [520, 521].

La cepa resistente a colistina también muestra una expresión aumentada de la proteína presente en el *spot* #1275T, *Thiamine biosynthesis protein*, codificada por el gen *ThiG* e involucrada en la biosíntesis de tiamina. En su forma bifosfato, la tiamina es un cofactor de las descarboxilaciones metabólicas y, en su forma trifosfato, funciona como señal para el óptimo crecimiento en *E. coli* bajo restricción de aminoácidos [478].

Finalmente, los análisis DIGE también revelaron un regulación a la baja de la proteína presente en el *spot* #1188T, *Molybdopterin biosynthesis protein*, proteína participante en la

biosíntesis de molibdopterina, un cofactor de óxido-reductasas. En bacterias anaeróbicas facultativas como *E. coli*, las molibdo-enzimas ayudan a sobrevivir en un ambiente carente de oxígeno [519]. Sin embargo, para un aerobio estricto como *Acinetobacter*, tal función es improbable. Por otra parte, una reductasa de nitrato con molibdopterina como cofactor ha sido descrita en *A. calcoaceticus* [522] y, tanto una nitrato (gi|126387933), como una nitrito reductasa (gi|126387934), así como un transportador de nitrato (gi|1263879369) están anotados en el genoma de *A. baumannii*, sugiriéndose la capacidad de *Acinetobacter* de reducir nitrato a amonio. Incluso si este proceso se ve ralentizado por una deficiencia en la síntesis de molibdopterina, debería ser compensado por la ya mencionada disminución en la expresión de la proteína GlnK, asegurándose la captación incrementada de nitrógeno mediada por AmtB.

7.2.1.4. Resistencia a colistina y sensibilidad antibiótica

Una observación importante en la literatura que cubre la dispersión de la resistencia a colistina en *A. baumannii* es la sensibilidad incrementada a los antibióticos descrita para otras cepas resistentes a colistina [492]. En el presente análisis, dos modificaciones en el patrón proteico de expresión pueden estar unidas a la sensibilidad antibiótica. Uno de ellos es la significativa regulación a la baja de la expresión de la proteína detectada en el *spot* #1538T*, *aac(60)-Ik gene product*, en la cepa resistente. Se trata de una N-acetiltransferasa involucrada en la inactivación por acetilación en posición 6' de aminoglicósidos como amikacina, kanamicina, netilmicina y tobramicina, pero no gentamicina [476]. La regulación a la baja de esta proteína tendría un impacto funcional medio sobre la resistencia, puesto que no se observaron diferencias estadísticamente significativas ni en el MIC de amikacina ni gentamicina entre la cepa parental y resistente (datos no publicados). De hecho, *A. baumannii* no parece depender exclusivamente de este gen para la resistencia a los aminoglicósidos, presentado una batería de otras enzimas inactivadoras de este tipo de drogas [523] con las que compensar la deficiencia en la expresión de esta proteína. Otra diferencia destacable en relación con la sensibilidad frente a los antibióticos, es la expresión también disminuida de la proteína CarO (#1556M*, *Putative outer membrane protein (CarO)*), involucrada en la entrada de imipenem a través de la membrana externa [490]. Sin embargo, al no observarse variación en la sensibilidad a imipenem por parte de la cepa resistente, el

significado de esta diferencia en su expresión sin cambio en la susceptibilidad antibiótica, permanece incierto.

Finalmente, a tres de las proteínas anotadas tras análisis DIGE, no se les pudo asignar ninguna anotación funcional. La proteína presente en el *spot* #1468T, *Hypothetical protein A1S_3155* y la presente en el #1385M, *Conserved hypothetical Protein*, presentaron alta homología con otras proteínas bacterianas, pero ninguna de ellas presentó asignación funcional alguna. Para la presente en el *spot* #1135T*, *Hypothetical protein A1S_1372*, su baja homología con una liasa de hidroximetilglutaril-CoA, impide alguna interpretación sostenible.

Tomando todo junto, los resultados hasta aquí descritos muestran que el reajuste de la cepa resistente a colistina apunta claramente hacia un fenotipo sustancialmente perjudicado, que revierte a la sensibilidad una vez ausente la presión del antibiótico o que encara las consecuencias de su reducida adaptabilidad biológica o *fitness*, siendo fácilmente superada por la cepa salvaje sensible a colistina en ausencia de la misma droga. Ejemplos similares de la pérdida de *fitness* asociado a la resistencia a antibióticos se han descrito en otras bacterias [294, 295]. La adaptabilidad biológica, en suma, conlleva un compromiso entre la supervivencia bajo la presión del antibiótico y el gasto metabólico adicional que ello supone, tal como se ha observado recientemente en una cepa multi-resistente de *A. baumannii* que resultó ser menos virulenta en un modelo de virulencia basado en *Dictyostelium* [4].

7.2.2. Proteoma caracterizado por análisis de iTRAQ

Las técnicas “-ómicas” han abierto nuevas perspectivas en el estudio de las rutas metabólicas involucradas en la supervivencia y patogénesis bacteriana. En el camino de descifrar los actores principales del metabolismo bacteriano, la proteómica aborda el problema desde mejor perspectiva en lo que a los mecanismos de adaptación se refiere, comparándolo, por ejemplo, con la transcriptómica y puede, idealmente, ayudar en la identificación de proteínas bacterianas que impidan – o al menos perjudiquen – el ataque de los fenotipos resistentes [212, 485, 486]. En esta línea, se investigó la expresión

diferencial de las proteínas de membrana en *A. baumannii* sensible y resistente a colistina mediante la tecnología iTRAQ y los resultados obtenidos se discuten en las siguientes subsecciones.

7.2.2.1 Proteínas con expresión aumentada en la cepa resistente a colistina

De entre las 25 proteínas diferencialmente expresadas comunes a los análisis comparativos 116/114 y 117/115, 9 proteínas presentaron su expresión regulada al alza (tabla 7, página 124). De estas, 2 están relacionadas con el transporte a través de membrana y con la adquisición de resistencia. En las bacterias Gram-negativas la membrana externa limita el nivel de entrada de antimicrobianos en la célula y las bombas de expulsión de múltiples drogas expulsan muchas clases de antimicrobianos estructuralmente distintos fuera de la célula. La resistencia múltiple está normalmente asociada a la expresión aumentada de estos transportadores [524], a los que se ha agrupado en 6 familias distintas: 1) la familia ABC (*ATP binding cassette*), 2) la superfamilia MFS (*major facilitator superfamily*), 3) la familia RND (*resistance-nodulation-division*), 4) la familia MATE (*multidrug and toxic compound extrusion*), 5) la familia SMR (*small multidrug resistance*) y 6) la superfamilia DMT (*drug/metabolite transporter*).

De entre las 25 proteínas diferencialmente expresadas comunes a los análisis comparativos 116/114 y 117/115, la proteína con el mayor nivel de sobre-expresión fue la anotada como #116, *Putative ABC transporter ATP-binding protein*, uno de los miembros de la familia ABC de transportadores, única familia de transportadores que utiliza la hidrólisis del ATP como fuerza directriz para bombear hacia el medio extracelular los distintos sustratos. En *Acinetobacter*, así como en otras bacterias Gram-negativas, los transportadores ABC no son los principales responsables de la expulsión de antibióticos como aminoglicósidos, eritromicina, tetraciclinas y, en parte, fluoroquinolonas [408]. De hecho, los procesos parecen ser llevados a cabo mayoritariamente por miembros de la familia RND de transportadores a la que pertenece otra de las proteínas con uno de los mayores niveles de expresión, presentándose también aumentada en la cepa resistente (#50, *RND superfamily-like exporters*) y para la que este hecho, en aislados clínicos de cepas resistentes de *Acinetobacter*, también ha sido documentado [387].

Otras proteínas con expresión aumentada en la cepa resistente son enzimas relacionadas con distintas rutas metabólicas. La proteína #84, *Phenylacetate-CoA oxygenase/reductase PaaK subunit*, es responsable de la hidroxilación del fenilacetato de CoA y otros análogos tales como la fenilalanina-CoA, como segundo paso en su degradación catabólica. La comparación genómica de tres cepas distintas de *Acinetobacter* mostró al aislado clínico multirresistente AYE con mayor versatilidad metabólica que otras cepas susceptibles [525]. De la misma manera, a ciertas cepas clínicas de *A. calcoaceticus* capaces de crecer en fenilacetato se las ha asociado a un patrón de resistencia media a los antibióticos [526], lo que sugiere un *fitness* metabólico disminuido de la cepa resistente a colistina bajo condiciones clínicas. En otro patógeno oportunista de importancia, *Burkholderia cenocepacia*, una ruta catabólica funcional del ácido fenilacético se ha observado como requerimiento para una patogenicidad completa [527].

Una segunda proteína metabólica con expresión aumentada en la cepa resistente es la #127, *Electron transfer flavoprotein beta-subunit*, uno de los miembros de la gran familia EFT (*electron transfer flavoproteins*), que nutre de electrones a los sustratos ubiquinona durante la respiración. Su gen en *A. baumannii* está adyacente al de la subunidad alfa, con la que forma un dímero funcional. El hecho de que su expresión se encuentre aumentada en la cepa resistente puede ser causa o efecto de un incremento potencial en la actividad respiratoria y un aumento del gradiente de protones, que, de hecho, asegura la fuerza motriz adecuada para ser usada, entre otros fines, como activadora de los mencionados transportadores de membrana pertenecientes a la familia RND. Otro aspecto del incremento en la actividad respiratoria es que, en el caso de desacople o escasa suplementación de sustratos, puede ser provocado un estrés oxidativo por incremento de la producción de compuestos superóxidos.

La proteína #63, *Catalase*, es una enzima con alta analogía con la hidroxidasa tipo II (HP II) que cataliza la conversión del peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno molecular y protege a la célula de los efectos tóxicos de los peróxidos generados bajo condiciones de estrés oxidativo. El papel de la catalasa tipo HP II en fase estacionaria de crecimiento puede reducir el impacto del estrés oxidativo resultante de la elevada actividad respiratoria mencionada anteriormente [528]. En *E. coli*, la expresión de la catalasa es dependiente de RpoS, un factor de transcripción inducido por, entre otros estímulos, condiciones

hiperosmóticas [501]. Aunque este factor no se ha descrito en *A. baumannii*, la inducción de estrés osmótico por la presencia de colistina está bien documentada [332], aunque el mecanismo preciso por el que tiene lugar permanece incierto.

Otra enzima con expresión aumentada en la cepa resistente es la anotada como #280, *Glutamate-1-semialdehyde aminotransferase*, catalizadora de la formación del ácido 5-amino-levulínico dentro de la ruta de síntesis de grupos hemo y cuya secuencia está altamente conservada entre las bacterias [529]. En *Salmonella*, mutaciones del gen *hemL* protagonizan la formación de variantes de colonias pequeñas, un fenotipo caracterizado por una elevada persistencia celular, pero reducida virulencia *in vivo* [530]. Curiosamente, en *E. coli* el gen *hemL* es uno de los genes controlados por el sistema PhoP-PhoQ que desciende el carácter aniónico del LPS e incrementa la resistencia a colistina [531].

Otras proteínas con regulación al alza en la cepa resistente a colistina son aquellas involucradas en la inserción en la membrana de otras proteínas, las cuales, en bacterias Gram-negativas como *E. coli*, representan el 20% y el 2% de su proteoma para las proteínas de membrana interna y externa respectivamente [532], y constituyen las principales dianas de la colistina. Así, la proteína #123, *Preprotein translocase subunit SecA*, está involucrada en la translocación de proteínas desplegadas a través de la membrana, un papel que incluye tanto la translocación de dominios hidrofílicos como la integración de los segmentos hidrofóbicos dentro de la membrana [533] utilizando la hidrólisis del ATP como fuerza directriz. De esta manera, la asociación de SecA con precursores de proteínas de la familia OmpA es necesaria para la translocación y correcta inserción en la membrana de una manera ATP-dependiente [534]. Por otra parte, una expresión defectiva de SecA está unida a la baja expresión del receptor de *acinetobactin* en la membrana externa, un sideróforo necesario para la adquisición de hierro [535].

También con expresión aumentada en la cepa resistente se encuentra la proteína #57, *Putative ClpA/B-type chaperone*, una chaperona tipo ClpA/B dependiente de ATP que protege a la célula del estrés por control de la agregación y desnaturalización de estructuras celulares vitales. El dominio de unión al ATP se encuentra localizado en una o dos copias del extremo N-terminal de ClpA y ClpB y regula la actividad de ClpP, una proteinasa inespecífica que desempeña su papel en la supervivencia de células que no están en

crecimiento o en división lenta, así como en el estrés oxidativo o por choque térmico [536]. Los mutantes de esta proteinasa son incapaces de alcanzar la fase de crecimiento exponencial tardía con algunas similitudes con la estasis producida por colistina.

Finalmente, la última proteína con expresión aumentada en la cepa resistente es la #335, *Hypothetical protein A1S_3482*, proteína de 27kDa con función biológica desconocida, pero para la que una búsqueda de homología por BLAST mostró cierta analogía con una glicosiltransferasa de LPS de *Thermus thermophilus* (gi|46198588). Aún así, se debe tener precaución a la hora de buscar paralelismos entre el género *Thermus* y *Acinetobacter*. Por otra parte, la presencia de extensiones altamente catiónicas en A1S_3482, que pueden competir de alguna manera con la unión de colistina, debe mencionarse.

7.2.2.2. Proteínas con expresión disminuida en la cepa resistente a colistina

Entre las 25 proteínas diferencialmente expresadas comunes a ambos análisis comparativos (116/114 y 117/115), 16 se mostraron con expresión disminuida en la cepa resistente a colistina (tabla 7, página 124).

La proteína #18, *Putative long-chain fatty acid transport protein*, se presenta, tras una búsqueda de homología por BLAST, perteneciente a la familia de proteínas de la membrana externa FadL/Tox, involucradas en la translocación, desde el medio extracelular hasta el periplasma, de sustratos altamente hidrofóbicos tales como los ácidos grasos de cadena larga (FadL) o hidrocarburos aromáticos (Todx) [537, 538]. Mutantes FadL manifiestan una capacidad perjudicada para crecer utilizando cadenas largas de ácidos grasos como única fuente de carbonos, viéndose limitada así la versatilidad metabólica de *A. baumannii*. Por otra parte, la expresión disminuida de FadL se ha relacionado con la resistencia al ácido nalidíxico en *E. coli* [539], así como frente a otros antibióticos en el género *Haemophylus* [540], probablemente por prevención de la entrada de los correspondientes agentes nocivos.

La proteína #99, *Putative acyl-CoA dehydrogenase*, regula específicamente el catabolismo de ácidos grasos por catálisis de la deshidrogenación en posición α y β del trans-enoil CoA. En *Salmonella*, la expresión de esta proteína está relacionada con parte de la respuesta adaptativa

a ayuno [541]. Claramente, puede verse como un procesamiento defectivo de los sustratos de ácidos grasos acoplado a un transporte también defectivo de los mismos a través de membrana, ya comentado previamente, puede causar un empeoramiento sustancial de la versatilidad metabólica de la cepa resistente a colistina de *A. baumannii*.

A parte de esta inadaptabilidad metabólica, la más destacada característica del proteoma de la cepa de *A. baumannii* resistente a colistina caracterizado por iTRAQ es la expresión disminuida de muchas proteínas estructurales de la membrana externa (10 de las 16 proteínas con expresión disminuida, el 62%), incluyendo porinas y miembros de la familia de proteínas OmpA, cuya relevancia en la relación patógeno/hospedador se ha hecho cada vez más evidente en los últimos años. Las proteínas con dominio OmpA son citotóxicas en las células de mamíferos, siendo capaces de translocarse a través de la membrana plasmática de la célula del hospedador y localizarse en el núcleo de la misma [542, 543]. Las porinas, por su parte, en adición a sus propiedades como formadoras de canales que permiten el transporte de solutos (preferentemente hidrofóbicos) a través de membrana, están también relacionadas en la adhesión célula-célula y en la unión de compuestos bactericidas a la superficie de las células bacterianas Gram-negativas. Variaciones en su estructura y/o en la regulación de su expresión son estrategias de supervivencia desarrolladas por las bacterias bien conocidas, incluidas las del género *Acinetobacter* [408], con el fin de evadir la presión ejercida por la acción del antibiótico. Esta tendencia hacia la expresión disminuida en la cepa resistente de este tipo de proteínas también fue puesta de manifiesto mediante el análisis DIGE discutido en el apartado anterior de este mismo capítulo.

La proteína #4, 34 kDa *Outer Membrane Protein*, se encuentra regulada a la baja en la cepa de *A. baumannii* resistente a colistina en este estudio y ha sido también documentada su expresión disminuida en aislados clínicos resistentes a imipenem [410]. En términos funcionales, no se observó ninguna diferencia significativa en la susceptibilidad a este antibiótico por parte de la cepa resistente a colistina [297]. Otras proteínas con dominio tipo OmpA y con expresión disminuida en la cepa resistente a colistina son la proteína #82, *Putative outer membrane protein*, también conocida como antígeno de superficie Bac e involucrada en distintos procesos de secreción a través de la membrana externa y la proteína #5, también descrita como *Putative outer membrane protein*, con su dominio OmpA en el extremo C-terminal.

La proteína #32, *OmpA/MotB*, es un heterodímero involucrado en la translocación protónica acoplada a la movilidad del flagelo en *E. coli*. Sin embargo, esta superestructura está ausente en *Acinetobacter* y, dado que la disfunción de este sistema conlleva a una acidificación intracelular en *E. coli* [544], en *A. baumannii* se podría especular que su expresión disminuida contribuye a solucionar parcialmente la fuga de protones debida a la mayor permeabilidad de la membrana externa descrita para la cepa resistente a colistina [297].

La expresión disminuida de la proteína #126, *Host factor I for bacteriophage Q beta replication*, una proteína de 17 kDa, podría estar relacionada con los niveles de expresión de las proteínas OmpA. La característica más relevante de esta proteína es su dominio Hfq cercano al extremo N-terminal con el que actúa como proteína chaperona promoviendo la unión de pequeñas moléculas de RNA con sus mRNA respectivos [479]. Mutaciones en esta proteína conducen a la pérdida de la virulencia dentro de células macrófagas por parte de *Salmonella* [545], *E. coli* [546] o *Neisseria* [547]. Este factor es una proteína abundante con entre 50.000 y 60.000 copias por célula y mayoritariamente citoplasmática, lo que hace a la interpretación de la variación de su expresión en esta fracción enriquecida en proteínas de membrana de la cepa resistente a colistina, más incierta aún. Tentativamente, se podría proponer que, en *A. baumannii*, Hfq puede gobernar la vida media de las proteínas OmpA por desestabilización del mRNA de las mismas [548]. Dado que un descenso en su expresión en la cepa resistente podría resultar en un incremento en la expresión de OmpA (al contrario de lo observado experimentalmente), una interpretación alternativa, en ausencia de datos a nivel del mRNA, propondría que el dominio Hfq puede compensar, en términos de expresión proteica, una caída aún más drástica del mRNA de proteínas OmpA.

Otras dos proteínas con regulación a la baja en la cepa resistente a colistina son la proteína #156, *Omp38 precursor* y la proteína #1, *Outer membrane protein omp38 precursor*. Ambas presentan una alineación perfecta excepto por la sustitución de un residuo de Thr en posición 216 por uno de Ala en el segundo de los casos. Esta proteína está descrita como responsable de la apoptosis inducida por *A. baumannii* en células de mamíferos [549], actuando como factor de virulencia. La segunda de las proteínas comentadas lidera el grupo #1 de proteínas dentro del cual se encuentra una proteína también identificada y cuantificada con el mismo orden de magnitud por el análisis de DIGE (#885M), resultados

discutidos en el apartado 7.2.2 de este mismo capítulo. La trascendencia que tiene esta y otras concordancias entre ambos análisis cuantitativos se discute en el apartado 7.2.3. de este mismo capítulo. La expresión disminuida de estas proteínas puede contribuir consecuentemente a la baja virulencia observada para la cepa resistente a colistina cuando es analizada en un modelo de virulencia basado en *Dictyostelium* (Fernández-Reyes, resultados sin publicar). La proteína #24, *Putative outer membrane protein*, es una proteína putativa de la membrana externa de 233 residuos que presenta una baja homología (de tan solo un 30%) con la proteína Omp25, haciendo muy arriesgada la interpretación en este caso. Esta proteína aparece también identificada y cuantificada con el mismo rango de magnitud como resultado del análisis de DIGE (#1556M*).

La proteína #113, *Putative membrane protein*, tiene tres dominios transmembrana previstos, lo que la haría estructuralmente distinta a las proteínas que presentan motivos en barril β , más comunes en las porinas. Si la regulación a la baja de su expresión en la cepa resistente puede estar relacionada con la reorganización de la membrana externa debida a cambios en el patrón proteico o a modificaciones del LPS, permanece en el campo de la especulación.

Finalmente, cuatro proteínas con expresión diferencial cuantitativa e identificadas comúnmente en ambos análisis comparativos (116/114 y 117/115), se presentan sin anotación funcional alguna. Dos de ellas, las proteínas #106 y #23 descritas ambas como *Putative signal peptide*, tienen anotadas cadenas polipeptídicas de 183 y 277 residuos, respectivamente. Sin embargo, debido a sus considerables tamaños, ambas deberían ser excluidas de tal clasificación. La última de ellas muestra homología con los miembros de la superfamilia META, pero también con la proteína HsIJ (*Heat-shock HsIJ*) de *A. baumannii* ACICU [339]. En *E. coli*, los mutante defectivos en esta proteína presentan una susceptibilidad incrementada a novobiocina [550, 551]. Esta proteína lidera el grupo #23 de proteínas dentro del cual se encuentra, tal como se puede observar en la tabla B1 del apartado B.5. del anexo B (página 310), otra proteína identificada y cuantificada en el análisis de DIGE (#765M) (figura 27 y tabla 6, páginas 113 y 114 respectivamente). La repercusión que tiene esta y otras concordancias observadas entre los resultados obtenidos por ambos análisis se discute en el apartado 7.2.3. de este mismo capítulo. La otra proteína comentada (#106), no presenta homología significativa a parte de otras proteínas anotadas

también como hipotéticas, por lo que cualquier interpretación a cerca de su disminuida expresión en la cepa resistente sería imprudente.

La proteína #35, *Peptidoglycan-associated lipoprotein precursor*, posee un dominio con un 99-100% de homología con el dominio de las proteínas OmpA, siendo más estrecha esta homología con la proteína OprL de *Pseudomonas aeruginosa*. En este organismo, el mutante doble OprL/OxyR presenta una susceptibilidad incrementada frente a H₂O₂ relativa a OxyR, especialmente en aislados de biopelículas. Sin embargo, pareciera que la proteína OprL actúa previniendo la hinchazón de la membrana bajo estrés oxidativo, así como jugando un papel en la captación de nutrientes [528].

Por último, la proteína #107, *Putative peptidoglycan-binding LysM*, presenta dos dominios bien diferenciados, un dominio BON N-terminal involucrado en la unión a fosfolípidos y un dominio LysM C-terminal con sitios de unión al peptidoglicano [552], normalmente presente en enzimas participantes de la degradación de la capa de peptidoglicano. Esta proteína puede, presumiblemente, actuar como puente entre el peptidoglicano y los fosfolípidos de membrana desde el periplasma.

En resumen, tres aspectos generales han emergido de este análisis mediante iTRAQ de la resistencia a colistina en *A. baumannii*. Primero, una expresión aumentada de transportadores; segundo, un cambio en su capacidad para la utilización de ácidos grasos, hallazgo quizá parcialmente provocado por el hecho de que nuestro análisis está suscrito a la fracción de proteínas de membrana. Aún así, es particularmente remarcable la capacidad incrementada para metabolizar fenilacetato en conjunción con el uso reducido de ácidos grasos de cadena larga como fuente de carbono. El tercero y más importante de estos aspectos es la sustancial reorganización de la arquitectura y composición de membrana por parte de este organismo, con especial énfasis en los miembros de la familia OmpA de proteínas constituyentes de la membrana externa.

7.2.3. Comparativa DIGE vs. iTRAQ

Tradicionalmente, el perfil proteico ha sido estudiado a través del análisis de la expresión de mRNA, pero, dado que la molécula efectora es normalmente la proteína, actualmente hay un interés creciente en el análisis de perfiles proteicos cuantitativos. Aunque los métodos usados en proteómica siguen una tendencia hacia la reducción de la complejidad del proteoma objeto de estudio, la cobertura de los análisis proteómicos - comparada a la alcanzada por los genómicos - permanece aún pequeña. Por ejemplo, una plataforma de *microarray* puede contener entre 20 y 40 mil elementos únicos sobre un solo soporte y, en comparación, la cobertura proteómica obtenida por un gel bidimensional es aproximadamente de 2.000 proteínas, un 2% del proteoma total. Por este motivo, actualmente se mantiene un significativo reto hacia el incremento de la cobertura alcanzada por las técnicas usadas en proteómica.

Una importante cuestión a resolver es cómo se comparan entre sí los distintos métodos usados en proteómica en cuanto al número de proteínas identificadas y cuantificadas. Las técnicas DIGE e iTRAQ son conocidas en el campo de la proteómica como técnicas potentes en el estudio comprensivo de los cambios en la expresión de proteínas y ofrecen un alto grado de complementariedad en los resultados por ellas obtenidos. Cuando muestras semejantes se analizan por ambas aproximaciones normalmente se obtiene un bajo solapamiento entre las proteínas identificadas. En un trabajo relativamente reciente comparando los datos procedentes de 2DE e iTRAQ después de que un modelo en rata fuese tratado con el carcinogénico N-nitrosomorfolina, se identificaron 57 proteínas diferencialmente expresadas a partir de 2DE y 98 a partir de iTRAQ [553]. De los biomarcadores identificados, el 63% (36 de los mismos) se identificó a partir de ambas aproximaciones y los cambios en la expresión de 26 de los mismos fueron confirmadas por ambas técnicas. Estos resultados sugieren que ambos métodos funcionan bien y que existe complementariedad en la identificación de las distintas proteínas [553].

Comparado con la 2DE convencional, la técnica DIGE es mucho más ventajosa al resolverse en un mismo gel distintas muestras para su comparación. La imagen descrita por el patrón proteico presente en cada muestra se captura separadamente, pero, al estar las muestras presentes en el mismo gel, pueden superponerse perfectamente para su

comparación sin que se produzcan distorsiones. Este hecho reduce el número de geles que debe procesarse con el fin de obtener una comparación estadísticamente válida y permite la cuantificación de los cambios en la expresión de proteínas entre muestras distintas. Los *spots* proteicos que cumplen los criterios definidos por el investigador son extraídos del gel para su digestión enzimática e identificados por análisis de espectrometría de masas.

Obviamente, no todas las proteínas presentes en las muestras analizadas pueden ser identificadas por 2DE convencional dadas las conocidas limitaciones que presentan estos métodos, tales como la precipitación de proteínas muy grandes o hidrofóbicas, así como las variaciones gel a gel. Estos problemas pueden ser parcialmente superados por la aplicación de la técnica DIGE gracias a la anteriormente comentada separación paralela de todas las muestras dentro de geles únicos. Sin embargo, sólo las proteínas que contienen lisina son susceptibles al marcaje por los fluoróforos CyDyes y la introducción de estos marcadores causa variaciones de las proteínas, particularmente en la región de proteínas de bajo peso molecular, perjudicándose, en algunos casos, la identificación de las mismas [554].

En las plataformas basadas en geles de electroforesis, las isoformas de proteínas y la co-migración afectan a la sensibilidad y precisión de la cuantificación respectivamente. Ha sido demostrado que los productos proteicos de un solo gen pueden presentar una media de entre 10 y 15 *spots* distintos y que esta micro-heterogeneidad es atribuible a las modificaciones posttraduccionales y degradaciones proteolíticas, entre otras causas [555, 556]. La presencia de isoformas de proteínas afecta también en los estudios cuantitativos al reducir la sensibilidad de los mismos. Se ha observado como más de un tercio de los *spots* proteicos en un gel bidimensional contienen 2 ó más proteínas [557] como resultado de la co-migración de proteínas dentro de un mismo *spot*, lo que hace a la comparación cuantitativa imprecisa. Para las proteínas que co-migran parcialmente los programas informáticos de detección de *spots* disponibles no son lo suficientemente robustos como para identificar sin ambigüedad las bandas de *spots*, mientras que la detección manual está predispuesta a la ocurrencia de errores causados por la subjetividad a la hora de describir un *spot* dado. En un estudio en el que se comparó la técnica DIGE con la del marcaje metabólico en *Saccharomyces cerevisiae*, todos los *spots* seleccionados en el gel DIGE para la evaluación cuantitativa contenían una proteína única [558], ilustrándose como la precisión

de la cuantificación DIGE (y su evaluación comparativa frente a la otra técnica) era mayor cuando una sola proteína estaba presente en cada *spot*.

Para detectar proteínas que no pueden ser separadas por técnicas basadas en geles de electroforesis deben aplicarse métodos basados en la cromatografía líquida. Aunque por sí mismas estas aproximaciones no permitirían realizar cuantificaciones directas [559], y exceptuando a los numerosos resultados que están obteniéndose tras el desarrollo de métodos cuantitativos basados en la cromatografía líquida y espectrometría de masas sin necesidad de marcaje químico alguno, las técnicas de derivatización química de proteínas o péptidos por marcaje con isótopos estables (como los del iTRAQ), son muy útiles, permitiendo la cuantificación basada en la espectrometría de masas. En un análisis iTRAQ, la solución resultante tras la digestión enzimática de cada muestra proteica se marca con uno de los reactivos disponibles, responsables de la producción de los iones reporteros en el espectro de MS/MS que proporcionarán las bases de la cuantificación. Los marcadores usados en la técnica iTRAQ se unen específicamente a los grupos N-terminales y residuos de lisina accesibles en los péptidos y, aunque cada reactivo tiene la misma masa total, una señal distintiva única se obtiene tras su fragmentación, con la que se puede comparar cantidades de péptidos a partir de sus intensidades en los espectros de MS/MS. Tras la fragmentación de los péptidos, distintos iones reporteros se obtienen a partir del isótopo estable dentro del marcador, de manera que las áreas de los picos descritos por estos iones en el espectro de MS/MS se usan para llevar a cabo la cuantificación. De esta manera, puede establecerse una correlación entre las áreas de los picos de los iones reporteros y el *ratio* de las concentraciones de sus proteínas respectivas dentro de la muestra.

Las aproximaciones basadas en la cromatografía líquida no producen resultados que se vean afectados por la presencia de distintas clases de proteínas ni son propensos a las típicas limitaciones de la electroforesis como la precipitación de las mismas [559]. La transferencia de la separación molecular desde un nivel proteico hasta uno peptídico viene acompañado de un incremento en la complejidad de la muestra que, a su vez, se ve compensado por la superior resolución que presenta la separación peptídica basada en la cromatografía líquida frente a la de las separaciones proteicas basadas en la 2DE. Así, el marcaje iTRAQ requerido en una cuantificación por espectrometría de masas se introduce en una etapa más tardía del análisis [559]. Con todo esto, aún no se pueden excluir

totalmente las pérdidas inespecíficas de proteína antes del mezclado de las muestras respectivas y la identificación de un inventario de proteínas mayor por una única aproximación proteómica es difícil.

El marcaje peptídico global seguido del fraccionamiento de la muestra para reducir su complejidad antes de los análisis cuantitativos, convierten al iTRAQ en la técnica de marcaje cuantitativo basada en la espectrometría de masas más beneficiosa, por encima de otras como el ICAT o su variante cICAT [560]. El iTRAQ, basado en la cromatografía líquida, se pensó que sustituiría progresivamente a las técnicas basadas en la 2DE, pero estudios comparativos entre ambas técnicas han revelado la complementariedad de los resultados obtenidos por las mismas [560].

Mientras que la técnica DIGE puede detectar diferencialmente la presencia de modificaciones postraduccionales que cambien la carga de la proteína (como por ejemplo las fosforilaciones) o su peso molecular (como por ejemplo las glicosilaciones), este fenómeno no puede ser observado por la técnica iTRAQ, aunque esta última se ve beneficiada gracias a que, con ella, se lleva a cabo el aislamiento de múltiples péptidos por proteína. Los péptidos de cada proteína aislados en un experimento iTRAQ permiten realizar análisis estadísticos que proporcionan una mayor confianza en los *ratios* medidos.

En estas técnicas *off-gel*, solamente una pequeña fracción de los péptidos marcados es realmente analizada por el espectrómetro de masas, limitación principalmente debida a la capacidad de carga que presentan las distintas columnas cromatográficas utilizadas. Así, se puede estimar que menos de un décimo de la cantidad inicial de proteínas es realmente introducida dentro del espectrómetro de masas [560]. La estimación precisa es compleja porque la extensión de la transferencia de masa de las plataformas de MS no se conoce del todo. Para los métodos basados en la 2DE, todas las proteínas son depositadas sobre una tira de IPG y la transferencia de proteínas al gel de acrilamida de la segunda dimensión y desde los *spots* proteicos de tamaños diferentes al espectrómetro de masas, sólo puede ser estimada de manera aproximada.

Entre los objetivos del presente trabajo de investigación se planteó determinar cuáles de las proteínas de *A. baumannii* están diferencialmente expresadas como consecuencia de la

inducción de su resistencia frente al antibiótico colistina. Para este objetivo se usaron dos técnicas proteómicas de marcaje cuantitativo, la técnica DIGE y la tecnología iTRAQ. La complementariedad de estas dos técnicas permitió realizar un análisis comprensivo del fenotipo resistente a colistina manifestado por *A. baumannii* en nuestro modelo experimental, identificándose un significativo número de proteínas diferencialmente expresadas. También nos ha permitido hacer una comparación de los resultados producidos por cada estrategia proteómica y de la reproducibilidad de las cuantificaciones realizadas, discusión en auge en la investigación proteómica [560-563].

En comparación con las técnicas basadas en geles de electroforesis usadas en esta tesis, el iTRAQ detectó un mayor número de proteínas de tamaños menores y mayores a los detectados por estas, así como con puntos isoelectricos más elevados que los presentados por las proteínas detectadas en estos métodos electroforéticos. El conjunto de proteínas detectadas por las diferentes técnicas tienen sus puntos isoelectricos por encima de 4, lo que no es de extrañar dado el rango de *pI* al que se analizaron las proteínas en los análisis de 2DE convencional y DIGE, y al estudio centrado en las proteínas de membrana, mayoritariamente básicas, realizado mediante iTRAQ. Comparado con el análisis DIGE, el de iTRAQ identificó dos veces más proteínas diferencialmente expresadas, con 68 grupos de proteínas frente a los 34 *spots* del método basado en la electroforesis. Un 32% de las proteínas identificadas por DIGE (11 de las 34), fueron también identificadas por iTRAQ, siendo 23 las proteínas identificadas únicamente usando la aproximación DIGE en esta comparación. La figura 41 (página siguiente) representa el solapamiento de los resultados obtenidos por ambas técnicas.

Como se puede observar, las 3 proteínas cuantificadas en común mostraron una regulación similar entre ambas técnicas y, aunque hay diferencias en la identificación específica de proteínas, los procesos metabólicos en los que las proteínas están involucradas son similares y en algunos casos presentan el mismo cambio en sus niveles de expresión, tal como se puede observar en la tabla 8 (página 166).

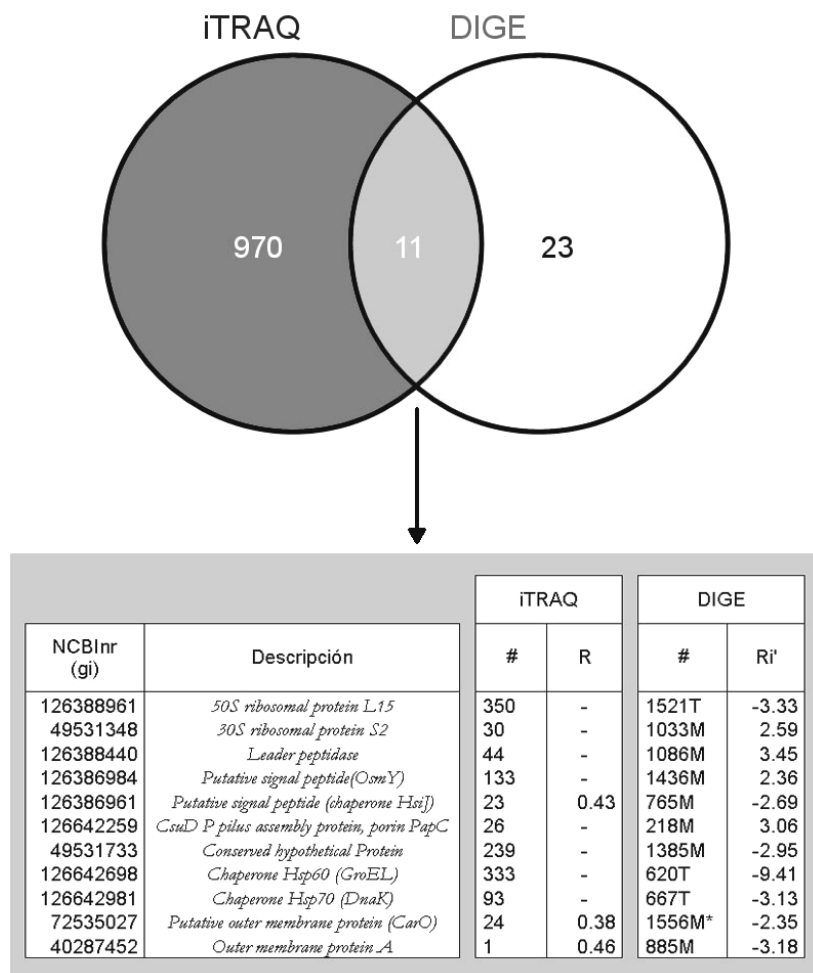


Figura 41. Diagrama de Venn en el que se muestra el solapamiento mostrado por los resultados obtenidos tras el análisis de la expresión diferencial cuantitativa mediante DIGE e iTRAQ. Las 11 proteínas comunes identificadas en ambos análisis cuantitativos aparecen anotadas.

Tabla 8. Proteoma de expresión diferencial caracterizado por ambas técnicas cuantitativas (iTRAQ y DIGE). El símbolo #, coincide con la anotación presente en las tablas de resultados correspondientes a cada análisis; ↑, indica expresión aumentada en la cepa resistente a colistina; ↓, indica expresión disminuida en la misma cepa y para el caso del iTRAQ se indica el análisis comparativo 116/114 ó 117/115 para aquellas que fueron cuantificadas en tan sólo uno de ellos.

#	Descripción	NCBIInr (gi)	iTRAQ	DIGE
Formación de biopelículas, síntesis del pilus o fimbria				
147	<i>baemin storage system HmsR protein</i>	126642205	↑ 117/115	
1578M	<i>CsuA/B Uncharacterized secreted protein</i>	126642263		↑
218M	<i>CsuD P pilus assembly protein, porin PapC</i>	126642259		↑
Respuesta a estrés				
1436M	<i>Putative signal peptide(OsmY)</i>	126386984		↑
57	<i>Putative ClpA/B-type chaperone</i>	126641353	↑	
Transporte, porinas, proteínas OMP, organización de la membrana				
8	<i>RND family drug transporter</i>	88758806	↑ 116/114	
19	<i>RND family drug transporter</i>	88758802	↑ 117/115	
29	<i>RND family drug transporter</i>	88758800	↑ 116/114	
50	<i>RND superfamily-like exporters</i>	126640221	↑	
116	<i>Putative ABC transporter ATP-binding protein</i>	126643230	↑	
123	<i>Preprotein translocase subunit SecA</i>	162286722	↑	
1085M	<i>Outer membrane protein HMP</i>	21666310		↑
32	<i>OmpA/MotB</i>	126641241	↓	
1384M*	<i>Outer membrane protein A</i>	109675218		↓
885M	<i>Outer membrane protein A</i>	40287452		↓
1	<i>Outer membrane protein omp38 precursor</i>	75438841	↓	
156	<i>Omp38 precursor</i>	148839593	↓	
24/1556M*	<i>Putative outer membrane protein (CarO)</i>	72535027	↓	↓
4	<i>34 kDa Outer Membrane Protein</i>	82654966	↓	
5	<i>Putative outer membrane protein</i>	126640934	↓	
82	<i>Putative outer membrane protein</i>	126642177	↓	
113	<i>Putative membrane protein</i>	126640829	↓	
34	<i>Putative glucose-sensitive porin (OprB-like)</i>	126642873	↓	
359	<i>Putative mechanosensitive ion channel</i>	126642124	↓ 116/114	
18	<i>Putative long-chain fatty acid transport protein</i>	126642803	↓	
148	<i>Transport protein of outer membrane lipoproteins</i>	126642648	↓ 117/115	
36	<i>putative membrane protease subunit</i>	126642789	↓ 117/115	
46	<i>organic solvent tolerance protein precursor</i>	126641591	↓ 117/115	
10	<i>hypothetical protein A1S_1295</i>	126641341	↓ 116/114	
Expresión génica, síntesis y plegamiento de proteínas				
122	<i>50S ribosomal protein L1</i>	160166883	↑ 116/114	
12	<i>50S ribosomal protein L2</i>	160419217	↑ 117/115	
1521T	<i>50S Ribosomal protein L15</i>	126388961		↓
88	<i>50S ribosomal protein L16</i>	126643089	↓ 116/114	
101	<i>50S ribosomal protein L20</i>	60390407	↓ 116/114	
1033M	<i>30S ribosomal protein S2</i>	49531348		↑
30	<i>30S ribosomal protein S2</i>	61215533	↑ 116/114	
1263T	<i>30S Ribosomal protein S3</i>	49532185		↑

#	Descripción	NCBIInr (gi)	iTRAQ	DIGE
1272Ta	<i>30S Ribosomal protein S3</i>	126388974		↑
48	<i>30S Ribosomal protein S3</i>	152060837	↑ 117/115	
349	<i>30S ribosomal protein S17</i>	126643087	↑ 116/114	
620T	<i>Chaperone Hsp60 (GroEL)</i>	126642698		↓
650T	<i>Co-Chaperone Hsp60 (GroEL)</i>	126642699		↓
667T	<i>Chaperone Hsp70 (DnaK)</i>	126642981		↓
765M	<i>Putative signal peptide (chaperone HsiJ)</i>	126386961		↓
23	<i>Putative signal peptide</i>	126641077	↓	
1086M	<i>Leader peptidase</i>	126388440		↑
295T	<i>Protein chain elongation factor EF-G</i>	49530070		↑
1402T	<i>Protein chain elongation factor EF-Tu</i>	49529548		↓
1028T	<i>Glycyl-tRNA synthetase alpha chain</i>	126643133		↑
62	<i>DNA-directed RNA polymerase subunit beta'</i>	160177568	↑ 117/115	
126	<i>Host factor I for bacteriophage Q beta replication</i>	50085463	↓	
Otros procesos metabólicos				
Resistencia a aminoglicósidos				
1538T*	<i>aac(60)-Ik gene product</i>	847647		↓
Ruta de las pentosas fosfato				
231	<i>glucose dehydrogenase</i>	126642872	↓ 116/114	
Glucólisis/Gluconeogénesis				
1272Tb	<i>Triosephosphate Isomerase</i>	126386296		↑
Antioxidante				
83	<i>Cu/Zn superoxide dismutase</i>	126643158	↓ 117/115	
Descomposición del H₂O₂				
63	<i>Catalase</i>	126641432	↑	
1075T	<i>Putative iron-dependent peroxidase</i>	126387550		↓
Síntesis de ATP				
129	<i>membrane-bound ATP synthase F1 sector, epsilon-subunit</i>	126640257	↑ 116/114	
222	<i>F0F1 ATP synthase subunit A</i>	126640249	↓ 116/114	
Metabolismo de vitaminas y cofactores				
280	<i>Glutamate-1-semialdehyde aminotransferase</i>	126642500	↑	
1275T	<i>Thiamine biosynthesis Protein</i>	126388190		↑
1355T	<i>Putative ubiquinone biosynthesis protein</i>	126388063		↓
1188T	<i>Molybdopterin biosynthesis protein</i>	126388075		↓
Metabolismo del piruvato				
284T	<i>MaeB hypothetical Protein</i>	126388262		↑
285Ta	<i>putative bifunctional protein (MaeB)</i>	49531362		↑
162	<i>L-lactate dehydrogenase FMN linked</i>	126640182	↑ 117/115	
Metabolismo del nitrógeno				
1636T	<i>Nitrogen assimilation regulatory protein P-II 2</i>	126386195		↓
150	<i>D-amino acid dehydrogenase small subunit</i>	126640202	↑ 116/114	
54	<i>glutamine synthetase</i>	50085541	↓ 117/115	
Metabolismo de aminoácidos				
84	<i>Phenylacetate-CoA oxygenase/reductase PaaK subunit</i>	126641386	↑	
877T	<i>Serine hydroxymethyltransferase</i>	126388232		↓
315	<i>glucosamine-fructose-6-phosphate aminotransferase</i>	126643402	↑ 116/114	
Metabolismo de ácidos grasos				
644T	<i>3-Hydroxyacyl-CoA dehydrogenase</i>	126387273		↑
99	<i>Putative acyl-CoA dehydrogenase</i>	126642370	↓	

#	Descripción	NCBIInr (gi)	iTRAQ	DIGE
52	<i>putative acyl-CoA dehydrogenase</i>	126642371	↓ 116/114	
Ciclo del TCA				
313	<i>succinate dehydrogenase, hydrophobic subunit</i>	50085919	↓ 116/114	
249	<i>dihydrolipoamide succinyltransferase component of 2-oxoglutarate dehydrogenase complex (E2)</i>	126642747	↓ 117/115	
285Tb	<i>Isocitrate dehydrogenase</i>	126642513		↑
Cadena transportadora de electrones				
73	<i>NADH dehydrogenase I chain F</i>	126640814	↑ 116/114	
13	<i>cytochrome d terminal oxidase polypeptide subunit I</i>	126641969	↓ 116/114	
33	<i>cytochrome o ubiquinol oxidase subunit II</i>	126642211	↓ 116/114	
127	<i>Electron transfer flavoprotein beta-subunit</i>	126642663	↑	

Los sistemas metabólicos identificados en común por ambas aproximaciones fueron el constituido por las proteínas estructurales de membrana y el transporte a través de esta; la expresión génica, biosíntesis y plegamiento de proteínas; la formación del pilus o la fimbria y formación de biopelículas; la respuesta a distintos tipos de estrés y otros procesos metabólicos como la descomposición del H₂O₂; el metabolismo de vitaminas y cofactores; el metabolismo del piruvato; el metabolismo del nitrógeno; el de aminoácidos; el de ácidos grasos y el ciclo de los ácidos tricarboxílicos. Ambas aproximaciones mostraron una regulación a la baja en la expresión de todas las proteínas constituyentes de la membrana externa con dominios OmpA y una regulación al alza de enzimas participantes en el metabolismo del piruvato, de proteínas participantes en la formación del pilus o fimbria y formación de biopelículas, de proteínas expresadas como respuesta frente a condiciones de estrés y, finalmente, una descompensación entre los niveles de expresión de distintos componentes de las subunidades ribosomales, coincidiendo ambas técnicas al señalar una expresión aumentada de los componente S2 y S3 de la subunidad 30S ribosomal.

Como ya se ha comentado, un 32% de las proteínas diferencialmente expresadas anotadas por DIGE fueron también detectadas por análisis de iTRAQ en el presente estudio. La complementariedad de los datos surgiría mayoritariamente por las diferencias en la preparación de las muestras y en los procedimientos analíticos usados por ambos métodos. El método iTRAQ proporciona un mapa más comprensivo del contenido proteico de cada muestra, dado que todas las proteínas presentes a partir de cierta cantidad, serían sistemáticamente identificadas y cuantificadas. Mientras que con la técnica DIGE se separan sólo las proteínas solubles incluidas en un rango de pH determinado, el iTRAQ

puede identificar proteínas por fuera de los límites de pH comúnmente utilizados en 2DE y puede distinguir entre proteínas que co-migrarían en un mismo gel.

En cuanto a la reproducibilidad observada entre estas técnicas, también se observaron algunas discordancias cuantitativas entre los procesos metabólicos descritos por DIGE e iTRAQ. Así, ambas técnicas indican una regulación opuesta en la expresión de enzimas participantes en la descomposición del H₂O₂, en el metabolismo de vitaminas y cofactores, en el metabolismo del nitrógeno, en el metabolismo de ácidos grasos y en el ciclo de los ácidos tricarboxílicos (tabla 8, página 166). Muchas pueden ser las razones por las que ambas técnicas cuantifican de manera diferente el ratio de expresión de las proteínas participantes en estos procesos metabólicos. Mediante DIGE se pueden detectar expresiones diferenciales de proteínas modificadas posttraduccionalmente, así como isoformas distintas de familias de genes gracias a la separación de los *spots* a diferentes valores de pI y PM. Sin embargo, y tal como ya se ha comentado, estas isoformas no pueden ser distinguidas por iTRAQ, dado que el marcaje se realiza a nivel de péptido y la mayoría de las secuencias peptídicas son idénticas dentro de un mismo grupo de isoformas. Así, los péptidos comunes compartidos por las distintas isoformas son agrupados dentro del mismo grupo de proteínas por parte del algoritmo *Pro Group*TM incorporado en el programa *Protein Pilot*TM y no se usan en la cuantificación de las mismas. Esto produce una pérdida de información al medir el cambio en la expresión de proteínas y enmascarar las diferencias en la abundancia de isoformas resultantes de la adaptación al antibiótico. De esta manera, y basándonos en el presente estudio, el iTRAQ se presenta como una técnica más robusta, capaz de detectar y cuantificar un número mucho mayor de proteínas, pero el DIGE proporciona una información útil y complementaria a la proporcionada por el análisis de iTRAQ, lo que subraya la importancia de la diversidad técnica a la hora de dilucidar la complejidad de los sistemas biológicos estudiados.

Como ya se ha comentado, y tal como se observa, los resultados sugieren que la información generada por cada uno de los métodos es complementaria en su naturaleza, principalmente como resultado de los distintos caminos seguidos en los procedimientos experimentales y de preparación de las muestras. Algunas proteínas o péptidos pueden estar mejor resueltos y/o representados en un método, pero no en el otro. Asumiendo que la desnaturalización proteica expone completamente todos los sitios de unión para el

marcaje cuantitativo, el ratio expresado por una proteína dada tendría que ser similar independientemente de si el método de marcaje usado es residuo-específico o global (N-terminal). Sin embargo, este fenómeno se hace aún más complicado por el hecho de que se recomiendan distintos agentes desnaturalizantes para los distintos métodos, introduciéndose otra variable debida al desenmascaramiento o bloqueo de sitios reactivos sobre distintos residuos aminoacídicos. Los marcadores de iTRAQ, al ser capaces de unirse al extremo N-terminal de todos los péptidos, ofrece una mayor tolerancia a cualquier impedimento estérico asociado al marcaje. Así, una de sus ventajas reside en su capacidad para marcar péptidos cuyos sitios de unión pueden no ser accesibles a la unión, a nivel de proteína, de los fluoróforos CyDyes de la técnica DIGE. Una desventaja del iTRAQ es que las muestras deben ser procesadas separadamente hasta la digestión enzimática, lo que puede ser origen de fuentes potenciales de error tales como los provocados durante la manipulación de las muestras o por la existencia de variables en el grado de la digestión enzimática entre las mismas. Por este motivo, asegurarse una preparación consistente de la muestra en todos los procedimientos utilizados en proteómica, pero especialmente en el método iTRAQ, es críticamente importante. El limitado solapamiento observado entre las proteínas diferencialmente expresadas e identificadas por ambos métodos, sugiere la complementariedad de las mismas y, aunque optimizaciones futuras en la sensibilidad instrumental, el marcaje químico y la cromatografía son necesarias en la cuantificación rutinaria de proteínas o péptidos por espectrometría de masas, la información complementaria obtenida a través de los distintos métodos proporciona un retrato más detallado de los sistemas biológicos sometidos a investigación.

7.3. Comparativa entre todos los métodos de análisis utilizados: *in-gel* (2DE vs. DIGE) vs. *off-gel* (iTRAQ)

A parte del análisis comparativo de los resultados obtenidos por DIGE e iTRAQ discutido en el apartado anterior de este mismo capítulo, es interesante observar cómo se relacionan entre sí los resultados de todas las aproximaciones utilizadas en esta investigación, es decir, incluyendo en esta comparación a las proteínas identificadas mediante los análisis a partir de 2DE convencional de la fracción de proteínas totales y de la enriquecida en proteínas de membrana (apartados 6.1.1. y 6.1.2. del capítulo 6, páginas 97 y 106 respectivamente).

En la figura 42 se muestra, mediante diagrama de Venn, cuál es el solapamiento presentado entre las identificaciones obtenidas tras el análisis por 2DE convencional del proteoma presente en el extracto de proteínas totales o solubles y en el extracto de proteínas de membrana, así como en el de expresión diferencial definido tras análisis de DIGE en ambas fracciones proteicas.

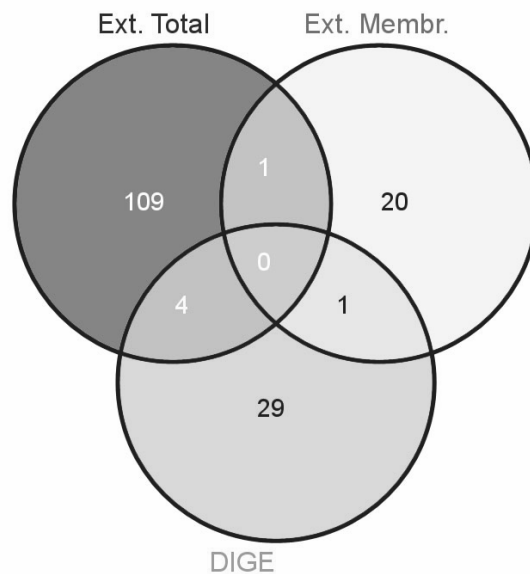


Figura 42. Representación en diagrama de Venn del solapamiento mostrado por los resultados obtenidos mediante los métodos basados en geles 2DE convencional tanto del extracto total de proteínas solubles (Ext. Total), como del de membrana (Ext. Membr.), y en ambos extractos a partir análisis DIGE.

Mediante 2DE y DIGE se han identificado 164 proteínas únicas, de las que 109 son exclusivas del análisis a partir de 2DE convencional del extracto de proteínas totales o solubles; 20 proceden del mismo tipo de análisis, pero en la fracción enriquecida en proteínas de membrana y 29 por análisis DIGE de ambas fracciones proteicas. Tal como se observa en la figura 42, una proteína fue identificada en común en ambos extractos proteicos a partir de 2DE convencional. Se trata de la proteína descrita como *outer membrane protein A* (gi|129307154) y detectada en el *spot* #46b* del extracto de proteínas totales o solubles (figura 19 y tabla 4, páginas 98 y 99 respectivamente) y en los *spots* #11*, 21*, 23* y 50* del extracto enriquecido en proteínas de membrana (figura 23 y tabla 5, páginas 107 y

108 respectivamente). El proteoma presente en la fracción enriquecida en proteínas de membrana y el de expresión diferencial definido por análisis DIGE comparten la presencia de una proteína en común. Se trata de la proteína identificada a partir del procesamiento del *spot #47* del gel que albergaba al proteoma presente en la fracción enriquecida en proteínas de membrana (figura 23 y tabla 5, páginas 107 y 108 respectivamente) y en el *spot #885M* del análisis DIGE (figura 27b y tabla 6, páginas 113 y 114 respectivamente), y descrita como *Outer membrane protein A (Omp38)* (gi|40287452). En el análisis cuantitativo, esta proteína se presentó con expresión disminuida en la cepa resistente. Por último, 4 proteínas se identificaron conjuntamente tanto en el análisis a partir de 2DE convencional del extracto de proteínas totales o solubles, como en el de DIGE. Una de ellas, anotada como *Serine hydroxymethyltransferase* (gi|126388232) se detectó en el *spot #37* del gel de 2DE convencional que albergaba a las proteínas totales o solubles (figura 19 y tabla 4, páginas 98 y 99 respectivamente) y en el *spot #877T* del proteoma de expresión diferencial descrito por DIGE (figura 27a y tabla 6, páginas 113 y 114 respectivamente), observándose una expresión disminuida de esta proteína en la cepa resistente a colistina. Otra es la presente en el *spot #5* del gel de 2DE convencional (figura 19 y tabla 4, páginas 98 y 99 respectivamente) y en el *#284T* del gel DIGE (figura 27a y tabla 6, páginas 113 y 114 respectivamente) e identificada como *hypothetical protein (MaeB)* (gi|126388262), presentándose con expresión aumentada en la cepa resistente. La tercera es una proteína descrita como *Chaperone Hsp60 (GroEL)* (gi|126642698) y detectada en los *spots #9** del gel en el que se separaron las proteínas totales o solubles (figura 19 y tabla 4, páginas 98 y 99 respectivamente) y con expresión disminuida en la cepa resistente a colistina a partir del *spot #620T* del gel DIGE (figura 27a y tabla 6, páginas 113 y 114 respectivamente). La cuarta y última proteína identificada en común tanto en el análisis por 2DE convencional de las proteínas totales o solubles como en el de DIGE, es la detectada en el *spot #6** en el primero de los casos (figura 19 y tabla 4, páginas 98 y 99 respectivamente) y en el *#667T* en el segundo (figura 27a y tabla 6, páginas 113 y 114 respectivamente) y descrita como *molecular chaperone DnaK* ó *Chaperone Hsp70 (DnaK)*. Esta proteína se presentó con expresión disminuida en la cepa resistente.

Cuando se introduce en la comparación de resultados aquellos que se obtuvieron mediante análisis iTRAQ, surge el diagrama de Venn mostrado en la figura 43, en el que se

representa el solapamiento observado entre los resultados obtenidos a partir de las diferentes técnicas utilizadas en esta tesis.

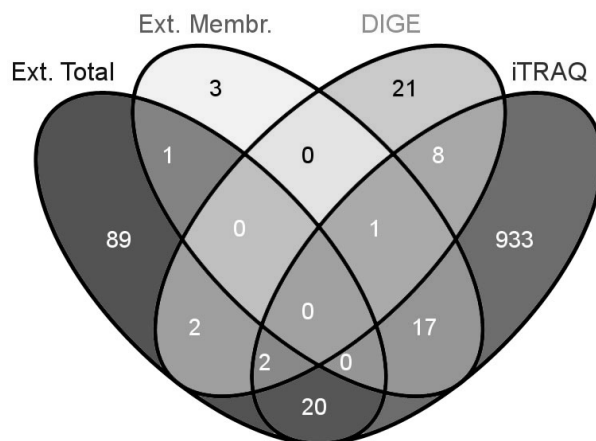


Figura 43. Representación en diagrama de Venn del solapamiento mostrado por los resultados obtenidos mediante los análisis basados en geles de 2DE convencional a partir del extracto total de proteínas solubles (Ext. Total), del de membrana (Ext. Membr.), de ambos extractos a través de análisis DIGE y a partir del extracto de proteínas de membrana mediante análisis iTRAQ.

Globalmente y tras la combinación de los resultados, en este estudio se han identificado 1.097 proteínas únicas del proteoma de *Acinetobacter*. Entre estas, 3 son proteínas identificadas de manera exclusiva mediante análisis de 2DE convencional en la fracción enriquecida en proteínas de membrana. En concreto, se trata de las proteínas #13b, *Inosine-5'-monophosphate dehydrogenase* (gi|38720), la #56, *xanthine phosphoribosyltransferase* (gi|126388934) y #15 y #20b, *protein chain elongation factor EF-Tu* (gi|126386252). Una proteína homóloga a esta última, pero en *A. baumannii* sp. ADP1 (gi|49529548), fue también identificada mediante DIGE a partir del *spot* #1402T (figura 27a y tabla 6, páginas 113 y 114 respectivamente). El 2% (21 de las 1.097 proteínas), serían las proteínas identificadas exclusivamente mediante análisis DIGE, 89 (el 8%), son las circunscritas al análisis mediante 2DE convencional del extracto de proteínas totales o solubles y 933 (el 85%) al análisis iTRAQ.

Una de las proteínas identificadas en común tanto por el análisis DIGE como por el de iTRAQ también fue identificada en el análisis de 2DE convencional de las proteínas presentes en la fracción enriquecida en proteínas de membrana. Se trata de la proteína *Outer M protein A (omp38)* (gi|40287452), identificada a partir del *spot #47* del gel de 2DE que albergaba a la fracción enriquecida en proteínas de membrana (figura 23 y tabla 5, páginas 107 y 108 respectivamente), a partir del *spot #885M*, del gel DIGE (figura 27b y tabla 6, páginas 113 y 114 respectivamente) y como miembro del grupo *#1* de proteínas identificadas en el análisis de iTRAQ (tabla B1 del apartado B.5. del anexo B, página 310).

Otras dos proteínas fueron identificadas comúnmente tanto por análisis de 2DE convencional entre las proteínas presentes en el extracto de proteínas totales o solubles, como por análisis DIGE e iTRAQ (figura 43, página anterior). Una de estas proteínas es la detectada en el *spot #9** en el primero de los análisis (figura 19 y tabla 4, páginas 98 y 99 respectivamente), en el *#620T* en el segundo (figura 27a y tabla 6, páginas 113 y 114 respectivamente) y como miembro del grupo de proteínas *#333* identificadas en el análisis iTRAQ (tabla B1 del apartado B.5. del anexo B, página 310). Está anotada como *Chaperone Hsp60 (GroEL)* o *chaperonin GroEL* (gi|126642698) y no fue uno de los grupos de proteínas cuyo nivel relativo de expresión fuese cuantificado en el análisis iTRAQ. Sin embargo, en el análisis DIGE esta proteína presentó un *ratio* en su nivel de expresión resistente/sensible igual a -9.41, indicando expresión disminuida en la cepa resistente y siendo la proteína con mayor diferencia en su nivel de expresión de entre las identificadas y cuantificadas por este análisis. La segunda proteína identificada comúnmente a estos análisis fue la detectada en el *spot #6** del gel de 2DE del extracto de proteínas totales (figura 19 y tabla 4, páginas 98 y 99 respectivamente), en el *#667T* del de DIGE (figura 27a y tabla 6, páginas 113 y 114 respectivamente) y es la proteína que lidera al conjunto de proteínas *#93* de entre las identificadas por iTRAQ (tabla B1 del apartado B.5. del anexo B, página 310). Está anotada como *molecular chaperone DnaK* o *Chaperone Hsp70 (DnaK)* y, al igual que en el caso anterior, no fue cuantificada en el análisis iTRAQ, mientras que por análisis DIGE se le midió un valor al *ratio* de su nivel de expresión resistente/sensible igual a -3.13.

Tal como también se muestra en la figura 43, 17 de las 1.097 proteínas identificadas por estos análisis, son identificaciones comunes a la aproximación por 2DE convencional de la fracción enriquecida en proteínas de membrana e iTRAQ y 20 son las comunes a los

análisis de 2DE convencional de los extractos de proteínas totales e iTRAQ. El alto grado de solapamiento observado en el primero de los casos (17 de las 22 proteínas identificadas por análisis de 2DE convencional de esta fracción proteica, es decir, el 77%) se debe a que se estudió la misma fracción de proteínas en ambos análisis, mientras que, en el segundo de los casos, el solapamiento es más limitado (20 de las 114 proteínas identificadas en este caso, es decir, el 17%) lo que no es de extrañar dado el distinto origen de los extractos proteicos estudiados en estos análisis.

8. CONCLUSIONES

Mediante la utilización de tres técnicas proteómicas (2DE, DIGE e iTRAQ), ha sido posible identificar 1.097 proteínas únicas propias del género de bacterias *Acinetobacter*, entre las que 82 de las mismas, obtenidas tras análisis de expresión diferencial cuantitativa (DIGE e iTRAQ), describirían un proteoma de transición en el que se observan algunas de las adaptaciones metabólicas que subyacen a la adquisición *in vitro* de resistencia al antibiótico colistina por parte de la cepa ATCC 19606 de *A. baumannii*. En este sentido, y tras la combinación de los resultados ofrecidos por las distintas técnicas, la información obtenida a partir de estos estudios permite concluir lo siguiente:

- 1) El reajuste de la cepa resistente a colistina apunta claramente hacia el desarrollo de un fenotipo sustancialmente perjudicado que revertiría a la sensibilidad una vez ausente la presión ejercida por el antibiótico o que encargaría las consecuencias de su reducida adaptabilidad biológica o *fitness*.
- 2) El fenotipo resistente a colistina está caracterizado por la expresión incrementada de proteínas que participan en la formación de biopelículas como son algunos de los constituyentes de la fimbria, así como de enzimas como la proteína HmsR, una glicosiltransferasa en la síntesis de polisacárido.
- 3) El fenotipo de resistencia a colistina muestra una regulación al alza en la expresión de proteínas que actúan en la protección celular frente a distintas condiciones de estrés, como son la proteína OsmY directamente relacionada con la acción de la colistina y la chaperona tipo ClpA/B.
- 4) La cepa resistente a colistina manifiesta un desequilibrio o perturbación en la expresión de distintos componentes de las subunidades ribosomales y un acusado descenso en la expresión de proteínas chaperonas, lo que se puede interpretar como la manifestación de un mecanismo defectuoso con efectos adversos en el proceso de síntesis y plegamiento de proteínas.

- 5) El fenotipo de resistencia frente al antibiótico colistina presentó también una expresión aumentada de proteínas enzimáticas participantes en el metabolismo del piruvato.

- 6) La resistencia a colistina inducida en nuestro modelo experimental también se caracteriza por la expresión disminuida de proteínas participantes en el metabolismo del nitrógeno, como es la proteína PII 2 reguladora de la asimilación de nitrógeno o la enzima glutamina sintetasa.

- 7) La cepa resistente a colistina manifiesta un cambio en su habilidad para la utilización de ácidos grasos y muestra una capacidad superior que la sensible para la metabolización del citrato y el fenilacetato en conjunción con un reducido uso de ácidos grasos de cadena larga como fuente única de carbono.

- 8) El fenotipo resistente a colistina muestra una expresión aumentada de transportadores activos de membrana miembros de las familias RND y ABC de bombas de expulsión de múltiples drogas asociadas a la adquisición de resistencia frente a diversos antibióticos.

- 9) La cepa resistente a colistina lleva a cabo una sustancial reorganización de la arquitectura y composición de la membrana, con especial énfasis en la expresión disminuida de los miembros de la familia OmpA de proteínas constituyentes de la membrana externa.

- 10) Tanto la técnica *in-gel* (DIGE) como la técnica *off-gel* (iTRAQ), utilizadas en el presente trabajo de investigación, resultaron útiles en el estudio de las adaptaciones metabólicas que subyacen a la adquisición de resistencia frente al antibiótico colistina por parte de *A. baumannii* ATCC 19606 y ofrecieron resultados complementarios dadas sus naturalezas y especificidades distintas a la hora de abordar el análisis de la expresión diferencial cuantitativa de proteínas por parte de este sistema biológico.

9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Gaynes R, Edwards JR: **Overview of nosocomial infections caused by gram-negative bacilli.** *Clin Infect Dis* 2005, **41**:848-854.
2. Wisplinghoff H, Bischoff T, Tallent SM, Seifert H, Wenzel RP, Edmond MB: **Nosocomial bloodstream infections in US hospitals: analysis of 24,179 cases from a prospective nationwide surveillance study.** *Clin Infect Dis* 2004, **39**:309-317.
3. Dijkshoorn L, Nemec A, Seifert H: **An increasing threat in hospitals: multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*.** *Nat Rev Microbiol* 2007, **5**:939-951.
4. Smith MG, Gianoulis TA, Pukatzki S, Mekalanos JJ, Ornston LN, Gerstein M, Snyder M: **New insights into *Acinetobacter baumannii* pathogenesis revealed by high-density pyrosequencing and transposon mutagenesis.** *Genes Dev* 2007, **21**:601-614.
5. Towner KJ: ***Acinetobacter*: an old friend, but a new enemy.** *J Hosp Infect* 2009, **73**:355-363.
6. Lin J, Huang S, Zhang Q: **Outer membrane proteins: key players for bacterial adaptation in host niches.** *Microbes Infect* 2002, **4**:325-331.
7. Drew D, Froderberg L, Baars L, de Gier JW: **Assembly and overexpression of membrane proteins in *Escherichia coli*.** *Biochim Biophys Acta* 2003, **1610**:3-10.
8. De E, Cosette P, Coquet L, Siroy A, Alexandre S, Duncan A, Naudin B, Rihouey C, Schaumann A, Junter GA, Jouenne T: **Membrane proteomes of *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii*.** *Pathol Biol (Paris)* 2009, **24**:24.
9. Anderson NL, Anderson NG: **Proteome and proteomics: new technologies, new concepts, and new words.** *Electrophoresis* 1998, **19**:1853-1861.
10. Wasinger VC, Cordwell SJ, Cerpa-Poljak A, Yan JX, Gooley AA, Wilkins MR, Duncan MW, Harris R, Williams KL, Humphery-Smith I: **Progress with gene-product mapping of the Mollicutes: *Mycoplasma genitalium*.** *Electrophoresis* 1995, **16**:1090-1094.
11. Wilkins MR, Sanchez JC, Gooley AA, Appel RD, Humphery-Smith I, Hochstrasser DF, Williams KL: **Progress with proteome projects: why all proteins**

- expressed by a genome should be identified and how to do it. *Biotechnol Genet Eng Rev* 1996, **13**:19-50.
12. Pandey A, Mann M: **Proteomics to study genes and genomes.** *Nature* 2000, **405**:837-846.
 13. Fields S: **Proteomics. Proteomics in genomeland.** *Science* 2001, **291**:1221-1224.
 14. **Finishing the euchromatic sequence of the human genome.** *Nature* 2004, **431**:931-945.
 15. Lander ES, Linton LM, Birren B, Nusbaum C, Zody MC, Baldwin J, Devon K, Dewar K, Doyle M, FitzHugh W, et al: **Initial sequencing and analysis of the human genome.** *Nature* 2001, **409**:860-921.
 16. Venter JC, Adams MD, Myers EW, Li PW, Mural RJ, Sutton GG, Smith HO, Yandell M, Evans CA, Holt RA, et al: **The sequence of the human genome.** *Science* 2001, **291**:1304-1351.
 17. Dziembowski A, Seraphin B: **Recent developments in the analysis of protein complexes.** *FEBS Lett* 2004, **556**:1-6.
 18. Peng J, Gygi SP: **Proteomics: the move to mixtures.** *J Mass Spectrom* 2001, **36**:1083-1091.
 19. Righetti PG, Castagna A, Antonucci F, Piubelli C, Cecconi D, Campostrini N, Zanusso G, Monaco S: **The proteome: anno Domini 2002.** *Clin Chem Lab Med* 2003, **41**:425-438.
 20. Stults JT, Arnott D: **Proteomics.** *Methods Enzymol* 2005, **402**:245-289.
 21. Zhu H, Bilgin M, Snyder M: **Proteomics.** *Annu Rev Biochem* 2003, **72**:783-812.
 22. Tambor V, Fucikova A, Lenco J, Kacerovsky M, Rehacek V, Stulik J, Pudil R: **Application of proteomics in biomarker discovery: a primer for the clinician.** *Physiol Res* 2009.
 23. Filén J-J: **Quantitative proteomics in the characterization of T helper lymphocyte differentiation.** University of Turku, Department of Medical Biochemistry and Molecular Biology; 2008.
 24. Dedeurwaerdere T, Dawyndt P: **Exploring and exploiting microbiological commons: contributions of bioinformatics and intellectual property rights in sharing biological information.** *Social Science Journal* 2005.

25. Bertacchini E: **Contractually constructed research commons: a critical economic appraisal.** In *COMMUNLA Conference 2009; Torino, Italy.* 2009
26. Gast AP: **The impact of restricting information access on science and technology.** Cambridge, MA: M.I.T.; 2003.
27. UNEP: **Convention on Biological Diversity (CBD).** Windhoek, Namibia: United Nations Environment Programme (UNEP); 2008.
28. N Banderia SB, A Frank, N Gupta, K Jeong, S Kim, J Ng.: **Computational Mass-Spectrometry.** USD Jacobs School. Department of Computer Science and Engineering; 2009.
29. Bell AW, Deutsch EW, Au CE, Kearney RE, Beavis R, Sechi S, Nilsson T, Bergeron JJ: **A HUPO test sample study reveals common problems in mass spectrometry-based proteomics.** *Nat Methods* 2009, **6**:423-430.
30. Duncan MW: **Omics and its 15 minutes.** *Exp Biol Med (Maywood)* 2007, **232**:471-472.
31. Horn DM, Zubarev RA, McLafferty FW: **Automated de novo sequencing of proteins by tandem high-resolution mass spectrometry.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000, **97**:10313-10317.
32. Standing KG: **Peptide and protein de novo sequencing by mass spectrometry.** *Curr Opin Struct Biol* 2003, **13**:595-601.
33. Liska AJ, Shevchenko A: **Expanding the organismal scope of proteomics: cross-species protein identification by mass spectrometry and its implications.** *Proteomics* 2003, **3**:19-28.
34. Gorg A, Weiss W, Dunn MJ: **Current two-dimensional electrophoresis technology for proteomics.** *Proteomics* 2004, **4**:3665-3685.
35. Molloy MP: **Two-dimensional electrophoresis of membrane proteins using immobilized pH gradients.** *Anal Biochem* 2000, **280**:1-10.
36. Bai F, Liu S, Witzmann FA: **A "de-streaking" method for two-dimensional electrophoresis using the reducing agent tris(2-carboxyethyl)-phosphine hydrochloride and alkylating agent vinylpyridine.** *Proteomics* 2005, **5**:2043-2047.
37. Herbert B, Galvani M, Hamdan M, Olivieri E, MacCarthy J, Pedersen S, Righetti PG: **Reduction and alkylation of proteins in preparation of two-dimensional map analysis: why, when, and how?** *Electrophoresis* 2001, **22**:2046-2057.

38. Righetti PG: **Real and imaginary artefacts in proteome analysis via two-dimensional maps.** *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2006, **841**:14-22.
39. Sebastiano R, Citterio A, Lapadula M, Righetti PG: **A new deuterated alkylating agent for quantitative proteomics.** *Rapid Commun Mass Spectrom* 2003, **17**:2380-2386.
40. **The cleavage specificities of selected enzymes and Chemicals** [http://au.expasy.org/tools/peptidecutter/peptidecutter_enzymes.html]
41. Olsen JV, Ong SE, Mann M: **Trypsin cleaves exclusively C-terminal to arginine and lysine residues.** *Mol Cell Proteomics* 2004, **3**:608-614.
42. Wilkinson J: **Fragmentation of polypeptides by enzymic methods.** In *Practical protein chemistry: A handbook*. Edited by Darbre A. New York: John Wiley and Sons; 1986
43. Lambert JP, Ethier M, Smith JC, Figeys D: **Proteomics: from gel based to gel free.** *Anal Chem* 2005, **77**:3771-3787.
44. Liu T, Belov ME, Jaitly N, Qian WJ, Smith RD: **Accurate mass measurements in proteomics.** *Chem Rev* 2007, **107**:3621-3653.
45. Pasquali C, Fialka I, Huber LA: **Subcellular fractionation, electromigration analysis and mapping of organelles.** *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 1999, **722**:89-102.
46. Andersen JS, Wilkinson CJ, Mayor T, Mortensen P, Nigg EA, Mann M: **Proteomic characterization of the human centrosome by protein correlation profiling.** *Nature* 2003, **426**:570-574.
47. Josic D, Clifton JG, Kovac S, Hixson DC: **Membrane proteins as diagnostic biomarkers and targets for new therapies.** *Curr Opin Mol Ther* 2008, **10**:116-123.
48. Fritze CE, Anderson TR: **Epitope tagging: general method for tracking recombinant proteins.** *Methods Enzymol* 2000, **327**:3-16.
49. Terpe K: **Overview of tag protein fusions: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems.** *Appl Microbiol Biotechnol* 2003, **60**:523-533.
50. Steel LF, Trotter MG, Nakajima PB, Mattu TS, Gonye G, Block T: **Efficient and specific removal of albumin from human serum samples.** *Mol Cell Proteomics* 2003, **2**:262-270.

51. Foster LJ, de Hoog CL, Zhang Y, Zhang Y, Xie X, Mootha VK, Mann M: **A mammalian organelle map by protein correlation profiling.** *Cell* 2006, **125**:187-199.
52. Righetti PG, Castagna A, Antonioli P, Boschetti E: **Prefractionation techniques in proteome analysis: the mining tools of the third millennium.** *Electrophoresis* 2005, **26**:297-319.
53. Yates JR, 3rd, Gilchrist A, Howell KE, Bergeron JJ: **Proteomics of organelles and large cellular structures.** *Nat Rev Mol Cell Biol* 2005, **6**:702-714.
54. Andersen JS, Mann M: **Organellar proteomics: turning inventories into insights.** *EMBO Rep* 2006, **7**:874-879.
55. Klose J: **Protein mapping by combined isoelectric focusing and electrophoresis of mouse tissues. A novel approach to testing for induced point mutations in mammals.** *Humangenetik* 1975, **26**:231-243.
56. O'Farrell PH: **High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins.** *J Biol Chem* 1975, **250**:4007-4021.
57. Scheele GA: **Two-dimensional gel analysis of soluble proteins. Characterization of guinea pig exocrine pancreatic proteins.** *J Biol Chem* 1975, **250**:5375-5385.
58. Hoogland C, Mostaguir K, Sanchez JC, Hochstrasser DF, Appel RD: **SWISS-2DPAGE, ten years later.** *Proteomics* 2004, **4**:2352-2356.
59. Hoogland C, Mostaguir K, Appel RD, Lisacek F: **The World-2DPAGE Constellation to promote and publish gel-based proteomics data through the ExPASy server.** *J Proteomics* 2008, **71**:245-248.
60. Wittmann-Liebold B, Graack HR, Pohl T: **Two-dimensional gel electrophoresis as tool for proteomics studies in combination with protein identification by mass spectrometry.** *Proteomics* 2006, **6**:4688-4703.
61. Bjellqvist B, Ek K, Righetti PG, Gianazza E, Gorg A, Westermeier R, Postel W: **Isoelectric focusing in immobilized pH gradients: principle, methodology and some applications.** *J Biochem Biophys Methods* 1982, **6**:317-339.
62. Tumani H, Pfeifle M, Lehmsiek V, Rau D, Mogel H, Ludolph AC, Brettschneider J: **Candidate biomarkers of chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy (CIDP): proteome analysis of cerebrospinal fluid.** *J Neuroimmunol* 2009, **214**:109-112.

63. Hongsachart P, Huang-Liu R, Sinchaikul S, Pan FM, Phutrakul S, Chuang YM, Yu CJ, Chen ST: **Glycoproteomic analysis of WGA-bound glycoprotein biomarkers in sera from patients with lung adenocarcinoma.** *Electrophoresis* 2009, **30**:1206-1220.
64. Link AJ, Eng J, Schieltz DM, Carmack E, Mize GJ, Morris DR, Garvik BM, Yates JR, 3rd: **Direct analysis of protein complexes using mass spectrometry.** *Nat Biotechnol* 1999, **17**:676-682.
65. Opiteck GJ, Lewis KC, Jorgenson JW, Anderegg RJ: **Comprehensive on-line LC/LC/MS of proteins.** *Anal Chem* 1997, **69**:1518-1524.
66. Blonder J, Terunuma A, Conrads TP, Chan KC, Yee C, Lucas DA, Schaefer CF, Yu LR, Issaq HJ, Veenstra TD, Vogel JC: **A proteomic characterization of the plasma membrane of human epidermis by high-throughput mass spectrometry.** *J Invest Dermatol* 2004, **123**:691-699.
67. Han DK, Eng J, Zhou H, Aebersold R: **Quantitative profiling of differentiation-induced microsomal proteins using isotope-coded affinity tags and mass spectrometry.** *Nat Biotechnol* 2001, **19**:946-951.
68. Stockwin LH, Blonder J, Bumke MA, Lucas DA, Chan KC, Conrads TP, Issaq HJ, Veenstra TD, Newton DL, Rybak SM: **Proteomic analysis of plasma membrane from hypoxia-adapted malignant melanoma.** *J Proteome Res* 2006, **5**:2996-3007.
69. Washburn MP, Wolters D, Yates JR, 3rd: **Large-scale analysis of the yeast proteome by multidimensional protein identification technology.** *Nat Biotechnol* 2001, **19**:242-247.
70. Wu CC, MacCoss MJ, Howell KE, Yates JR, 3rd: **A method for the comprehensive proteomic analysis of membrane proteins.** *Nat Biotechnol* 2003, **21**:532-538.
71. Kim YH, Cho K, Yun SH, Kim JY, Kwon KH, Yoo JS, Kim SI: **Analysis of aromatic catabolic pathways in *Pseudomonas putida* KT 2440 using a combined proteomic approach: 2-DE/MS and cleavable isotope-coded affinity tag analysis.** *Proteomics* 2006, **6**:1301-1318.
72. Kubota K, Wakabayashi K, Matsuoka T: **Proteome analysis of secreted proteins during osteoclast differentiation using two different methods: two-dimensional electrophoresis and isotope-coded affinity tags analysis with two-dimensional chromatography.** *Proteomics* 2003, **3**:616-626.
73. Schmidt F, Donahoe S, Hagens K, Mattow J, Schaible UE, Kaufmann SH, Aebersold R, Jungblut PR: **Complementary analysis of the *Mycobacterium***

- tuberculosis proteome by two-dimensional electrophoresis and isotope-coded affinity tag technology. *Mol Cell Proteomics* 2004, **3**:24-42.
74. Schmidt F, Dahlmann B, Janek K, Kloss A, Wacker M, Ackermann R, Thiede B, Jungblut PR: **Comprehensive quantitative proteome analysis of 20S proteasome subtypes from rat liver by isotope coded affinity tag and 2-D gel-based approaches.** *Proteomics* 2006, **6**:4622-4632.
 75. Tian Q, Stepaniants SB, Mao M, Weng L, Feetham MC, Doyle MJ, Yi EC, Dai H, Thorsson V, Eng J, et al: **Integrated genomic and proteomic analyses of gene expression in Mammalian cells.** *Mol Cell Proteomics* 2004, **3**:960-969.
 76. Fenn JB, Mann M, Meng CK, Wong SF, Whitehouse CM: **Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules.** *Science* 1989, **246**:64-71.
 77. Karas M, Hillenkamp F: **Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10,000 daltons.** *Anal Chem* 1988, **60**:2299-2301.
 78. Tanaka K, Waki H, Ido Y, Akita S, Yoshida Y and Yoshida T: **Protein and polymer analyses up to m/z 100 000 by laser ionization time-of-flight mass spectrometry.** *Rapid Commun Mass Spectrom* 1988, **2**:151-153.
 79. Mann M, Hendrickson RC, Pandey A: **Analysis of proteins and proteomes by mass spectrometry.** *Annu Rev Biochem* 2001, **70**:437-473.
 80. Aebersold R, Mann M: **Mass spectrometry-based proteomics.** *Nature* 2003, **422**:198-207.
 81. Domon B, Aebersold R: **Mass spectrometry and protein analysis.** *Science* 2006, **312**:212-217.
 82. Belov ME, Gorshkov MV, Udseth HR, Anderson GA, Smith RD: **Zeptomole-sensitivity electrospray ionization--Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry of proteins.** *Anal Chem* 2000, **72**:2271-2279.
 83. Wysocki VH, Resing KA, Zhang Q, Cheng G: **Mass spectrometry of peptides and proteins.** *Methods* 2005, **35**:211-222.
 84. Thiede B, Hohenwarter W, Krah A, Mattow J, Schmid M, Schmidt F, Jungblut PR: **Peptide mass fingerprinting.** *Methods* 2005, **35**:237-247.
 85. Nesvizhskii AI: **Protein identification by tandem mass spectrometry and sequence database searching.** *Methods Mol Biol* 2007, **367**:87-119.

86. Hernandez P, Muller M, Appel RD: **Automated protein identification by tandem mass spectrometry: issues and strategies.** *Mass Spectrom Rev* 2006, **25**:235-254.
87. Perkins DN, Pappin DJ, Creasy DM, Cottrell JS: **Probability-based protein identification by searching sequence databases using mass spectrometry data.** *Electrophoresis* 1999, **20**:3551-3567.
88. Clauser KR, Baker P, Burlingame AL: **Role of accurate mass measurement (+/- 10 ppm) in protein identification strategies employing MS or MS/MS and database searching.** *Anal Chem* 1999, **71**:2871-2882.
89. Zhang X, Jin QK, Carr SA, Annan RS: **N-Terminal peptide labeling strategy for incorporation of isotopic tags: a method for the determination of site-specific absolute phosphorylation stoichiometry.** *Rapid Commun Mass Spectrom* 2002, **16**:2325-2332.
90. Mann M, Wilm M: **Error-tolerant identification of peptides in sequence databases by peptide sequence tags.** *Anal Chem* 1994, **66**:4390-4399.
91. Wilkins MR, Williams KL: **Cross-species protein identification using amino acid composition, peptide mass fingerprinting, isoelectric point and molecular mass: a theoretical evaluation.** *J Theor Biol* 1997, **186**:7-15.
92. Tuloup M HC, Coro I, Hoogland C, Binz P-A, Appel RD: **Aldente and BioGraph: An improved peptide mass fingerprinting protein identification environment.** In *Swiss Proteomics Society 2003 Congress: Understanding Biological Systems through Proteomics; Basel, Switzerland.* FontisMedia; 2003: 174-176.
93. Fenyó D, Qin J, Chait BT: **Protein identification using mass spectrometric information.** *Electrophoresis* 1998, **19**:998-1005.
94. Palagi PM, Hernandez P, Walther D, Appel RD: **Proteome informatics I: bioinformatics tools for processing experimental data.** *Proteomics* 2006, **6**:5435-5444.
95. Pappin DJ, Hojrup P, Bleasby AJ: **Rapid identification of proteins by peptide-mass fingerprinting.** *Curr Biol* 1993, **3**:327-332.
96. Chamrad DC, Korting G, Stuhler K, Meyer HE, Klose J, Bluggel M: **Evaluation of algorithms for protein identification from sequence databases using mass spectrometry data.** *Proteomics* 2004, **4**:619-628.
97. Eng J, McCormack A, Yates JR: **An approach to correlate tandem mass spectral data of peptides with amino acid sequences in a protein database.** *J Am Soc Mass Spectrom* 1994, **5**:976-989.

98. Zhang N, Aebersold R, Schwikowski B: **ProbID: a probabilistic algorithm to identify peptides through sequence database searching using tandem mass spectral data.** *Proteomics* 2002, **2**:1406-1412.
99. Colinge J, Masselot A, Giron M, Dessingy T, Magnin J: **OLAV: towards high-throughput tandem mass spectrometry data identification.** *Proteomics* 2003, **3**:1454-1463.
100. Craig R, Beavis RC: **TANDEM: matching proteins with tandem mass spectra.** *Bioinformatics* 2004, **20**:1466-1467.
101. Tabb DL, Saraf A, Yates JR, 3rd: **GutenTag: high-throughput sequence tagging via an empirically derived fragmentation model.** *Anal Chem* 2003, **75**:6415-6421.
102. Tabb DL, MacCoss MJ, Wu CC, Anderson SD, Yates JR, 3rd: **Similarity among tandem mass spectra from proteomic experiments: detection, significance, and utility.** *Anal Chem* 2003, **75**:2470-2477.
103. Field HI, Fenyo D, Beavis RC: **RADARS, a bioinformatics solution that automates proteome mass spectral analysis, optimises protein identification, and archives data in a relational database.** *Proteomics* 2002, **2**:36-47.
104. Moulder R, Filen JJ, Salmi J, Katajamaa M, Nevalainen OS, Oresic M, Aittokallio T, Lahesmaa R, Nyman TA: **A comparative evaluation of software for the analysis of liquid chromatography-tandem mass spectrometry data from isotope coded affinity tag experiments.** *Proteomics* 2005, **5**:2748-2760.
105. Kapp EA, Schutz F, Connolly LM, Chakel JA, Meza JE, Miller CA, Fenyo D, Eng JK, Adkins JN, Omenn GS, Simpson RJ: **An evaluation, comparison, and accurate benchmarking of several publicly available MS/MS search algorithms: sensitivity and specificity analysis.** *Proteomics* 2005, **5**:3475-3490.
106. Omenn GS, States DJ, Adamski M, Blackwell TW, Menon R, Hermjakob H, Apweiler R, Haab BB, Simpson RJ, Eddes JS, et al: **Overview of the HUPO Plasma Proteome Project: results from the pilot phase with 35 collaborating laboratories and multiple analytical groups, generating a core dataset of 3020 proteins and a publicly-available database.** *Proteomics* 2005, **5**:3226-3245.
107. Nesvizhskii AI, Aebersold R: **Analysis, statistical validation and dissemination of large-scale proteomics datasets generated by tandem MS.** *Drug Discov Today* 2004, **9**:173-181.
108. Peng J, Elias JE, Thoreen CC, Licklider LJ, Gygi SP: **Evaluation of multidimensional chromatography coupled with tandem mass spectrometry**

- (LC/LC-MS/MS) for large-scale protein analysis: the yeast proteome.** *J Proteome Res* 2003, **2**:43-50.
109. Keller A, Nesvizhskii AI, Kolker E, Aebersold R: **Empirical statistical model to estimate the accuracy of peptide identifications made by MS/MS and database search.** *Anal Chem* 2002, **74**:5383-5392.
110. Nesvizhskii AI, Keller A, Kolker E, Aebersold R: **A statistical model for identifying proteins by tandem mass spectrometry.** *Anal Chem* 2003, **75**:4646-4658.
111. Tabb DL, McDonald WH, Yates JR, 3rd: **DTASelect and Contrast: tools for assembling and comparing protein identifications from shotgun proteomics.** *J Proteome Res* 2002, **1**:21-26.
112. Kim YJ, Zhan P, Feild B, Ruben SM, He T: **Reproducibility assessment of relative quantitation strategies for LC-MS based proteomics.** *Anal Chem* 2007, **79**:5651-5658.
113. Carr S, Aebersold R, Baldwin M, Burlingame A, Clauser K, Nesvizhskii A: **The need for guidelines in publication of peptide and protein identification data: Working Group on Publication Guidelines for Peptide and Protein Identification Data.** *Mol Cell Proteomics* 2004, **3**:531-533.
114. Wilkins MR, Appel RD, Van Eyk JE, Chung MC, Gorg A, Hecker M, Huber LA, Langen H, Link AJ, Paik YK, et al: **Guidelines for the next 10 years of proteomics.** *Proteomics* 2006, **6**:4-8.
115. Gerber SA, Rush J, Stemman O, Kirschner MW, Gygi SP: **Absolute quantification of proteins and phosphoproteins from cell lysates by tandem MS.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003, **100**:6940-6945.
116. Miller I, Crawford J, Gianazza E: **Protein stains for proteomic applications: which, when, why?** *Proteomics* 2006, **6**:5385-5408.
117. Patton WF: **Detection technologies in proteome analysis.** *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2002, **771**:3-31.
118. Kettman JR, Kuhn L, Young P, Lefkovits I: **Parameters of the labeling of mitogen-activated murine lymphocytes by [35S]methionine for two-dimensional gel electrophoresis. I. Effect of culture conditions.** *J Immunol Methods* 1986, **88**:53-64.
119. Westbrook JA, Yan JX, Wait R, Dunn MJ: **A combined radiolabelling and silver staining technique for improved visualisation, localisation, and**

- identification of proteins separated by two-dimensional gel electrophoresis.** *Proteomics* 2001, **1**:370-376.
120. Neuhoff V, Arold N, Taube D, Ehrhardt W: **Improved staining of proteins in polyacrylamide gels including isoelectric focusing gels with clear background at nanogram sensitivity using Coomassie Brilliant Blue G-250 and R-250.** *Electrophoresis* 1988, **9**:255-262.
 121. Candiano G, Bruschi M, Musante L, Santucci L, Ghiggeri GM, Carnemolla B, Orecchia P, Zardi L, Righetti PG: **Blue silver: a very sensitive colloidal Coomassie G-250 staining for proteome analysis.** *Electrophoresis* 2004, **25**:1327-1333.
 122. Rabilloud T, Vuillard L, Gilly C, Lawrence JJ: **Silver-staining of proteins in polyacrylamide gels: a general overview.** *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* 1994, **40**:57-75.
 123. Chevallet M, Luche S, Diemer H, Strub JM, Van Dorsselaer A, Rabilloud T: **Sweet silver: a formaldehyde-free silver staining using aldoses as developing agents, with enhanced compatibility with mass spectrometry.** *Proteomics* 2008, **8**:4853-4861.
 124. Berggren K, Chernokalskaya E, Steinberg TH, Kemper C, Lopez MF, Diwu Z, Haugland RP, Patton WF: **Background-free, high sensitivity staining of proteins in one- and two-dimensional sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels using a luminescent ruthenium complex.** *Electrophoresis* 2000, **21**:2509-2521.
 125. Fazekas de St Groth S, Webster RG, Datyner A: **Two new staining procedures for quantitative estimation of proteins on electrophoretic strips.** *Biochim Biophys Acta* 1963, **71**:377-391.
 126. Switzer RC, 3rd, Merril CR, Shifrin S: **A highly sensitive silver stain for detecting proteins and peptides in polyacrylamide gels.** *Anal Biochem* 1979, **98**:231-237.
 127. Diezel W, Kopperschlager G, Hofmann E: **An improved procedure for protein staining in polyacrylamide gels with a new type of Coomassie Brilliant Blue.** *Anal Biochem* 1972, **48**:617-620.
 128. Neuhoff V, Stamm R, Eibl H: **Clear background and highly sensitive protein staining with Coomassie Blue dyes in polyacrylamide gels: A systematic analysis.** *Electrophoresis* 2005, **6**:427-448.
 129. Rabilloud T: **Mechanisms of protein silver staining in polyacrylamide gels: a 10-year synthesis.** *Electrophoresis* 1990, **11**:785-794.

130. Heukeshoven J, Dernick R: **Improved silver staining procedure for fast staining in PhastSystem Development Unit. I. Staining of sodium dodecyl sulfate gels.** *Electrophoresis* 1988, **9**:28-32.
131. James P, Quadroni M, Carafoli E, Gonnet G: **Protein identification by mass profile fingerprinting.** *Biochem Biophys Res Commun* 1993, **195**:58-64.
132. Scheler C, Lamer S, Pan Z, Li XP, Salnikow J, Jungblut P: **Peptide mass fingerprint sequence coverage from differently stained proteins on two-dimensional electrophoresis patterns by matrix assisted laser desorption/ionization-mass spectrometry (MALDI-MS).** *Electrophoresis* 1998, **19**:918-927.
133. Sinha P, Poland J, Schnolzer M, Rabilloud T: **A new silver staining apparatus and procedure for matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight analysis of proteins after two-dimensional electrophoresis.** *Proteomics* 2001, **1**:835-840.
134. Giometti CS, Gemmell MA, Tollaksen SL, Taylor J: **Quantitation of human leukocyte proteins after silver staining: a study with two-dimensional electrophoresis.** *Electrophoresis* 1991, **12**:536-543.
135. Patton WF, Beechem JM: **Rainbow's end: the quest for multiplexed fluorescence quantitative analysis in proteomics.** *Curr Opin Chem Biol* 2002, **6**:63-69.
136. Berggren K, Steinberg TH, Lauber WM, Carroll JA, Lopez MF, Chernokalskaya E, Zieske L, Diwu Z, Haugland RP, Patton WF: **A luminescent ruthenium complex for ultrasensitive detection of proteins immobilized on membrane supports.** *Anal Biochem* 1999, **276**:129-143.
137. Lopez MF, Berggren K, Chernokalskaya E, Lazarev A, Robinson M, Patton WF: **A comparison of silver stain and SYPRO Ruby Protein Gel Stain with respect to protein detection in two-dimensional gels and identification by peptide mass profiling.** *Electrophoresis* 2000, **21**:3673-3683.
138. Tonge R, Shaw J, Middleton B, Rowlinson R, Rayner S, Young J, Pognan F, Hawkins E, Currie I, Davison M: **Validation and development of fluorescence two-dimensional differential gel electrophoresis proteomics technology.** *Proteomics* 2001, **1**:377-396.
139. Unlu M, Morgan ME, Minden JS: **Difference gel electrophoresis: a single gel method for detecting changes in protein extracts.** *Electrophoresis* 1997, **18**:2071-2077.

140. GE-Healthcare (Ed.). **2-D Electrophoresis. Principles and methods.** Buckinghamshire, United Kingdom; 2004.
141. Gharbi S, Gaffney P, Yang A, Zvelebil MJ, Cramer R, Waterfield MD, Timms JF: **Evaluation of two-dimensional differential gel electrophoresis for proteomic expression analysis of a model breast cancer cell system.** *Mol Cell Proteomics* 2002, **1**:91-98.
142. Raman B, Cheung A, Marten MR: **Quantitative comparison and evaluation of two commercially available, two-dimensional electrophoresis image analysis software packages, Z3 and Melanie.** *Electrophoresis* 2002, **23**:2194-2202.
143. Stessl M, Noe CR, Lachmann B: **Influence of image-analysis software on quantitation of two-dimensional gel electrophoresis data.** *Electrophoresis* 2009, **30**:325-328.
144. Corthals GL, Rose K: *Quantitation in proteomics. Proteome research: New frontiers in functional genomics.* Wilkins. Springer-Verlag; 2007.
145. Goshe MB, Smith RD: **Stable isotope-coded proteomic mass spectrometry.** *Curr Opin Biotechnol* 2003, **14**:101-109.
146. Ong SE, Mann M: **Mass spectrometry-based proteomics turns quantitative.** *Nat Chem Biol* 2005, **1**:252-262.
147. Bondarenko PV, Chelius D, Shaler TA: **Identification and relative quantitation of protein mixtures by enzymatic digestion followed by capillary reversed-phase liquid chromatography-tandem mass spectrometry.** *Anal Chem* 2002, **74**:4741-4749.
148. Ishihama Y, Oda Y, Tabata T, Sato T, Nagasu T, Rappsilber J, Mann M: **Exponentially modified protein abundance index (emPAI) for estimation of absolute protein amount in proteomics by the number of sequenced peptides per protein.** *Mol Cell Proteomics* 2005, **4**:1265-1272.
149. Bantscheff M, Schirle M, Sweetman G, Rick J, Kuster B: **Quantitative mass spectrometry in proteomics: a critical review.** *Anal Bioanal Chem* 2007, **389**:1017-1031.
150. Cox J, Mann M: **MaxQuant enables high peptide identification rates, individualized p.p.b.-range mass accuracies and proteome-wide protein quantification.** *Nat Biotechnol* 2008, **26**:1367-1372.
151. Leitner A, Lindner W: **Current chemical tagging strategies for proteome analysis by mass spectrometry.** *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2004, **813**:1-26.

152. Leitner A, Lindner W: **Chemistry meets proteomics: the use of chemical tagging reactions for MS-based proteomics.** *Proteomics* 2006, **6**:5418-5434.
153. 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**:994-999.
154. Yi EC, Li XJ, Cooke K, Lee H, Raught B, Page A, Aneliunas V, Hieter P, Goodlett DR, Aebersold R: **Increased quantitative proteome coverage with (13)C/(12)C-based, acid-cleavable isotope-coded affinity tag reagent and modified data acquisition scheme.** *Proteomics* 2005, **5**:380-387.
155. Karsan A, Pollet I, Yu LR, Chan KC, Conrads TP, Lucas DA, Andersen R, Veenstra T: **Quantitative proteomic analysis of sokotrasterol sulfate-stimulated primary human endothelial cells.** *Mol Cell Proteomics* 2005, **4**:191-204.
156. Li J, Steen H, Gygi SP: **Protein profiling with cleavable isotope-coded affinity tag (cICAT) reagents: the yeast salinity stress response.** *Mol Cell Proteomics* 2003, **2**:1198-1204.
157. Martin DB, Gifford DR, Wright ME, Keller A, Yi E, Goodlett DR, Aebersold R, Nelson PS: **Quantitative proteomic analysis of proteins released by neoplastic prostate epithelium.** *Cancer Res* 2004, **64**:347-355.
158. Meehan KL, Sadar MD: **Quantitative profiling of LNCaP prostate cancer cells using isotope-coded affinity tags and mass spectrometry.** *Proteomics* 2004, **4**:1116-1134.
159. Shio Y, Donohoe S, Yi EC, Goodlett DR, Aebersold R, Eisenman RN: **Quantitative proteomic analysis of Myc oncoprotein function.** *Embo J* 2002, **21**:5088-5096.
160. Ranish JA, Yi EC, Leslie DM, Purvine SO, Goodlett DR, Eng J, Aebersold R: **The study of macromolecular complexes by quantitative proteomics.** *Nat Genet* 2003, **33**:349-355.
161. Zhou Y, Gu G, Goodlett DR, Zhang T, Pan C, Montine TJ, Montine KS, Aebersold RH, Zhang J: **Analysis of alpha-synuclein-associated proteins by quantitative proteomics.** *J Biol Chem* 2004, **279**:39155-39164.
162. Dunkley TP, Watson R, Griffin JL, Dupree P, Lilley KS: **Localization of organelle proteins by isotope tagging (LOPIT).** *Mol Cell Proteomics* 2004, **3**:1128-1134.
163. Marelli M, Smith JJ, Jung S, Yi E, Nesvizhskii AI, Christmas RH, Saleem RA, Tam YY, Fagarasanu A, Goodlett DR, et al: **Quantitative mass spectrometry reveals**

- a role for the GTPase Rho1p in actin organization on the peroxisome membrane. *J Cell Biol* 2004, **167**:1099-1112.
164. Tam EM, Morrison CJ, Wu YI, Stack MS, Overall CM: **Membrane protease proteomics: Isotope-coded affinity tag MS identification of undescribed MT1-matrix metalloproteinase substrates.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004, **101**:6917-6922.
165. Ross PL, Huang YN, Marchese JN, Williamson B, Parker K, Hattan S, Khainovski N, Pillai S, Dey S, Daniels S, et al: **Multiplexed protein quantitation in *Saccharomyces cerevisiae* using amine-reactive isobaric tagging reagents.** *Mol Cell Proteomics* 2004, **3**:1154-1169.
166. Pierce A, Unwin RD, Evans CA, Griffiths S, Carney L, Zhang L, Jaworska E, Lee CF, Blinco D, Okoniewski MJ, et al: **Eight-channel iTRAQ enables comparison of the activity of six leukemogenic tyrosine kinases.** *Mol Cell Proteomics* 2008, **7**:853-863.
167. Zieske LR: **A perspective on the use of iTRAQ reagent technology for protein complex and profiling studies.** *J Exp Bot* 2006, **57**:1501-1508.
168. Gan CS, Chong PK, Pham TK, Wright PC: **Technical, experimental, and biological variations in isobaric tags for relative and absolute quantitation (iTRAQ).** *J Proteome Res* 2007, **6**:821-827.
169. **Applied Biosystems iTRAQ Reagents.** Foster City, CA Applied Biosystems; 2004.
170. Langen H, Fountoulakis M, Evers S, Wipf B, Berndt P: **15N and 13C labeling of cells for identification and quantification of proteins on 2D gels.** In *Proceedings from the 3rd Siena 2-D Electrophoresis Meeting; Siena, Italy.* Edited by Hochstrasser DF, Bini, L., and Pallini, V. ICES; 1998: 58.
171. Oda Y, Huang K, Cross FR, Cowburn D, Chait BT: **Accurate quantitation of protein expression and site-specific phosphorylation.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999, **96**:6591-6596.
172. Ong SE, Blagojev B, Kratchmarova I, Kristensen DB, Steen H, Pandey A, Mann M: **Stable isotope labeling by amino acids in cell culture, SILAC, as a simple and accurate approach to expression proteomics.** *Mol Cell Proteomics* 2002, **1**:376-386.
173. Ong SE, Foster LJ, Mann M: **Mass spectrometric-based approaches in quantitative proteomics.** *Methods* 2003, **29**:124-130.

174. Shah SJ, Yu KH, Sangar V, Parry SI, Blair IA: **Identification and quantification of preterm birth biomarkers in human cervicovaginal fluid by liquid chromatography/tandem mass spectrometry.** *J Proteome Res* 2009, **8**:2407-2417.
175. Yu KH, Barry CG, Austin D, Busch CM, Sangar V, Rustgi AK, Blair IA: **Stable isotope dilution multidimensional liquid chromatography-tandem mass spectrometry for pancreatic cancer serum biomarker discovery.** *J Proteome Res* 2009, **8**:1565-1576.
176. Desiderio DM, Kai M: **Preparation of stable isotope-incorporated peptide internal standards for field desorption mass spectrometry quantification of peptides in biologic tissue.** *Biomed Mass Spectrom* 1983, **10**:471-479.
177. Miyagi M, Rao KC: **Proteolytic 18O-labeling strategies for quantitative proteomics.** *Mass Spectrom Rev* 2007, **26**:121-136.
178. Yao X, Freas A, Ramirez J, Demirev PA, Fenselau C: **Proteolytic 18O labeling for comparative proteomics: model studies with two serotypes of adenovirus.** *Anal Chem* 2001, **73**:2836-2842.
179. Hicks WA, Halligan BD, Slyper RY, Twigger SN, Greene AS, Olivier M: **Simultaneous quantification and identification using 18O labeling with an ion trap mass spectrometer and the analysis software application "ZoomQuant".** *J Am Soc Mass Spectrom* 2005, **16**:916-925.
180. Li XJ, Zhang H, Ranish JA, Aebersold R: **Automated statistical analysis of protein abundance ratios from data generated by stable-isotope dilution and tandem mass spectrometry.** *Anal Chem* 2003, **75**:6648-6657.
181. Halligan BD, Slyper RY, Twigger SN, Hicks W, Olivier M, Greene AS: **ZoomQuant: an application for the quantitation of stable isotope labeled peptides.** *J Am Soc Mass Spectrom* 2005, **16**:302-306.
182. MacCoss MJ, Wu CC, Liu H, Sadygov R, Yates JR, 3rd: **A correlation algorithm for the automated quantitative analysis of shotgun proteomics data.** *Anal Chem* 2003, **75**:6912-6921.
183. Marzolf B, Deutsch EW, Moss P, Campbell D, Johnson MH, Galitski T: **SBEAMS-Microarray: database software supporting genomic expression analyses for systems biology.** *BMC Bioinformatics* 2006, **7**:286.
184. Weinstein RA: **Nosocomial infection update.** *Emerg Infect Dis* 1998, **4**:416-420.
185. Rahal JJ, Urban C, Segal-Maurer S: **Nosocomial antibiotic resistance in multiple gram-negative species: experience at one hospital with squeezing the resistance balloon at multiple sites.** *Clin Infect Dis* 2002, **34**:499-503.

186. Levy SB: **Multidrug resistance--a sign of the times.** *N Engl J Med* 1998, **338**:1376-1378.
187. Yates RR: **New intervention strategies for reducing antibiotic resistance.** *Chest* 1999, **115**:24S-27S.
188. Fluit AC, Jones ME, Schmitz FJ, Acar J, Gupta R, Verhoef J: **Antimicrobial susceptibility and frequency of occurrence of clinical blood isolates in Europe from the SENTRY antimicrobial surveillance program, 1997 and 1998.** *Clin Infect Dis* 2000, **30**:454-460.
189. Lee JH, Jeong SH, Cha SS, Lee SH: **New disturbing trend in antimicrobial resistance of gram-negative pathogens.** *PLoS Pathog* 2009, **5**:e1000221.
190. Talbot GH, Bradley J, Edwards JE, Jr., Gilbert D, Scheld M, Bartlett JG: **Bad bugs need drugs: an update on the development pipeline from the Antimicrobial Availability Task Force of the Infectious Diseases Society of America.** *Clin Infect Dis* 2006, **42**:657-668.
191. Munoz-Price LS, Weinstein RA: **Acinetobacter infection.** *N Engl J Med* 2008, **358**:1271-1281.
192. Chastre J: **Infections due to Acinetobacter baumannii in the ICU.** *Semin Respir Crit Care Med* 2003, **24**:69-78.
193. Alanis AJ: **Resistance to antibiotics: are we in the post-antibiotic era?** *Arch Med Res* 2005, **36**:697-705.
194. Peña C, Pujol M, Pallares R, Corbella X, Vidal T, Tortras N, Ariza J, Gudiol F: **Estimación de costes atribuibles a la infección nosocomial: Prolongación de hospitalización y cálculo de costes alternativos.** *Med Clin (Barcelona)* 1996, **106**:441-444.
195. Jones RN: **Resistance patterns among nosocomial pathogens: trends over the past few years.** *Chest* 2001, **119**:397S-404S.
196. Niederman MS: **Impact of antibiotic resistance on clinical outcomes and the cost of care.** *Crit Care Med* 2001, **29**:N114-120.
197. Martínez JL, Baquero F: **Interactions among strategies associated with bacterial infection: pathogenicity, epidemicity, and antibiotic resistance.** *Clin Microbiol Rev* 2002, **15**:647-679.

198. Lee NY, Lee HC, Ko NY, Chang CM, Shih HI, Wu CJ, Ko WC: **Clinical and economic impact of multidrug resistance in nosocomial *Acinetobacter baumannii* bacteremia.** *Infect Control Hosp Epidemiol* 2007, **28**:713-719.
199. Roberts RR, Hota B, Ahmad I, Scott RD, 2nd, Foster SD, Abbasi F, Schabowski S, Kampe LM, Ciavarella GG, Supino M, et al: **Hospital and societal costs of antimicrobial-resistant infections in a Chicago teaching hospital: implications for antibiotic stewardship.** *Clin Infect Dis* 2009, **49**:1175-1184.
200. Martin SJ, Micek ST, Wood GC: **Antimicrobial resistance: consideration as an adverse drug event.** *Crit Care Med* 2010, **38**:S155-161.
201. Waterer GW, Wunderink RG: **Increasing threat of Gram-negative bacteria.** *Crit Care Med* 2001, **29**:N75-81.
202. Wenzel RP, Wong MT: **Managing antibiotic use--impact of infection control.** *Clin Infect Dis* 1999, **28**:1126-1127.
203. Landman D, Quale JM, Mayorga D, Adedeji A, Vangala K, Ravishankar J, Flores C, Brooks S: **Citywide clonal outbreak of multiresistant *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa* in Brooklyn, NY: the preantibiotic era has returned.** *Arch Intern Med* 2002, **162**:1515-1520.
204. Burke JP: **Antibiotic resistance--squeezing the balloon?** *Jama* 1998, **280**:1270-1271.
205. Bou G: **[The high level resistance to carbapenems in *Acinetobacter baumannii* is a multifactorial problem].** *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2001, **19**:336-338.
206. Quinn JP: **Clinical problems posed by multiresistant nonfermenting gram-negative pathogens.** *Clin Infect Dis* 1998, **27 Suppl 1**:S117-124.
207. Acar JF, Goldstein FW: **Consequences of increasing resistance to antimicrobial agents.** *Clin Infect Dis* 1998, **27 Suppl 1**:S125-130.
208. Tafur JD, Torres JA, Villegas MV: **Mecanismos de resistencia a los antibióticos en bacterias Gram negativas.** In *Infect* vol. 12. pp. 227-232; 2008:227-232.
209. Dupont M, Pages JM, Lafitte D, Siroy A, Bollet C: **Identification of an OprD homologue in *Acinetobacter baumannii*.** *J Proteome Res* 2005, **4**:2386-2390.
210. Marti S, Sanchez-Cespedes J, Oliveira E, Bellido D, Giralt E, Vila J: **Proteomic analysis of a fraction enriched in cell envelope proteins of *Acinetobacter baumannii*.** *Proteomics* 2006, **6 Suppl 1**:S82-87.

211. Siroy A, Cosette P, Seyer D, Lemaitre-Guillier C, Vallenet D, Van Dorsselaer A, Boyer-Mariotte S, Jouenne T, De E: **Global comparison of the membrane subproteomes between a multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* strain and a reference strain.** *J Proteome Res* 2006, **5**:3385-3398.
212. Yun SH, Choi CW, Park SH, Lee JC, Leem SH, Choi JS, Kim S, Kim SI: **Proteomic analysis of outer membrane proteins from *Acinetobacter baumannii* DU202 in tetracycline stress condition.** *J Microbiol* 2008, **46**:720-727.
213. Soares NC, Cabral MP, Gayoso C, Mallo S, Rodriguez-Velo P, Fernandez-Moreira E, Bou G: **Associating growth-phase-related changes in the proteome of *Acinetobacter baumannii* with increased resistance to oxidative stress.** *J Proteome Res* 2010, **9**:1951-1964.
214. Vashist J, Tiwari V, Kapil A, Rajeswari MR: **Quantitative profiling and identification of outer membrane proteins of beta-lactam resistant strain of *Acinetobacter baumannii*.** *J Proteome Res* 2010, **9**:1121-1128.
215. Hood MI, Jacobs AC, Sayood K, Dunman PM, Skaar EP: ***Acinetobacter baumannii* increases tolerance to antibiotics in response to monovalent cations.** *Antimicrob Agents Chemother* 2010, **54**:1029-1041.
216. Soares AJ, Santos MF, Trugilho MR, Neves-Ferreira AG, Perales J, Domont GB: **Differential proteomics of the plasma of individuals with sepsis caused by *Acinetobacter baumannii*.** *J Proteomics* 2009, **73**:267-278.
217. Bergogne-Berezin E, Towner KJ: ***Acinetobacter* spp. as nosocomial pathogens: microbiological, clinical, and epidemiological features.** *Clin Microbiol Rev* 1996, **9**:148-165.
218. Joly-Guillou ML: **Clinical impact and pathogenicity of *Acinetobacter*.** *Clin Microbiol Infect* 2005, **11**:868-873.
219. Peleg AY, Seifert H, Paterson DL: ***Acinetobacter baumannii*: emergence of a successful pathogen.** *Clin Microbiol Rev* 2008, **21**:538-582.
220. Vieu JF, Bergogne-Berezin E, Joly ML, Berthelot G, Fichelle A, Prevost C: **[Epidemiology of *Acinetobacter calcoaceticus*].** *Nouv Presse Med* 1980, **9**:3551-3552.
221. Allen KD, Green HT: **Hospital outbreak of multi-resistant *Acinetobacter anitratus*: an airborne mode of spread?** *J Hosp Infect* 1987, **9**:110-119.
222. Bernards AT, Frenay HM, Lim BT, Hendriks WD, Dijkshoorn L, van Boven CP: **Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and *Acinetobacter baumannii*:**

- an unexpected difference in epidemiologic behavior. *Am J Infect Control* 1998, **26**:544-551.
223. Glew RH, Moellering RC, Jr., Kunz LJ: **Infections with *Acinetobacter calcoaceticus* (*Herellea vaginicola*): clinical and laboratory studies.** *Medicine (Baltimore)* 1977, **56**:79-97.
 224. deFreitas DJ, McCabe JP: ***Acinetobacter baumannii* meningitis: a rare complication of incidental durotomy.** *J Spinal Disord Tech* 2004, **17**:115-116.
 225. Sader HS, Jones RN, Silva JB: **Skin and soft tissue infections in Latin American medical centers: four-year assessment of the pathogen frequency and antimicrobial susceptibility patterns.** *Diagn Microbiol Infect Dis* 2002, **44**:281-288.
 226. Sebeny PJ, Riddle MS, Petersen K: ***Acinetobacter baumannii* skin and soft-tissue infection associated with war trauma.** *Clin Infect Dis* 2008, **47**:444-449.
 227. Guerrero DM, Perez F, Conger NG, Solomkin JS, Adams MD, Rather PN, Bonomo RA: ***Acinetobacter baumannii*-Associated Skin and Soft Tissue Infections: Recognizing a Broadening Spectrum of Disease.** *Surg Infect (Larchmt)* 2009.
 228. Zapor MJ, Moran KA: **Infectious diseases during wartime.** *Curr Opin Infect Dis* 2005, **18**:395-399.
 229. Güell O: **Una bacteria infecta la UCI de adultos del hospital 12 de Octubre desde 2005.** In *El País*. Madrid; 2007.
 230. Brisou J, Prevot AR: **[Studies on bacterial taxonomy. X. The revision of species under *Acromobacter* group.]** *Ann Inst Pasteur (Paris)* 1954, **86**:722-728.
 231. Rossau R, Landshoot AV, Gillis M, Ley JD: **Taxonomy of *Moraxellaceae* fam. nov., a New Bacterial Family To Accommodate the Genera *Moraxella*, *Acinetobacter*, and *Psychrobacter* and Related Organisms.** *Int J Syst Bacteriol* 1991, **41**:310 - 319.
 232. Song J, Choo YJ, Cho JC: ***Perlucidibaca piscinae* gen. nov., sp. nov., a freshwater bacterium belonging to the family *Moraxellaceae*.** *Int J Syst Evol Microbiol* 2008, **58**:97-102.
 233. Bouvet PJ, Grimont PA: **Taxonomy of the genus *Acinetobacter* with the recognition of *Acinetobacter baumannii* sp. nov., *Acinetobacter haemolyticus* sp. nov., *Acinetobacter johnsonii* sp. nov., and *Acinetobacter junii* sp. nov., and emended description of *Acinetobacter calcoaceticus* and *Acinetobacter lwoffii*.** *Int J Syst Bacteriol* 1986, **36**:228-240.

234. Nemec A, De Baere T, Tjernberg I, Vaneechoutte M, van der Reijden TJ, Dijkshoorn L: **Acinetobacter ursingii sp. nov. and Acinetobacter schindleri sp. nov., isolated from human clinical specimens.** *Int J Syst Evol Microbiol* 2001, **51**:1891-1899.
235. Nemec A, Dijkshoorn L, Cleenwerck I, De Baere T, Janssens D, Van Der Reijden TJ, Jezek P, Vaneechoutte M: **Acinetobacter parvus sp. nov., a small-colony-forming species isolated from human clinical specimens.** *Int J Syst Evol Microbiol* 2003, **53**:1563-1567.
236. Carr EL, Kampfer P, Patel BK, Gurtler V, Seviour RJ: **Seven novel species of Acinetobacter isolated from activated sludge.** *Int J Syst Evol Microbiol* 2003, **53**:953-963.
237. **List of Bacterial Names with Standing in Nomenclature: a folder available on the Internet** [<http://www.bacterio.net>]
238. Beijerinck M: **Pigmenten als oxydatieproducten gevormd door bacterien.** *Versl Koninklijke Akad Wetensch Amsterdam* 1911, **19**:1092-1103.
239. Skerman VBD, McGowan V, Sneath PHA: **Approved list of bacterial names.** *Int J Syst Bacteriol* 1980, **30**:225-420.
240. Baumann P, Doudoroff M, Stanier RY: **A study of the Moraxella group. II. Oxidative-negative species (genus Acinetobacter).** *J Bacteriol* 1968, **95**:1520-1541.
241. Audureau A: **Etude du genre Moraxella.** *Ann Inst Pasteur* 1940, **64**:126-166.
242. Vaneechoutte M, De Baere T, Nemec A, Musilek M, van der Reijden TJ, Dijkshoorn L: **Reclassification of Acinetobacter grimontii Carr et al. 2003 as a later synonym of Acinetobacter junii Bouvet and Grimont 1986.** *Int J Syst Evol Microbiol* 2008, **58**:937-940.
243. Tjernberg I, Ursing J: **Clinical strains of Acinetobacter classified by DNA-DNA hybridization.** *Apmis* 1989, **97**:595-605.
244. Bouvet PJ, Jeanjean S: **Delineation of new proteolytic genomic species in the genus Acinetobacter.** *Res Microbiol* 1989, **140**:291-299.
245. Nishimura Y, Kanzaki H, Iizuka H: **Taxonomic studies of Acinetobacter species based on the electrophoretic analysis of enzymes.** *J Basic Microbiol* 1988, **28**:363-370.

246. Gerner-Smidt P, Tjernberg I: **Acinetobacter in Denmark: II. Molecular studies of the Acinetobacter calcoaceticus-Acinetobacter baumannii complex.** *Apmis* 1993, **101**:826-832.
247. Kim D, Baik KS, Kim MS, Park SC, Kim SS, Rhee MS, Kwak YS, Seong CN: **Acinetobacter soli sp. nov., isolated from forest soil.** *J Microbiol* 2008, **46**:396-401.
248. Nemec A, Musilek M, Maixnerova M, De Baere T, van der Reijden TJ, Vaneechoutte M, Dijkshoorn L: **Acinetobacter beijerinckii sp. nov. and Acinetobacter gyllenbergii sp. nov., haemolytic organisms isolated from humans.** *Int J Syst Evol Microbiol* 2009, **59**:118-124.
249. Vaneechoutte M, Nemec A, Musilek M, van der Reijden TJ, van den Barselaar M, Tjernberg I, Calame W, Fani R, De Baere T, Dijkshoorn L: **Description of Acinetobacter venetianus ex Di Cello et al. 1997 sp. nov.** *Int J Syst Evol Microbiol* 2009, **59**:1376-1381.
250. Nemec A, Musilek M, Sedo O, De Baere T, Maixnerova M, van der Reijden TJ, Zdrahal Z, Vaneechoutte M, Dijkshoorn L: **Acinetobacter bereziniae sp. nov. and Acinetobacter guillouiae sp. nov., to accommodate Acinetobacter genomic species 10 and 11, respectively.** *Int J Syst Evol Microbiol* 2010, **60**:896-903.
251. Gerner-Smidt P: **Ribotyping of the Acinetobacter calcoaceticus-Acinetobacter baumannii complex.** *J Clin Microbiol* 1992, **30**:2680-2685.
252. Gerner-Smidt P, Tjernberg I, Ursing J: **Reliability of phenotypic tests for identification of Acinetobacter species.** *J Clin Microbiol* 1991, **29**:277-282.
253. CLSI: **Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; 16th informational supplement. CLSI document M100-S15.** Wayne, Pa.: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2005.
254. Asensio A, Canton R, Vaque J, Calbo-Torrecillas F, Herruzo R, Arribas JL, Saenz MC: **[Prevalence of infection by carbapenem-resistant Acinetobacter baumannii in Spain (1999-2005)].** *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2008, **26**:199-204.
255. Nemec A: **Antimicrobial resistance and clonality in Acinetobacter baumannii.** Universiy of Leiden, 2009.
256. Seifert H, Dijkshoorn L, Gerner-Smidt P, Pelzer N, Tjernberg I, Vaneechoutte M: **Distribution of Acinetobacter species on human skin: comparison of phenotypic and genotypic identification methods.** *J Clin Microbiol* 1997, **35**:2819-2825.

257. Gales AC, Jones RN, Forward KR, Linares J, Sader HS, Verhoef J: **Emerging importance of multidrug-resistant Acinetobacter species and Stenotrophomonas maltophilia as pathogens in seriously ill patients: geographic patterns, epidemiological features, and trends in the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (1997-1999).** *Clin Infect Dis* 2001, **32** Suppl 2:S104-113.
258. Tankovic J, Legrand P, De Gatines G, Chemineau V, Brun-Buisson C, Duval J: **Characterization of a hospital outbreak of imipenem-resistant Acinetobacter baumannii by phenotypic and genotypic typing methods.** *J Clin Microbiol* 1994, **32**:2677-2681.
259. Levin AS, Mendes CM, Sinto SI, Sader HS, Scarpitta CR, Rodrigues E, Sauaia N, Boulos M: **An outbreak of multiresistant Acinetobacter baumannii in a university hospital in Sao Paulo, Brazil.** *Infect Control Hosp Epidemiol* 1996, **17**:366-368.
260. Fierobe L, Lucet JC, Decre D, Muller-Serieys C, Deleuze A, Joly-Guillou ML, Mantz J, Desmonts JM: **An outbreak of imipenem-resistant Acinetobacter baumannii in critically ill surgical patients.** *Infect Control Hosp Epidemiol* 2001, **22**:35-40.
261. Barbolla RE, Centron D, Di Martino A, Maimone S, Salgueira C, Famiglietti A, Vay C, Catalano M: **Identification of an epidemic carbapenem-resistant Acinetobacter baumannii strain at hospitals in Buenos Aires City.** *Diagn Microbiol Infect Dis* 2003, **45**:261-264.
262. Houang ET, Chu YW, Leung CM, Chu KY, Berlau J, Ng KC, Cheng AF: **Epidemiology and infection control implications of Acinetobacter spp. in Hong Kong.** *J Clin Microbiol* 2001, **39**:228-234.
263. Lee K, Ha GY, Shin BM, Kim JJ, Kang JO, Jang SJ, Yong D, Chong Y: **Metallo-beta-lactamase-producing Gram-negative bacilli in Korean Nationwide Surveillance of Antimicrobial Resistance group hospitals in 2003: continued prevalence of VIM-producing Pseudomonas spp. and increase of IMP-producing Acinetobacter spp.** *Diagn Microbiol Infect Dis* 2004, **50**:51-58.
264. Liu SY, Lin JY, Chu C, Su LH, Lin TY, Chiu CH: **Integron-associated imipenem resistance in Acinetobacter baumannii isolated from a regional hospital in Taiwan.** *Int J Antimicrob Agents* 2006, **27**:81-84.
265. Naas T, Levy M, Hirschauer C, Marchandin H, Nordmann P: **Outbreak of carbapenem-resistant Acinetobacter baumannii producing the carbapenemase OXA-23 in a tertiary care hospital of Papeete, French Polynesia.** *J Clin Microbiol* 2005, **43**:4826-4829.

266. Nishio H, Komatsu M, Shibata N, Shimakawa K, Sueyoshi N, Ura T, Satoh K, Toyokawa M, Nakamura T, Wada Y, et al: **Metallo-beta-lactamase-producing gram-negative bacilli: laboratory-based surveillance in cooperation with 13 clinical laboratories in the Kinki region of Japan.** *J Clin Microbiol* 2004, **42**:5256-5263.
267. Quale J, Bratu S, Landman D, Heddurshetti R: **Molecular epidemiology and mechanisms of carbapenem resistance in Acinetobacter baumannii endemic in New York City.** *Clin Infect Dis* 2003, **37**:214-220.
268. Van Looveren M, Goossens H: **Antimicrobial resistance of Acinetobacter spp. in Europe.** *Clin Microbiol Infect* 2004, **10**:684-704.
269. Yu YS, Yang Q, Xu XW, Kong HS, Xu GY, Zhong BY: **Typing and characterization of carbapenem-resistant Acinetobacter calcoaceticus-baumannii complex in a Chinese hospital.** *J Med Microbiol* 2004, **53**:653-656.
270. Fournier PE, Richet H: **The epidemiology and control of Acinetobacter baumannii in health care facilities.** *Clin Infect Dis* 2006, **42**:692-699.
271. Villegas MV, Hartstein AI: **Acinetobacter outbreaks, 1977-2000.** *Infect Control Hosp Epidemiol* 2003, **24**:284-295.
272. Turton JF, Kaufmann ME, Warner M, Coelho J, Dijkshoorn L, van der Reijden T, Pitt TL: **A prevalent, multiresistant clone of Acinetobacter baumannii in Southeast England.** *J Hosp Infect* 2004, **58**:170-179.
273. van den Broek PJ, Arends J, Bernardts AT, De Brauwier E, Mascini EM, van der Reijden TJ, Spanjaard L, Thewessen EA, van der Zee A, van Zeijl JH, Dijkshoorn L: **Epidemiology of multiple Acinetobacter outbreaks in The Netherlands during the period 1999-2001.** *Clin Microbiol Infect* 2006, **12**:837-843.
274. Coelho JM, Turton JF, Kaufmann ME, Glover J, Woodford N, Warner M, Palepou MF, Pike R, Pitt TL, Patel BC, Livermore DM: **Occurrence of carbapenem-resistant Acinetobacter baumannii clones at multiple hospitals in London and Southeast England.** *J Clin Microbiol* 2006, **44**:3623-3627.
275. Da Silva G, Dijkshoorn L, van der Reijden T, van Strijen B, Duarte A: **Identification of widespread, closely related Acinetobacter baumannii isolates in Portugal as a subgroup of European clone II.** *Clin Microbiol Infect* 2007, **13**:190-195.
276. Naas T, Coignard B, Carbonne A, Blanckaert K, Bajolet O, Bernet C, Verdeil X, Astagneau P, Desenclos JC, Nordmann P: **VEB-1 Extended-spectrum beta-lactamase-producing Acinetobacter baumannii, France.** *Emerg Infect Dis* 2006, **12**:1214-1222.

277. Vila J, Ruiz J, Navia M, Becerril B, Garcia I, Perea S, Lopez-Hernandez I, Alamo I, Ballester F, Planes AM, et al: **Spread of amikacin resistance in *Acinetobacter baumannii* strains isolated in Spain due to an epidemic strain.** *J Clin Microbiol* 1999, **37**:758-761.
278. Bogaerts P, Naas T, Wybo I, Bauraing C, Soetens O, Pierard D, Nordmann P, Glupczynski Y: **Outbreak of infection by carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* producing the carbapenemase OXA-58 in Belgium.** *J Clin Microbiol* 2006, **44**:4189-4192.
279. Schulte B, Goerke C, Weyrich P, Grobner S, Bahrs C, Wolz C, Autenrieth IB, Borgmann S: **Clonal spread of meropenem-resistant *Acinetobacter baumannii* strains in hospitals in the Mediterranean region and transmission to South-west Germany.** *J Hosp Infect* 2005, **61**:356-357.
280. Nemeč A, Krizová L, Maixnerová M, Diancourt L, van der Reijden TJ, Brisse S, van den Broek P, Dijkshoorn L: **Emergence of carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii* in the Czech Republic is associated with the spread of multidrug-resistant strains of European clone II.** *J Antimicrob Chemother* 2008, **62**:484-489.
281. Naas T, Kernbaum S, Allali S, Nordmann P: **Multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*, Russia.** *Emerg Infect Dis* 2007, **13**:669-671.
282. Peleg AY, Bell JM, Hofmeyr A, Wiese P: **Inter-country transfer of Gram-negative organisms carrying the VIM-4 and OXA-58 carbapenem-hydrolysing enzymes.** *J Antimicrob Chemother* 2006, **57**:794-795.
283. Onarheim H, Hoivik T, Harthug S, Digranes A, Mylvaganam H, Vindenes HA: **[Outbreak of multiresistant *Acinetobacter baumannii* infection].** *Tidsskr Nor Lægeforen* 2000, **120**:1028-1033.
284. Davis KA, Moran KA, McAllister CK, Gray PJ: **Multidrug-resistant *Acinetobacter* extremity infections in soldiers.** *Emerg Infect Dis* 2005, **11**:1218-1224.
285. Hawley JS, Murray CK, Griffith ME, McElmeel ML, Fulcher LC, Hospenthal DR, Jorgensen JH: **Susceptibility of acinetobacter strains isolated from deployed U.S. military personnel.** *Antimicrob Agents Chemother* 2007, **51**:376-378.
286. Hujer KM, Hujer AM, Hulten EA, Bajaksouzian S, Adams JM, Donskey CJ, Ecker DJ, Massire C, Eshoo MW, Sampath R, et al: **Analysis of antibiotic resistance genes in multidrug-resistant *Acinetobacter* sp. isolates from military and civilian patients treated at the Walter Reed Army Medical Center.** *Antimicrob Agents Chemother* 2006, **50**:4114-4123.

287. Jones A, Morgan D, Walsh A, Turton J, Livermore D, Pitt T, Green A, Gill M, Mortiboy D: **Importation of multidrug-resistant *Acinetobacter* spp infections with casualties from Iraq.** *Lancet Infect Dis* 2006, **6**:317-318.
288. Turton JF, Kaufmann ME, Gill MJ, Pike R, Scott PT, Fishbain J, Craft D, Deye G, Riddell S, Lindler LE, Pitt TL: **Comparison of *Acinetobacter baumannii* isolates from the United Kingdom and the United States that were associated with repatriated casualties of the Iraq conflict.** *J Clin Microbiol* 2006, **44**:2630-2634.
289. Rodriguez-Bano J, Cisneros JM, Fernandez-Cuenca F, Ribera A, Vila J, Pascual A, Martinez-Martinez L, Bou G, Pachon J: **Clinical features and epidemiology of *Acinetobacter baumannii* colonization and infection in Spanish hospitals.** *Infect Control Hosp Epidemiol* 2004, **25**:819-824.
290. Urban C, Segal-Maurer S, Rahal JJ: **Considerations in control and treatment of nosocomial infections due to multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*.** *Clin Infect Dis* 2003, **36**:1268-1274.
291. Joly-Guillou ML, Hidri N, Wolff. M: ***Acinetobacter*, agent d'infections nosocomiales. Apport des modèles expérimentaux.** *Presse Med* 2002, **31**:651-656.
292. Obana Y, Nishino T, Tanino T: **In-vitro and in-vivo activities of antimicrobial agents against *Acinetobacter calcoaceticus*.** *J Antimicrob Chemother* 1985, **15**:441-448.
293. Obana Y: **Pathogenic significance of *Acinetobacter calcoaceticus*: analysis of experimental infection in mice.** *Microbiol Immunol* 1986, **30**:645-657.
294. Andersson DI: **Persistence of antibiotic resistant bacteria.** *Curr Opin Microbiol* 2003, **6**:452-456.
295. Andersson DI: **The biological cost of mutational antibiotic resistance: any practical conclusions?** *Curr Opin Microbiol* 2006, **9**:461-465.
296. Depardieu F, Podglajen I, Leclercq R, Collatz E, Courvalin P: **Modes and modulations of antibiotic resistance gene expression.** *Clin Microbiol Rev* 2007, **20**:79-114.
297. Fernandez-Reyes M, Rodriguez-Falcon M, Chiva C, Pachon J, Andreu D, Rivas L: **The cost of resistance to colistin in *Acinetobacter baumannii*: a proteomic perspective.** *Proteomics* 2009, **9**:1632-1645.
298. Vincent JL: **Dear SIRS, I'm sorry to say that I don't like you.** *Crit Care Med* 1997, **25**:372-374.

299. Rahal JJ, Urban C: **Acinetobacter: Epidemiology and control.** In *Weinstein RA, Bonten MJM Infection control in the ICU environment.* Boston: Kluwer Academic Pub.; 2001: 67-76
300. Garnacho-Montero J, Ortiz-Leyba C, Fernandez-Hinojosa E, Aldabo-Pallas T, Cayuela A, Marquez-Vacaro JA, Garcia-Curiel A, Jimenez-Jimenez FJ: **Acinetobacter baumannii ventilator-associated pneumonia: epidemiological and clinical findings.** *Intensive Care Med* 2005, **31**:649-655.
301. Anstey NM, Currie BJ, Hassell M, Palmer D, Dwyer B, Seifert H: **Community-acquired bacteremic Acinetobacter pneumonia in tropical Australia is caused by diverse strains of Acinetobacter baumannii, with carriage in the throat in at-risk groups.** *J Clin Microbiol* 2002, **40**:685-686.
302. Anstey NM, Currie BJ, Withnall KM: **Community-acquired Acinetobacter pneumonia in the Northern Territory of Australia.** *Clin Infect Dis* 1992, **14**:83-91.
303. Bick JA, Semel JD: **Fulminant community-acquired Acinetobacter pneumonia in a healthy woman.** *Clin Infect Dis* 1993, **17**:820-821.
304. Gottlieb T, Barnes DJ: **Community-acquired Acinetobacter pneumonia.** *Aust N Z J Med* 1989, **19**:259-260.
305. Leung WS, Chu CM, Tsang KY, Lo FH, Lo KF, Ho PL: **Fulminant community-acquired Acinetobacter baumannii pneumonia as a distinct clinical syndrome.** *Chest* 2006, **129**:102-109.
306. Seifert H, Strate A, Pulverer G: **Nosocomial bacteremia due to Acinetobacter baumannii. Clinical features, epidemiology, and predictors of mortality.** *Medicine (Baltimore)* 1995, **74**:340-349.
307. CDC: **Acinetobacter baumannii infections among patients at military medical facilities treating injured U.S. service members, 2002-2004.** *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 2004, **53**:1063-1066.
308. Trottier V, Segura PG, Namias N, King D, Pizano LR, Schulman CI: **Outcomes of Acinetobacter baumannii infection in critically ill burned patients.** *J Burn Care Res* 2007, **28**:248-254.
309. Johnson EN, Burns TC, Hayda RA, Hospenthal DR, Murray CK: **Infectious complications of open type III tibial fractures among combat casualties.** *Clin Infect Dis* 2007, **45**:409-415.

310. Briggs S, Ellis-Pegler R, Raymond N, Thomas M, Wilkinson L: **Gram-negative bacillary meningitis after cranial surgery or trauma in adults.** *Scand J Infect Dis* 2004, **36**:165-173.
311. Durand ML, Calderwood SB, Weber DJ, Miller SI, Southwick FS, Caviness VS, Jr., Swartz MN: **Acute bacterial meningitis in adults. A review of 493 episodes.** *N Engl J Med* 1993, **328**:21-28.
312. Palabiyikoglu I, E. Tekeli, F. Cokca, O. Akan, N. Unal, I. Erberktas, S. Lale, and S. Kiraz. : **Nosocomial meningitis in a university hospital between 1993 and 2002.** *J Hosp Infect* 2006, **62**:94-97.
313. Siegman-Igra Y, Bar-Yosef S, Gorea A, Avram J: **Nosocomial acinetobacter meningitis secondary to invasive procedures: report of 25 cases and review.** *Clin Infect Dis* 1993, **17**:843-849.
314. Metan G, Alp E, Aygen B, Sumerkan B: **Carbapenem-resistant Acinetobacter baumannii: an emerging threat for patients with post-neurosurgical meningitis.** *Int J Antimicrob Agents* 2007, **29**:112-113.
315. Nguyen MH, Harris SP, Muder RR, Pasculle AW: **Antibiotic-resistant Acinetobacter meningitis in neurosurgical patients.** *Neurosurgery* 1994, **35**:851-855; discussion 855.
316. Nunez ML, Martinez-Toldos MC, Bru M, Simarro E, Segovia M, Ruiz J: **Appearance of resistance to meropenem during the treatment of a patient with meningitis by Acinetobacter.** *Scand J Infect Dis* 1998, **30**:421-423.
317. O'Neill E, Humphreys H, Phillips J, Smyth EG: **Third-generation cephalosporin resistance among Gram-negative bacilli causing meningitis in neurosurgical patients: significant challenges in ensuring effective antibiotic therapy.** *J Antimicrob Chemother* 2006, **57**:356-359.
318. Metan G, Alp E, Aygen B, Sumerkan B: **Acinetobacter baumannii meningitis in post-neurosurgical patients: clinical outcome and impact of carbapenem resistance.** *J Antimicrob Chemother* 2007, **60**:197-199.
319. Menon T, Shanmugasundaram S, Nandhakumar B, Nalina K, Balasubramaniam: **Infective endocarditis due to Acinetobacter baumannii complex--a case report.** *Indian J Pathol Microbiol* 2006, **49**:576-578.
320. Olut AI, Erkek E: **Early prosthetic valve endocarditis due to Acinetobacter baumannii: a case report and brief review of the literature.** *Scand J Infect Dis* 2005, **37**:919-921.

321. Rizos I, Tsiodras S, Papathanasiou S, Rigopoulos A, Barbetseas J, Stefanadis C: **Prosthetic valve endocarditis due to Acinetobacter spp: a rare case and literature review.** *Am J Med Sci* 2007, **333**:197-199.
322. Starakis I, Blikas A, Siagris D, Marangos M, Karatza C, Bassaris H: **Prosthetic valve endocarditis caused by Acinetobacter lwoffii: a case report and review.** *Cardiol Rev* 2006, **14**:45-49.
323. Valero C, Farinas MC, Garcia Palomo D, Mazarrasa JC, Gonzalez Macias J: **Endocarditis due to Acinetobacter lwoffii on native mitral valve.** *Int J Cardiol* 1999, **69**:97-99.
324. Corrigan KM, Harmis NY, Willcox MD: **Association of acinetobacter species with contact lens-induced adverse responses.** *Cornea* 2001, **20**:463-466.
325. Kau HC, Tsai CC, Kao SC, Hsu WM, Liu JH: **Corneal ulcer of the side port after phacoemulsification induced by Acinetobacter baumannii.** *J Cataract Refract Surg* 2002, **28**:895-897.
326. Levy J, Oshry T, Rabinowitz R, Lifshitz T: **Acinetobacter corneal graft ulcer and endophthalmitis: report of two cases.** *Can J Ophthalmol* 2005, **40**:79-82.
327. Lindbohm N, Moilanen JA, Vesaluoma MH, Tervo TM: **Acinetobacter and Staphylococcus aureus ulcerative keratitis after laser in situ keratomileusis treated with antibiotics and phototherapeutic keratectomy.** *J Refract Surg* 2005, **21**:404-406.
328. Lorenz MG, Wackernagel W: **Bacterial gene transfer by natural genetic transformation in the environment.** *Microbiol Rev* 1994, **58**:563-602.
329. Nielsen KM, Bones AM, Van Elsas JD: **Induced Natural Transformation of Acinetobacter calcoaceticus in Soil Microcosms.** *Appl Environ Microbiol* 1997, **63**:3972-3977.
330. Metzgar D, Bacher JM, Pezo V, Reader J, Doring V, Schimmel P, Marliere P, de Crecy-Lagard V: **Acinetobacter sp. ADP1: an ideal model organism for genetic analysis and genome engineering.** *Nucleic Acids Res* 2004, **32**:5780-5790.
331. Young DM, Ornston LN: **Functions of the mismatch repair gene mutS from Acinetobacter sp. strain ADP1.** *J Bacteriol* 2001, **183**:6822-6831.
332. Barbe V, Vallenet D, Fonknechten N, Kreimeyer A, Oztas S, Labarre L, Cruveiller S, Robert C, Duprat S, Wincker P, et al: **Unique features revealed by the genome sequence of Acinetobacter sp. ADP1, a versatile and naturally transformation competent bacterium.** *Nucleic Acids Res* 2004, **32**:5766-5779.

333. Busch S, Rosenplanter C, Averhoff B: **Identification and characterization of ComE and ComF, two novel pilin-like competence factors involved in natural transformation of Acinetobacter sp. strain BD413.** *Appl Environ Microbiol* 1999, **65**:4568-4574.
334. Herzberg C, Friedrich A, Averhoff B: **comB, a novel competence gene required for natural transformation of Acinetobacter sp. BD413: identification, characterization, and analysis of growth-phase-dependent regulation.** *Arch Microbiol* 2000, **173**:220-228.
335. Porstendorfer D, Gohl O, Mayer F, Averhoff B: **ComP, a pilin-like protein essential for natural competence in Acinetobacter sp. Strain BD413: regulation, modification, and cellular localization.** *J Bacteriol* 2000, **182**:3673-3680.
336. Perez F, Hujer AM, Hujer KM, Decker BK, Rather PN, Bonomo RA: **Global challenge of multidrug-resistant Acinetobacter baumannii.** *Antimicrob Agents Chemother* 2007, **51**:3471-3484.
337. Fournier PE, Vallenet D, Barbe V, Audic S, Ogata H, Poirel L, Richet H, Robert C, Mangenot S, Abergel C, et al: **Comparative genomics of multidrug resistance in Acinetobacter baumannii.** *PLoS Genet* 2006, **2**:e7.
338. Piechaud D, Piechaud M, Second L: **[Proteolytic types of Moraxella lwoffii and Moraxella glucidolytica (Bacterium anitratum).].** *Ann Inst Pasteur (Paris)* 1956, **90**:517-522.
339. Iacono M, Villa L, Fortini D, Bordoni R, Imperi F, Bonnal RJ, Sicheritz-Ponten T, De Bellis G, Visca P, Cassone A, Carattoli A: **Whole-genome pyrosequencing of an epidemic multidrug-resistant Acinetobacter baumannii strain belonging to the European clone II group.** *Antimicrob Agents Chemother* 2008, **52**:2616-2625.
340. Goldstein FW, Labigne-Roussel A, Gerbaud G, Carlier C, Collatz E, Courvalin P: **Transferable plasmid-mediated antibiotic resistance in Acinetobacter.** *Plasmid* 1983, **10**:138-147.
341. Murray BE, Moellering RC, Jr.: **Evidence of plasmid-mediated production of aminoglycoside-modifying enzymes not previously described in Acinetobacter.** *Antimicrob Agents Chemother* 1980, **17**:30-36.
342. Devaud M, Kayser FH, Bachi B: **Transposon-mediated multiple antibiotic resistance in Acinetobacter strains.** *Antimicrob Agents Chemother* 1982, **22**:323-329.
343. Palmén R, Hellingwerf KJ: **Uptake and processing of DNA by Acinetobacter calcoaceticus--a review.** *Gene* 1997, **192**:179-190.

344. Fluit AC, Schmitz FJ: **Resistance integrons and super-integrons.** *Clin Microbiol Infect* 2004, **10**:272-288.
345. Rowe-Magnus DA, Mazel D: **The role of integrons in antibiotic resistance gene capture.** *Int J Med Microbiol* 2002, **292**:115-125.
346. Poirel L, Cabanne L, Vahaboglu H, Nordmann P: **Genetic environment and expression of the extended-spectrum beta-lactamase blaPER-1 gene in gram-negative bacteria.** *Antimicrob Agents Chemother* 2005, **49**:1708-1713.
347. Severino P, Magalhaes VD: **Integrons as tools for epidemiological studies.** *Clin Microbiol Infect* 2004, **10**:156-162.
348. Turton JF, Kaufmann ME, Glover J, Coelho JM, Warner M, Pike R, Pitt TL: **Detection and typing of integrons in epidemic strains of Acinetobacter baumannii found in the United Kingdom.** *J Clin Microbiol* 2005, **43**:3074-3082.
349. Seward RJ: **Detection of integrons in worldwide nosocomial isolates of Acinetobacter spp.** *Clin Microbiol Infect* 1999, **5**:308-318.
350. Weldhagen GF: **Integrons and beta-lactamases--a novel perspective on resistance.** *Int J Antimicrob Agents* 2004, **23**:556-562.
351. Segal H, Garry S, Elisha BG: **Is IS(ABA-1) customized for Acinetobacter?** *FEMS Microbiol Lett* 2005, **243**:425-429.
352. Heritier C, Poirel L, Nordmann P: **Cephalosporinase over-expression resulting from insertion of ISAbal in Acinetobacter baumannii.** *Clin Microbiol Infect* 2006, **12**:123-130.
353. Turton JF, Ward ME, Woodford N, Kaufmann ME, Pike R, Livermore DM, Pitt TL: **The role of ISAbal in expression of OXA carbapenemase genes in Acinetobacter baumannii.** *FEMS Microbiol Lett* 2006, **258**:72-77.
354. **Antimicrobial resistance**
[<http://encyclopedia2.thefreedictionary.com/Antimicrobial+resistance>]
355. Bou G, Cervero G, Dominguez MA, Quereda C, Martinez-Beltran J: **Characterization of a nosocomial outbreak caused by a multiresistant Acinetobacter baumannii strain with a carbapenem-hydrolyzing enzyme: high-level carbapenem resistance in A. baumannii is not due solely to the presence of beta-lactamases.** *J Clin Microbiol* 2000, **38**:3299-3305.
356. Fernandez-Cuenca F, Martinez-Martinez L, Conejo MC, Ayala JA, Perea EJ, Pascual A: **Relationship between beta-lactamase production, outer**

- membrane protein and penicillin-binding protein profiles on the activity of carbapenems against clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. *J Antimicrob Chemother* 2003, **51**:565-574.
357. Bou G, Martinez-Beltran J: **Cloning, nucleotide sequencing, and analysis of the gene encoding an AmpC beta-lactamase in *Acinetobacter baumannii***. *Antimicrob Agents Chemother* 2000, **44**:428-432.
 358. Hujer KM, Hamza NS, Hujer AM, Perez F, Helfand MS, Bethel CR, Thomson JM, Anderson VE, Barlow M, Rice LB, et al: **Identification of a new allelic variant of the *Acinetobacter baumannii* cephalosporinase, ADC-7 beta-lactamase: defining a unique family of class C enzymes**. *Antimicrob Agents Chemother* 2005, **49**:2941-2948.
 359. Perilli M, Felici A, Oratore A, Cornaglia G, Bonfiglio G, Rossolini GM, Amicosante G: **Characterization of the chromosomal cephalosporinases produced by *Acinetobacter lwoffii* and *Acinetobacter baumannii* clinical isolates**. *Antimicrob Agents Chemother* 1996, **40**:715-719.
 360. Ruiz M, Marti S, Fernandez-Cuenca F, Pascual A, Vila J: **Prevalence of IS(Aba1) in epidemiologically unrelated *Acinetobacter baumannii* clinical isolates**. *FEMS Microbiol Lett* 2007, **274**:63-66.
 361. Corvec S, Caroff N, Espaze E, Giraudeau C, Drugeon H, Reynaud A: **AmpC cephalosporinase hyperproduction in *Acinetobacter baumannii* clinical strains**. *J Antimicrob Chemother* 2003, **52**:629-635.
 362. Segal H, Nelson EC, Elisha BG: **Genetic environment and transcription of ampC in an *Acinetobacter baumannii* clinical isolate**. *Antimicrob Agents Chemother* 2004, **48**:612-614.
 363. Poirel L, Nordmann P: **Carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii*: mechanisms and epidemiology**. *Clin Microbiol Infect* 2006, **12**:826-836.
 364. Queenan AM, Bush K: **Carbapenemases: the versatile beta-lactamases**. *Clin Microbiol Rev* 2007, **20**:440-458, table of contents.
 365. Walsh TR, Toleman MA, Poirel L, Nordmann P: **Metallo-beta-lactamases: the quiet before the storm?** *Clin Microbiol Rev* 2005, **18**:306-325.
 366. Canduela MJ, Gallego L, Sevillano E, Valderrey C, Calvo F, Perez J: **Evolution of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates obtained from elderly patients with respiratory tract infections**. *J Antimicrob Chemother* 2006, **57**:1220-1222.

367. Koh TH, Sng LH, Wang GC, Hsu LY, Zhao Y: **IMP-4 and OXA beta-lactamases in Acinetobacter baumannii from Singapore.** *J Antimicrob Chemother* 2007, **59**:627-632.
368. Peleg AY, Franklin C, Walters LJ, Bell JM, Spelman DW: **OXA-58 and IMP-4 carbapenem-hydrolyzing beta-lactamases in an Acinetobacter junii blood culture isolate from Australia.** *Antimicrob Agents Chemother* 2006, **50**:399-400.
369. Tsakris A, Ikonomidis A, Pournaras S, Spanakis N, Markogiannakis A: **Carriage of OXA-58 but not of OXA-51 beta-lactamase gene correlates with carbapenem resistance in Acinetobacter baumannii.** *J Antimicrob Chemother* 2006, **58**:1097-1099.
370. Galimand M, Sabtcheva S, Courvalin P, Lambert T: **Worldwide disseminated armA aminoglycoside resistance methylase gene is borne by composite transposon Tn1548.** *Antimicrob Agents Chemother* 2005, **49**:2949-2953.
371. Goñi M, Agudo M, Gómez-Lus R: *Antibiòtics Aminoglicòsids*. Barcelona: Societat Catalana de Biologia; 2004.
372. Kotra LP, Haddad J, Mobashery S: **Aminoglycosides: perspectives on mechanisms of action and resistance and strategies to counter resistance.** *Antimicrob Agents Chemother* 2000, **44**:3249-3256.
373. Mingeot-Leclercq MP, Glupczynski Y, Tulkens PM: **Aminoglycosides: activity and resistance.** *Antimicrob Agents Chemother* 1999, **43**:727-737.
374. Houang ET, Chu YW, Lo WS, Chu KY, Cheng AF: **Epidemiology of rifampin ADP-ribosyltransferase (arr-2) and metallo-beta-lactamase (blaIMP-4) gene cassettes in class 1 integrons in Acinetobacter strains isolated from blood cultures in 1997 to 2000.** *Antimicrob Agents Chemother* 2003, **47**:1382-1390.
375. Lee K, Yum JH, Yong D, Lee HM, Kim HD, Docquier JD, Rossolini GM, Chong Y: **Novel acquired metallo-beta-lactamase gene, bla(SIM-1), in a class 1 integron from Acinetobacter baumannii clinical isolates from Korea.** *Antimicrob Agents Chemother* 2005, **49**:4485-4491.
376. Nemec A, Dolzani L, Brisse S, van den Broek P, Dijkshoorn L: **Diversity of aminoglycoside-resistance genes and their association with class 1 integrons among strains of pan-European Acinetobacter baumannii clones.** *J Med Microbiol* 2004, **53**:1233-1240.
377. Riccio ML, Franceschini N, Boschi L, Caravelli B, Cornaglia G, Fontana R, Amicosante G, Rossolini GM: **Characterization of the metallo-beta-lactamase determinant of Acinetobacter baumannii AC-54/97 reveals the existence of**

- bla(IMP) allelic variants carried by gene cassettes of different phylogeny.** *Antimicrob Agents Chemother* 2000, **44**:1229-1235.
378. Seward RJ, Lambert T, Towner KJ: **Molecular epidemiology of aminoglycoside resistance in *Acinetobacter* spp.** *J Med Microbiol* 1998, **47**:455-462.
379. Tsakris A, Ikonomidis A, Pournaras S, Tzouveleki LS, Sofianou D, Legakis NJ, Maniatis AN: **VIM-1 metallo-beta-lactamase in *Acinetobacter baumannii*.** *Emerg Infect Dis* 2006, **12**:981-983.
380. Zarrilli R, Crispino M, Bagattini M, Barretta E, Di Popolo A, Triassi M, Villari P: **Molecular epidemiology of sequential outbreaks of *Acinetobacter baumannii* in an intensive care unit shows the emergence of carbapenem resistance.** *J Clin Microbiol* 2004, **42**:946-953.
381. Chopra I, Roberts M: **Tetracycline antibiotics: mode of action, applications, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance.** *Microbiol Mol Biol Rev* 2001, **65**:232-260 ; second page, table of contents.
382. Ribera A: **Tetracyclines.** In *Antimicrobials*. Edited by Ruiz J. Barcelona: Societat Catalana de Biologia; 2004: 121-134
383. Heritier C, Poirel L, Lambert T, Nordmann P: **Contribution of acquired carbapenem-hydrolyzing oxacillinases to carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii*.** *Antimicrob Agents Chemother* 2005, **49**:3198-3202.
384. Higgins PG, Wisplinghoff H, Stefanik D, Seifert H: **Selection of topoisomerase mutations and overexpression of *adeB* mRNA transcripts during an outbreak of *Acinetobacter baumannii*.** *J Antimicrob Chemother* 2004, **54**:821-823.
385. Magnet S, Courvalin P, Lambert T: **Resistance-nodulation-cell division-type efflux pump involved in aminoglycoside resistance in *Acinetobacter baumannii* strain BM4454.** *Antimicrob Agents Chemother* 2001, **45**:3375-3380.
386. Marchand I, Damier-Piolle L, Courvalin P, Lambert T: **Expression of the RND-type efflux pump AdeABC in *Acinetobacter baumannii* is regulated by the AdeRS two-component system.** *Antimicrob Agents Chemother* 2004, **48**:3298-3304.
387. Nemeč A, Maixnerová M, van der Reijden TJ, van den Broek PJ, Dijkshoorn L: **Relationship between the AdeABC efflux system gene content, netilmicin susceptibility and multidrug resistance in a genotypically diverse collection of *Acinetobacter baumannii* strains.** *J Antimicrob Chemother* 2007, **60**:483-489.
388. Peleg AY, Adams J, Paterson DL: **Tigecycline Efflux as a Mechanism for Nonsusceptibility in *Acinetobacter baumannii*.** *Antimicrob Agents Chemother* 2007, **51**:2065-2069.

389. Ruzin A, Keeney D, Bradford PA: **AdeABC multidrug efflux pump is associated with decreased susceptibility to tigecycline in *Acinetobacter calcoaceticus*-*Acinetobacter baumannii* complex.** *J Antimicrob Chemother* 2007, **59**:1001-1004.
390. Wieczorek P, Sacha P, Hauschild T, Zorawski M, Krawczyk M, Tryniszewska E: **Multidrug resistant *Acinetobacter baumannii*--the role of AdeABC (RND family) efflux pump in resistance to antibiotics.** *Folia Histochem Cytobiol* 2008, **46**:257-267.
391. Charlson ME, Pompei P, Ales KL, MacKenzie CR: **A new method of classifying prognostic comorbidity in longitudinal studies: development and validation.** *J Chronic Dis* 1987, **40**:373-383.
392. Chu YW, Chau SL, Houang ET: **Presence of active efflux systems AdeABC, AdeDE and AdeXYZ in different *Acinetobacter* genomic DNA groups.** *J Med Microbiol* 2006, **55**:477-478.
393. Masuda N, Sakagawa E, Ohya S, Gotoh N, Tsujimoto H, Nishino T: **Substrate specificities of MexAB-OprM, MexCD-OprJ, and MexXY-oprM efflux pumps in *Pseudomonas aeruginosa*.** *Antimicrob Agents Chemother* 2000, **44**:3322-3327.
394. Morita Y, Kimura N, Mima T, Mizushima T, Tsuchiya T: **Roles of MexXY- and MexAB-multidrug efflux pumps in intrinsic multidrug resistance of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1.** *J Gen Appl Microbiol* 2001, **47**:27-32.
395. Rosenberg EY, Ma D, Nikaido H: **AcrD of *Escherichia coli* is an aminoglycoside efflux pump.** *J Bacteriol* 2000, **182**:1754-1756.
396. Roberts MC: **Tetracycline therapy: update.** *Clin Infect Dis* 2003, **36**:462-467.
397. Pankey GA: **Tigecycline.** *J Antimicrob Chemother* 2005, **56**:470-480.
398. Gibreel A, Wetsch NM, Taylor DE: **Contribution of the CmeABC efflux pump to macrolide and tetracycline resistance in *Campylobacter jejuni*.** *Antimicrob Agents Chemother* 2007, **51**:3212-3216.
399. Damier-Piolle L, Magnet S, Bremont S, Lambert T, Courvalin P: **AdeIJK, a resistance-nodulation-cell division pump effluxing multiple antibiotics in *Acinetobacter baumannii*.** *Antimicrob Agents Chemother* 2008, **52**:557-562.
400. Peleg AY, Potoski BA, Rea R, Adams J, Sethi J, Capitano B, Husain S, Kwak EJ, Bhat SV, Paterson DL: ***Acinetobacter baumannii* bloodstream infection while receiving tigecycline: a cautionary report.** *J Antimicrob Chemother* 2007, **59**:128-131.

401. Ruiz J: **Mechanisms of resistance to quinolones: target alterations, decreased accumulation and DNA gyrase protection.** *J Antimicrob Chemother* 2003, **51**:1109-1117.
402. Ribera A, Ruiz J, Jiminez de Anta MT, Vila J: **Effect of an efflux pump inhibitor on the MIC of nalidixic acid for Acinetobacter baumannii and Stenotrophomonas maltophilia clinical isolates.** *J Antimicrob Chemother* 2002, **49**:697-698.
403. Su XZ, Chen J, Mizushima T, Kuroda T, Tsuchiya T: **AbeM, an H⁺-coupled Acinetobacter baumannii multidrug efflux pump belonging to the MATE family of transporters.** *Antimicrob Agents Chemother* 2005, **49**:4362-4364.
404. Limansky AS, Mussi MA, Viale AM: **Loss of a 29-kilodalton outer membrane protein in Acinetobacter baumannii is associated with imipenem resistance.** *J Clin Microbiol* 2002, **40**:4776-4778.
405. Mussi MA, Limansky AS, Viale AM: **Acquisition of resistance to carbapenems in multidrug-resistant clinical strains of Acinetobacter baumannii: natural insertional inactivation of a gene encoding a member of a novel family of beta-barrel outer membrane proteins.** *Antimicrob Agents Chemother* 2005, **49**:1432-1440.
406. Siroy A, Molle V, Lemaitre-Guillier C, Vallenet D, Pestel-Caron M, Cozzone AJ, Jouenne T, De E: **Channel formation by CarO, the carbapenem resistance-associated outer membrane protein of Acinetobacter baumannii.** *Antimicrob Agents Chemother* 2005, **49**:4876-4883.
407. Gribun A, Nitzan Y, Pechatnikov I, Hershkovits G, Katcoff DJ: **Molecular and structural characterization of the HMP-AB gene encoding a pore-forming protein from a clinical isolate of Acinetobacter baumannii.** *Curr Microbiol* 2003, **47**:434-443.
408. Vila J, Marti S, Sanchez-Cespedes J: **Porins, efflux pumps and multidrug resistance in Acinetobacter baumannii.** *J Antimicrob Chemother* 2007, **59**:1210-1215.
409. Clark RB: **Imipenem resistance among Acinetobacter baumannii: association with reduced expression of a 33-36 kDa outer membrane protein.** *J Antimicrob Chemother* 1996, **38**:245-251.
410. del Mar Tomas M, Beceiro A, Perez A, Velasco D, Moure R, Villanueva R, Martinez-Beltran J, Bou G: **Cloning and functional analysis of the gene encoding the 33- to 36-kilodalton outer membrane protein associated with carbapenem resistance in Acinetobacter baumannii.** *Antimicrob Agents Chemother* 2005, **49**:5172-5175.

411. Ruiz J: **Quinolones: acció i resistència.** In *Antimicrobians*. Edited by J.Ruiz. Barcelona: Societat Catalana de Biologia; 2004: 135-142
412. Vila J: **Fluoroquinolone resistance.** In *Frontiers in antimicrobial resistance: a tribute to Stuart B Levy*. Edited by D White MA, and P McDermott 2005: 41-52
413. Galimand M, Lambert T, Courvalin P: **Emergence and dissemination of a new mechanism of resistance to aminoglycosides in Gram-negative bacteria: 16S rRNA methylation.** *Euro Surveill* 2005, **10**:E050127 050122.
414. Hamouda A, Amyes SG: **Novel gyrA and parC point mutations in two strains of Acinetobacter baumannii resistant to ciprofloxacin.** *J Antimicrob Chemother* 2004, **54**:695-696.
415. Vila J, Ruiz J, Goni P, Jimenez de Anta T: **Quinolone-resistance mutations in the topoisomerase IV parC gene of Acinetobacter baumannii.** *J Antimicrob Chemother* 1997, **39**:757-762.
416. Vila J, Ruiz J, Goni P, Marcos A, Jimenez de Anta T: **Mutation in the gyrA gene of quinolone-resistant clinical isolates of Acinetobacter baumannii.** *Antimicrob Agents Chemother* 1995, **39**:1201-1203.
417. Guardabassi L, Dijkshoorn L, Collard JM, Olsen JE, Dalsgaard A: **Distribution and in-vitro transfer of tetracycline resistance determinants in clinical and aquatic Acinetobacter strains.** *J Med Microbiol* 2000, **49**:929-936.
418. Ribera A, Roca I, Ruiz J, Gibert I, Vila J: **Partial characterization of a transposon containing the tet(A) determinant in a clinical isolate of Acinetobacter baumannii.** *J Antimicrob Chemother* 2003, **52**:477-480.
419. Ribera A, Ruiz J, Vila J: **Presence of the Tet M determinant in a clinical isolate of Acinetobacter baumannii.** *Antimicrob Agents Chemother* 2003, **47**:2310-2312.
420. Robicsek A, Strahilevitz J, Jacoby GA, Macielag M, Abbanat D, Park CH, Bush K, Hooper DC: **Fluoroquinolone-modifying enzyme: a new adaptation of a common aminoglycoside acetyltransferase.** *Nat Med* 2006, **12**:83-88.
421. Yamane K, Wachino J, Suzuki S, Kimura K, Shibata N, Kato H, Shibayama K, Konda T, Arakawa Y: **New plasmid-mediated fluoroquinolone efflux pump, QepA, found in an Escherichia coli clinical isolate.** *Antimicrob Agents Chemother* 2007, **51**:3354-3360.
422. Falagas ME, Kasiakou SK: **Colistin: the revival of polymyxins for the management of multidrug-resistant gram-negative bacterial infections.** *Clin Infect Dis* 2005, **40**:1333-1341.

423. Li J, Nation RL, Turnidge JD, Milne RW, Coulthard K, Rayner CR, Paterson DL: **Colistin: the re-emerging antibiotic for multidrug-resistant Gram-negative bacterial infections.** *Lancet Infect Dis* 2006, **6**:589-601.
424. Zavascki AP, Goldani LZ, Li J, Nation RL: **Polymyxin B for the treatment of multidrug-resistant pathogens: a critical review.** *J Antimicrob Chemother* 2007, **60**:1206-1215.
425. Velkov T, Thompson PE, Nation RL, Li J: **Structure--activity relationships of polymyxin antibiotics.** *J Med Chem* 2010, **53**:1898-1916.
426. Bergen PJ, Li J, Rayner CR, Nation RL: **Colistin methanesulfonate is an inactive prodrug of colistin against *Pseudomonas aeruginosa*.** *Antimicrob Agents Chemother* 2006, **50**:1953-1958.
427. Thompson CA: **Colistin makes a limited comeback.** *Am J Health Syst Pharm* 2006, **63**:688, 691.
428. Falagas ME, Rizos M, Bliziotis IA, Rellos K, Kasiakou SK, Michalopoulos A: **Toxicity after prolonged (more than four weeks) administration of intravenous colistin.** *BMC Infect Dis* 2005, **5**:1.
429. Hancock RE: **Antibacterial peptides and the outer membranes of gram-negative bacilli.** *J Med Microbiol* 1997, **46**:1-3.
430. Clausell A, Garcia-Subirats M, Pujol M, Busquets MA, Rabanal F, Cajal Y: **Gram-negative outer and inner membrane models: insertion of cyclic cationic lipopeptides.** *J Phys Chem B* 2007, **111**:551-563.
431. Hancock RE: **Peptide antibiotics.** *Lancet* 1997, **349**:418-422.
432. Pristovsek P, Kidric J: **Solution structure of polymyxins B and E and effect of binding to lipopolysaccharide: an NMR and molecular modeling study.** *J Med Chem* 1999, **42**:4604-4613.
433. Breazeale SD, Ribeiro AA, McClerren AL, Raetz CR: **A formyltransferase required for polymyxin resistance in *Escherichia coli* and the modification of lipid A with 4-Amino-4-deoxy-L-arabinose. Identification and function of UDP-4-deoxy-4-formamido-L-arabinose.** *J Biol Chem* 2005, **280**:14154-14167.
434. Gunn JS: **The *Salmonella* PmrAB regulon: lipopolysaccharide modifications, antimicrobial peptide resistance and more.** *Trends Microbiol* 2008, **16**:284-290.

435. Gunn JS, Lim KB, Krueger J, Kim K, Guo L, Hackett M, Miller SI: **PmrA-PmrB-regulated genes necessary for 4-aminoarabinose lipid A modification and polymyxin resistance.** *Mol Microbiol* 1998, **27**:1171-1182.
436. Moskowitz SM, Ernst RK, Miller SI: **PmrAB, a two-component regulatory system of Pseudomonas aeruginosa that modulates resistance to cationic antimicrobial peptides and addition of aminoarabinose to lipid A.** *J Bacteriol* 2004, **186**:575-579.
437. Zhou Z, Ribeiro AA, Lin S, Cotter RJ, Miller SI, Raetz CR: **Lipid A modifications in polymyxin-resistant Salmonella typhimurium: PMRA-dependent 4-amino-4-deoxy-L-arabinose, and phosphoethanolamine incorporation.** *J Biol Chem* 2001, **276**:43111-43121.
438. Helander IM, Kato Y, Kilpelainen I, Kostianen R, Lindner B, Nummila K, Sugiyama T, Yokochi T: **Characterization of lipopolysaccharides of polymyxin-resistant and polymyxin-sensitive Klebsiella pneumoniae O3.** *Eur J Biochem* 1996, **237**:272-278.
439. Llobet E, Tomas JM, Bengoechea JA: **Capsule polysaccharide is a bacterial decoy for antimicrobial peptides.** *Microbiology* 2008, **154**:3877-3886.
440. Shi Y, Cromie MJ, Hsu FF, Turk J, Groisman EA: **PhoP-regulated Salmonella resistance to the antimicrobial peptides magainin 2 and polymyxin B.** *Mol Microbiol* 2004, **53**:229-241.
441. Gunn JS, Ryan SS, Van Velkinburgh JC, Ernst RK, Miller SI: **Genetic and functional analysis of a PmrA-PmrB-regulated locus necessary for lipopolysaccharide modification, antimicrobial peptide resistance, and oral virulence of Salmonella enterica serovar typhimurium.** *Infect Immun* 2000, **68**:6139-6146.
442. Nikaido H: **Molecular basis of bacterial outer membrane permeability revisited.** *Microbiol Mol Biol Rev* 2003, **67**:593-656.
443. McPhee JB, Lewenza S, Hancock RE: **Cationic antimicrobial peptides activate a two-component regulatory system, PmrA-PmrB, that regulates resistance to polymyxin B and cationic antimicrobial peptides in Pseudomonas aeruginosa.** *Mol Microbiol* 2003, **50**:205-217.
444. Hawley JS, Murray CK, Jorgensen JH: **Development of colistin-dependent Acinetobacter baumannii-Acinetobacter calcoaceticus complex.** *Antimicrob Agents Chemother* 2007, **51**:4529-4530.

445. Hawley JS, Murray CK, Jorgensen JH: **Colistin heteroresistance in acinetobacter and its association with previous colistin therapy.** *Antimicrob Agents Chemother* 2008, **52**:351-352.
446. Ko KS, Suh JY, Kwon KT, Jung SI, Park KH, Kang CI, Chung DR, Peck KR, Song JH: **High rates of resistance to colistin and polymyxin B in subgroups of Acinetobacter baumannii isolates from Korea.** *J Antimicrob Chemother* 2007, **60**:1163-1167.
447. Li J, Rayner CR, Nation RL, Owen RJ, Spelman D, Tan KE, Liolios L: **Heteroresistance to colistin in multidrug-resistant Acinetobacter baumannii.** *Antimicrob Agents Chemother* 2006, **50**:2946-2950.
448. Gales AC, Jones RN, Sader HS: **Global assessment of the antimicrobial activity of polymyxin B against 54 731 clinical isolates of Gram-negative bacilli: report from the SENTRY antimicrobial surveillance programme (2001-2004).** *Clin Microbiol Infect* 2006, **12**:315-321.
449. Conrad RS, Galanos C: **Fatty acid alterations and polymyxin B binding by lipopolysaccharides from Pseudomonas aeruginosa adapted to polymyxin B resistance.** *Antimicrob Agents Chemother* 1989, **33**:1724-1728.
450. Peterson AA, Fesik SW, McGroarty EJ: **Decreased binding of antibiotics to lipopolysaccharides from polymyxin-resistant strains of Escherichia coli and Salmonella typhimurium.** *Antimicrob Agents Chemother* 1987, **31**:230-237.
451. Nicas TI, Hancock RE: **Outer membrane protein H1 of Pseudomonas aeruginosa: involvement in adaptive and mutational resistance to ethylenediaminetetraacetate, polymyxin B, and gentamicin.** *J Bacteriol* 1980, **143**:872-878.
452. Young ML, Bains M, Bell A, Hancock RE: **Role of Pseudomonas aeruginosa outer membrane protein OprH in polymyxin and gentamicin resistance: isolation of an OprH-deficient mutant by gene replacement techniques.** *Antimicrob Agents Chemother* 1992, **36**:2566-2568.
453. Gooderham WJ, Bains M, McPhee JB, Wiegand I, Hancock RE: **Induction by cationic antimicrobial peptides and involvement in intrinsic polymyxin and antimicrobial peptide resistance, biofilm formation, and swarming motility of PsrA in Pseudomonas aeruginosa.** *J Bacteriol* 2008, **190**:5624-5634.
454. Adams MD, Nickel GC, Bajaksouzian S, Lavender H, Murthy AR, Jacobs MR, Bonomo RA: **Resistance to colistin in Acinetobacter baumannii associated with mutations in the PmrAB two-component system.** *Antimicrob Agents Chemother* 2009, **53**:3628-3634.

455. Levin BR, Lipsitch M, Perrot V, Schrag S, Antia R, Simonsen L, Walker NM, Stewart FM: **The population genetics of antibiotic resistance.** *Clin Infect Dis* 1997, **24 Suppl 1**:S9-16.
456. Andersson DI, Levin BR: **The biological cost of antibiotic resistance.** *Curr Opin Microbiol* 1999, **2**:489-493.
457. Levin BR: **Models for the spread of resistant pathogens.** *Neth J Med* 2002, **60**:58-64; discussion 64-56.
458. Andersson DI, Hughes D: **Antibiotic resistance and its cost: is it possible to reverse resistance?** *Nat Rev Microbiol* 2010, **8**:260-271.
459. Dahlberg C, Chao L: **Amelioration of the cost of conjugative plasmid carriage in Escherichia coli K12.** *Genetics* 2003, **165**:1641-1649.
460. Bouma JE, Lenski RE: **Evolution of a bacteria/plasmid association.** *Nature* 1988, **335**:351-352.
461. Andersson DI, Björkman J, Hughes D: *Fitness and virulence of antibiotic resistant bacteria.* London and New York: Taylor and Francis; 2001.
462. Levin BR, Perrot V, Walker N: **Compensatory mutations, antibiotic resistance and the population genetics of adaptive evolution in bacteria.** *Genetics* 2000, **154**:985-997.
463. Bjorkman J, Hughes D, Andersson DI: **Virulence of antibiotic-resistant Salmonella typhimurium.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998, **95**:3949-3953.
464. Bjorkman J, Samuelsson P, Andersson DI, Hughes D: **Novel ribosomal mutations affecting translational accuracy, antibiotic resistance and virulence of Salmonella typhimurium.** *Mol Microbiol* 1999, **31**:53-58.
465. Bjorkman J, Nagaev I, Berg OG, Hughes D, Andersson DI: **Effects of environment on compensatory mutations to ameliorate costs of antibiotic resistance.** *Science* 2000, **287**:1479-1482.
466. Johanson U, Aevansson A, Liljas A, Hughes D: **The dynamic structure of EF-G studied by fusidic acid resistance and internal revertants.** *J Mol Biol* 1996, **258**:420-432.
467. Saugar JM, Rodriguez-Hernandez MJ, de la Torre BG, Pachon-Ibanez ME, Fernandez-Reyes M, Andreu D, Pachon J, Rivas L: **Activity of cecropin A-melittin hybrid peptides against colistin-resistant clinical strains of**

- Acinetobacter baumannii: molecular basis for the differential mechanisms of action.** *Antimicrob Agents Chemother* 2006, **50**:1251-1256.
468. Hanouille X, Wieruszkeski JM, Rousselot-Pailley P, Landrieu I, Baulard AR, Lippens G: **Monitoring of the ethionamide pro-drug activation in mycobacteria by (1)H high resolution magic angle spinning NMR.** *Biochem Biophys Res Commun* 2005, **331**:452-458.
469. Molloy MP, Herbert BR, Slade MB, Rabilloud T, Nouwens AS, Williams KL, Gooley AA: **Proteomic analysis of the Escherichia coli outer membrane.** *Eur J Biochem* 2000, **267**:2871-2881.
470. Rabilloud T, Carpentier G, Tarroux P: **Improvement and simplification of low-background silver staining of proteins by using sodium dithionite.** *Electrophoresis* 1988, **9**:288-291.
471. Shilov IV, Seymour SL, Patel AA, Loboda A, Tang WH, Keating SP, Hunter CL, Nuwaysir LM, Schaeffer DA: **The Paragon Algorithm, a next generation search engine that uses sequence temperature values and feature probabilities to identify peptides from tandem mass spectra.** *Mol Cell Proteomics* 2007, **6**:1638-1655.
472. Tomaras AP, Dorsey CW, Edelman RE, Actis LA: **Attachment to and biofilm formation on abiotic surfaces by Acinetobacter baumannii: involvement of a novel chaperone-usher pili assembly system.** *Microbiology* 2003, **149**:3473-3484.
473. Oh JT, Cajal Y, Dhurjati PS, Van Dyk TK, Jain MK: **Cecropins induce the hyperosmotic stress response in Escherichia coli.** *Biochim Biophys Acta* 1998, **1415**:235-245.
474. Oh JT, Van Dyk TK, Cajal Y, Dhurjati PS, Sasser M, Jain MK: **Osmotic stress in viable Escherichia coli as the basis for the antibiotic response by polymyxin B.** *Biochem Biophys Res Commun* 1998, **246**:619-623.
475. Oh JT, Cajal Y, Skowronska EM, Belkin S, Chen J, Van Dyk TK, Sasser M, Jain MK: **Cationic peptide antimicrobials induce selective transcription of micF and osmY in Escherichia coli.** *Biochim Biophys Acta* 2000, **1463**:43-54.
476. Ploy MC, Giamarellou H, Bourlioux P, Courvalin P, Lambert T: **Detection of aac(6')-I genes in amikacin-resistant Acinetobacter spp. by PCR.** *Antimicrob Agents Chemother* 1994, **38**:2925-2928.
477. Magnusson LU, Nystrom T, Farewell A: **Underproduction of sigma 70 mimics a stringent response. A proteome approach.** *J Biol Chem* 2003, **278**:968-973.

478. Lakaye B, Wirtzfeld B, Wins P, Grisar T, Bettendorff L: **Thiamine triphosphate, a new signal required for optimal growth of Escherichia coli during amino acid starvation.** *J Biol Chem* 2004, **279**:17142-17147.
479. Brennan RG, Link TM: **Hfq structure, function and ligand binding.** *Curr Opin Microbiol* 2007, **10**:125-133.
480. Moore RA, Chan L, Hancock RE: **Evidence for two distinct mechanisms of resistance to polymyxin B in Pseudomonas aeruginosa.** *Antimicrob Agents Chemother* 1984, **26**:539-545.
481. Santoni V, Molloy M, Rabilloud T: **Membrane proteins and proteomics: un amour impossible?** *Electrophoresis* 2000, **21**:1054-1070.
482. Becker D, Selbach M, Rollenhagen C, Ballmaier M, Meyer TF, Mann M, Bumann D: **Robust Salmonella metabolism limits possibilities for new antimicrobials.** *Nature* 2006, **440**:303-307.
483. Smith PA, Romesberg FE: **Combating bacteria and drug resistance by inhibiting mechanisms of persistence and adaptation.** *Nat Chem Biol* 2007, **3**:549-556.
484. Clatworthy AE, Pierson E, Hung DT: **Targeting virulence: a new paradigm for antimicrobial therapy.** *Nat Chem Biol* 2007, **3**:541-548.
485. Xu C, Lin X, Ren H, Zhang Y, Wang S, Peng X: **Analysis of outer membrane proteome of Escherichia coli related to resistance to ampicillin and tetracycline.** *Proteomics* 2006, **6**:462-473.
486. Sender U, Bandow J, Engelmann S, Lindequist U, Hecker M: **Proteomic signatures for daunomycin and adriamycin in Bacillus subtilis.** *Pharmazie* 2004, **59**:65-70.
487. Yun SH, Kim YH, Joo EJ, Choi JS, Sohn JH, Kim SI: **Proteome analysis of cellular response of Pseudomonas putida KT2440 to tetracycline stress.** *Curr Microbiol* 2006, **53**:95-101.
488. Bader MW, Navarre WW, Shiao W, Nikaido H, Frye JG, McClelland M, Fang FC, Miller SI: **Regulation of Salmonella typhimurium virulence gene expression by cationic antimicrobial peptides.** *Mol Microbiol* 2003, **50**:219-230.
489. Vaara M: **Outer membrane permeability barrier to azithromycin, clarithromycin, and roxithromycin in gram-negative enteric bacteria.** *Antimicrob Agents Chemother* 1993, **37**:354-356.

490. Rahaman SO, Mukherjee J, Chakrabarti A, Pal S: **Decreased membrane permeability in a polymyxin B-resistant Escherichia coli mutant exhibiting multiple resistance to beta-lactams as well as aminoglycosides.** *FEMS Microbiol Lett* 1998, **161**:249-254.
491. Bishop RE: **The lipid A palmitoyltransferase PagP: molecular mechanisms and role in bacterial pathogenesis.** *Mol Microbiol* 2005, **57**:900-912.
492. Li J, Nation RL, Owen RJ, Wong S, Spelman D, Franklin C: **Antibiograms of multidrug-resistant clinical Acinetobacter baumannii: promising therapeutic options for treatment of infection with colistin-resistant strains.** *Clin Infect Dis* 2007, **45**:594-598.
493. Rodriguez-Bano J, Marti S, Soto S, Fernandez-Cuenca F, Cisneros JM, Pachon J, Pascual A, Martinez-Martinez L, McQueary C, Actis LA, Vila J: **Biofilm formation in Acinetobacter baumannii: associated features and clinical implications.** *Clin Microbiol Infect* 2008, **14**:276-278.
494. Gutschmann T, Hagge SO, David A, Roes S, Bohling A, Hammer MU, Seydel U: **Lipid-mediated resistance of Gram-negative bacteria against various pore-forming antimicrobial peptides.** *J Endotoxin Res* 2005, **11**:167-173.
495. Raetz CR, Reynolds CM, Trent MS, Bishop RE: **Lipid A modification systems in gram-negative bacteria.** *Annu Rev Biochem* 2007, **76**:295-329.
496. Moore RA, Hancock RE: **Involvement of outer membrane of Pseudomonas cepacia in aminoglycoside and polymyxin resistance.** *Antimicrob Agents Chemother* 1986, **30**:923-926.
497. Yim HH, Villarejo M: **osmY, a new hyperosmotically inducible gene, encodes a periplasmic protein in Escherichia coli.** *J Bacteriol* 1992, **174**:3637-3644.
498. Liechty A, Chen J, Jain MK: **Origin of antibacterial stasis by polymyxin B in Escherichia coli.** *Biochim Biophys Acta* 2000, **1463**:55-64.
499. Cajal Y, Ghanta J, Easwaran K, Surolia A, Jain MK: **Specificity for the exchange of phospholipids through polymyxin B mediated intermembrane molecular contacts.** *Biochemistry* 1996, **35**:5684-5695.
500. Cajal Y, Rogers J, Berg OG, Jain MK: **Intermembrane molecular contacts by polymyxin B mediate exchange of phospholipids.** *Biochemistry* 1996, **35**:299-308.
501. Vijayakumar SR, Kirchhof MG, Patten CL, Schellhorn HE: **RpoS-regulated genes of Escherichia coli identified by random lacZ fusion mutagenesis.** *J Bacteriol* 2004, **186**:8499-8507.

502. Weber A, Kogl SA, Jung K: **Time-dependent proteome alterations under osmotic stress during aerobic and anaerobic growth in Escherichia coli.** *J Bacteriol* 2006, **188**:7165-7175.
503. Nystrom T: **Stationary-phase physiology.** *Annu Rev Microbiol* 2004, **58**:161-181.
504. Gu SQ, Jockel J, Beinker P, Warnecke J, Semenkov YP, Rodnina MV, Wintermeyer W: **Conformation of 4.5S RNA in the signal recognition particle and on the 30S ribosomal subunit.** *Rna* 2005, **11**:1374-1384.
505. Raynaud C, Charbit A: **Regulation of expression of type I signal peptidases in Listeria monocytogenes.** *Microbiology* 2005, **151**:3769-3776.
506. Kaczanowska M, Ryden-Aulin M: **Ribosome biogenesis and the translation process in Escherichia coli.** *Microbiol Mol Biol Rev* 2007, **71**:477-494.
507. Ito K, Cerretti DP, Nashimoto H, Nomura M: **Characterization of an amber mutation in the structural gene for ribosomal protein L15, which impairs the expression of the protein export gene, secY, in Escherichia coli.** *Embo J* 1984, **3**:2319-2324.
508. Franceschi FJ, Nierhaus KH: **Ribosomal proteins L15 and L16 are mere late assembly proteins of the large ribosomal subunit. Analysis of an Escherichia coli mutant lacking L15.** *J Biol Chem* 1990, **265**:16676-16682.
509. Arnold RJ, Reilly JP: **Observation of Escherichia coli ribosomal proteins and their posttranslational modifications by mass spectrometry.** *Anal Biochem* 1999, **269**:105-112.
510. Culver GM, Noller HF: **Efficient reconstitution of functional Escherichia coli 30S ribosomal subunits from a complete set of recombinant small subunit ribosomal proteins.** *Rna* 1999, **5**:832-843.
511. Daugelavicius R, Bakiene E, Bamford DH: **Stages of polymyxin B interaction with the Escherichia coli cell envelope.** *Antimicrob Agents Chemother* 2000, **44**:2969-2978.
512. Saugar JM, Alarcon T, Lopez-Hernandez S, Lopez-Brea M, Andreu D, Rivas L: **Activities of polymyxin B and cecropin A-,melittin peptide CA(1-8)M(1-18) against a multiresistant strain of Acinetobacter baumannii.** *Antimicrob Agents Chemother* 2002, **46**:875-878.
513. Kragol G, Lovas S, Varadi G, Condie BA, Hoffmann R, Otvos L, Jr.: **The antibacterial peptide pyrrococricin inhibits the ATPase actions of DnaK and prevents chaperone-assisted protein folding.** *Biochemistry* 2001, **40**:3016-3026.

514. Gohl O, Friedrich A, Hoppert M, Averhoff B: **The thin pili of *Acinetobacter* sp. strain BD413 mediate adhesion to biotic and abiotic surfaces.** *Appl Environ Microbiol* 2006, **72**:1394-1401.
515. Sobczak I, Lolkema JS: **The 2-hydroxycarboxylate transporter family: physiology, structure, and mechanism.** *Microbiol Mol Biol Rev* 2005, **69**:665-695.
516. El-Mansi M, Cozzone AJ, Shiloach J, Eikmanns BJ: **Control of carbon flux through enzymes of central and intermediary metabolism during growth of *Escherichia coli* on acetate.** *Curr Opin Microbiol* 2006, **9**:173-179.
517. Leigh JA, Dodsworth JA: **Nitrogen regulation in bacteria and archaea.** *Annu Rev Microbiol* 2007, **61**:349-377.
518. Javelle A, Severi E, Thornton J, Merrick M: **Ammonium sensing in *Escherichia coli*. Role of the ammonium transporter AmtB and AmtB-GlnK complex formation.** *J Biol Chem* 2004, **279**:8530-8538.
519. Soballe B, Poole RK: **Microbial ubiquinones: multiple roles in respiration, gene regulation and oxidative stress management.** *Microbiology* 1999, **145** (Pt 8):1817-1830.
520. Macvanin M, Ballagi A, Hughes D: **Fusidic acid-resistant mutants of *Salmonella enterica* serovar typhimurium have low levels of heme and a reduced rate of respiration and are sensitive to oxidative stress.** *Antimicrob Agents Chemother* 2004, **48**:3877-3883.
521. Dwyer DJ, Kohanski MA, Hayete B, Collins JJ: **Gyrase inhibitors induce an oxidative damage cellular death pathway in *Escherichia coli*.** *Mol Syst Biol* 2007, **3**:91.
522. Villalobo A, Roldan JM, Rivas J, Cardenas J: **Assimilatory nitrate reductase from *Acinetobacter calcoaceticus*.** *Arch Microbiol* 1977, **112**:127-132.
523. Bonomo RA, Szabo D: **Mechanisms of multidrug resistance in *Acinetobacter* species and *Pseudomonas aeruginosa*.** *Clin Infect Dis* 2006, **43** Suppl 2:S49-56.
524. Poole K: **Outer membranes and efflux: the path to multidrug resistance in Gram-negative bacteria.** *Curr Pharm Biotechnol* 2002, **3**:77-98.
525. Vallenet D, Nordmann P, Barbe V, Poirel L, Mangenot S, Bataille E, Dossat C, Gas S, Kreimeyer A, Lenoble P, et al: **Comparative analysis of *Acinetobacter*: three genomes for three lifestyles.** *PLoS One* 2008, **3**:e1805.

526. Vila J, Almela M, Jimenez de Anta MT: **Laboratory investigation of hospital outbreak caused by two different multiresistant *Acinetobacter calcoaceticus* subsp. *anitratus* strains.** *J Clin Microbiol* 1989, **27**:1086-1089.
527. Law RJ, Hamlin JN, Sivro A, McCorrister SJ, Cardama GA, Cardona ST: **A functional phenylacetic acid catabolic pathway is required for full pathogenicity of *Burkholderia cenocepacia* in the *Caenorhabditis elegans* host model.** *J Bacteriol* 2008, **190**:7209-7218.
528. Panmanee W, Gomez F, Witte D, Pancholi V, Britigan BE, Hassett DJ: **The peptidoglycan-associated lipoprotein OprL helps protect a *Pseudomonas aeruginosa* mutant devoid of the transactivator OxyR from hydrogen peroxide-mediated killing during planktonic and biofilm culture.** *J Bacteriol* 2008, **190**:3658-3669.
529. Hungerer C, Troup B, Romling U, Jahn D: **Regulation of the *hemaA* gene during 5-aminolevulinic acid formation in *Pseudomonas aeruginosa*.** *J Bacteriol* 1995, **177**:1435-1443.
530. Cano DA, Pucciarelli MG, Martinez-Moya M, Casadesus J, Garcia-del Portillo F: **Selection of small-colony variants of *Salmonella enterica* serovar typhimurium in nonphagocytic eucaryotic cells.** *Infect Immun* 2003, **71**:3690-3698.
531. Minagawa S, Ogasawara H, Kato A, Yamamoto K, Eguchi Y, Oshima T, Mori H, Ishihama A, Utsumi R: **Identification and molecular characterization of the Mg²⁺ stimulon of *Escherichia coli*.** *J Bacteriol* 2003, **185**:3696-3702.
532. Xie Y, Parthasarathy G, Di Cello F, Teng CH, Paul-Satyaseela M, Kim KS: **Transcriptome of *Escherichia coli* K1 bound to human brain microvascular endothelial cells.** *Biochem Biophys Res Commun* 2008, **365**:201-206.
533. Lill R, Cunningham K, Brundage LA, Ito K, Oliver D, Wickner W: **SecA protein hydrolyzes ATP and is an essential component of the protein translocation ATPase of *Escherichia coli*.** *Embo J* 1989, **8**:961-966.
534. Mori H, Sugiyama H, Yamanaka M, Sato K, Tagaya M, Mizushima S: **Amino-terminal region of SecA is involved in the function of SecG for protein translocation into *Escherichia coli* membrane vesicles.** *J Biochem* 1998, **124**:122-129.
535. Zimble DL, Penwell WF, Gaddy JA, Menke SM, Tomaras AP, Connerly PL, Actis LA: **Iron acquisition functions expressed by the human pathogen *Acinetobacter baumannii*.** *Biometals* 2009, **22**:23-32.

536. Weichart D, Querfurth N, Dreger M, Hengge-Aronis R: **Global role for ClpP-containing proteases in stationary-phase adaptation of Escherichia coli.** *J Bacteriol* 2003, **185**:115-125.
537. Hearn EM, Patel DR, Lepore BW, Indic M, van den Berg B: **Transmembrane passage of hydrophobic compounds through a protein channel wall.** *Nature* 2009, **458**:367-370.
538. Hearn EM, Patel DR, van den Berg B: **Outer-membrane transport of aromatic hydrocarbons as a first step in biodegradation.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008, **105**:8601-8606.
539. Lin GM, Lin JC, Chen PJ, Siu LK, Huang LY, Chang FY: **Pan-drug resistant Acinetobacter baumannii bacteremia following endoscopic retrograde cholangiopancreatography.** *Am J Gastroenterol* 2008, **103**:498-499.
540. Lerner CG, Kakavas SJ, Wagner C, Chang RT, Merta PJ, Ruan X, Metzger RE, Beutel BA: **Novel approach to mapping of resistance mutations in whole genomes by using restriction enzyme modulation of transformation efficiency.** *Antimicrob Agents Chemother* 2005, **49**:2767-2777.
541. Spector MP, DiRusso CC, Pallen MJ, Garcia del Portillo F, Dougan G, Finlay BB: **The medium-/long-chain fatty acyl-CoA dehydrogenase (fadF) gene of Salmonella typhimurium is a phase 1 starvation-stress response (SSR) locus.** *Microbiology* 1999, **145 (Pt 1)**:15-31.
542. Boso-Ribelles V, Roma-Sanchez E, Carmena J, Caceres C, Bautista D: **Tigecycline: a new treatment choice against Acinetobacter baumannii.** *Recent Pat Antiinfect Drug Discov* 2008, **3**:117-122.
543. Choi CH, Hyun SH, Kim J, Lee YC, Seol SY, Cho DT, Lee JC: **Nuclear translocation and DNase I-like enzymatic activity of Acinetobacter baumannii outer membrane protein A.** *FEMS Microbiol Lett* 2008, **288**:62-67.
544. Hosking ER, Vogt C, Bakker EP, Manson MD: **The Escherichia coli MotAB proton channel unplugged.** *J Mol Biol* 2006, **364**:921-937.
545. Updegrove T, Wilf N, Sun X, Wartell RM: **Effect of Hfq on RprA-rpoS mRNA pairing: Hfq-RNA binding and the influence of the 5' rpoS mRNA leader region.** *Biochemistry* 2008, **47**:11184-11195.
546. Kulesus RR, Diaz-Perez K, Slechta ES, Eto DS, Mulvey MA: **Impact of the RNA chaperone Hfq on the fitness and virulence potential of uropathogenic Escherichia coli.** *Infect Immun* 2008, **76**:3019-3026.

547. Fantappie L, Metruccio MM, Seib KL, Oriente F, Cartocci E, Ferlicca F, Giuliani MM, Scarlato V, Delany I: **The RNA chaperone Hfq is involved in stress response and virulence in *Neisseria meningitidis* and is a pleiotropic regulator of protein expression.** *Infect Immun* 2009, **77**:1842-1853.
548. Rasmussen AA, Eriksen M, Gilany K, Udesen C, Franch T, Petersen C, Valentin-Hansen P: **Regulation of ompA mRNA stability: the role of a small regulatory RNA in growth phase-dependent control.** *Mol Microbiol* 2005, **58**:1421-1429.
549. Choi CH, Lee EY, Lee YC, Park TI, Kim HJ, Hyun SH, Kim SA, Lee SK, Lee JC: **Outer membrane protein 38 of *Acinetobacter baumannii* localizes to the mitochondria and induces apoptosis of epithelial cells.** *Cell Microbiol* 2005, **7**:1127-1138.
550. Jovanovic M, Lilic M, Savic DJ, Jovanovic G: **The LysR-type transcriptional regulator CysB controls the repression of hslJ transcription in *Escherichia coli*.** *Microbiology* 2003, **149**:3449-3459.
551. Lilic M, Jovanovic M, Jovanovic G, Savic DJ: **Identification of the CysB-regulated gene, hslJ, related to the *Escherichia coli* novobiocin resistance phenotype.** *FEMS Microbiol Lett* 2003, **224**:239-246.
552. Buist G, Steen A, Kok J, Kuipers OP: **LysM, a widely distributed protein motif for binding to (peptido)glycans.** *Mol Microbiol* 2008, **68**:838-847.
553. Gluckmann M, Fella K, Waidelich D, Merkel D, Krufft V, Kramer PJ, Walter Y, Hellmann J, Karas M, Kroger M: **Prevalidation of potential protein biomarkers in toxicology using iTRAQ reagent technology.** *Proteomics* 2007, **7**:1564-1574.
554. Sitek B, Apostolov O, Stuhler K, Pfeiffer K, Meyer HE, Eggert A, Schramm A: **Identification of dynamic proteome changes upon ligand activation of Trk-receptors using two-dimensional fluorescence difference gel electrophoresis and mass spectrometry.** *Mol Cell Proteomics* 2005, **4**:291-299.
555. Fountoulakis M, Juranville JF, Berndt P, Langen H, Suter L: **Two-dimensional database of mouse liver proteins. An update.** *Electrophoresis* 2001, **22**:1747-1763.
556. Fountoulakis M, Berndt P, Langen H, Suter L: **The rat liver mitochondrial proteins.** *Electrophoresis* 2002, **23**:311-328.
557. Gygi SP, Corthals GL, Zhang Y, Rochon Y, Aebersold R: **Evaluation of two-dimensional gel electrophoresis-based proteome analysis technology.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000, **97**:9390-9395.
558. Kolkman A, Dirksen EH, Slijper M, Heck AJ: **Double standards in quantitative proteomics: direct comparative assessment of difference in gel**

- electrophoresis and metabolic stable isotope labeling.** *Mol Cell Proteomics* 2005, **4**:255-266.
559. Putz S, Reinders J, Reinders Y, Sickmann A: **Mass spectrometry-based peptide quantification: applications and limitations.** *Expert Rev Proteomics* 2005, **2**:381-392.
560. Wu WW, Wang G, Baek SJ, Shen RF: **Comparative study of three proteomic quantitative methods, DIGE, cICAT, and iTRAQ, using 2D gel- or LC-MALDI TOF/TOF.** *J Proteome Res* 2006, **5**:651-658.
561. Chong PK, Gan CS, Pham TK, Wright PC: **Isobaric tags for relative and absolute quantitation (iTRAQ) reproducibility: Implication of multiple injections.** *J Proteome Res* 2006, **5**:1232-1240.
562. Fenselau C: **A review of quantitative methods for proteomic studies.** *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2007, **855**:14-20.
563. Vercauteren FG, Arckens L, Quirion R: **Applications and current challenges of proteomic approaches, focusing on two-dimensional electrophoresis.** *Amino Acids* 2007, **33**:405-414.

ANEXO A: PROTOCOLOS UTILIZADOS EN ESTA TESIS

A.1. Enriquecimiento del contenido proteico de muestras mediante uso del kit *Ready-Prep 2-D cleanup kit* (BioRad, Hercules, CA, EEUU)

* Se usaron tubos de 1,5 mL durante todo el protocolo

* Las muestras se mantuvieron en hielo durante todo el procedimiento

Soluciones provistas en el kit:

- Agente de precipitación 1
- Agente de precipitación 2
- Reactivo de lavado 1
- Reactivo de lavado 2
- Aditivo de lavado 2

PROCEDIMIENTO:

1. Transferir 100 μ L de muestra a un tubo de 1,5 mL
2. Adicionar 300 μ L de agente de precipitación 1 a la muestra y mezclar bien en un agitador *vortex*, incubándola sobre hielo durante 15 minutos
3. Adicionar 300 μ L de agente de precipitación 2 a la mezcla agitándola bien en un *vortex*.
4. Centrifugar los tubos a una velocidad no menor a los 12.000 x g durante 5 minutos para formar un *pellet* visible, tomando rápidamente el tubo una vez que la centrifugación ha terminado con el fin de que el *pellet* no se disperse.
5. Descartar el sobrenadante con cuidado de que no se disperse el *pellet*.
6. Colocar el tubo en la centrífuga en la misma posición que antes con el fin de que el *pellet* permanezca en la misma posición del tubo, centrifugando durante 15-30 segundos para que cualquier volumen residual se deposite en el fondo del tubo y poder usar una pipeta para eliminarlo cuidadosamente.

7. Adicionar 40 μL del reactivo de lavado 1 directamente sobre el *pellet* y centrifugar a la misma velocidad ($> 12.000 \times g$) durante 5 minutos.
8. Eliminar el líquido con una pipeta.
9. Adicionar 25 μL de agua Milli-Q sobre el *pellet*. Agitar con *vortex* durante 10-20 segundos. El *pellet* proteico puede dispersarse, pero sin disolverse en el agua.
10. Adicionar 1 ml de reactivo de lavado 2 (debe estar conservado a -20°C al menos durante una hora antes de su uso) y 5 μL del aditivo de lavado 2. Agitar en *vortex* durante 1 minuto.
11. Incubar el tubo a -20°C durante 30 minutos agitándolo en un *vortex* durante 30 segundos cada 10 minutos a lo largo de este período de incubación.
12. Centrifugar a velocidad máxima durante 5 minutos para que se vuelva a formar el *pellet*, descartando el sobrenadante. Volver a centrifugar durante 15-30 segundos y retirar el líquido remanente con ayuda de una pipeta, dejando secar el *pellet* al aire y a temperatura ambiente por no más de 5 minutos, dado que un excesivo secado hará difícil su posterior resuspensión.
13. Resuspender el *pellet* por adición del volumen apropiado del buffer de rehidratación de 2-DE si es que se continuará con una electroforesis bidimensional.

A.2. Medición de la concentración de proteínas por el método del ácido bicinconínico mediante el kit comercial *BCA Protein Assay Kit* (Pierce, Rockford, IL, EEUU)

Contenido del kit:

- Reactivo A – Contiene Na_2CO_3 , ácido bicinconínico y tartrato de sodio en hidróxido de sodio 0,1M
- Reactivo B – Contiene sulfato de cobre al 4%
- Ampolla conteniendo el estándar de albúmina de suero bovino (BSA) a una concentración de 2 mg/ml – Contiene 2mg/ml de BSA en solución salina al 0,9% y azida sódica al 0,05%.

Preparación de los estándares y soluciones de trabajo en el procedimiento descrito para la medición de la concentración de proteínas en viales de 2,5 ml o mayores:

- Preparación del estándar de albúmina de suero bovino (BSA):

Usar la tabla 1 (al final de este protocolo) como guía para la preparación de un conjunto de estándares de BSA. Diluir el contenido de una ampolla de BSA en viales usando el mismo diluyente en el que se encuentra la muestra de proteínas. Cada vial de BSA es suficiente para preparar el conjunto de diluciones estándar sugeridas en la tabla 1. Habrá un volumen suficiente para la realización de 3 réplicas de cada dilución estándar.

- Preparación de la solución de trabajo (ST):

1. Usar la siguiente fórmula con el fin de determinar el volumen total de la ST necesaria:

$(\# \text{estándares} + \# \text{muestras}) \times (\# \text{réplicas}) \times (\text{volumen de la ST por muestra}) =$
volumen total de la ST necesaria

Nota: Serán necesarios 2 ml de la ST para cada muestra

2. Preparar la ST mezclando 50 partes del reactivo A con 1 parte del reactivo B (50:1, reactivo A:B).

PROCEDIMIENTO:

1. Dispensar 0,1 ml de cada estándar y muestra desconocida en viales apropiadamente rotulados
2. Adicionar 2 ml de la ST a cada tubo y mezclar bien
3. Cubrir e incubar los tubos a 37°C durante 30 minutos para un rango de concentraciones de 20 a 2.000 µg/ml ó a 60°C durante 30 minutos para un rango de 5 a 250 µg/ml
4. Enfriar los tubos a temperatura ambiente
5. Con un espectrofotómetro ajustado para la lectura a 562 nm, hacer una calibración a cero con una cubeta que contenga sólo agua y medir la absorbancia de cada dilución estándar y muestras problema consecutivamente dentro de los siguientes 10 minutos.
6. Sustraer la media de la medida de absorbancia a 562 nm de los blancos de las réplicas de cada estándar de la medida de absorbancia a 562 nm de todas las réplicas de los estándares individuales y muestras problema.
7. Preparar una curva estándar representando la media de las medidas de absorbancia a 562 nm de cada estándar de BSA *vs.* sus concentraciones en µg/ml y usarla como curva estándar para determinar la concentración de proteína presente en cada una de las muestras problema.

Tabla 1. Preparación de los estándares de dilución de BSA

Esquema de dilución para un rango de concentraciones entre 20 y 2.000 $\mu\text{g}/\text{mL}$

Vial	Volumen de Diluyente	Volumen y fuente de BSA	Concentración final de BSA
A	0	300 μL Stock BSA	2.000 $\mu\text{g}/\text{ml}$
B	125 μL	375 μL Stock BSA	1.500 $\mu\text{g}/\text{ml}$
C	325 μL	325 μL Stock BSA	1.000 $\mu\text{g}/\text{ml}$
D	175 μL	175 μL del vial B	750 $\mu\text{g}/\text{ml}$
E	325 μL	325 μL del vial C	500 $\mu\text{g}/\text{ml}$
F	325 μL	325 μL del vial E	250 $\mu\text{g}/\text{ml}$
G	325 μL	325 μL del vial F	125 $\mu\text{g}/\text{ml}$
H	400 μL	100 μL del vial G	25 $\mu\text{g}/\text{ml}$
I	400 μL	0	0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ = Blanco

Esquema de dilución para un rango de concentraciones entre 5 y 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$

Vial	Volumen de Diluyente	Volumen y fuente de BSA	Concentración final de BSA
A	700 μL	100 μL Stock BSA	250 $\mu\text{g}/\text{ml}$
B	400 μL	400 μL del vial A	125 $\mu\text{g}/\text{ml}$
C	450 μL	300 μL del vial B	50 $\mu\text{g}/\text{ml}$
D	400 μL	400 μL del vial C	25 $\mu\text{g}/\text{ml}$
E	400 μL	100 μL del vial D	5 $\mu\text{g}/\text{ml}$
F	400 μL	0	0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ = Blanco

A.3. Geles de poliacrilamida utilizados en la 2-DE

* Los geles se elaboraron el día anterior de su uso dejándolos polimerizar durante toda la noche a 4°C.

Para la polimerización de 8 geles de 16 cm x 20 cm x 1 mm de acrilamida al 12% se emplearon las siguientes soluciones incorporadas en el orden en el que aparecen y sometidas a una continua agitación lenta a medida que eran dispensadas:

- 87 mL de Tris-HCl 2,5 M, pH 8,9
- 110 mL de una solución de Acrilamida al 30 %
- 27,20 mL de una solución de PDA (piperacina diacrilamida) al 2%
- 45,80 mL de agua Milli-Q
- 2,75 mL de una solución de SDS al 10%
- 550 µL de una solución de Tiosulfato de sodio al 38,25%
- 172 µL de TEMED (N,N,N',N'-Tetrametiletilenediamino)
- 1,375 mL de una solución de PSA (persulfato de amonio) al 20%

A.4. Tinción con nitrato de plata compatible con espectrometría de masas de las proteínas incluidas en geles de poliacrilamida

* Todas las soluciones se preparan con agua Milli-Q en el momento de su uso.

* Se usaron guantes sin talco para evitar la contaminación de los geles.

1. FIJACIÓN:

- 30 minutos en una solución de ácido acético al 5 % y metanol al 50%.

2. LAVADO:

- 15 minutos en una solución de metanol al 50%.

- 15 minutos en agua Milli-Q.

3. SENSIBILIZACIÓN:

- 1 minuto en una solución de tiosulfato sódico al 0,01%.

4. LAVADO:

- 2 lavados de 1 minuto con agua Milli-Q.

5. TINCIÓN:

- Incubación en una solución de Nitrato de Plata al 0,1% durante 20 minutos a 4°C.

6. LAVADO:

- 2 lavados de 1 minutos con agua Milli-Q.

7. REVELADO:

- Solución de carbonato sódico al 2% en formalina (formol al 35%) al 0,04%. Seguir el proceso de revelado detenidamente para poder pararlo antes de que se produzca una sobreexposición

8. PARADA:

- 5 minutos en una solución de ácido acético al 5%.

9. CONSERVACIÓN:

- A 4°C en ácido acético al 1%.

A.5. Marcaje de proteínas usando el kit *Amersham CyDye DIGE Fluors (minimal dyes) for Ettan DIGE* (GE Healthcare, Barcelona)

Componentes provistos en el kit:

- 5 nmol del marcador Cy2
- 5 nmol del marcador Cy3
- 5 nmol del marcador Cy5

PROCEDIMIENTO

1) Reconstitución de los fluorocromos CyDyes en dimetilformamida (DMF) para obtener una solución *stock* de los mismos:

1. Tomar un pequeño volumen de DMF (con unas especificaciones que respeten un contenido de H₂O ≤ 0,005% y una pureza ≥ 99,8%), desde una botella abierta recientemente (preferiblemente nueva o que lleve abierta menos de 3 meses) y dispensarlo en un tubo.
2. Tomar los marcadores CyDyes desde el congelador (a -20°C) y dejarlos a temperatura ambiente durante 5 minutos.
3. Adicionar DMF a cada vial de CyDye para obtener una concentración final de 1 mM para la solución *stock* de cada CyDye.
4. Mezclar vigorosamente durante 30 segundos.
5. Centrifugar durante 30 segundos a 12.000 x g.
6. Los fluoróforos pueden ser usados inmediatamente y la solución *stock* sobrante ser conservada en oscuridad a -20°C lo antes posible, pudiendo usarse en los siguientes 2 meses.

2) Preparación de la solución de trabajo de los marcadores CyDye usada para marcar las proteínas:

1. Darle un pulso de centrifuga a la solución *stock* con el fin de que todo el volumen de la misma se deposite en el fondo del tubo.

2. Adicionar un volumen de la solución *stock* de CyDye a 1,5 volúmenes de DMF para obtener una solución de CyDye a una concentración de 400 μM . Así, si a 2 μL de la solución *stock* se le añaden 3 μL de DMF se obtiene una concentración final de 400 pmol de CyDye en 1 μL .

3) Marqueje mínimo de una muestra de proteínas:

1. Dispensar un volumen de muestra proteica equivalente a 50 μg de proteína en un tubo.
2. Adicionar 1 μL de la solución de trabajo de los fluoróforos a cada muestra según el diseño experimental desarrollado.
3. Agitar y centrifugar con el fin de tener todo el volumen en el fondo del tubo y dejar en hielo y en la oscuridad durante 30 minutos.
4. Adicionar 1 μL de lisina 10 mM para parar la reacción, mezclando con la misma pipeta y centrifugando de nuevo.
5. Dejar durante 10 minutos en hielo y en la oscuridad.
6. Las muestras pueden ser usadas inmediatamente o ser almacenadas hasta 3 meses a -70°C en la oscuridad.

A partir de este punto se procede con la combinación de las muestras que han de ser separadas en la misma 1ª y 2ª dimensión de la electroforesis según el experimento diseñado, teniendo en cuenta que deben usarse reactivos y cristales que no emitan autofluorescencia para la polimerización de la acrilamida y demás procesos, con el fin de eliminar las posibles interferencias a las señales emitidas específicamente por los fluorocromos.

A.6. Digestión triptica de proteínas incluidas en geles de electroforesis teñidos con plata mediante uso del equipamiento *Montage In Gel Digest 96 well ZipPlate* acoplado a un colector de soluciones *Multiscreen Vacuum Manifold* (Millipore Ibérica, Madrid)

- * Usar guantes y bata de laboratorio durante todo el procedimiento
- * Extremar el cuidado durante todo el proceso para minimizar la contaminación por queratinas
- * Al usar la placa de manera parcial, conservarla sobre la placa colectora y dentro de la bolsa de plástico dispensada hasta su próximo uso
- * Mantener la tripsina sobre hielo en todo momento, especialmente una vez reconstituida
- * Las eluciones que tienen lugar en este protocolo se realizan a 2 valores de presión de vacío distintas: a una presión máxima (15 – 20” Hg) y a una baja presión (5 – 7” Hg)
- * Siempre se incluirán controles positivos y negativos en cada procedimiento de digestión
- * Dado que en el fondo de cada pocillo hay una membrana C18 incorporada, el desalado y concentración de la muestra de péptidos por cromatografía en fase reversa tiene lugar de manera automática en los últimos pasos de lavado y extracción de los péptidos

SOLUCIONES DE TRABAJO

DESTEÑIDO DE PLATA

Solución de desteñido de la plata: Realizar una solución de trabajo mezclando a una proporción 1:1 las siguientes soluciones:

- Ferricianuro de potasio ($K_3Fe(CN)_6$) 30 mM disuelto en agua Milli-Q
- Tiosulfato de sodio ($Na_2S_2O_3$) 100 mM disuelto en agua Milli-Q

REDUCCIÓN/ALQUILACIÓN

- Bicarbonato de amonio 50 mM en etanol al 50%
- Etanol al 100%
- DTT 10 mM en bicarbonato de amonio 50 mM

- Iodoacetamida 55 mM en bicarbonato de amonio 50 mM
- Bicarbonato de amonio 50 Mm

DIGESTIÓN

- Buffer 1: Bicarbonato de amonio 25 mM en acetonitrilo al 5%
- Buffer 2: Bicarbonato de amonio 25 mM en acetonitrilo al 50%
- Solución de resuspensión de tripsina: HCl 1 mM
- Buffer de tripsina: Bicarbonato de amonio 25 mM
- Tripsina porcina modificada en calidad de secuenciación (Promega)

EXTRACCIÓN DE PÉPTIDOS

- Solución de extracción/lavado: TFA al 0,2% (MALDI TOF MS) o ácido fórmico al 1,1% (ESI MS)
- Solución de elusión: TFA al 0,1% en acetonitrilo al 50% (MALDI TOF MS) o ácido fórmico al 1% en metanol al 55% (ESI MS)

PROCEDIMIENTO

En una visión general, los pasos a seguir son: 1) Preparación de las bandas de gel, 2) Desteñido de la plata, 3) Reducción/Alquilación de las proteínas, 4) Digestión trípica y 5) Extracción de los péptidos.

1) PREPARACIÓN DE LAS BANDAS

1. Cortar los *spots* o bandas proteicas a un tamaño entre 1 y 2 mm de diámetro usando un bisturí o cuchilla y colocarlos en los pocillos de la placa *ZipPlate*.
2. Colocar la placa sobre el sistema de elusión por vacío *Multiscreen Vacuum Manifold*, manteniéndola tapada en todo momento

2) DESTENIDO DE LA PLATA

3. Adicionar 200 μL de la solución de trabajo para el desteñido de la plata a cada pocillo. Esta solución de trabajo ha de ser preparada justo antes de ser usada. Cubrir la placa para protegerla de la luz e incubarla durante 20 minutos.
4. Levantar un poco la tapa de la placa para que pueda pasar el aire y aplicar una presión total de vacío hasta eliminar del todo la solución de desteñido de los pocillos.
5. Añadir 200 μL de agua Milli-Q a cada pocillo e incubar la placa bien tapada durante 15 minutos.
6. Levantar la tapa y aplicar presión total de vacío hasta eliminar toda el agua
7. Repetir los pasos 5 y 6 al menos 2 veces o hasta que los *spots* se vean totalmente desteñidos. Continuar con el protocolo de reducción/alquilación

3) REDUCCIÓN/ALQUILACIÓN

8. Añadir 100 μL de la solución de Bicarbonato de amonio 50 mM en etanol al 50% a cada pocillo, tapando la placa e incubándola durante 20 minutos
9. Levantar la tapa y aplicar presión total de vacío hasta eliminar toda la solución.
10. Deshidratar las piezas de gel adicionando 100 μL de etanol al 100% a cada pocillo e incubar la placa tapada durante 15 minutos
11. Levantar la tapa y aplicar vacío a presión máxima hasta eliminar el etanol de los pocillos.
12. Colocar la placa sobre la placa colectora de 96 pocillos
13. Reducir las proteínas añadiendo 200 μL de la solución de reducción (DTT 10 mM en bicarbonato de amonio 50 mM) a cada pocillo y tapar bien la placa
14. Colocar las 2 placas ensambladas dentro de una de las bolsas de plástico de incubación e incubarla en una estufa o incubadora térmica durante 1 hora a 56°C
15. Colocar la placa sobre el sistema de vacío y aplicar vacío a presión máxima hasta eliminar la solución de DTT de los pocillos
16. Añadir 200 μL de la solución de alquilación (iodoacetamida 55 mM en bicarbonato de amonio 50 mM) a cada pocillo, tapar la placa, cubrirla de la luz e incubarla durante 30 minutos a temperatura ambiente.

17. Levantar la tapa y aplicar vacío a presión máxima hasta haber eliminado toda la solución de alquilación
18. Añadir 200 μ L de bicarbonato de amonio 50 mM a cada pocillo e incubar la placa durante 15 minutos bien tapada
19. Levantar la placa y aplicar un vacío a máxima presión hasta haber eliminado completamente la solución
20. Repetir los pasos 18 y 19

4) DIGESTIÓN

21. Adicionar 100 μ L del buffer 1 a cada pocillo e incubar la placa tapada durante 30 minutos.
22. Levantar la tapa y aplicar presión máxima de vacío hasta eliminar totalmente la solución
23. Añadir 100 μ L de buffer 2 a cada pocillo, tapar la placa e incubar durante 30 minutos
24. Levantar la tapa y aplicar vacío a presión máxima hasta eliminar la solución completamente
25. Repetir los pasos 23 y 24
26. Añadir 200 μ L de acetonitrilo al 100% a cada pocillo, tapar la placa e incubar durante 10 minutos
27. Durante los 10 minutos de la incubación anterior se puede proceder con la preparación de la solución de tripsina de la siguiente manera:
 - Si se va a usar la placa entera:
 1. Golpear el vial de tripsina recién sacado del congelador sobre la superficie de la mesa de trabajo con el fin de hacer caer al fondo el contenido del mismo
 2. Adicionar 200 μ L de buffer de tripsina (bicarbonato de amonio 25 mM) dentro del vial
 3. Mezclar vigorosamente hasta disolver el contenido
 4. Transferir el contenido a un tubo de 2 mL
 5. Adicionar 1,6 mL del mismo buffer de tripsina
 6. Usar esta solución inmediatamente

- Si se usa la placa parcialmente:

1. Golpear el vial de tripsina recién sacado del congelador sobre la superficie de la mesa de trabajo con el fin de hacer caer al fondo el contenido del mismo
2. Añadir 100 μL de la solución de resuspensión de tripsina (HCl 1 mM) en el vial
3. Mezclar vigorosamente hasta disolver el contenido
4. Preparar 12 alícuotas de 8 μL cada una en tubos previamente rotulados y enfriados sobre hielo. Conservarlos a -20°C
5. Cuando se esté preparado para usarlo, tomar las alícuotas necesarias y añadirles 136 μL de buffer de tripsina (bicarbonato de amonio 25 mM).
6. Mezclar y usarlas inmediatamente.

28. Levantar la tapa de la placa y aplicar vacío a máxima presión hasta eliminar el acetonitrilo

29. Colocar la placa *ZipPlate* sobre la placa colectora de 96 pocillos y adicionar 15 μL de la solución de tripsina recién preparada

30. Colocar ambas placas ensambladas dentro de una de las bolsas de incubación e incubarlas toda la noche en una cámara con control de humedad a 30°C .

5) EXTRACCIÓN DE LOS PÉPTIDOS TRÍPTICOS

31. Adicionar 8 μL de acetonitrilo al 100% a cada pocillo

32. Incubar la placa a 37°C durante 15 minutos

33. Añadir 130 μL de solución de extracción/lavado a cada pocillo, tapar la placa e incubar durante 30 minutos

34. Colocar la placa sobre el sistema de vacío y ajustarlo a una baja presión de vacío (5 – 7” Hg), manteniéndolo durante unos 5 minutos para que los péptidos se unan a la membrana C18 que presenta la placa *ZipPlate* en su fondo. Si la solución no ha sido eliminada del todo después de los 5 minutos, aumentar la presión de vacío al máximo para que salga toda la solución.

35. Añadir 100 μL de la solución de extracción/lavado y aplicar una presión máxima de vacío hasta que se elimine toda la solución

36. Repetir el paso 35

37. Levantar la placa *ZipPlate* y secar con un papel limpio el desagüe de los pocillos para eliminar cualquier volumen residual que haya podido quedar
38. Levantar la parte superior del sistema de vacío y colocar la placa colectora en el fondo del mismo, para volver a ensamblar el sistema de vacío y colocar la placa *ZipPlate* sobre el mismo.
39. Dispensar 15 μ L de la solución de elusión en el centro de cada pocillo
40. Ajustar el vacío a baja presión (5 – 7” Hg)
41. Seguir cuidadosamente el proceso de elusión hasta que se hayan vaciado todos los pocillos
42. Los péptidos eluidos en la placa colectora pueden ser usados después de dejarlos al aire unos 30 minutos para que se evapore el exceso de disolvente orgánico o almacenarlos a -20°C hasta su utilización

A.7. Digestión triptica y marcaje cuantitativo de los péptidos mediante isótopos isobáricos estables (iTRAQ)

Componentes del kit iTRAQ:

- Reactivo iTRAQ 114
- Reactivo iTRAQ 115
- Reactivo iTRAQ 116
- Reactivo iTRAQ 117
- Vial con 25 µg de tripsina y 222 µg de CaCl₂
- Buffer de dilución – Bicarbonato de trietilamonio 0,5 M
- Agente desnaturizante – SDS al 2%
- Agente reductor – Tris-(2-carboxietil)fosfina (TCEP) 50 mM
- Agente bloqueante de Cisteínas – Tiosulfonato de metilmetano (MMTS) 200 mM
- Etanol absoluto

PROCEDIMIENTO

En general los pasos a seguir en este protocolo son: 1) Desnaturizar, reducir y bloquear las proteínas presentes en las muestras; 2) Digerir las proteínas con tripsina; 3) Marcar los péptidos tripticos con los reactivos de iTRAQ; 4) Combinar los péptidos marcados en una sola muestra y 5) Fraccionar la mezcla compleja de péptidos marcados mediante cromatografía de intercambio catiónico.

1) DESNATURALIZAR, REDUCIR Y BLOQUEAR LAS PROTEÍNAS

1. Llevar hasta un volumen de 20 µL, los 100 µg de proteína de cada muestra mediante adición del suficiente volumen de buffer de dilución
2. Añadir 1 µL de agente desnaturizante y agitar vigorosamente
3. Añadir 2 µL de agente reductor a cada muestra
4. Mezclar y centrifugar para hacer bajar todo el volumen de muestra hasta el fondo del tubo

5. Incubar las muestras a 60°C durante 1 hora
6. Centrifugar para hacer bajar toda la muestra hasta el fondo del tubo
7. Añadir 1 µL de reactivo bloqueante de las cisteínas
8. Mezclar y centrifugar
9. Incubar los tubos a temperatura ambiente durante 10 minutos

2) DIGERIR LAS PROTEÍNAS CON TRIPSINA

10. Reconstituir 2 viales de tripsina con 25 µL de agua Milli-Q cada uno
11. Mezclar vigorosamente
12. Añadir 10 µL de la solución de tripsina a cada muestra
13. Mezclar vigorosamente y centrifugar
14. Incubar las muestras a 37°C durante toda la noche (entre 12 y 16 horas)
15. Centrifugar para depositar las muestras al fondo del tubo

3) MARCAR LOS PÉPTIDOS TRÍPTICOS CON LOS REACTIVOS iTRAQ

16. Llevar los reactivos iTRAQ necesarios a temperatura ambiente
17. Añadir 70 µL de etanol a cada vial de reactivo iTRAQ
18. Mezclar en *vortex* durante 1 minuto y centrifugar cada reactivo
19. Transferir el contenido de cada reactivo iTRAQ reconstituido a cada una de las muestras según el diseño experimental elaborado
20. Mezclar vigorosamente cada tubo y centrifugar
21. Incubar las muestras durante 1 hora a temperatura ambiente

4) COMBINAR LOS PÉPTIDOS MARCADOS EN UNA SOLA MUESTRA

22. Combinar el contenido de cada muestra marcada dentro de un nuevo vial
23. Mezclar vigorosamente y centrifugar

A.8. Fraccionamiento peptídico por cromatografía de intercambio catiónico (SCX)

Para el fraccionamiento de la muestra por intercambio catiónico se utilizó lo siguiente:

- Cartucho para el intercambio catiónico de 200 μ L y de 4,0 mm x 15 mm, con partículas POROS[®] 50 HS de 50 μ m de tamaño (Applied Biosystems)
- Buffer de carga para la cromatografía de intercambio catiónico (SCX) – KH_2PO_4 10 mM en acetonitrilo al 25% y pH 3,0
- Buffers de elución para la cromatografía de SCX – Se utilizaron 6 soluciones a pH 3,0 compuestas de KH_2PO_4 10 mM en acetonitrilo al 25% y 6 concentraciones distintas de KCl cada una (25, 50, 100, 150, 250 y 375 mM)
- Buffer de lavado de la columna de SCX – KH_2PO_4 10 mM en acetonitrilo al 25% y pH 3,0 y 1 M KCl a pH 3,0
- Buffer de conservación de la columna de SCX – KH_2PO_4 10 mM en acetonitrilo al 25% y azida sódica a pH 3,0

PROCEDIMIENTO

1. Ensamblar las diferentes partes de las que consta el sistema
2. Reducir las concentraciones de sales y compuestos orgánicos por dilución de la muestra hasta 10 veces su volumen con el buffer de carga para el SCX
3. Mezclar vigorosamente
4. Chequear que el pH de la mezcla se encuentra entre 2,5 y 3,3. Si no es así ajustarlo adicionando más buffer de carga
5. Para preparar el cartucho de SCX inyectando 1 mL del buffer de lavado del cartucho de SCX eliminando el volumen eluido
6. Inyectar 2 mL del buffer de carga eliminando el volumen eluido
7. Inyectar lentamente (a razón de 1 gota por segundo) la muestra diluida dentro del cartucho de SCX colectando el volumen eluido en un nuevo vial
8. Inyectar 1 mL del buffer de carga para eliminar los restos de TCEP, SDS, CaCl_2 y el exceso de reactivos iTRAQ que pueda haber quedado atrapado en el cartucho. Colectar el

volumen eluido en el mismo vial usado anteriormente. Este vial debe ser conservado hasta verificar que todo el proceso ha ido correctamente.

9. Para eluir los péptidos aún atrapados en el cartucho, se inyectaron lentamente (1 gota/segundo) 500 μ L de cada uno de los buffers de elución, capturando cada eluido en un nuevo vial.
10. Lavar el cartucho inyectando 1 mL del buffer de lavado de la columna SCX eliminando el eluido
11. Para conservar el cartucho para un próximo uso, inyectar 2 mL del buffer de conservación eliminando el eluido
12. Desmontar el sistema y tapar la entrada y salida del cartucho con sus tapas
13. Escribir el número de veces que ha sido usado el cartucho
14. Almacenar el cartucho a 4°C
15. Limpiar la jeringa, su aguja, los adaptadores y conectores con agua Milli-Q.

A.9. Desalado mediante cromatografía en fase reversa de las muestras de péptidos marcados con los reactivos iTRAQ y fraccionados por cromatografía SCX

* Se utilizaron cartuchos con membranas C18, *Spec 3 mL C18 cartridges* (Varian Inc., Palo Alto, CA, EEUU) a los que se les acopló el émbolo de jeringas de 5 mL para promover el proceso de elusión

PROCEDIMIENTO

Para cada fracción de péptidos marcados en el ensayo de iTRAQ obtenida por cromatografía de SCX, se procedió de la siguiente manera:

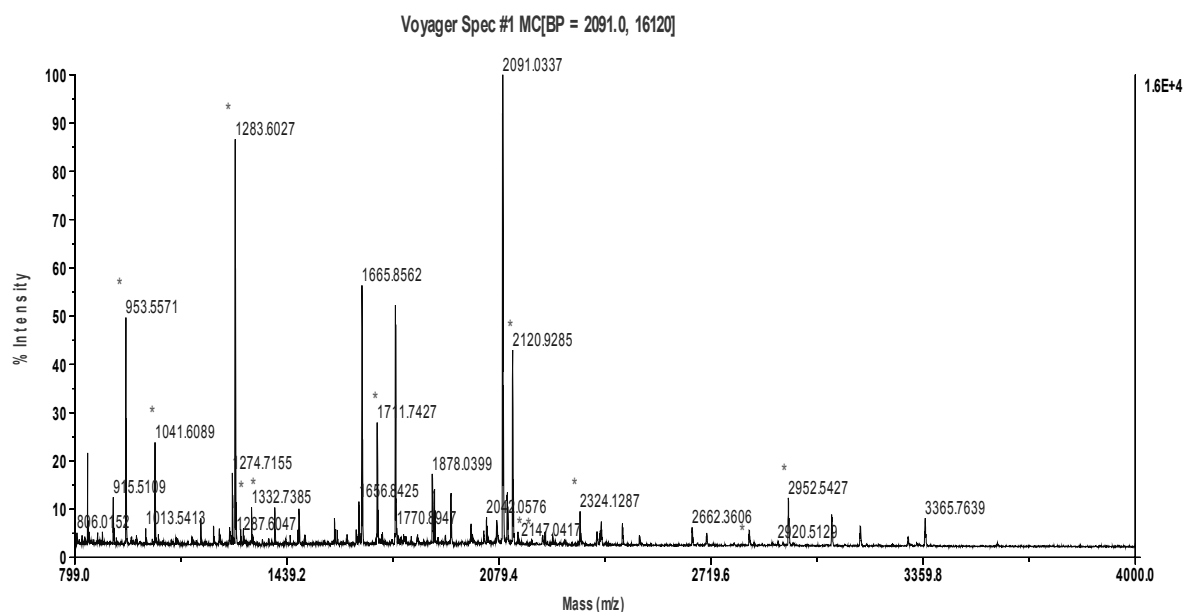
- Pasar a través de la membrana 250 μ L de Acetonitrilo (ACN) 100%
- Hacer lo mismo con 250 μ L de ácido Trifluoroacético (TFA) al 0,1%
- Cargar lentamente el volumen completo de la fracción de SCX correspondiente, recogiendo el eluido en el mismo vial
- Con los péptidos unidos a la membrana C18 hacer dos lavados con 250 μ L de TFA al 0,1% cada vez
- Eluir lentamente los péptidos con 250 μ L de una solución de TFA al 0,1% en ACN al 100% recogiendo el eluido en un nuevo vial rotulado

Antes de proceder con el análisis de LC-MS/MS cada fracción obtenida fue evaporada completamente para ser luego resuspendidas en 10 μ L de ácido fórmico al 1%

ANEXO B: RESULTADOS ADICIONALES

B.1. PROTEÍNAS IDENTIFICADAS POR MALDI TOF MS PRESENTES EN LA TABLA 4 (página 99).

- *Spot #2, Espectro de MALDI TOF MS*

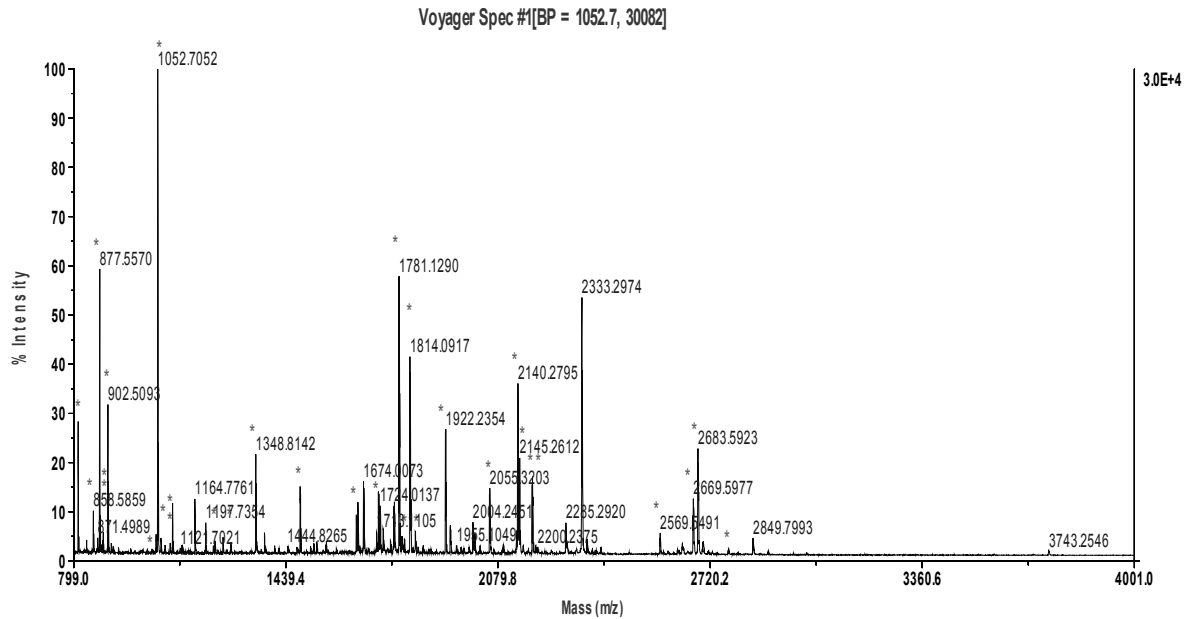


Lista de picos (las masas de los péptidos que se corresponden con los de la proteína identificada están subrayadas):

837.9910; 915.5122; 953.5553; 1013.5458; 1041.6053; 1051.7101; 1217.6683; 1235.6028; 1274.7224; 1283.6032; 1299.6012; 1332.7403; 1336.6649; 1402.7863; 1448.9717; 1582.7664; 1590.8582; 1656.8471; 1665.8528; 1711.7381; 1766.8887; 1832.8176; 1878.0331; 1883.9917; 1934.0908; 2041.0519; 2071.9369; 2090.0282; 2104.0514; 2119.9245; 2135.9148; 2218.2907; 2241.2447; 2323.1319; 2374.3004; 2387.4470; 2451.2139; 2502.3927; 2660.3771; 2704.2898; 2833.2805; 2951.5318; 3168.6174; 3312.4390; 3363.7575

Valor de *score* de la siguiente proteína no-homóloga identificada: 54

- Spot #3, Espectro de MALDI TOF MS

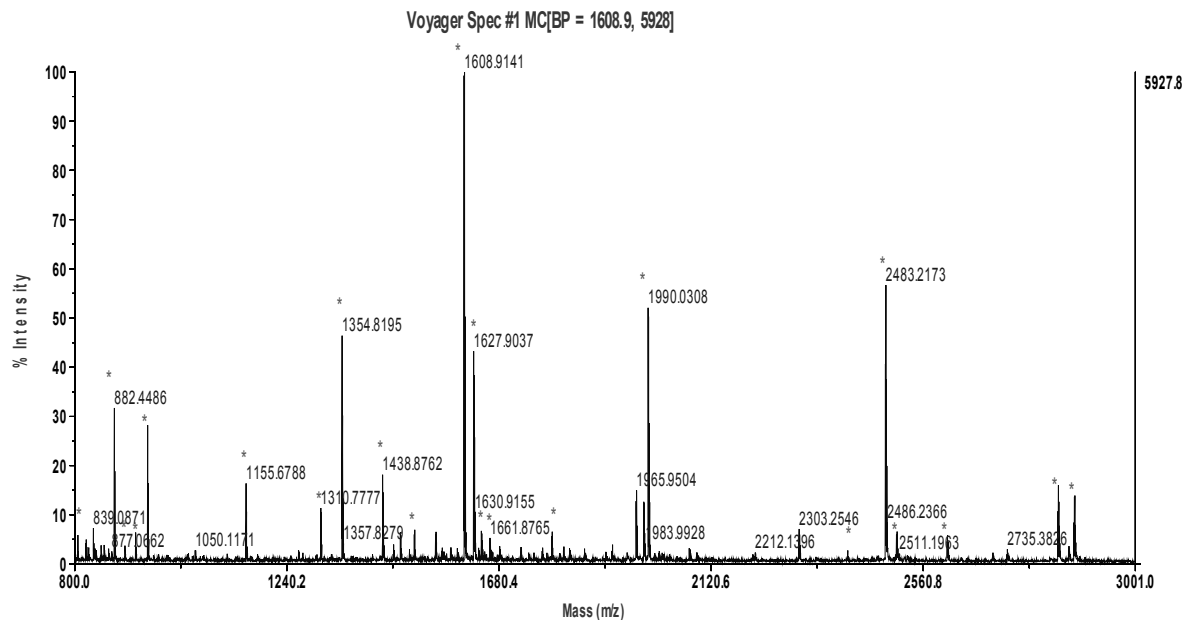


Lista de picos (las masas de los péptidos que se corresponden con los de la proteína identificada están subrayadas):

812.4764; 858.5846; 877.5600; 886.5623; 888.5323; 902.5098; 1047.6013; 1052.7013;
1062.6859; 1090.6836; 1097.6708; 1164.7764; 1197.7433; 1220.7655; 1225.8134; 1249.7691;
1272.8677; 1348.8138; 1374.8309; 1482.8996; 1523.9456; 1533.0356; 1560.9517; 1652.0222;
1674.0143; 1713.1064; 1719.1059; 1724.0158; 1733.1169; 1766.0901; 1781.1269; 1789.1589;
1814.0897; 1830.0863; 1853.0585; 1921.2325; 1935.2551; 2004.2567; 2025.1345; 2054.3178;
2095.2750; 2139.2857; 2144.2595; 2183.2288; 2193.3336; 2332.3036; 2348.2851; 2364.2832;
2389.3211; 2568.5418; 2668.5796; 2682.5833; 2696.5910; 2774.8087; 2847.9756; 2893.7734

Valor de *score* de la siguiente proteína no-homóloga identificada: 70

- Spot #6, *Espectro de MALDI TOF MS*

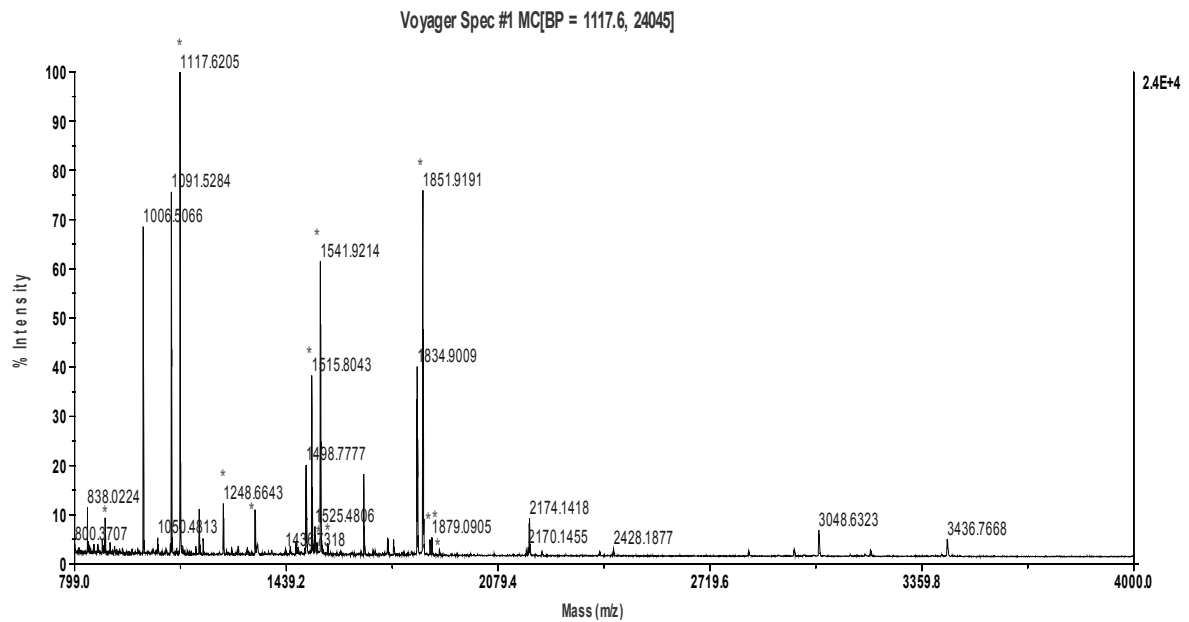


Lista de picos (las masas de los péptidos que se corresponden con los de la proteína identificada están subrayadas):

806.4771; 882.4513; 904.5088; 926.5146; 951.5774; 1155.6850; 1310.7733; 1354.8217; 1438.8811; 1504.7995; 1607.9078; 1627.8999; 1643.9056; 1661.8706; 1770.1049; 1789.9780; 1980.9617; 1990.0367; 2075.1110; 2302.2760; 2403.2862; 2482.2204; 2505.3044; 2610.3188; 2734.4062; 2840.3132; 2862.2935; 2873.4221

Valor de *score* de la siguiente proteína no-homóloga identificada: 65

- *Spot #8, Espectro de MALDI TOF MS*

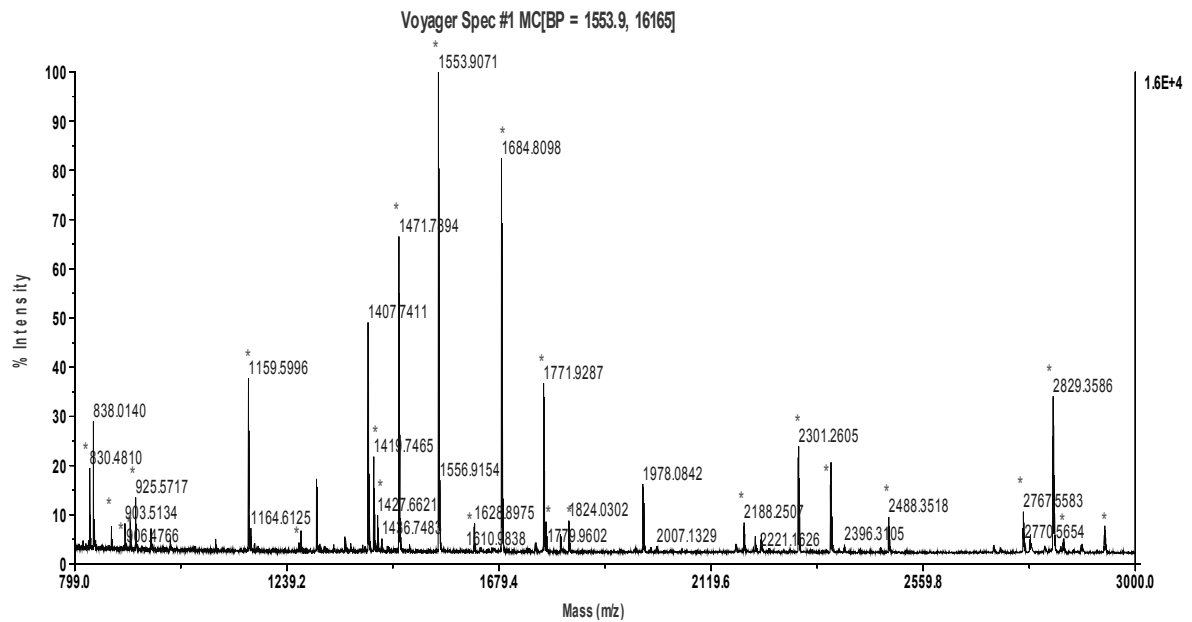


Lista de picos (las masas de los péptidos que se corresponden con los de la proteína identificada están subrayadas):

838.0226; 891.4642; 1006.5035; 1050.4844; 1117.6159; 1187.5457; 1248.6599; 1344.7935; 1515.8019; 1525.4770; 1531.7900; 1541.9207; 1563.8539; 1672.8997; 1744.9243; 1762.9095; 1833.9130; 1850.9146; 1873.0107; 1878.0742; 1901.0779; 2172.1363; 2385.3851; 2427.1803; 2834.5893; 2972.5295; 3046.5385; 3203.8250; 3435.7667

Valor de *score* de la siguiente proteína no-homóloga identificada: 58

- *Spot #9, Espectro de MALDI TOF MS*

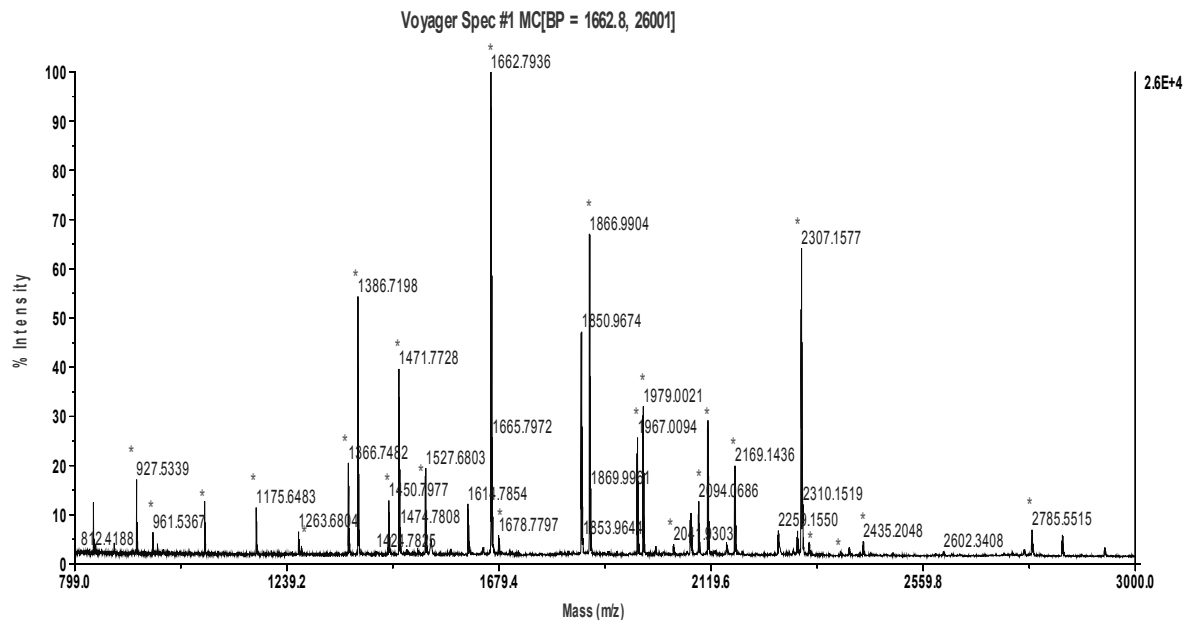


Lista de picos (las masas de los péptidos que se corresponden con los de la proteína identificada están subrayadas):

830.4812; 838.0099; 875.4651; 903.5099; 914.5372; 925.5716; 957.5240; 1159.6019;
1164.6145; 1268.6719; 1300.7578; 1359.7336; 1407.7452; 1419.7516; 1427.6563; 1471.7854;
1553.9036; 1627.8875; 1684.8139; 1771.9344; 1776.9524; 1807.0231; 1824.0383; 1978.0858;
2187.2446; 2223.1142; 2300.2512; 2367.3021; 2487.3579; 2766.5427; 2780.3380; 2828.3464;
2849.5547; 2886.3205; 2934.3505

Valor de *score* de la siguiente proteína no-homóloga identificada: 59

- *Spot #10, Espectro de MALDI TOF MS*

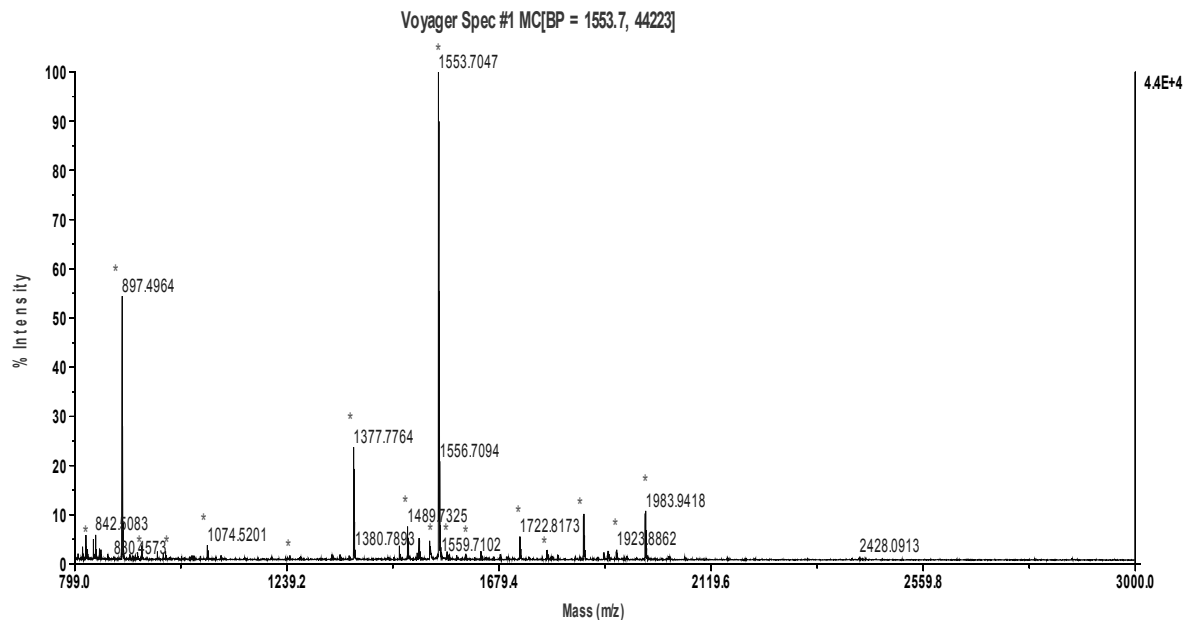


Lista de picos (las masas de los péptidos que se corresponden con los de la proteína identificada están subrayadas):

837.9985; 881.2579; 927.5361; 961.5377; 970.9980; 1068.6813; 1175.6453; 1263.6755; 1269.5162; 1366.7419; 1386.7233; 1450.8002; 1471.7687; 1526.6764; 1614.7877; 1662.7882; 1678.7743; 1849.9619; 1866.9924; 1966.0097; 1978.0017; 2040.9266; 2076.0452; 2093.0842; 2112.1876; 2150.6969; 2168.1400; 2258.1391; 2298.0901; 2306.1568; 2322.1746; 2405.2856; 2434.2078; 2784.5573; 2847.5121; 2935.2785

Valor de *score* de la siguiente proteína no-homóloga identificada: 59

- *Spot #11, Espectro de MALDI TOF MS*

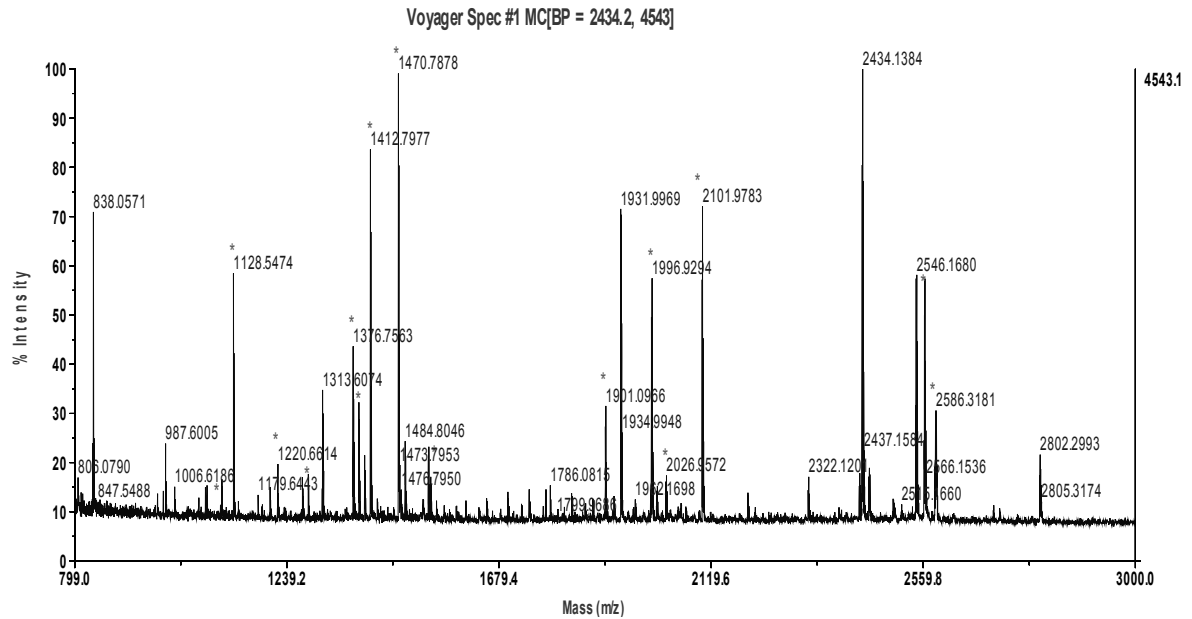


Lista de picos (las masas de los péptidos que se corresponden con los de la proteína identificada están subrayadas):

822.4103; 838.0436; 850.3889; 897.4998; 938.4211; 987.5320; 1074.5242; 1245.6544;
1377.7810; 1489.7387; 1509.6862; 1513.7747; 1553.7049; 1571.8127; 1610.7116; 1641.8689;
1681.8977; 1722.8104; 1778.9131; 1800.8445; 1854.8547; 1896.2572; 1905.8649; 1922.8864;
1982.9486; 2032.0651

Valor de *score* de la siguiente proteína no-homóloga identificada: 66

- Spot #12, Espectro de MALDI TOF MS

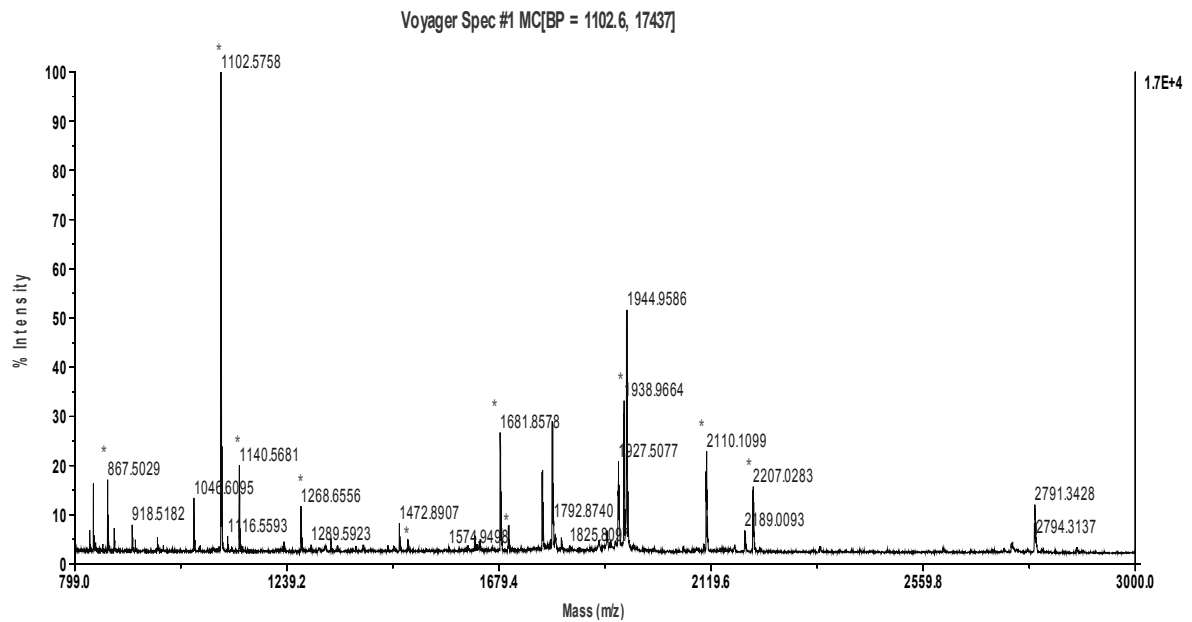


Lista de picos (las masas de los péptidos que se corresponden con los de la proteína identificada están subrayadas):

838.0612; 987.6021; 1104.5814; 1128.5487; 1220.6677; 1283.7151; 1313.6042; 1376.7624; 1388.7473; 1400.7690; 1412.7980; 1470.7900; 1484.8034; 1532.8442; 1537.8022; 1900.0877; 1931.9932; 1995.9271; 2025.9423; 2100.9753; 2321.1049; 2433.1395; 2447.0556; 2544.1856; 2561.1841; 2584.2173; 2800.3365

Valor de *score* de la siguiente proteína no-homóloga identificada: 58

- Spot #15, Espectro de MALDI TOF MS

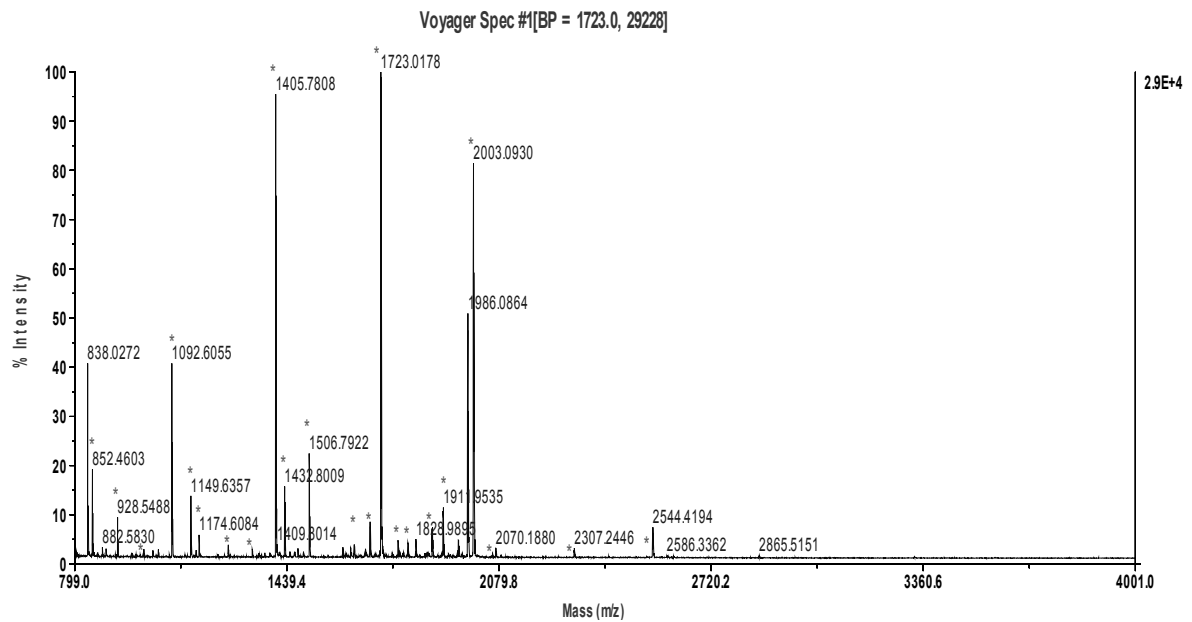


Lista de picos (las masas de los péptidos que se corresponden con los de la proteína identificada están subrayadas):

837.9838; 867.4923; 881.2606; 918.5249; 970.9347; 1046.5986; 1102.5822; 1116.5631; 1140.5659; 1233.5761; 1268.6429; 1330.6806; 1472.8890; 1489.8873; 1628.7940; 1681.8360; 1698.8773; 1768.8229; 1789.8463; 1795.9274; 1808.9887; 1903.4535; 1926.5198; 1938.0024; 1943.9989; 2109.1585; 2189.0624; 2206.0838; 2345.1763; 2742.3807; 2790.3912; 2876.3542

Valor de *score* de la siguiente proteína no-homóloga identificada: 69

- *Spot #17, Espectro de MALDI TOF MS*

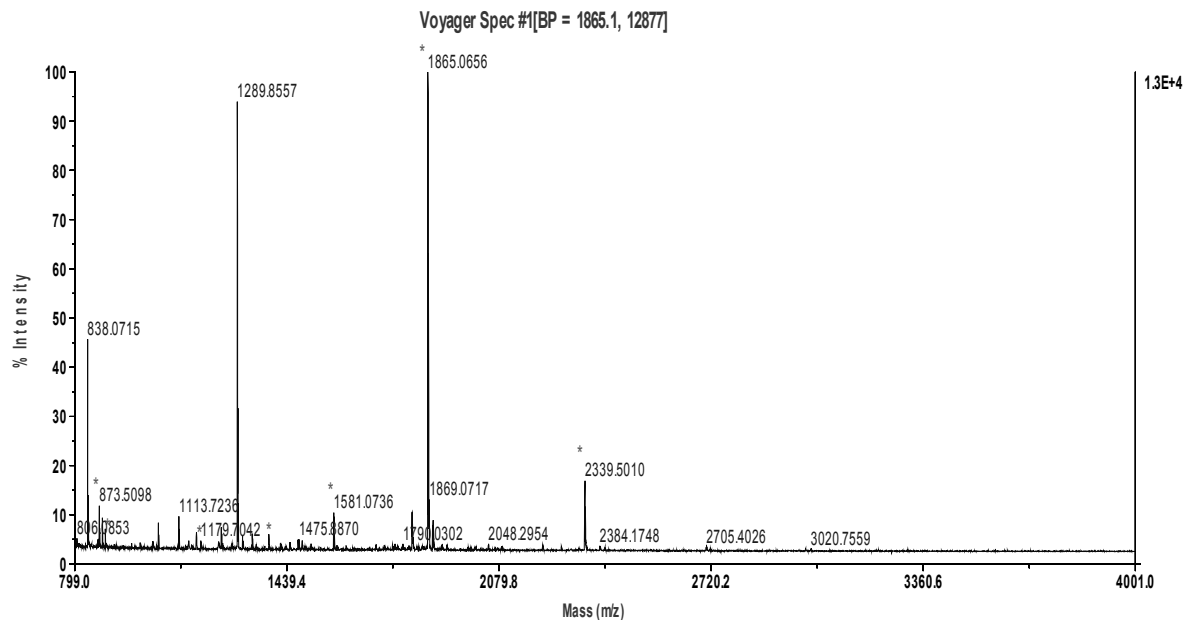


Lista de picos (las masas de los péptidos que se corresponden con los de la proteína identificada están subrayadas):

852.4647; 928.5458; 1007.5226; 1051.7471; 1092.6078; 1149.6371; 1165.7828; 1174.6048; 1262.7391; 1334.9188; 1355.8040; 1405.7830; 1432.8041; 1448.9532; 1462.8300; 1489.7873; 1506.7869; 1608.9997; 1642.8572; 1690.9328; 1723.0208; 1775.0107; 1805.0088; 1828.9971; 1878.0784; 1910.9592; 1957.0913; 2002.0915; 2060.1137; 2070.1837; 2306.2521; 2542.4363; 2863.3899

Valor de *score* de la siguiente proteína no-homóloga identificada: 60

- Spot #19, Espectro de MALDI TOF MS

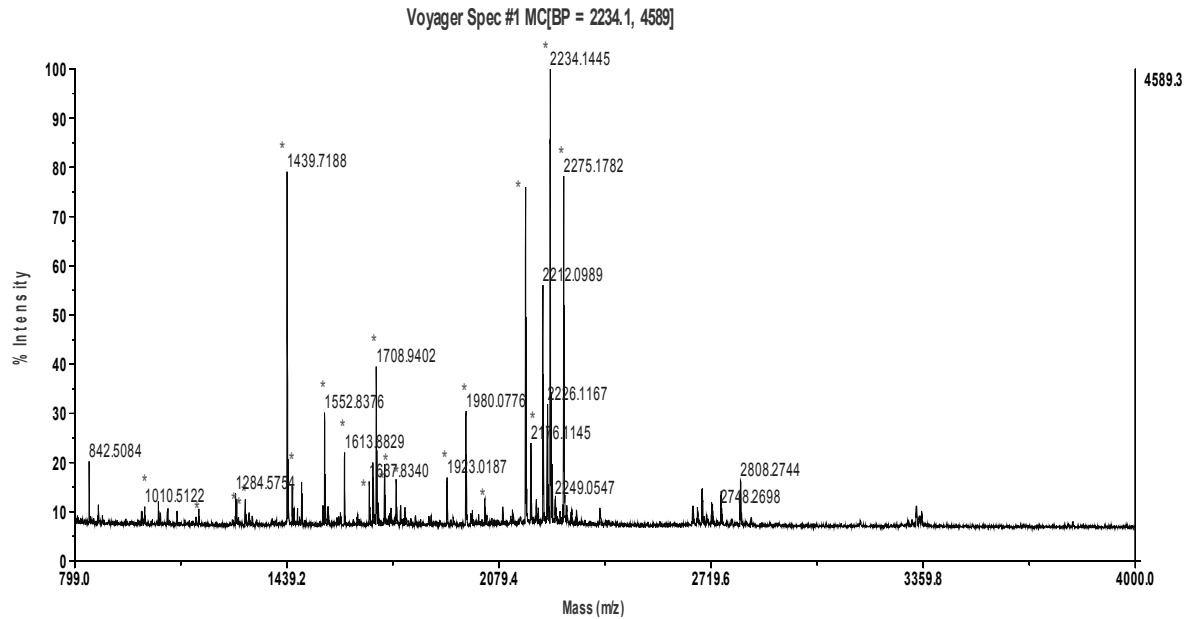


Lista de picos (las masas de los péptidos que se corresponden con los de la proteína identificada están subrayadas):

838.0692; 873.5100; 882.6294; 891.5075; 1051.8006; 1113.7177; 1166.6743; 1241.8414; 1289.8575; 1335.0152; 1384.9407; 1485.9117; 1581.0662; 1818.0690; 1865.0728; 1879.0774; 2338.4976

Valor de *score* de la siguiente proteína no-homóloga identificada: 57

- *Spot #26, Espectro de MALDI TOF MS*

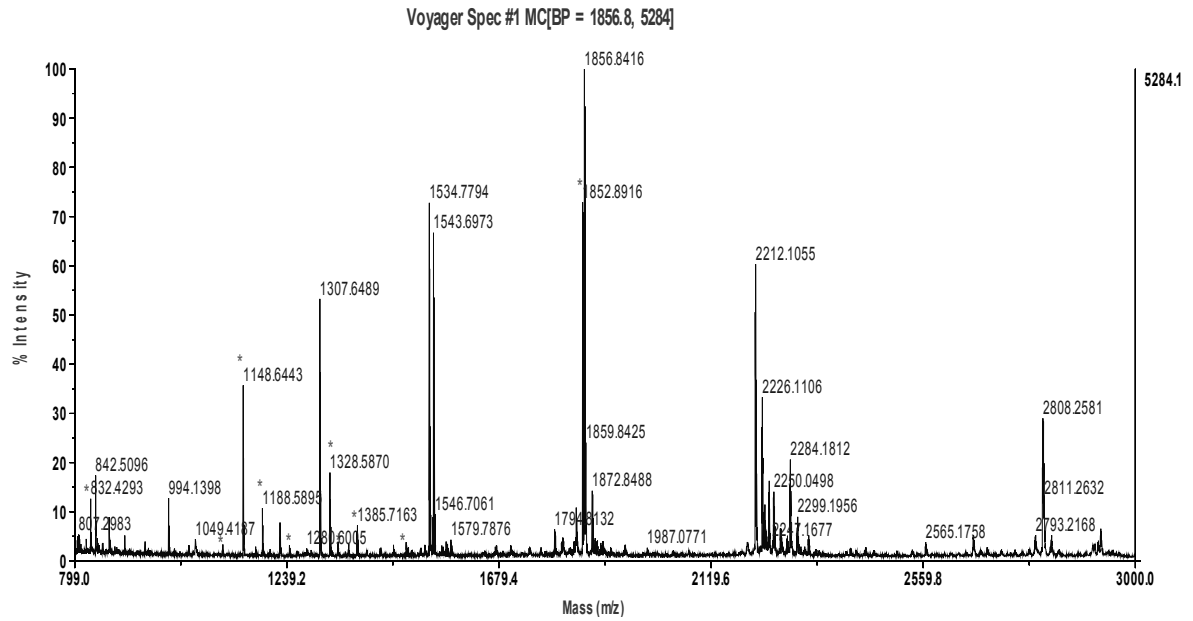


Lista de picos (las masas de los péptidos que se corresponden con los de la proteína identificada están subrayadas):

1010.5277; 1051.7167; 1079.5723; 1173.6252; 1284.6077; 1287.7454; 1313.7644; 1334.8912;
1439.7209; 1455.7192; 1483.7755; 1552.8303; 1612.8819; 1698.8268; 1708.9358; 1714.8168;
1733.8956; 1768.9782; 1781.8867; 1922.0142; 1979.0637; 2036.0133; 2089.9843; 2159.1063;
2175.1072; 2233.1439; 2274.1756; 2298.1739; 2720.2569; 2748.2866; 2806.2323

Valor de *score* de la siguiente proteína no-homóloga identificada: 66

- Spot #28, Espectro de MALDI TOF MS

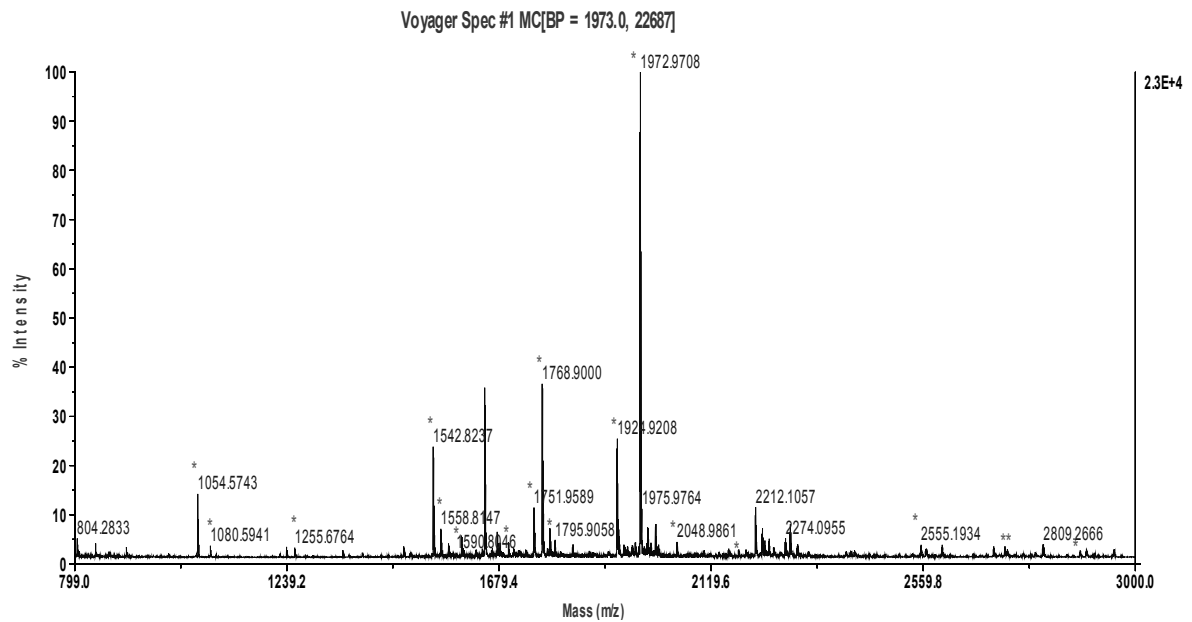


Lista de picos (las masas de los péptidos que se corresponden con los de la proteína identificada están subrayadas):

832.4335; 903.0778; 1106.6024; 1148.6421; 1188.5870; 1244.7239; 1328.5918; 1344.5900; 1384.7276; 1486.7123; 1703.9510; 1852.8867; 2927.2995

Valor de *score* de la siguiente proteína no-homóloga identificada: 55

- *Spot #31, Espectro de MALDI TOF MS*

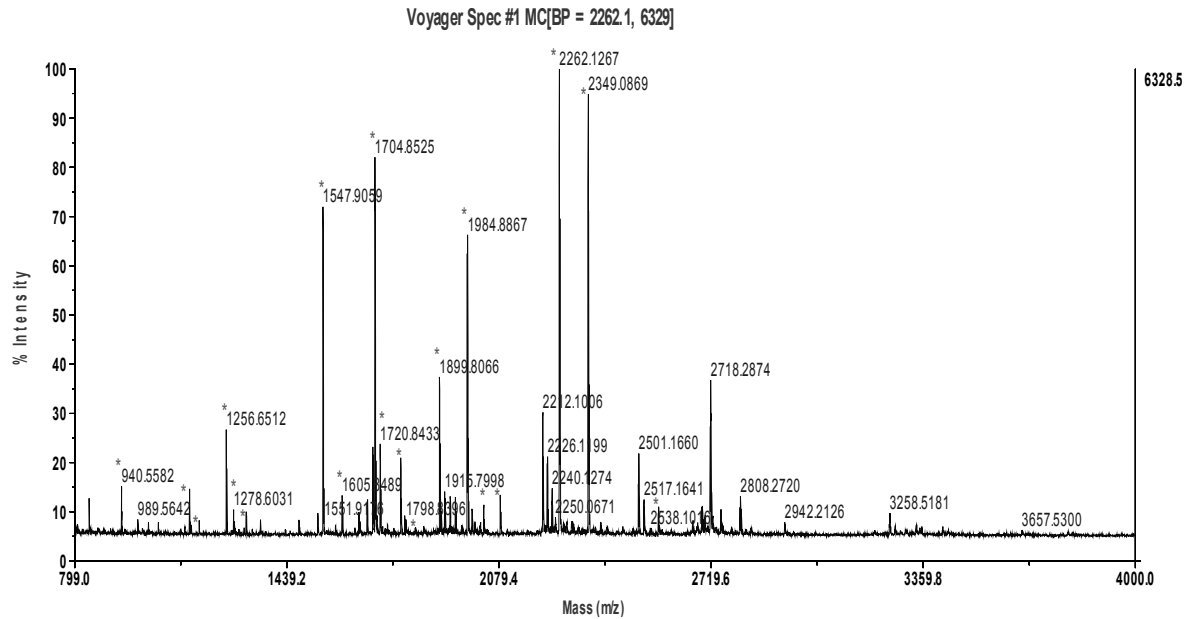


Lista de picos (las masas de los péptidos que se corresponden con los de la proteína identificada están subrayadas):

1054.5695; 1080.5923; 1238.6485; 1255.6737; 1355.5938; 1395.8695; 1481.7884; 1542.8302; 1558.8087; 1574.8042; 1601.7287; 1605.7507; 1675.7864; 1681.7566; 1698.9322; 1751.9624; 1768.8952; 1784.8900; 1831.8775; 1923.9264; 1971.9736; 1987.9758; 2003.9592; 2009.9309; 2047.9723; 2155.1957; 2176.0706; 2191.0235; 2273.1043; 2416.2258; 2446.1309; 2536.1579; 2554.1694; 2598.2083; 2663.3372; 2728.3421; 2731.3408; 2733.3080; 2766.2608; 2857.4494; 2884.4136; 2897.5051; 2953.3480

Valor de *score* de la siguiente proteína no-homóloga identificada: 56

- Spot #32, Espectro de MALDI TOF MS

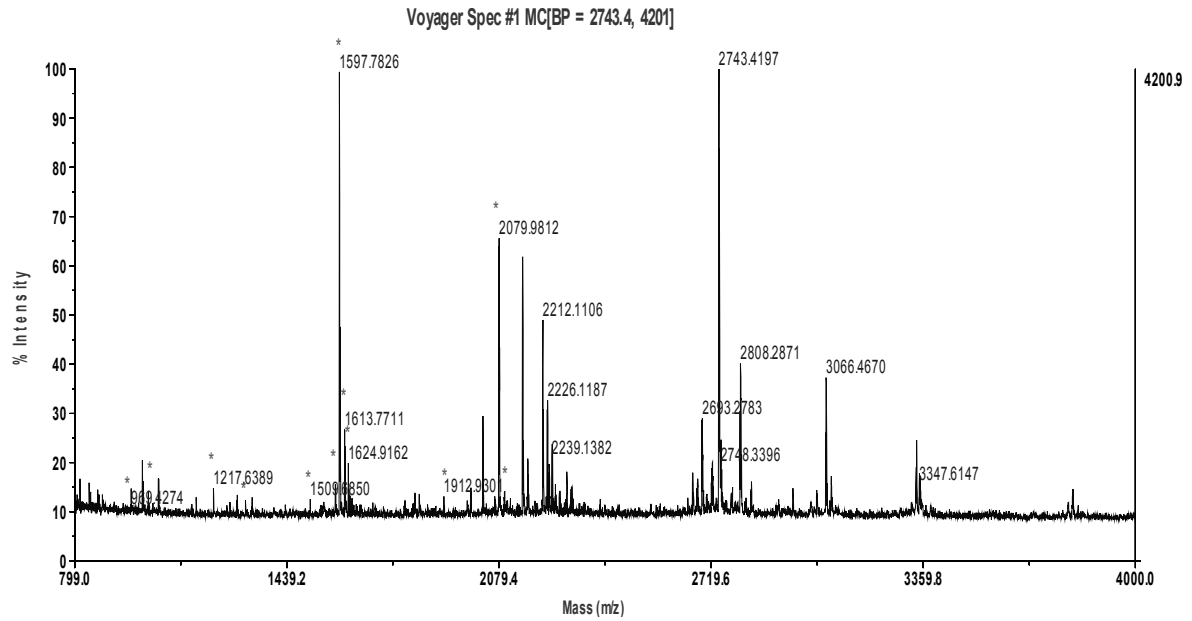


Lista de picos (las masas de los péptidos que se corresponden con los de la proteína identificada están subrayadas):

940.5605; 1145.6727; 1149.6305; 1175.0634; 1256.6453; 1278.6002; 1316.7028; 1359.6988;
1547.9104; 1605.8536; 1698.8509; 1704.8548; 1720.8445; 1782.8583; 1798.8343; 1899.8026;
 1931.7955; 1947.7851; 1983.8887; 1997.8946; 2032.9803; 2082.9823; 2261.1232; 2348.0768;
 2386.0277; 2499.1642; 2515.1860; 2560.2746; 2747.5070; 2940.2703; 3257.5117; 3337.6548

Valor de *score* de la siguiente proteína no-homóloga identificada: 64

- *Spot #33, Espectro de MALDI TOF MS*

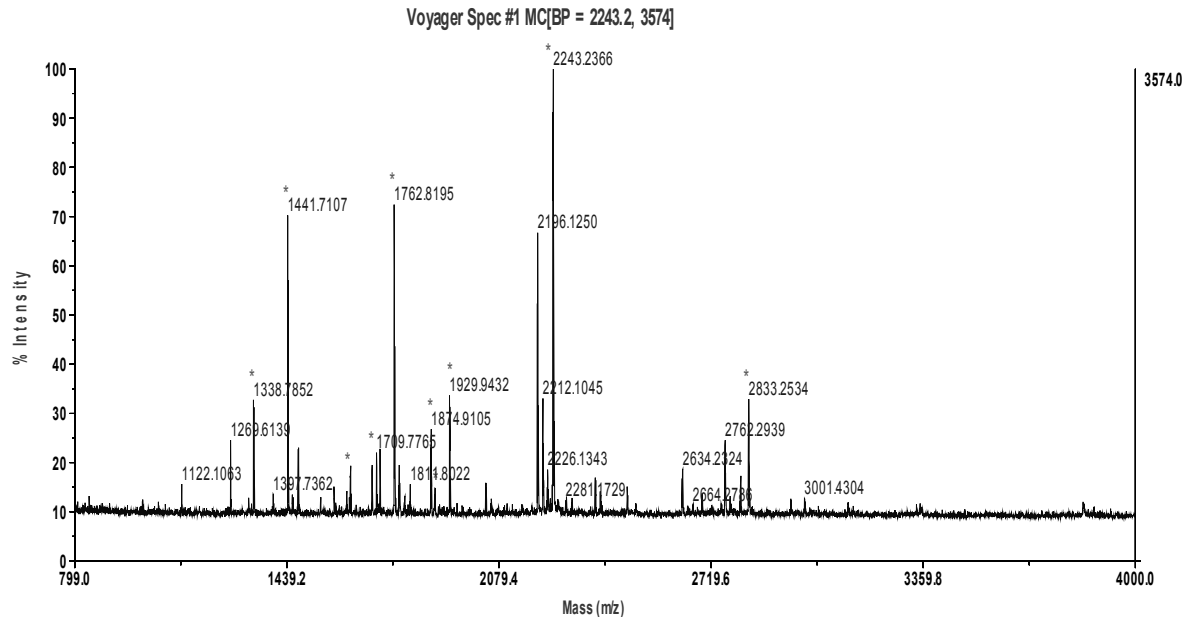


Lista de picos (las masas de los péptidos que se corresponden con los de la proteína identificada están subrayadas):

816.5441; 882.5596; 969.5362; 982.5859; 996.6120; 1021.5643; 1151.7247; 1165.7515;
1217.6297; 1314.6798; 1448.9258; 1509.6929; 1523.6984; 1585.7507; 1597.7795; 1613.7606;
1624.8734; 1826.0020; 1912.9559; 2078.9660; 2093.0082; 2150.1057; 2164.1127; 2225.1228;
 2230.1660; 2742.3008

Valor de *score* de la siguiente proteína no-homóloga identificada: 53

- *Spot #36, Espectro de MALDI TOF MS*

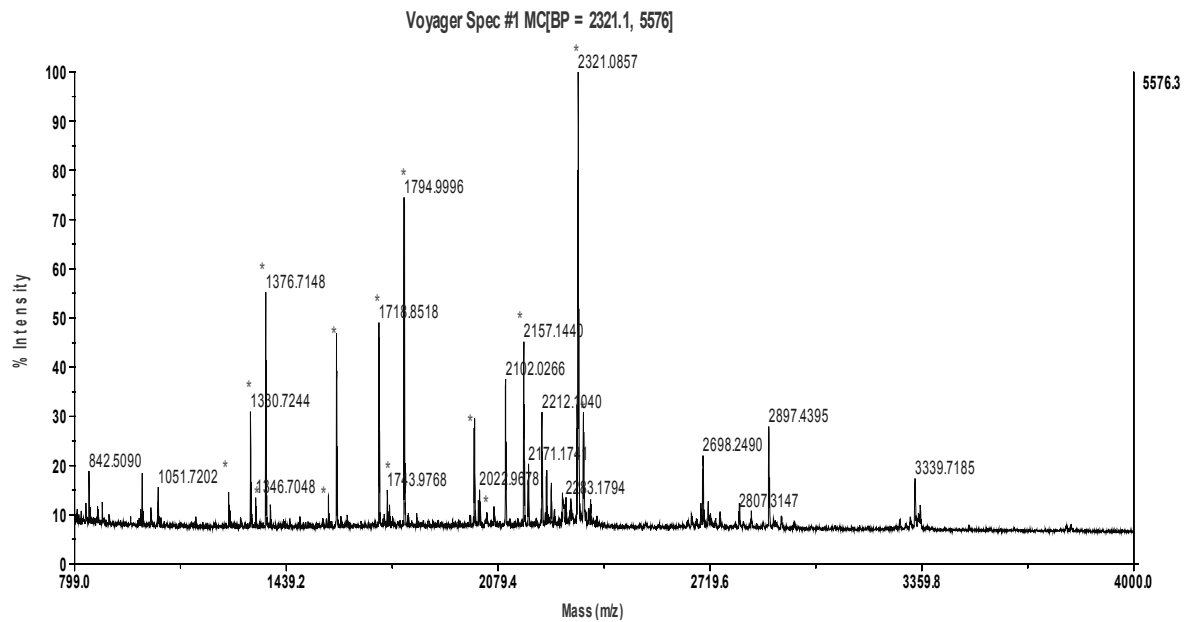


Lista de picos (las masas de los péptidos que se corresponden con los de la proteína identificada están subrayadas):

1122.1036; 1269.6089; 1338.7910; 1441.7053; 1473.7052; 1630.7989; 1695.9106; 1709.7705; 1719.7921; 1762.8204; 1776.8304; 1810.8261; 1873.8995; 1884.9887; 1929.9357; 2039.0033; 2242.2386; 2369.1666; 2466.1933; 2631.2868; 2832.2545

Valor de *score* de la siguiente proteína no-homóloga identificada: 47

- *Spot #39, Espectro de MALDI TOF MS*

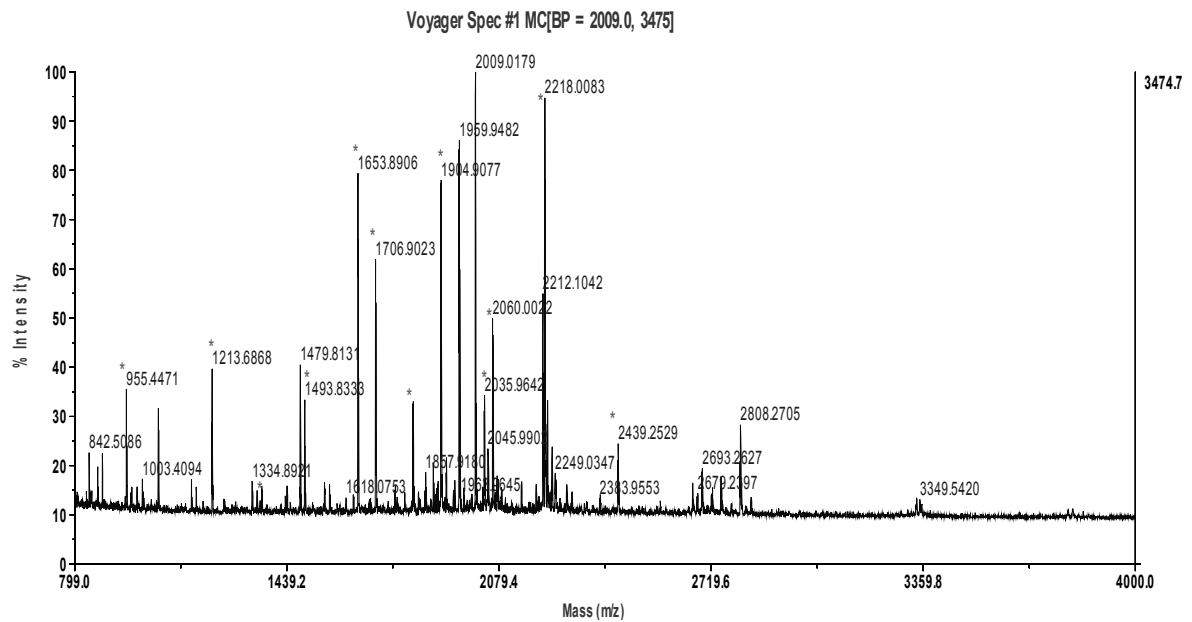


Lista de picos (las masas de los péptidos que se corresponden con los de la proteína identificada están subrayadas):

1003.4103; 1051.7174; 1264.8091; 1330.7210; 1346.7057; 1376.7094; 1565.8361; 1590.7664; 1718.8585; 1743.9824; 1795.0046; 2006.9785; 2022.9697; 2101.0237; 2156.1400; 2170.1617; 2320.0802; 2336.0795; 2358.0436; 2696.2235; 2712.2252; 2896.4332

Valor de *score* de la siguiente proteína no-homóloga identificada: 50

- Spot #42, Espectro de MALDI TOF MS

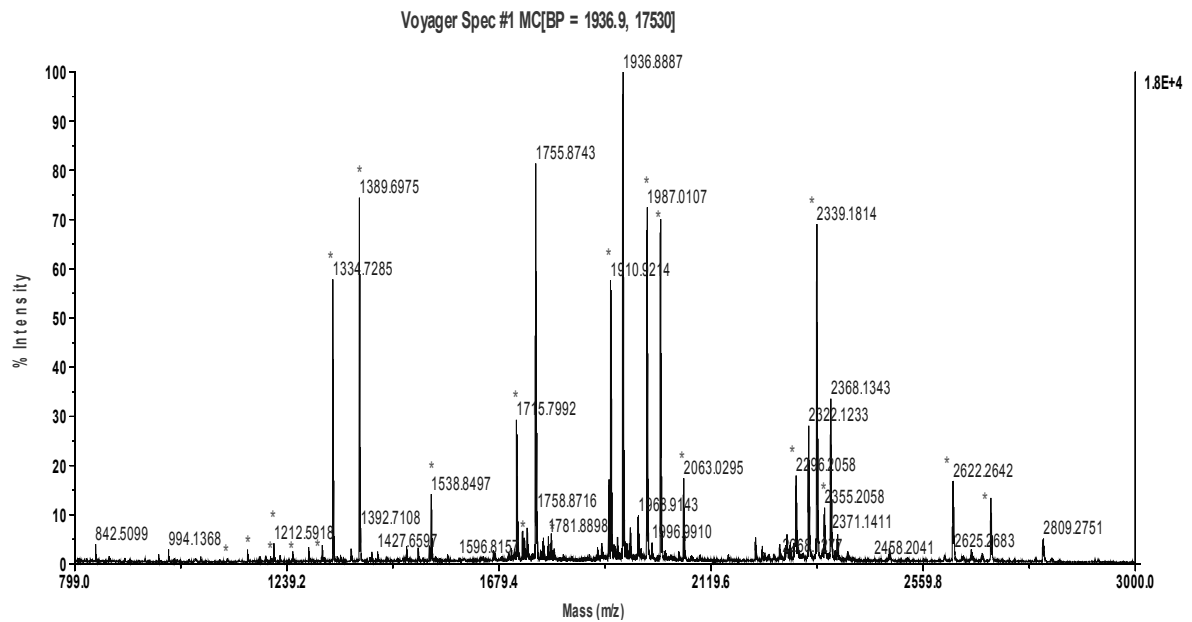


Lista de picos (las masas de los péptidos que se corresponden con los de la proteína identificada están subrayadas):

868.5512; 882.5548; 955.4426; 1051.7165; 1213.6899; 1334.8941; 1349.7755; 1363.6789;
 1479.8059; 1492.8256; 1552.9125; 1653.8969; 1706.9045; 1819.9669; 1903.9044; 1958.9508;
 2008.0118; 2034.9673; 2045.0096; 2060.0032; 2072.9317; 2217.0047; 2225.1200; 2249.0251;
2438.2336; 2691.2887; 2748.2751

Valor de *score* de la siguiente proteína no-homóloga identificada: 32

- Spot #43, Espectro de MALDI TOF MS

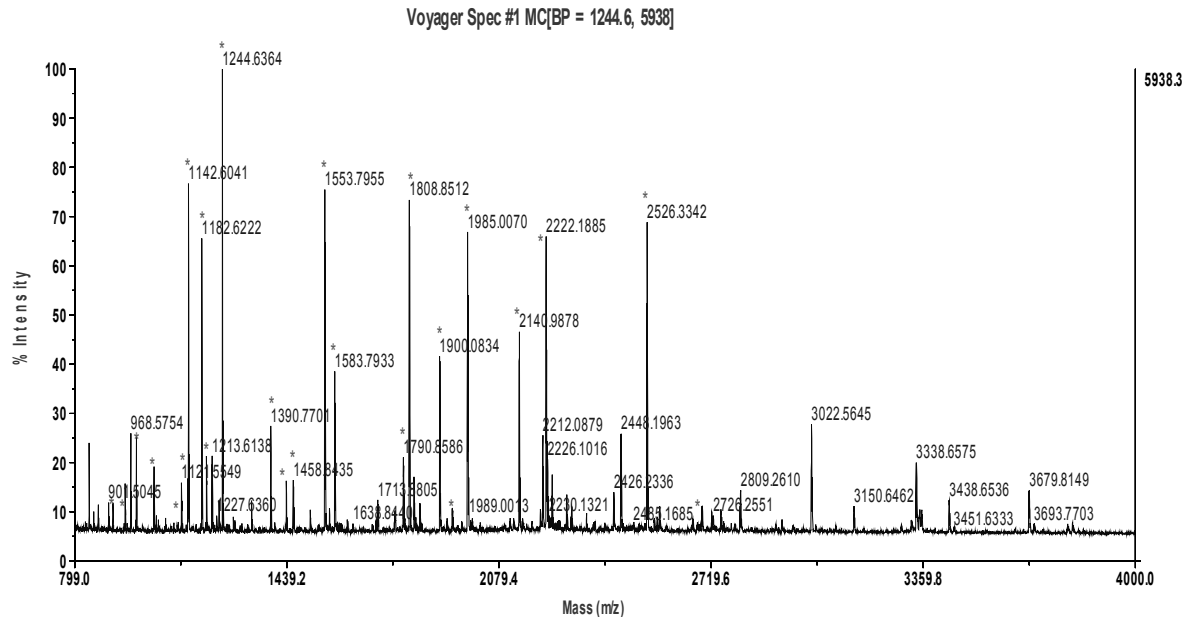


Lista de picos (las masas de los péptidos que se corresponden con los de la proteína identificada están subrayadas):

1006.3182; 1099.5241; 1115.6144; 1157.6765; 1183.6011; 1195.6282; 1205.6521; 1212.5930; 1251.6177; 1284.7573; 1312.7494; 1334.7239; 1389.7029; 1415.7220; 1487.7774; 1511.7169; 1538.8508; 1715.7940; 1727.7926; 1731.7985; 1737.8653; 1755.8726; 1770.8607; 1780.8901; 1781.8945; 1786.8680; 1787.8737; 1792.8521; 1906.8844; 1910.9216; 1924.9358; 1967.8921; 1986.0113; 2014.0240; 2051.9779; 2062.0203; 2261.1407; 2273.1209; 2276.1243; 2295.2105; 2338.1655; 2354.1915; 2488.2604; 2620.2598; 2658.2001; 2659.1861; 2681.2710; 2699.2535

Valor de *score* de la siguiente proteína no-homóloga identificada: 56

- *Spot #46, Espectro de MALDI TOF MS*

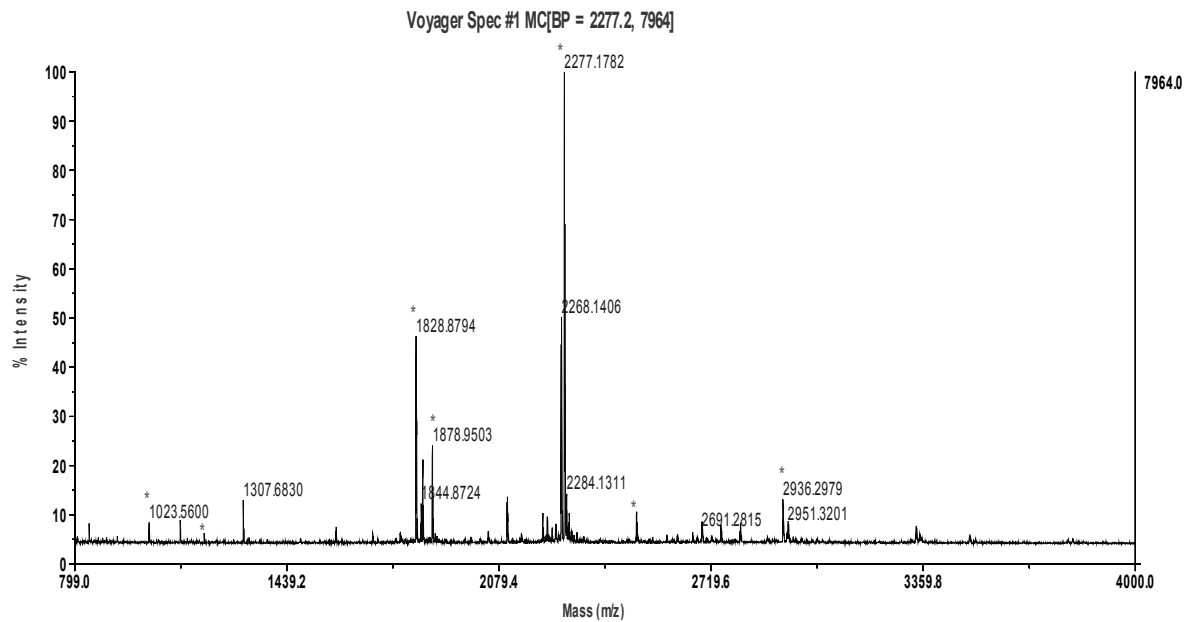


Lista de picos (las masas de los péptidos que se corresponden con los de la proteína identificada están subrayadas):

914.3877; 951.5200; 968.5748; 985.4346; 1038.5255; 1121.5486; 1140.5621; 1142.5999; 1182.6243; 1196.5822; 1244.6316; 1332.7094; 1390.7663; 1437.6928; 1458.8452; 1509.8166; 1553.7916; 1567.8071; 1583.7946; 1713.8773; 1790.8654; 1808.8537; 1822.7951; 1840.8388; 1900.0772; 1938.0219; 1984.0145; 2139.9849; 2221.1820; 2298.1773; 2446.1944; 2525.3454; 2562.1826; 2662.3408; 2691.2440; 2720.2335; 2748.2647

Valor de *score* de la siguiente proteína no-homóloga identificada: 79

- Spot #47, Espectro de MALDI TOF MS

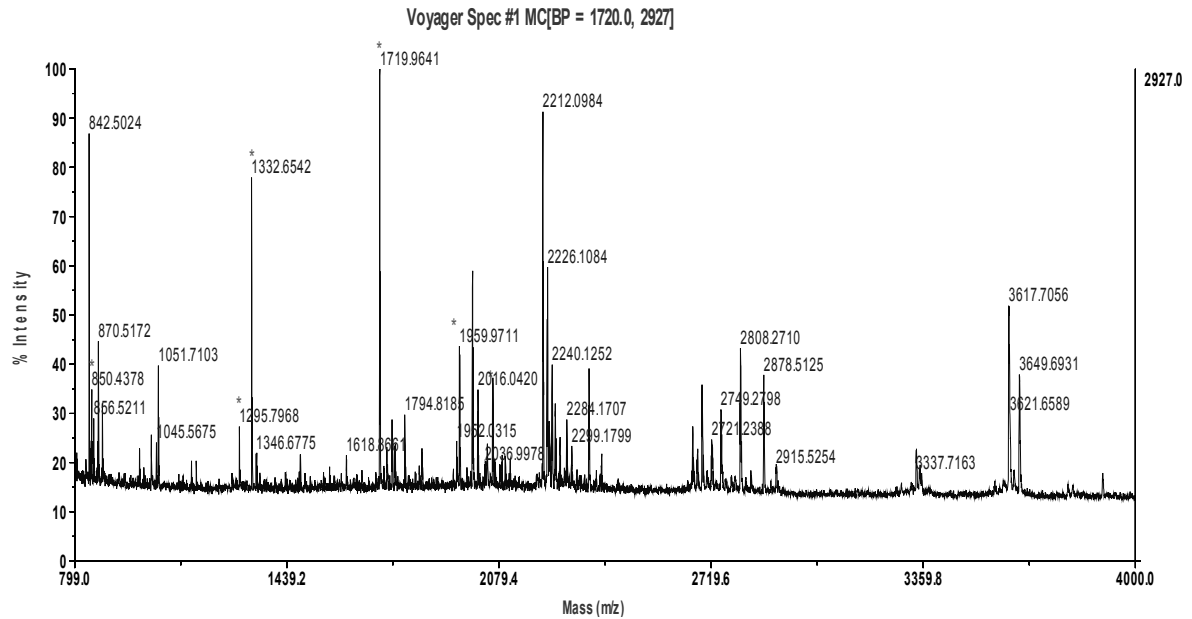


Lista de picos (las masas de los péptidos que se corresponden con los de la proteína identificada están subrayadas):

1023.5520; 1117.6003; 1189.5891; 1586.8561; 1697.8487; 1828.8762; 1843.9012; 1849.0150; 1877.9466; 1886.9607; 2047.0798; 2104.0211; 2250.0922; 2267.1279; 2276.1777; 2282.1189; 2290.1655; 2298.1523; 2314.1445; 2494.1901; 2691.2861; 2748.3058; 2935.3155; 2949.5192; 3337.6623

Valor de *score* de la siguiente proteína no-homóloga identificada: 68

- Spot #49, Espectro de MALDI TOF MS

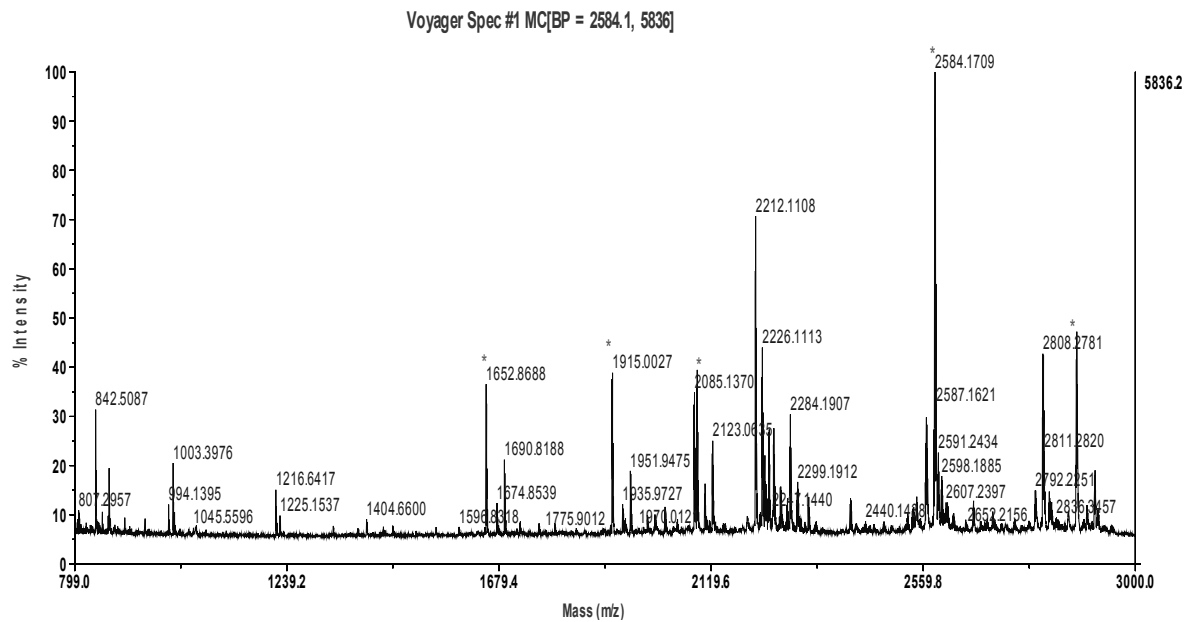


Lista de picos (las masas de los péptidos que se corresponden con los de la proteína identificada están subrayadas):

850.4322; 882.5696; 1030.5379; 1051.7139; 1295.8053; 1332.6616; 1618.8764; 1718.9732; 1756.9430; 1846.9802; 1959.9693; 1999.0301; 2015.0483; 2060.0532; 2230.2060; 2249.0720; 2350.2205; 2388.1332; 2720.2214; 2748.2886; 2876.4301; 2914.5483; 3616.6442; 3648.6257

Valor de *score* de la siguiente proteína no-homóloga identificada: 40

- *Spot #52, Espectro de MALDI TOF MS*

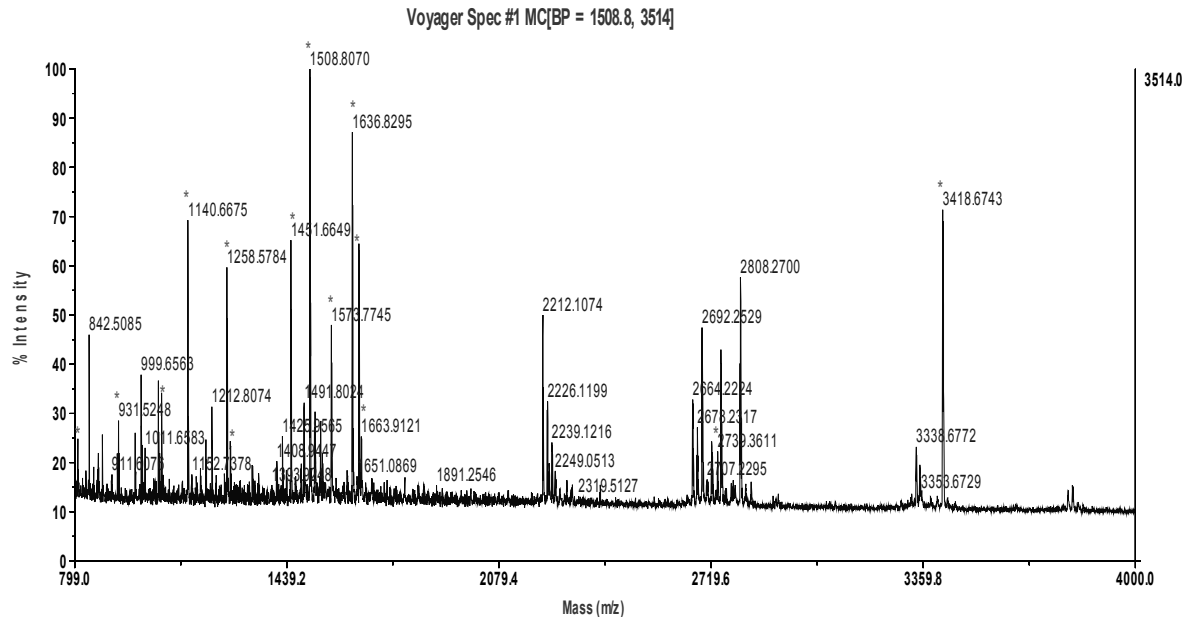


Lista de picos (las masas de los péptidos que se corresponden con los de la proteína identificada están subrayadas):

1652.8792; 1914.0061; 2089.9469; 2122.0499; 2582.1530; 2588.1645; 2596.1726; 2876.3976

Valor de *score* de la siguiente proteína no-homóloga identificada: 34

- *Spot #56, Espectro de MALDI TOF MS*

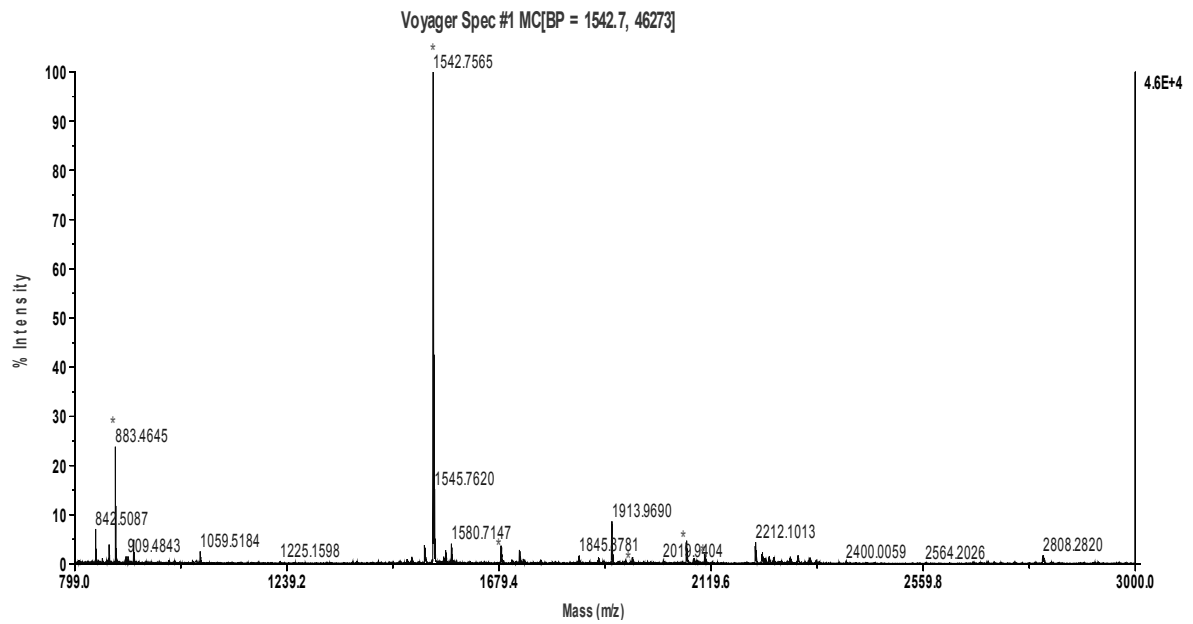


Lista de picos (las masas de los péptidos que se corresponden con los de la proteína identificada están subrayadas):

808.5059; 882.6555; 931.5216; 981.6400; 999.6528; 1051.7040; 1055.6953; 1061.504000,
1140.6726; 1165.7320; 1178.6300; 1194.7925; 1212.7992; 1258.5811; 1268.8160; 1425.9494;
1451.6712; 1490.8048; 1508.8109; 1522.7894; 1540.8021; 1546.7620; 1573.7754; 1636.8352;
1656.8705; 1663.9205; 2249.0358; 2663.2179; 2677.2458; 2691.2714; 2720.2327; 2738.3418;
2748.2642; 2838.3177; 3337.6655; 3348.5396; 3417.6653

Valor de *score* de la siguiente proteína no-homóloga identificada: 54

- *Spot #59, Espectro de MALDI TOF MS*

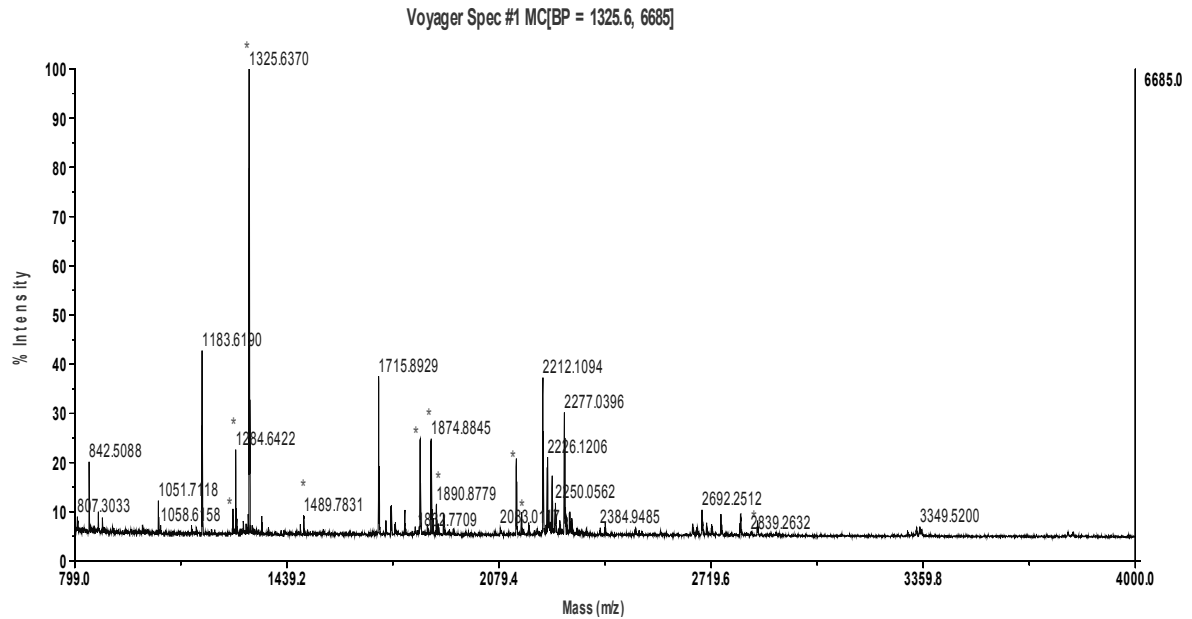


Lista de picos (las masas de los péptidos que se corresponden con los de la proteína identificada están subrayadas):

883.4688; 1542.7649; 1683.8703; 1955.9560; 2067.9480; 2082.9948; 2083.9616; 2089.9275; 2105.8970; 2324.0572

Valor de *score* de la siguiente proteína no-homóloga identificada: 52

- *Spot #61, Espectro de MALDI TOF MS*

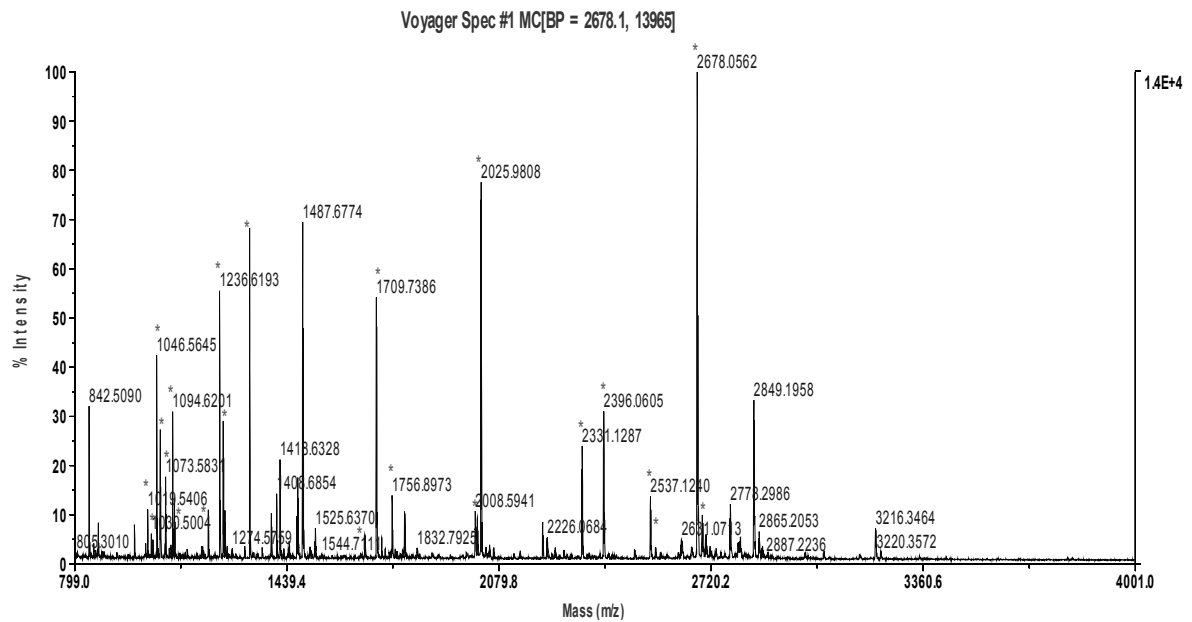


Lista de picos (las masas de los péptidos que se corresponden con los de la proteína identificada están subrayadas):

882.5628; 1051.7068; 1183.6150; 1276.6459; 1284.6436; 1325.6422; 1363.5837; 1489.7892; 1715.8976; 1737.8675; 1753.8623; 1840.9429; 1862.9471; 1873.8824; 1878.8930; 1889.8757; 1895.8807; 1911.8414; 2131.0170; 2147.0157; 2168.9664; 2221.1185; 2249.0496; 2276.0403; 2282.1139; 2292.0535; 2298.1819; 2490.2200; 2663.2215; 2677.2470; 2691.2746; 2720.2282; 2748.2949; 2858.3841; 3312.2859; 3337.6411; 3348.5544; 3352.5906

Valor de *score* de la siguiente proteína no-homóloga identificada: 52

- Spot #68, Espectro de MALDI TOF MS

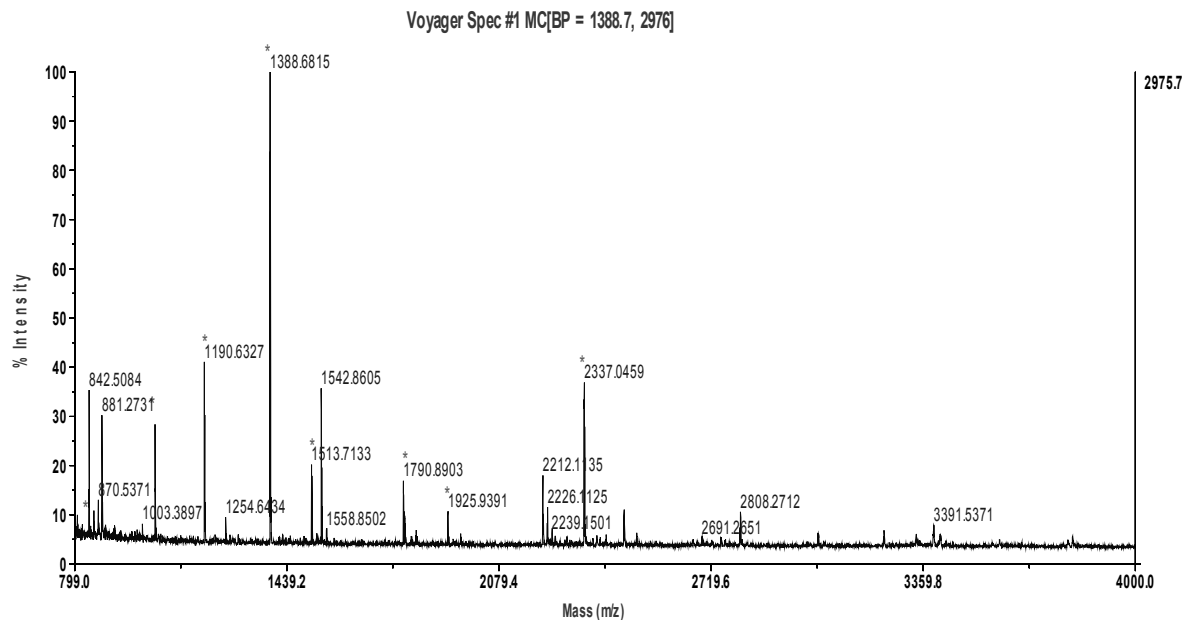


Lista de picos (las masas de los péptidos que se corresponden con los de la proteína identificada están subrayadas):

1019.5365; 1030.5000; 1035.5532; 1046.5635; 1057.5152; 1073.5877; 1094.6178; 1100.5465; 1202.6661; 1236.6217; 1247.7029; 1252.6353; 1326.8106; 1487.6785; 1525.6329; 1674.9063; 1709.7349; 1756.8990; 2007.6055; 2014.0180; 2024.9808; 2050.9773; 2062.9440; 2330.1217; 2395.0607; 2536.1192; 2552.1190; 2568.1704; 2677.0635; 2693.0822; 2703.0642; 2777.2191; 2848.1953; 2864.1067; 2873.2484

Valor de *score* de la siguiente proteína no-homóloga identificada: 42

- *Spot #76, Espectro de MALDI TOF MS*

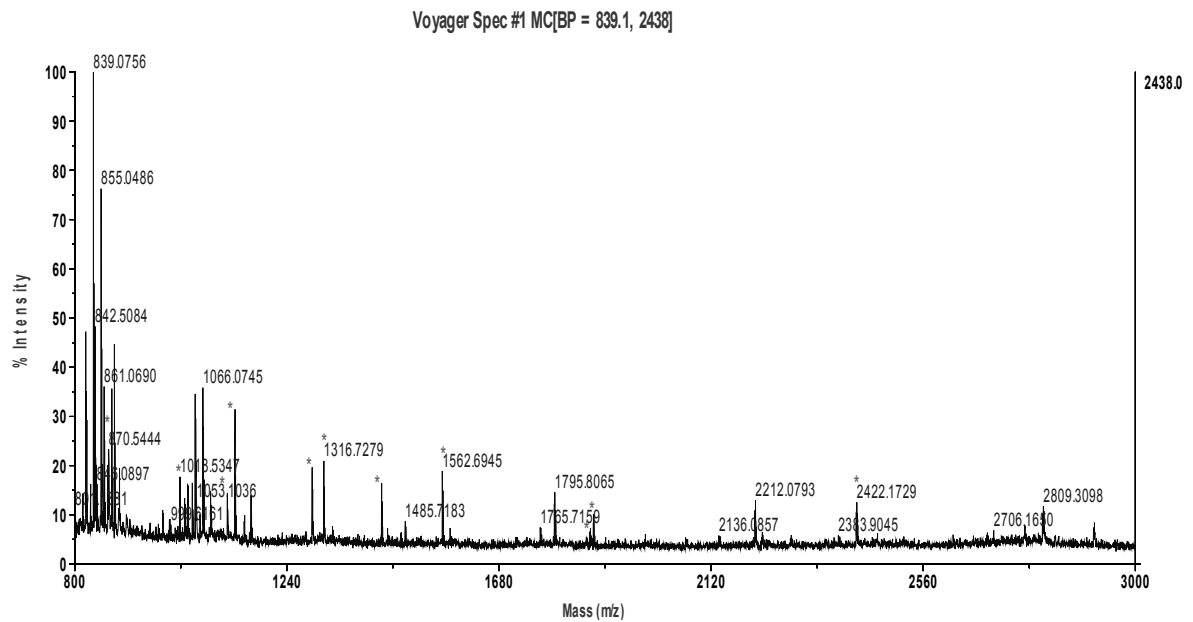


Lista de picos (las masas de los péptidos que se corresponden con los de la proteína identificada están subrayadas):

841.3832; 1041.5389; 1190.6356; 1388.6780; 1513.7187; 1542.8607; 1790.8890; 1924.9351; 1963.8905; 2336.0393; 2456.1836

Valor de *score* de la siguiente proteína no-homóloga identificada: 53

- Spot #78, Espectro de MALDI TOF MS

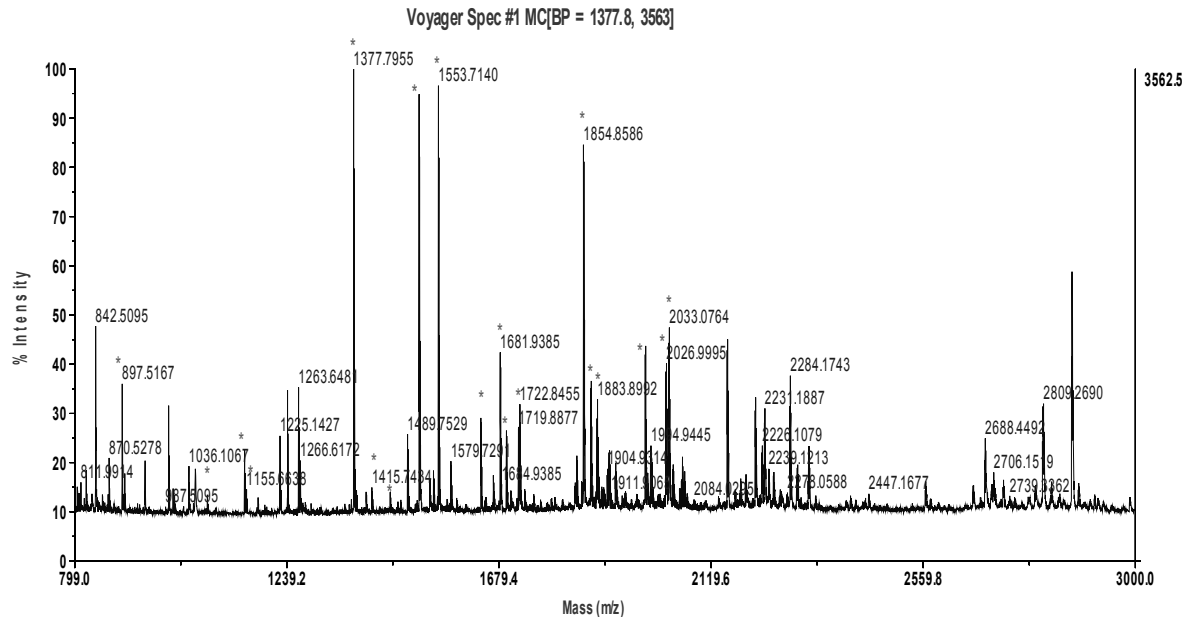


Lista de picos (las masas de los péptidos que se corresponden con los de la proteína identificada están subrayadas):

868.5418; 882.5608; 1018.5360; 1116.6205; 1132.5792; 1151.7299; 1165.7420; 1292.6249; 1316.7251; 1436.6796; 1562.7033; 1868.8519; 1875.8670; 2421.1632

Valor de *score* de la siguiente proteína no-homóloga identificada: 53

- Spot #81, Espectro de MALDI TOF MS

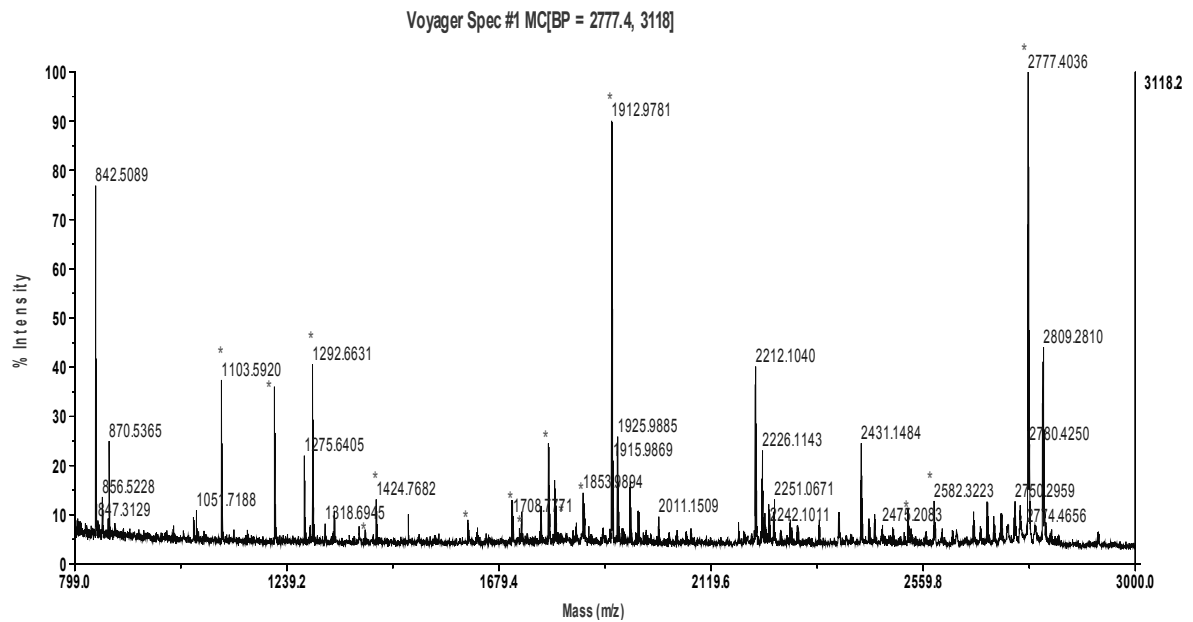


Lista de picos (las masas de los péptidos que se corresponden con los de la proteína identificada están subrayadas):

897.5113; 1074.5378; 1151.5639; 1155.6538; 1240.5880; 1263.6464; 1266.6131; 1377.8026;
1415.7319; 1453.7515; 1489.7446; 1513.7790; 1535.7244; 1543.8003; 1553.7078; 1641.8733;
 1667.8806; 1681.9303; 1694.8242; 1703.9040; 1722.8381; 1840.9382; 1854.8670; 1869.9190;
1882.8646; 1907.8710; 1921.8172; 1982.9390; 2026.0093; 2032.0774; 2040.0100; 2058.0570;
 2060.0724; 2064.0159; 2190.9845; 2687.4313; 2704.3681; 2867.4539

Valor de *score* de la siguiente proteína no-homóloga identificada: 52

- Spot #82, Espectro de MALDI TOF MS

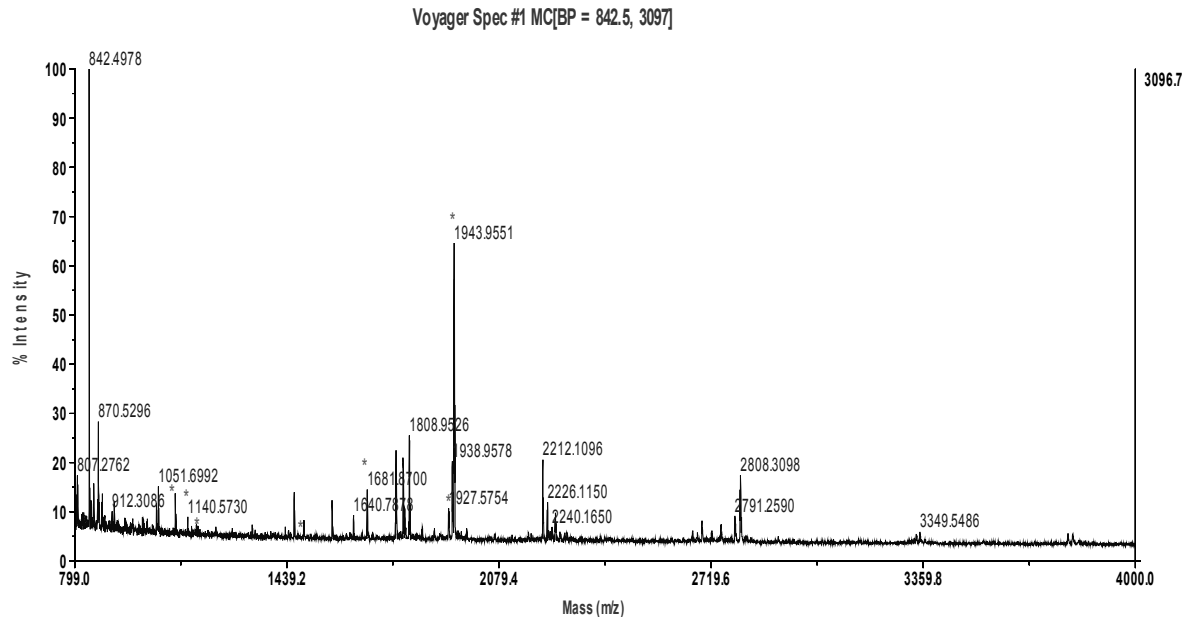


Lista de picos (las masas de los péptidos que se corresponden con los de la proteína identificada están subrayadas):

1103.5879; 1213.6950; 1275.6397; 1286.6114; 1292.6671; 1318.6893; 1337.7001; 1388.7481; 1401.7474; 1424.7769; 1491.2793; 1614.8670; 1705.7585; 1721.8211; 1781.8399; 1797.8367; 1853.9911; 1855.9615; 1912.9831; 1924.9719; 1934.8923; 1950.9460; 1967.9889; 2176.4816; 2225.1109; 2430.1580; 2446.1652; 2527.2158; 2581.2741; 2663.2696; 2691.2584; 2776.4157

Valor de *score* de la siguiente proteína no-homóloga identificada: 55

- *Spot #86, Espectro de MALDI TOF MS*

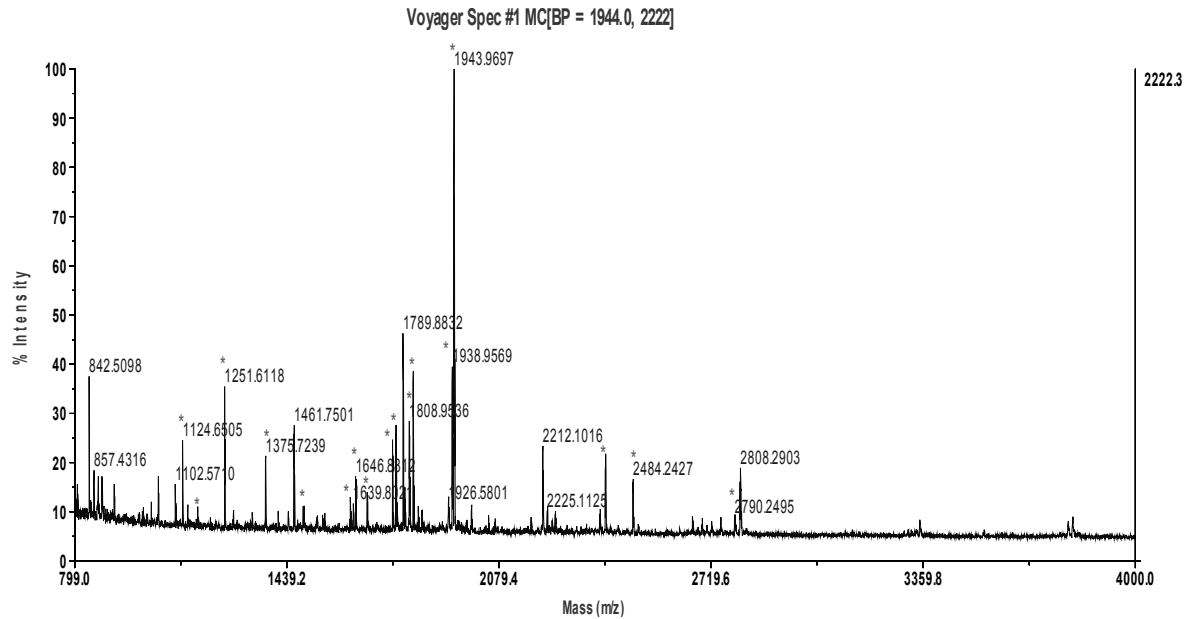


Lista de picos (las masas de los péptidos que se corresponden con los de la proteína identificada están subrayadas):

1051.7012; 1102.5529; 1140.5820; 1170.5922; 1373.7047; 1460.7521; 1489.8807; 1575.7779; 1639.7968; 1681.8733; 1768.8037; 1789.8864; 1808.9498; 1846.9217; 1926.5810; 1937.9660; 1942.9672; 1943.9607; 2790.2781

Valor de *score* de la siguiente proteína no-homóloga identificada: 57

- *Spot #87, Espectro de MALDI TOF MS*

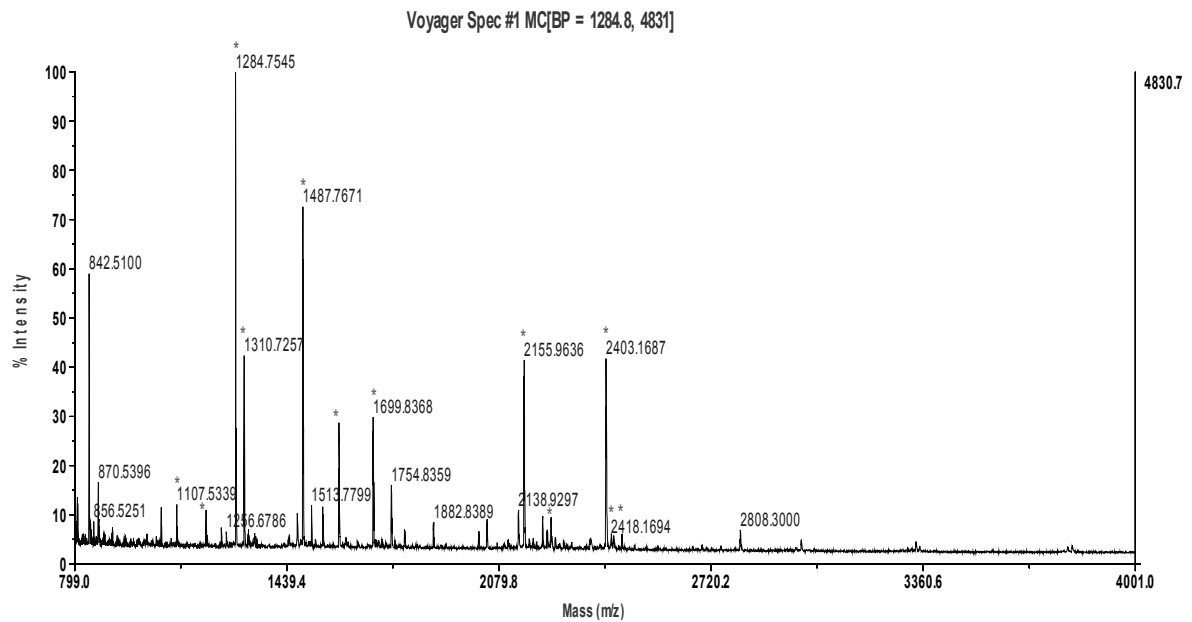


Lista de picos (las masas de los péptidos que se corresponden con los de la proteína identificada están subrayadas):

918.5225; 1051.7163; 1102.5664; 1124.6508; 1170.6073; 1251.6166; 1276.6380; 1374.7084; 1412.6678; 1443.7274; 1460.7608; 1488.8079; 1630.8773; 1639.8065; 1646.8773; 1681.8809; 1757.9889; 1768.7891; 1789.8767; 1808.9560; 1819.8739; 1937.9506; 1942.9775; 2400.3268; 2483.2404; 2790.2385

Valor de *score* de la siguiente proteína no-homóloga identificada: 51

- *Spot #89, Espectro de MALDI TOF MS*

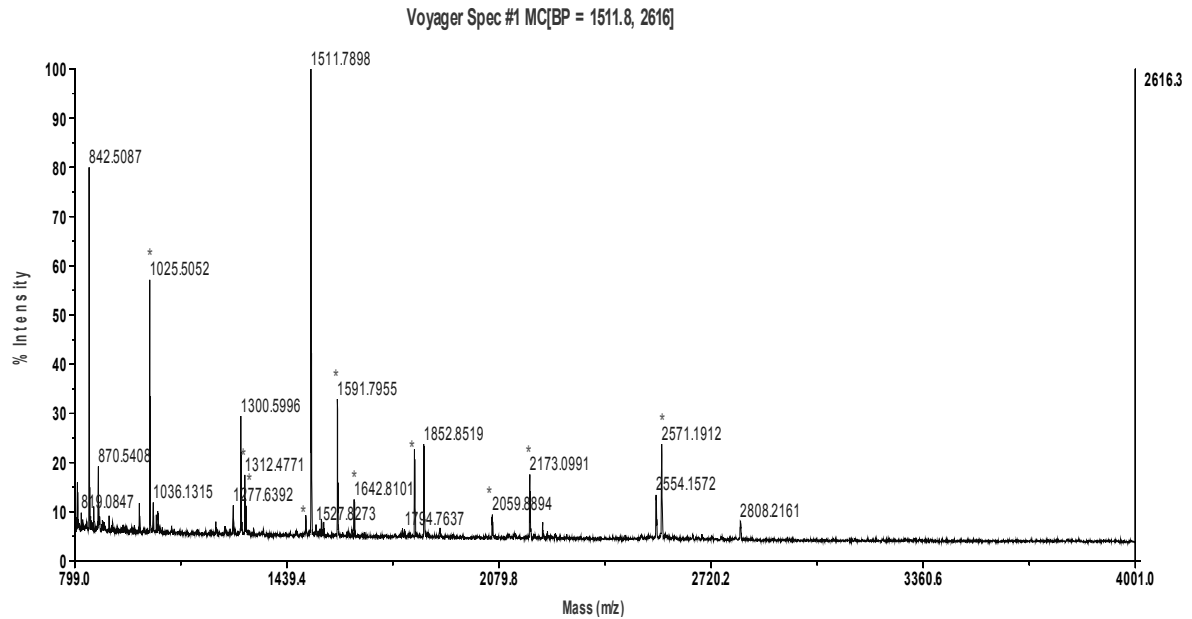


Lista de picos (las masas de los péptidos que se corresponden con los de la proteína identificada están subrayadas):

807.3024; 1107.5394; 1195.6252; 1241.7474; 1284.7562; 1310.7221; 1487.7742; 1513.7880; 1547.8185; 1595.8057; 1596.8094; 1699.8436; 1754.8351; 1881.8264; 2018.1583; 2043.0529; 2137.9370; 2154.9501; 2236.1617; 2402.1326; 2418.1129; 2425.1766; 2450.2937; 3337.7791

Valor de *score* de la siguiente proteína no-homóloga identificada: 55

- *Spot #91, Espectro de MALDI TOF MS*

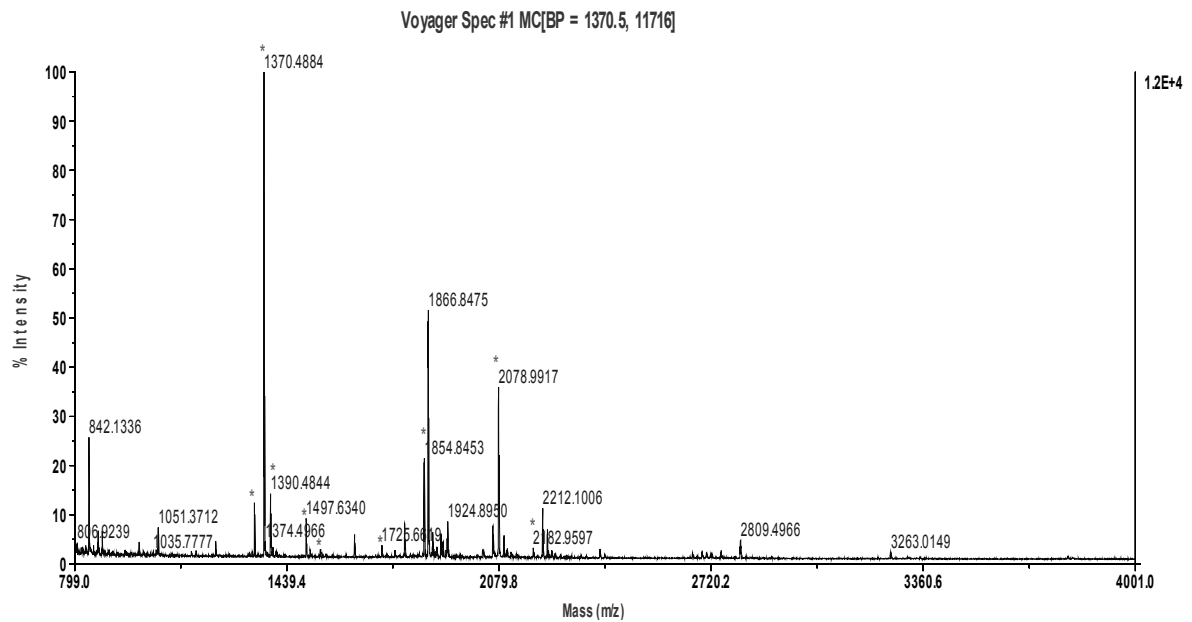


Lista de picos (las masas de los péptidos que se corresponden con los de la proteína identificada están subrayadas):

807.2892; 856.5291; 994.1461; 1025.5014; 1036.1251; 1312.4786; 1316.5937; 1496.7565;
 1511.7928; 1543.7600; 1549.7303; 1591.7894; 1642.8178; 1824.8321; 1852.8580; 1901.8622;
2058.8698; 2172.0785; 2553.1160; 2570.1414

Valor de *score* de la siguiente proteína no-homóloga identificada: 56

- *Spot #99, Espectro de MALDI TOF MS*

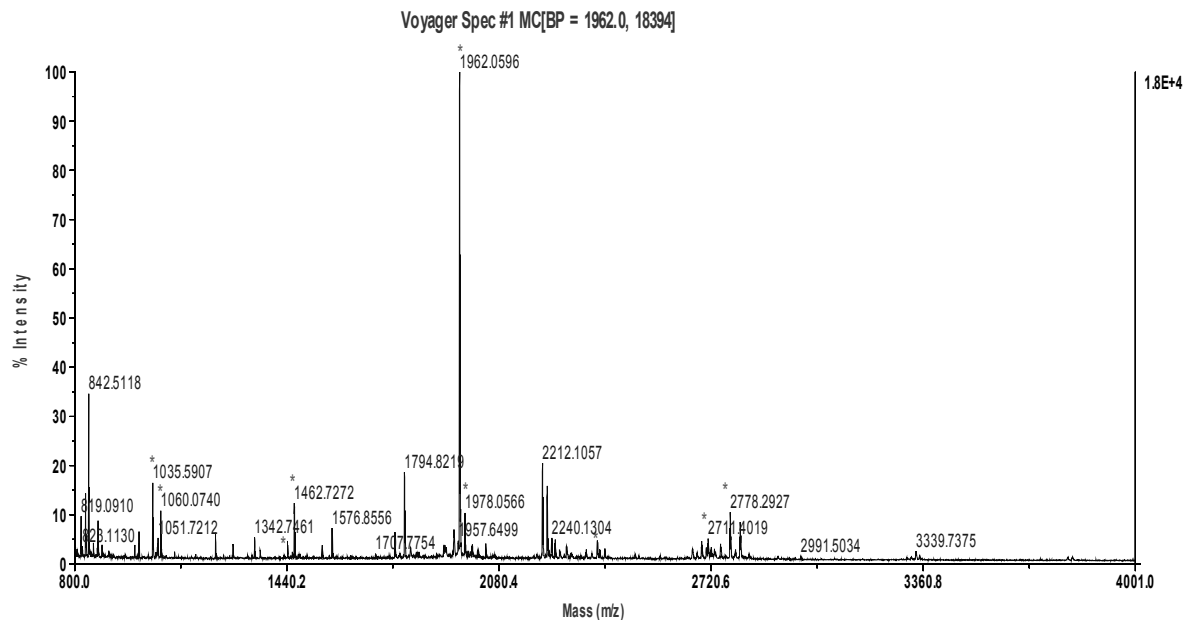


Lista de picos (las masas de los péptidos que se corresponden con los de la proteína identificada están subrayadas):

882.5643; 1051.6944; 1151.7066; 1165.7198; 1225.1242; 1341.7171; 1370.7190; 1390.7122; 1396.7399; 1497.8325; 1509.7173; 1540.7504; 1643.8502; 1725.7972; 1853.9392; 1865.9408; 1879.9392; 1887.9249; 1891.9065; 1903.8875; 1910.9616; 1919.8838; 1922.9680; 1924.9755; 2030.0340; 2061.0225; 2078.0362; 2094.0286; 2104.0304; 2115.9966; 2182.9591

Valor de *score* de la siguiente proteína no-homóloga identificada: 61

- *Spot #103, Espectro de MALDI TOF MS*

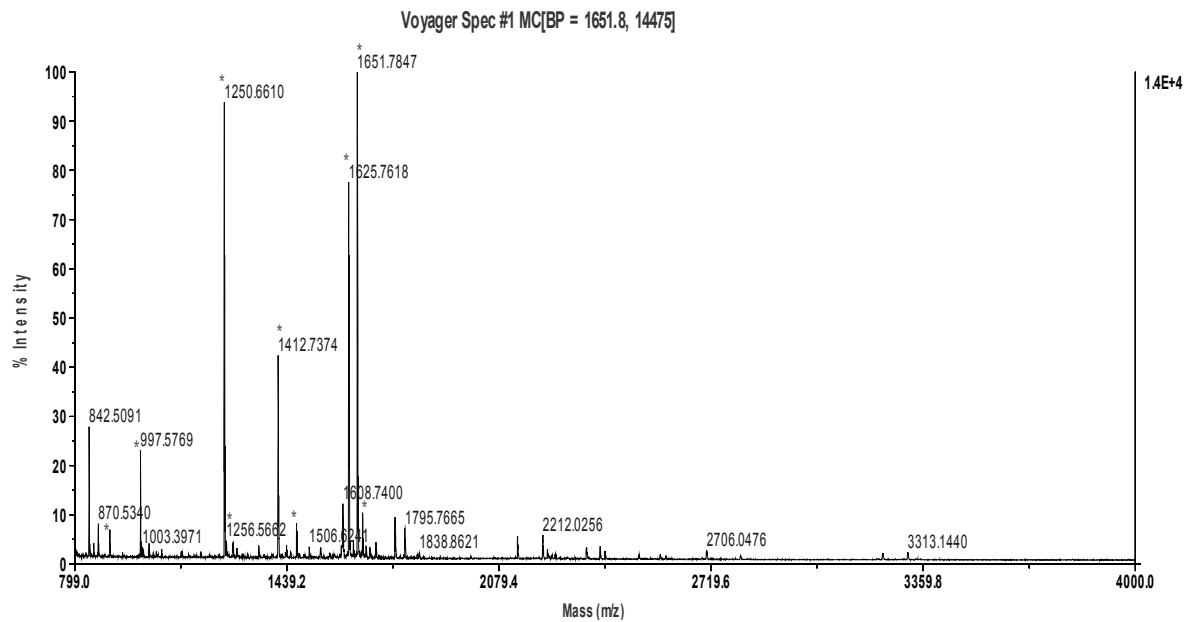


Lista de picos (las masas de los péptidos que se corresponden con los de la proteína identificada están subrayadas):

1035.5929; 1342.7462; 1359.6661; 1441.8077; 1456.7989; 1462.7300; 1546.8676; 1567.8010; 1576.8585; 1961.0526; 1977.0430; 2040.0146; 2376.2337; 2399.0214; 2691.2450; 2710.3653; 2717.0584; 2720.2346; 2748.2990; 2777.3037; 3337.6970

Valor de *score* de la siguiente proteína no-homóloga identificada: 78

- Spot #109, Espectro de MALDI TOF MS

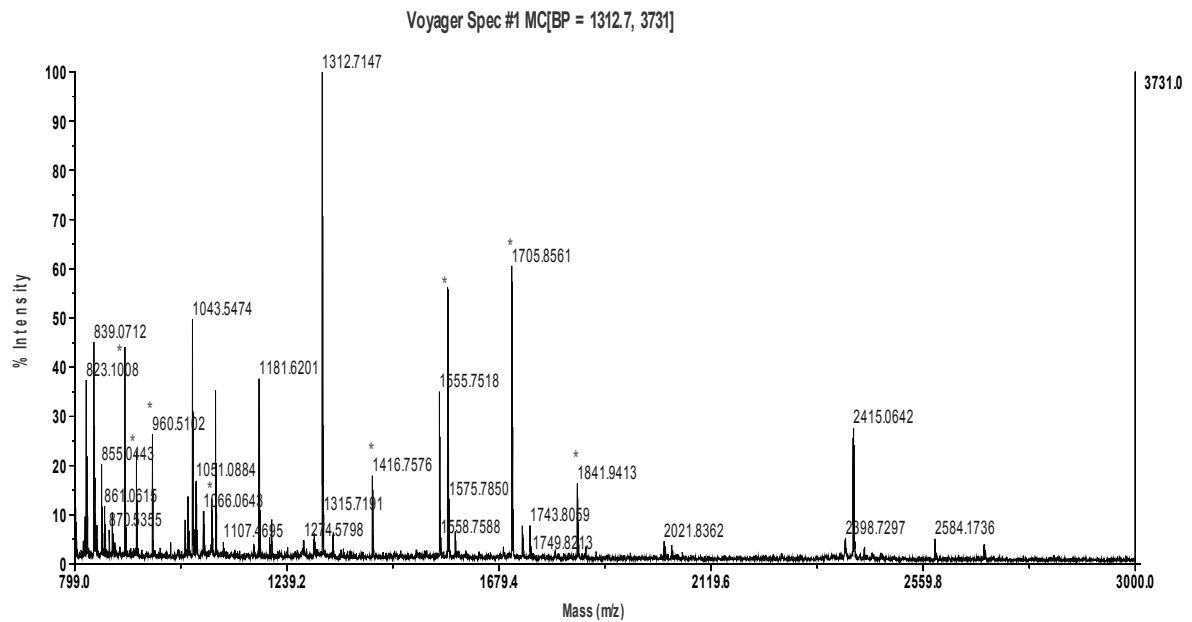


Lista de picos (las masas de los péptidos que se corresponden con los de la proteína identificada están subrayadas):

905.5419; 997.5797; 1003.3984; 1023.5967; 1250.6581; 1256.5635; 1276.6827; 1412.7694; 1468.6679; 1506.6170; 1540.7500; 1608.7426; 1625.7633; 1651.7838; 1667.7729; 2134.9198; 2342.8903; 2398.9237

Valor de *score* de la siguiente proteína no-homóloga identificada: 48

- *Spot #111, Espectro de MALDI TOF MS*

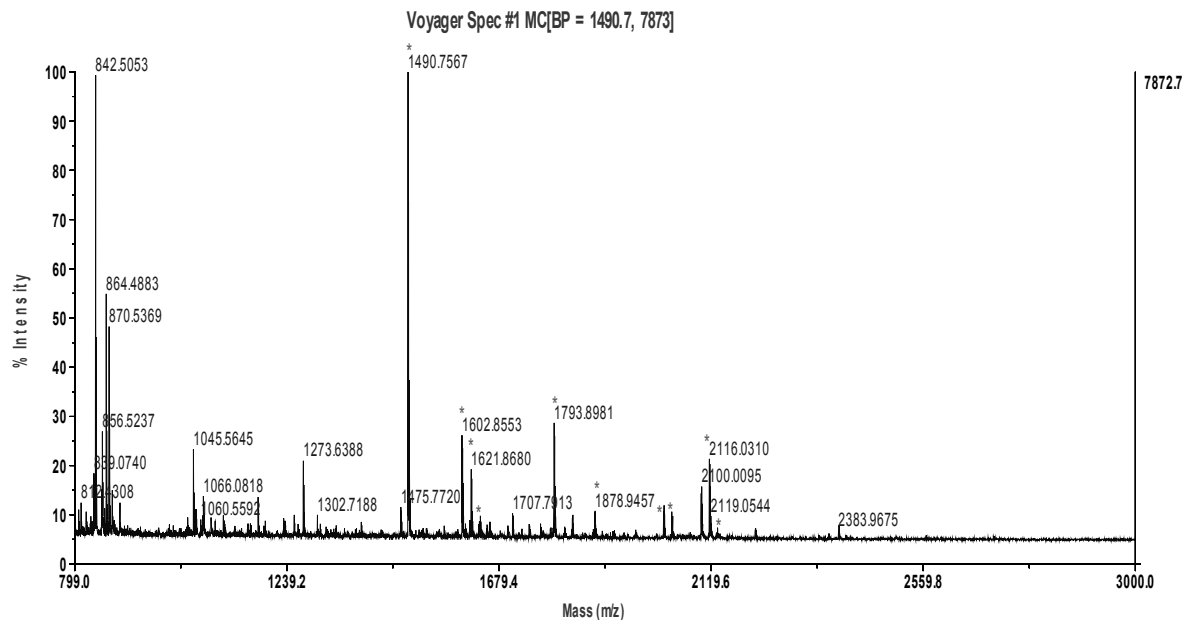


Lista de picos (las masas de los péptidos que se corresponden con los de la proteína identificada están subrayadas):

903.4726; 927.4658; 960.5078; 1028.0799; 1034.1183; 1043.5478; 1050.0909; 1066.0633; 1083.5638; 1181.6230; 1203.6026; 1208.0727; 1295.3238; 1296.2882; 1312.7114; 1334.7069; 1416.7628; 1555.7564; 1572.7770; 1588.7768; 1705.8586; 1727.8435; 1743.8146; 1841.9456; 1859.947100M; 1880.9041; 2021.8375; 2037.8595; 2397.6095; 2414.0704; 2584.1806; 2685.1721

Valor de *score* de la siguiente proteína no-homóloga identificada: 60

- *Spot #113, Espectro de MALDI TOF MS*

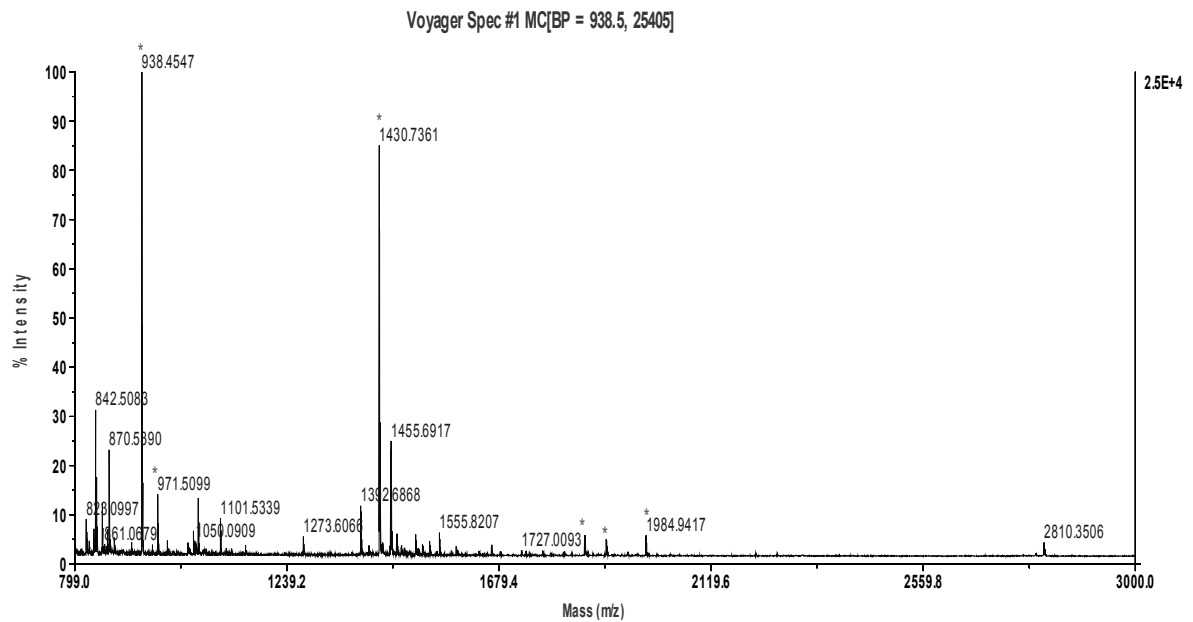


Lista de picos (las masas de los péptidos que se corresponden con los de la proteína identificada están subrayadas):

864.4899; 1107.5339; 1490.7278; 1602.8297; 1621.8306; 1637.8347; 1659.7969; 1793.8662; 1815.8308; 1831.8271; 1874.0865; 1877.9081; 2021.0019; 2038.0330; 2098.9434; 2115.9567; 2131.9588

Valor de *score* de la siguiente proteína no-homóloga identificada: 57

- *Spot #114, Espectro de MALDI TOF MS*

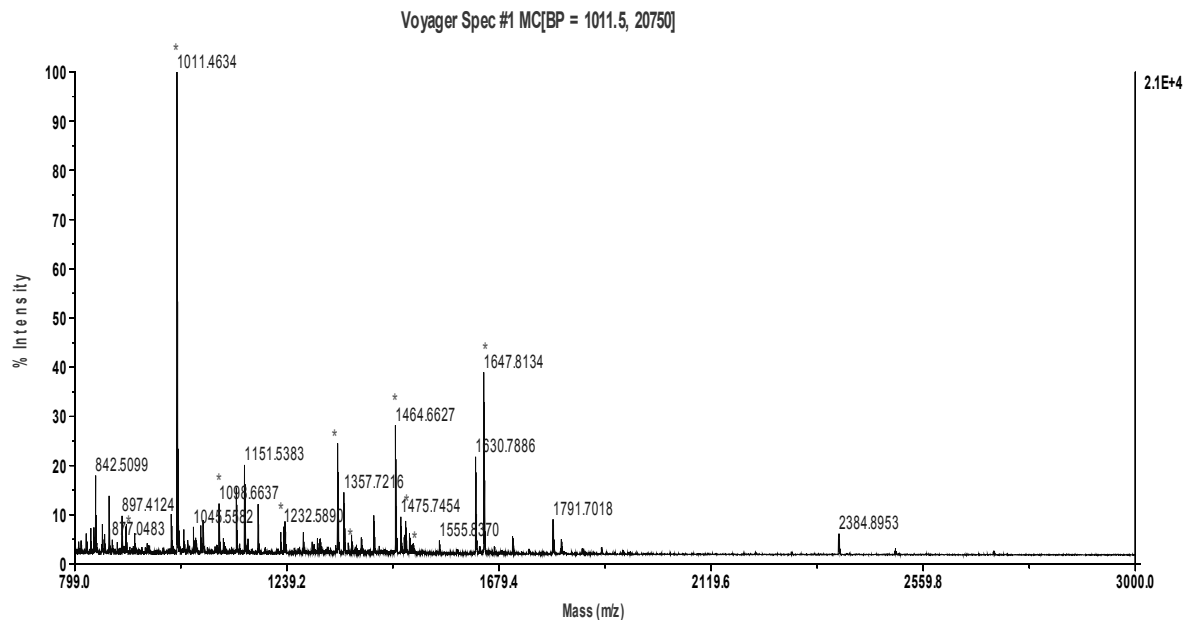


Lista de picos (las masas de los péptidos que se corresponden con los de la proteína identificada están subrayadas):

938.4574; 971.5064; 1055.5601; 1101.5397; 1153.6779; 1392.6925; 1430.7381; 1454.6895; 1466.6978; 1506.6935; 1535.6999; 1555.8125; 1590.8143; 1663.7847; 1856.9307; 1901.9504; 1983.9444; 2809.3559

Valor de *score* de la siguiente proteína no-homóloga identificada: 66

- Spot #115, Espectro de MALDI TOF MS

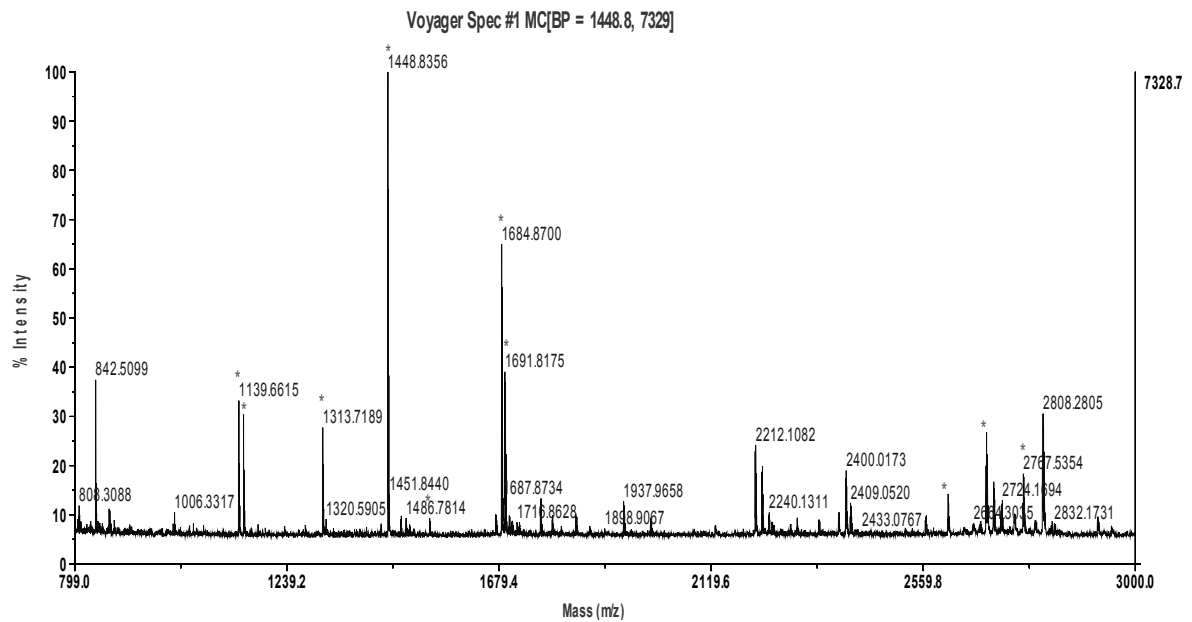


Lista de picos (las masas de los péptidos que se corresponden con los de la proteína identificada están subrayadas):

897.4139; 905.4634; 923.5098; 999.4813; 1011.4650; 1025.4747; 1065.5044; 1098.6596;
 1107.5357; 1134.5044; 1140.5641; 1151.5368; 1157.5766; 1193.6055; 1226.7588; 1232.5871;
 1235.5182; 1273.6285; 1344.6682; 1366.6467; 1373.7102; 1382.6415; 1430.7686; 1464.6665;
 1482.7500; 1485.8075; 1498.7254; 1501.7964; 1555.8445; 1630.7856; 1647.8103; 1807.7971;
 1808.8126; 1891.9198; 1936.8823

Valor de *score* de la siguiente proteína no-homóloga identificada: 47

- *Spot #121, Espectro de MALDI TOF MS*



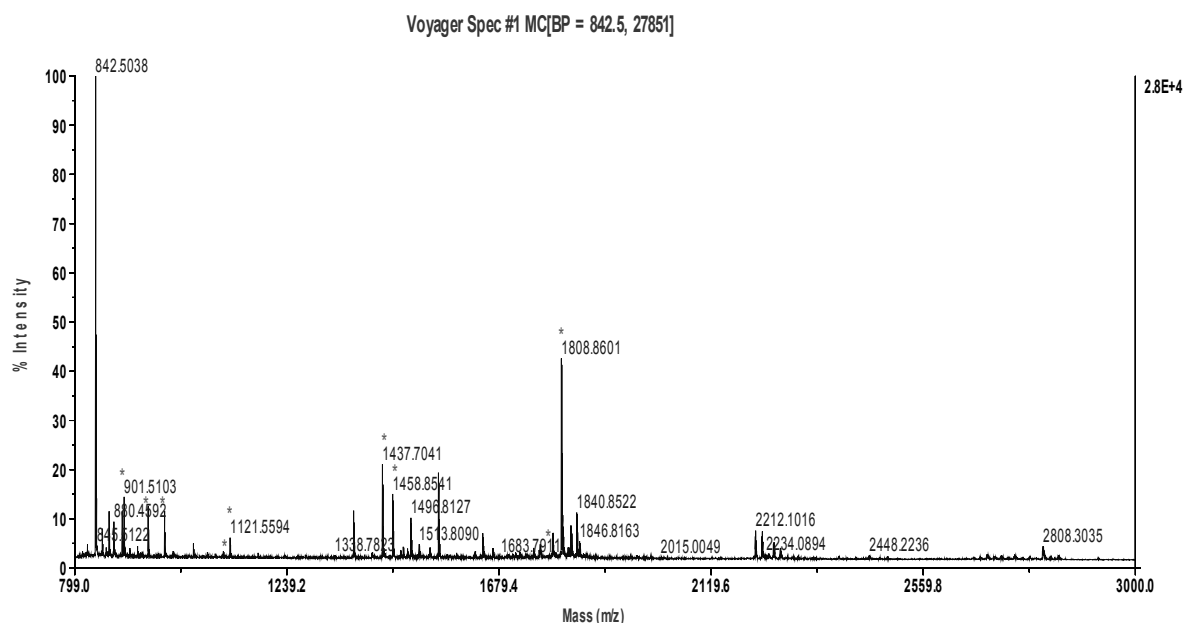
Lista de picos (las masas de los péptidos que se corresponden con los de la proteína identificada están subrayadas):

1006.3313; 1139.6646; 1149.6365; 1313.7261; 1320.5816; 1448.8335; 1486.7882; 1535.7236; 1672.7905; 1684.8672; 1691.8267; 1789.8776; 1838.9513; 1937.9760; 2298.1912; 2342.9537; 2399.0190; 2408.0385; 2564.1658; 2610.4561; 2690.1502; 2721.2392; 2766.5420; 2921.2862

Valor de *score* de la siguiente proteína no-homóloga identificada: 51

B.2 PROTEÍNAS IDENTIFICADAS POR MALDI TOF MS PRESENTES EN LA TABLA 5 (página 108).

- *Spot #11, Espectro de MALDI TOF MS*

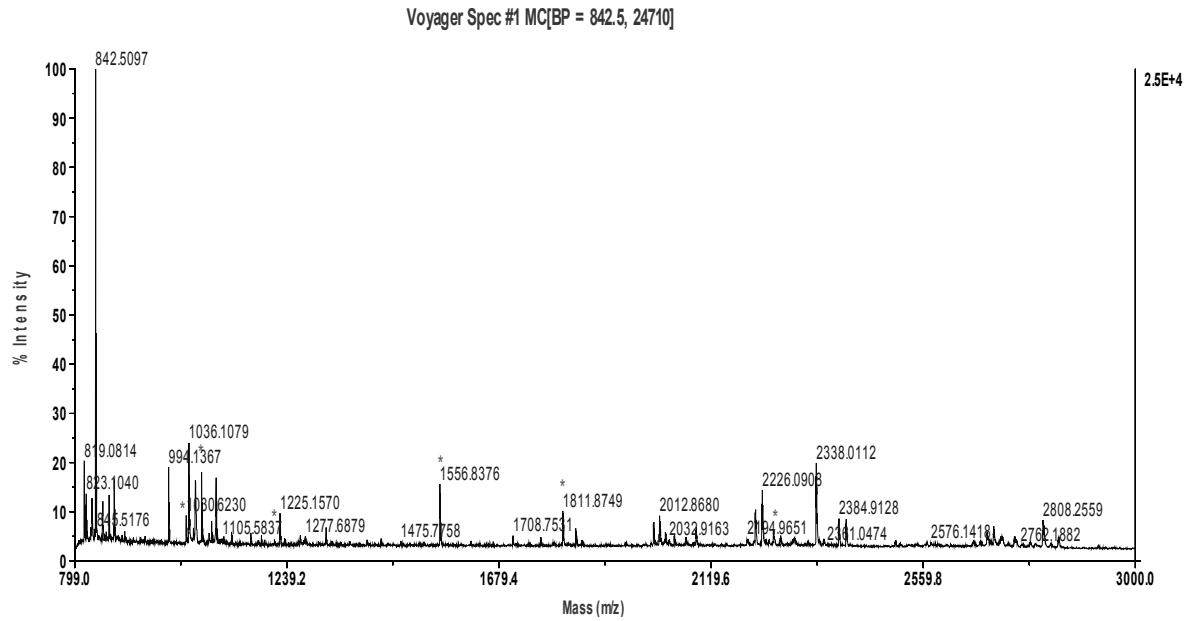


Lista de picos (las masas de los péptidos que se corresponden con los de la proteína identificada están subrayadas):

864.4983; 897.5183; 901.5160; 913.5072; 929.5123; 951.5270; 985.4445; 1074.5463; 1107.6338; 1121.5593; 1377.8118; 1415.7619; 1437.7111; 1458.8487; 1480.8400; 1489.7722; 1496.8054; 1513.8080; 1535.7531; 1553.7387; 1591.6991; 1629.8181; 1641.9031; 1645.8092; 1722.8411; 1733.8137; 1751.8272; 1764.8714; 1790.8778; 1808.8622; 1822.8518; 1828.8370; 1840.8501; 1846.8107; 1964.9512; 2329.1516; 2447.2047; 2838.4731

Valor de *score* de la siguiente proteína no-homóloga identificada: 57

- *Spot #14, Espectro de MALDI TOF MS*

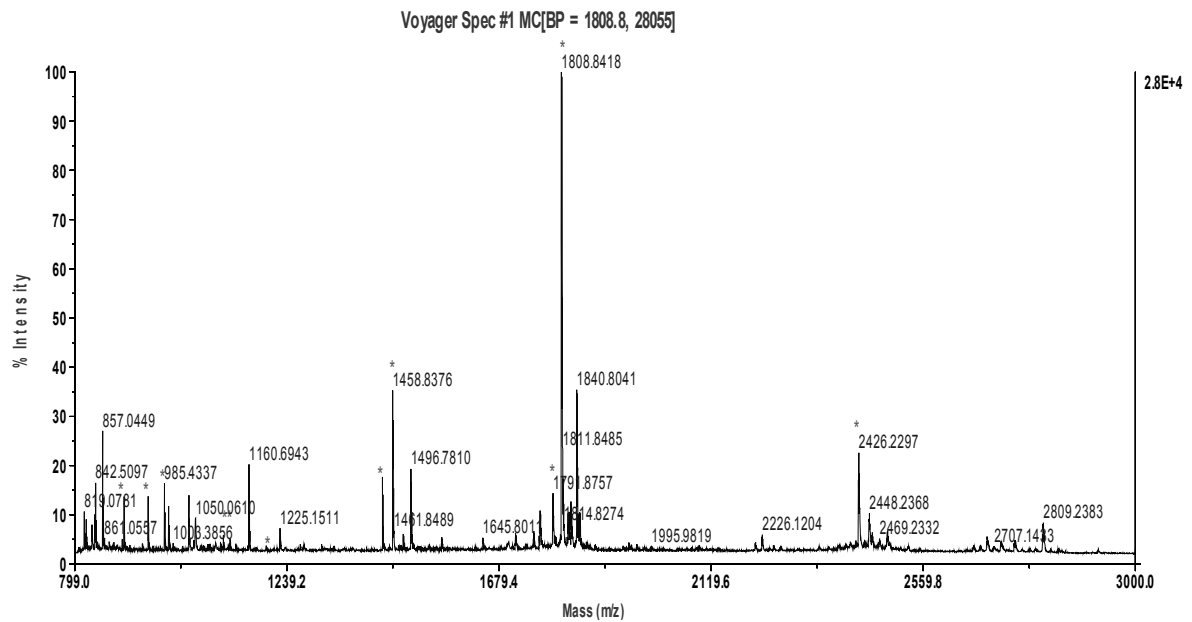


Lista de picos (las masas de los péptidos que se corresponden con los de la proteína identificada están subrayadas):

1030.6158; 1062.5797; 1124.5282; 1186.6299; 1213.6812; 1332.5627; 1369.6591; 1556.8374; 1811.8315; 2024.8322; 2088.0860; 2336.9640

Valor de *score* de la siguiente proteína no-homóloga identificada: 53

- *Spot #21, Espectro de MALDI TOF MS*

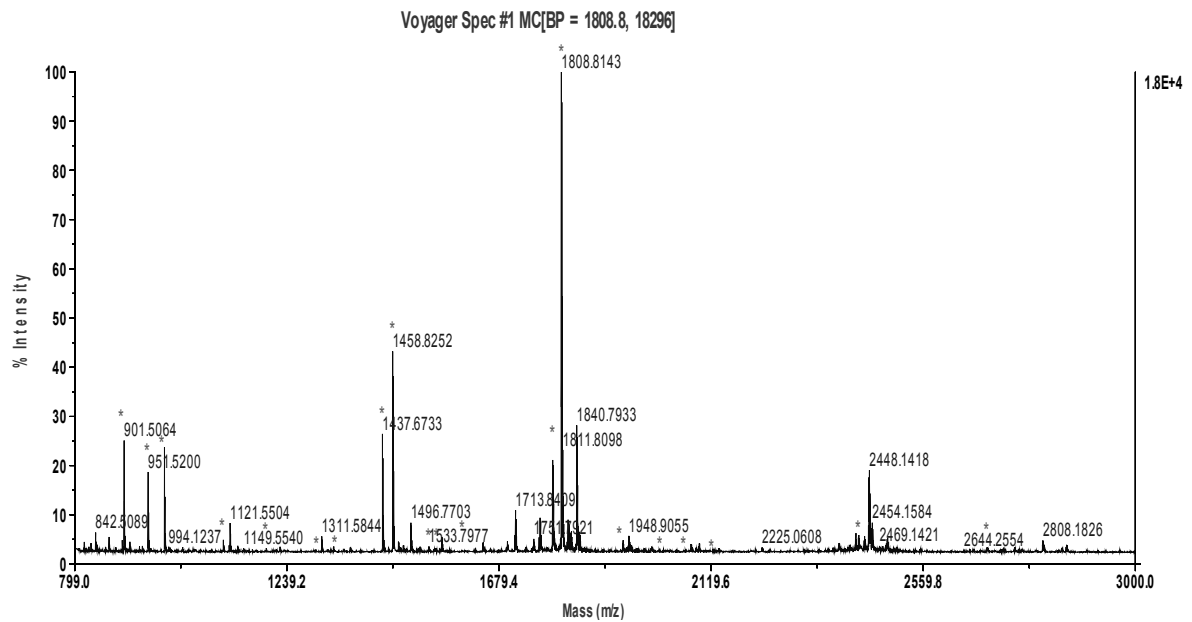


Lista de picos (las masas de los péptidos que se corresponden con los de la proteína identificada están subrayadas):

897.6099; 901.5069; 939.4688; 951.5172; 961.4969; 985.4321; 1075.6479; 1101.6363; 1107.6155; 1121.5604; 1133.6842; 1160.6894; 1196.5550; 1311.5666; 1437.6770; 1458.8099; 1480.8019; 1560.7624; 1645.7665; 1764.8183; 1790.8268; 1808.8082; 1822.7948; 1828.7586; 1840.7676; 1846.7560; 1948.8891; 1964.9198; 2425.1795; 2437.1504; 2446.1377; 2453.1427; 2468.1359; 2484.1277

Valor de *score* de la siguiente proteína no-homóloga identificada: 54

- Spot #22, Espectro de MALDI TOF MS

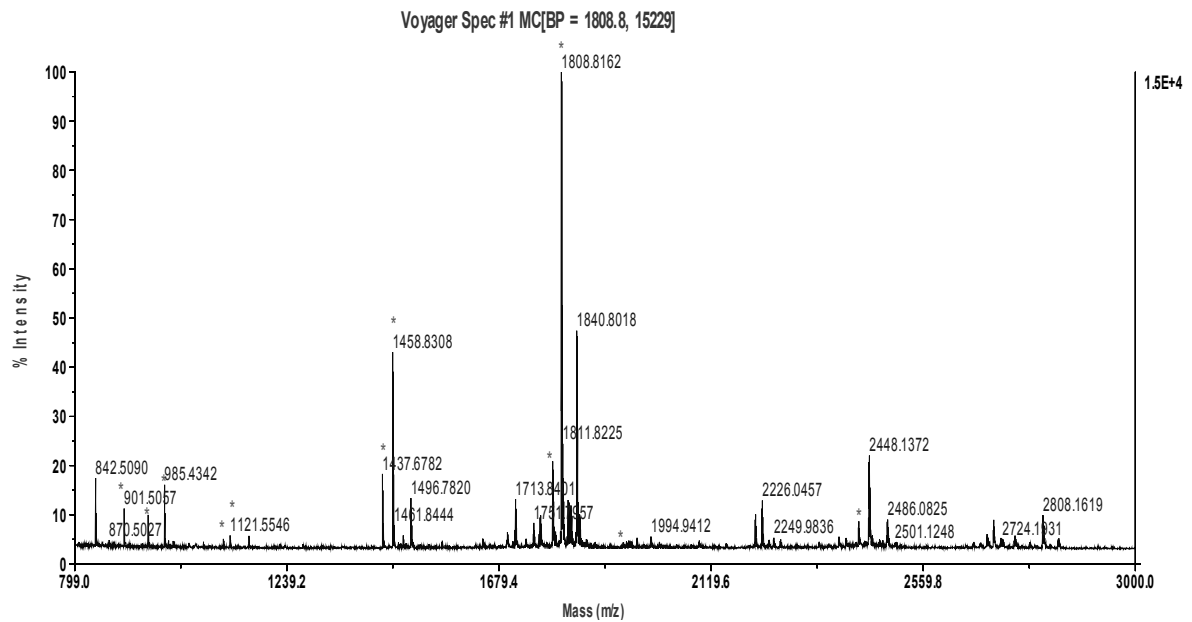


Lista de picos (las masas de los péptidos que se corresponden con los de la proteína identificada están subrayadas):

845.4030; 863.4514; 871.4457; 884.4940; 901.5113; 913.5038; 933.5132; 939.4553;
951.5221; 985.4374; 997.4320; 1023.3830; 1070.5942; 1107.6202; 1119.6027; 1133.6003;
 1137.5414; 1149.5635; 1160.6962; 1167.6938; 1196.5628; 1211.6781; 1217.6584; 1299.5919;
 1311.5761; 1324.6555; 1329.7384; 1336.6294; 1362.6268; 1370.7150; 1414.8341; 1437.6815;
1458.8209; 1470.8276; 1480.7852; 1486.8154; 1496.7711; 1512.7391; 1515.8268; 1533.7956;
 1543.7730; 1548.7741; 1555.7788; 1560.7693; 1576.7768; 1607.8273; 1629.8086; 1645.7744;
 1661.7910; 1679.7900; 1751.7855; 1762.8158; 1764.8263; 1790.8335; 1808.8166; 1822.8025;
 1828.7661; 1840.7993; 1846.7637; 1878.7811; 1894.7915; 1936.9001; 1943.8331; 1948.8977;
 1953.8782; 1964.8972; 1979.8669; 1994.9870; 2011.8813; 2019.9546; 2031.9587; 2047.9857;
2066.0358; 2078.0468; 2094.0377; 2123.0200; 2134.9754; 2225.0663; 2240.0579; 2311.0317;
 2342.0340; 2356.0517; 2362.0644; 2372.0442; 2407.1377; 2419.1290; 2425.1852; 2437.1576;
 2446.1452; 2452.1338; 2474.1243; 2484.1347; 2691.1558

Valor de *score* de la siguiente proteína no-homóloga identificada: 66

- Spot #23, Espectro de MALDI TOF MS

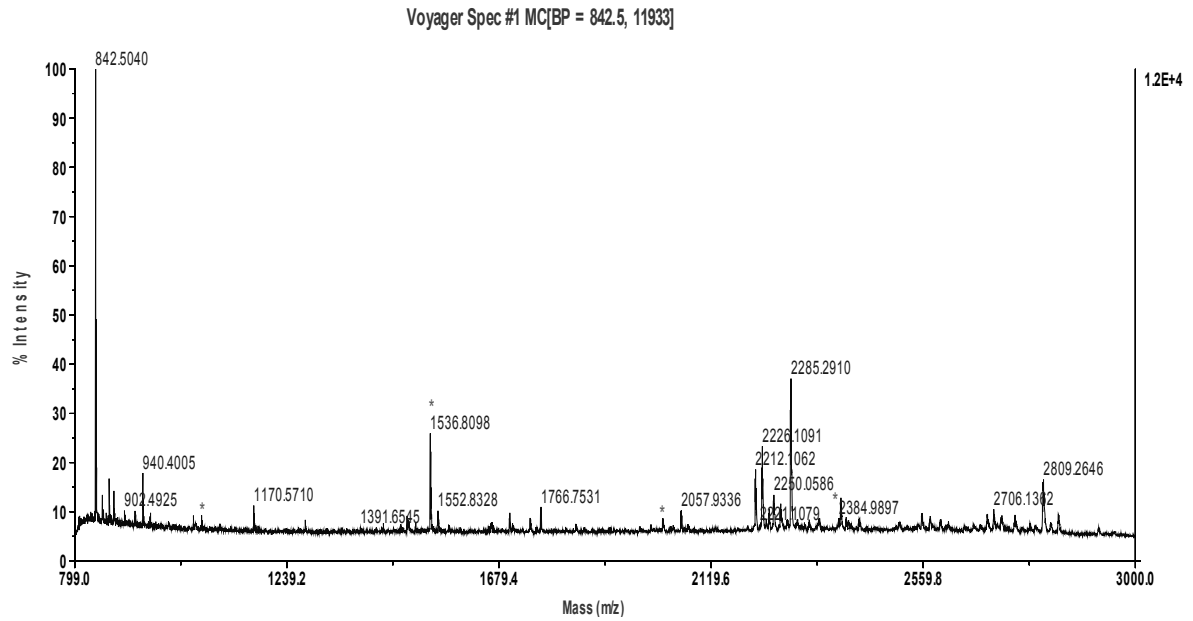


Lista de picos (las masas de los péptidos que se corresponden con los de la proteína identificada están subrayadas):

901.4994; 951.5255; 985.4413; 1107.6252; 1121.5513; 1160.7013; 1272.6225; 1437.6715; 1458.8264; 1480.8147; 1486.8213; 1560.7775; 1645.7815; 1696.8218; 1734.7762; 1750.8152; 1764.8347; 1790.8399; 1808.8224; 1822.8105; 1828.7969; 1840.8070; 1846.7702; 1860.7826; 1936.8789; 1943.8972; 1948.9038; 1964.9330; 1994.9349; 2094.0461; 2149.9883; 2362.1057; 2425.1649; 2446.1525; 2468.1174; 2474.1663; 2484.1073; 2677.1371

Valor de *score* de la siguiente proteína no-homóloga identificada: 51

- *Spot #26, Espectro de MALDI TOF MS*

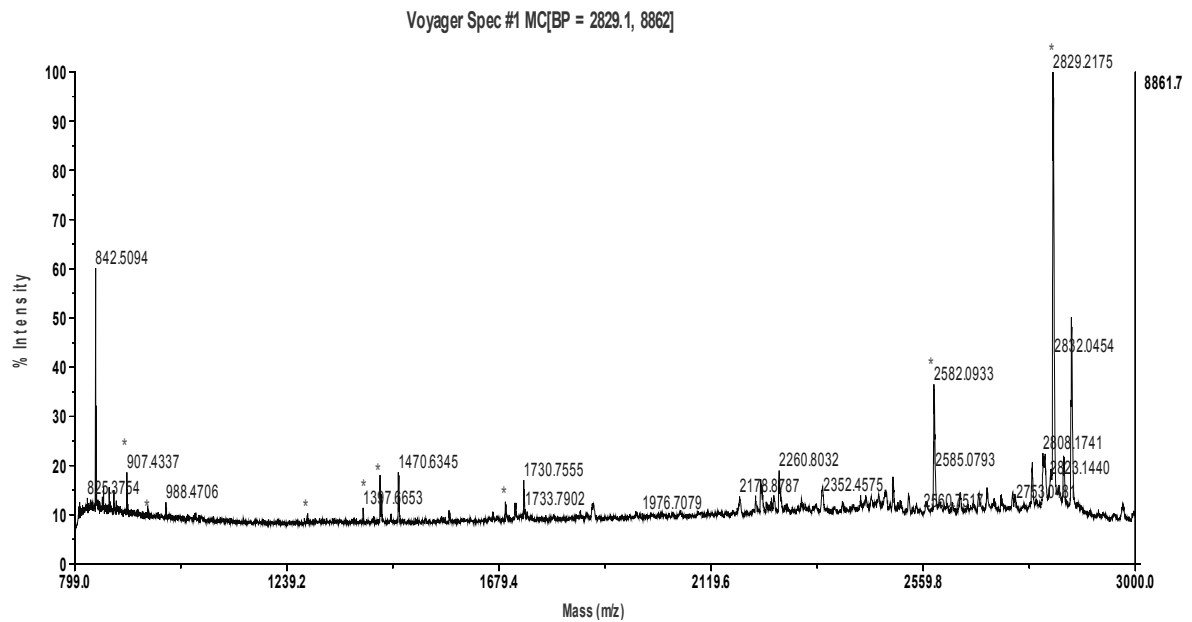


Lista de picos (las masas de los péptidos que se corresponden con los de la proteína identificada están subrayadas):

880.4521; 1062.5160; 1488.7848; 1536.7889; 1574.7343; 1743.9470; 2018.9766; 2387.9702

Valor de *score* de la siguiente proteína no-homóloga identificada: 50

- Spot #30, Espectro de MALDI TOF MS

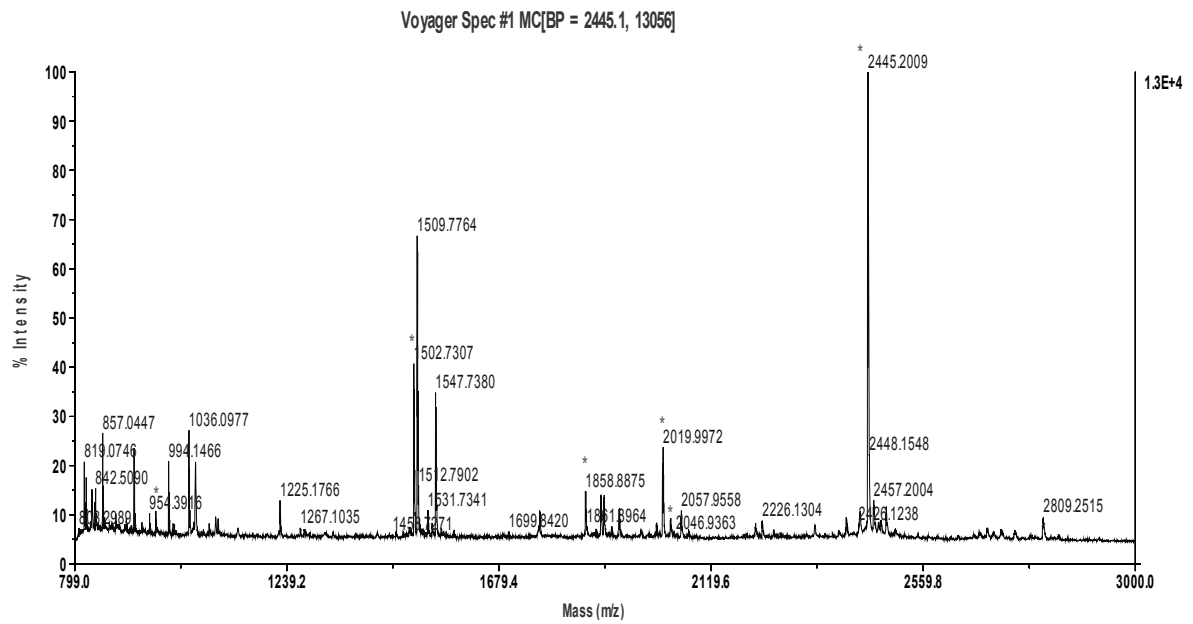


Lista de picos (las masas de los péptidos que se corresponden con los de la proteína identificada están subrayadas):

880.4664; 907.4279; 950.5029; 988.4604; 1281.5218; 1397.6378; 1419.6311; 1432.6438; 1435.5959; 1470.6003; 1575.6440; 1666.7050; 1692.7658; 1712.7427; 1714.7244; 1730.7279; 1737.7062; 2221.8385; 2233.9103; 2244.8155; 2259.7729; 2495.9644; 2511.9104; 2528.9702; 2581.0909; 2828.3139; 2849.9918; 2866.1492

Valor de *score* de la siguiente proteína no-homóloga identificada: 43

- *Spot #35, Espectro de MALDI TOF MS*

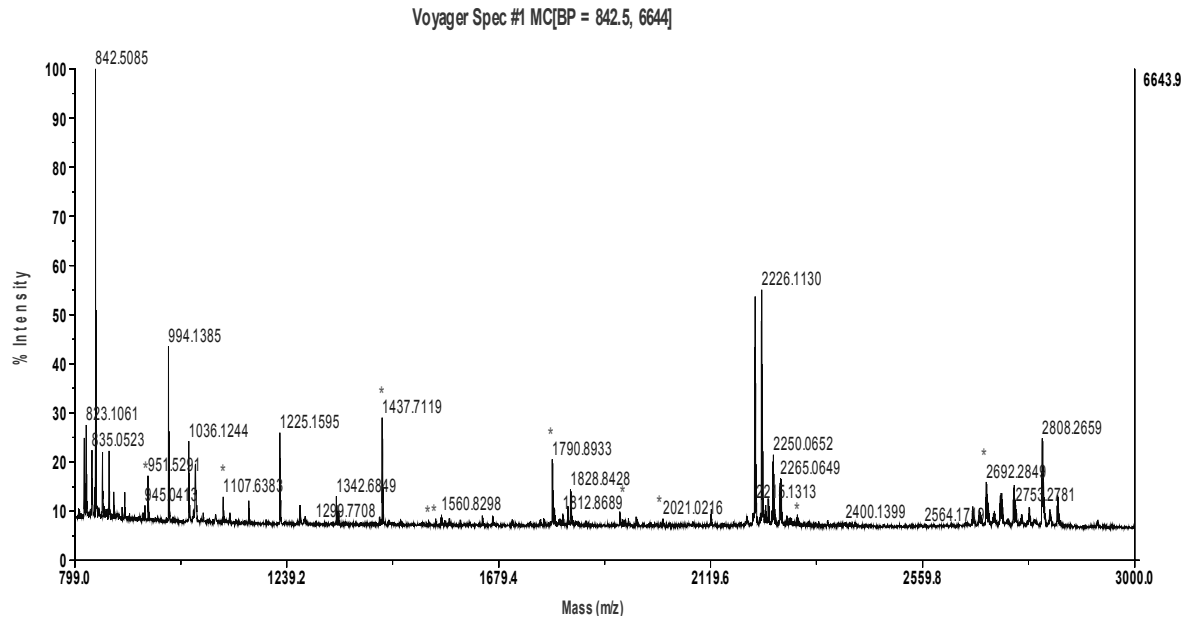


Lista de picos (las masas de los péptidos que se corresponden con los de la proteína identificada están subrayadas):

967.5609; 1502.7151; 1509.7468; 1858.8214; 1928.7478; 2005.8692; 2018.9356; 2034.9435; 2056.8732; 2071.9094; 2248.9964; 2444.1178; 2456.1325; 2472.0869; 2482.0909

Valor de *score* de la siguiente proteína no-homóloga identificada: 53

- *Spot #50, Espectro de MALDI TOF MS*



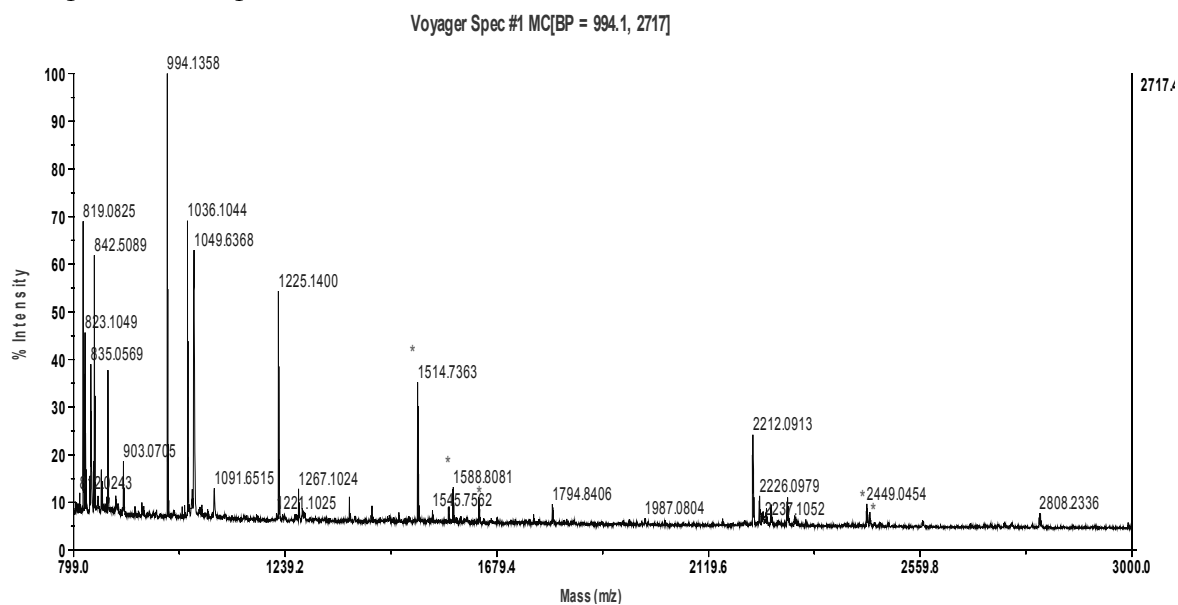
Lista de picos (las masas de los péptidos que se corresponden con los de la proteína identificada están subrayadas):

823.1029; 870.5375; 880.4717; 897.6187; 951.5291; 1107.6427; 1160.7220; 1267.1250; 1342.6822; 1346.7428; 1431.7876; 1437.7171; 1533.8374; 1548.8171; 1559.8706; 1567.7674; 1599.8248; 1645.7999; 1666.8129; 1707.7943; 1765.7581; 1772.8911; 1790.9005; 1812.8772; 1822.8780; 1828.8392; 1930.9720; 1936.9875; 1948.9841; 1964.9574; 2020.0210; 2120.1051; 2239.1426; 2299.1463; 2362.1679; 2663.2399; 2677.2334; 2691.2620; 2707.2502; 2720.2516; 2748.2855; 2780.2515; 2807.2526; 2822.2705; 2839.2611

Valor de *score* de la siguiente proteína no-homóloga identificada: 56

B.3. PROTEÍNAS IDENTIFICADAS POR MALDI TOF MS PRESENTES EN LA TABLA 6 (página 114).

- *Spot #1135, Espectro de MALDI TOF MS*

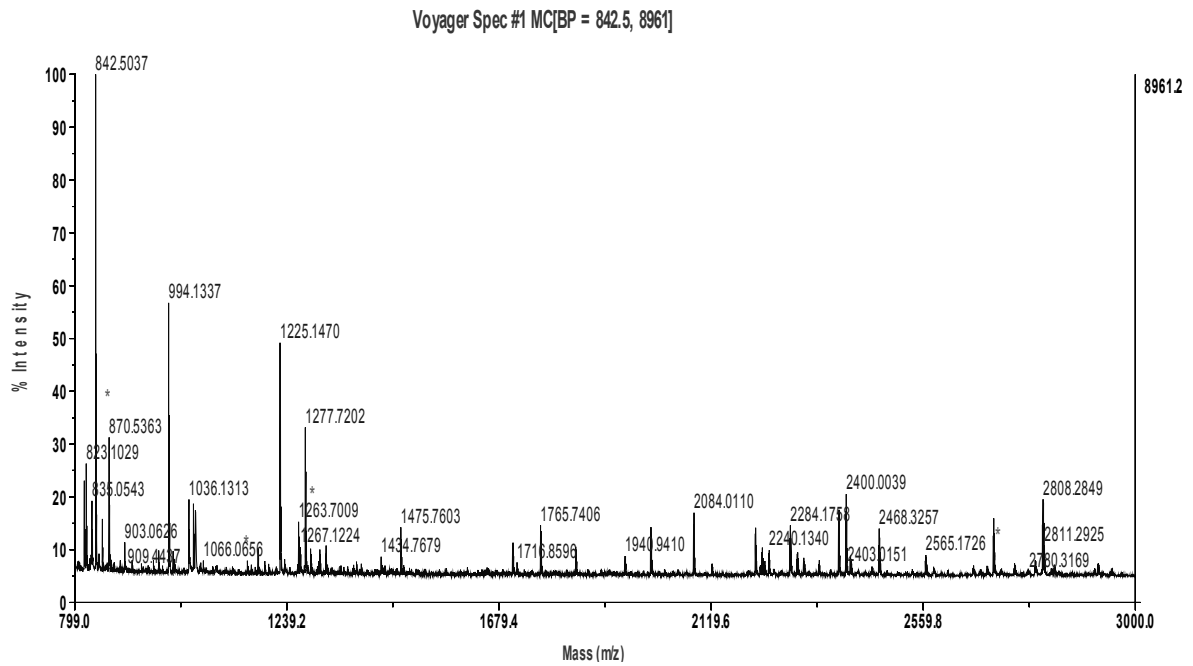


Lista de picos (las masas de los péptidos que se corresponden con los de la proteína identificada están subrayadas):

819.0870; 823.1055; 870.5400; 903.0762; 994.1380; 1036.1011; 1225.1395; 1267.1131; 1372.9563; 1514.7288; 1578.7591; 1587.8173; 1641.7867; 1794.8116; 2248.9807; 2448.0303; 2454.1241; 2807.2176

Valor de *score* de la siguiente proteína no-homóloga identificada: 47

- *Spot #1538, Espectro de MALDI TOF MS*

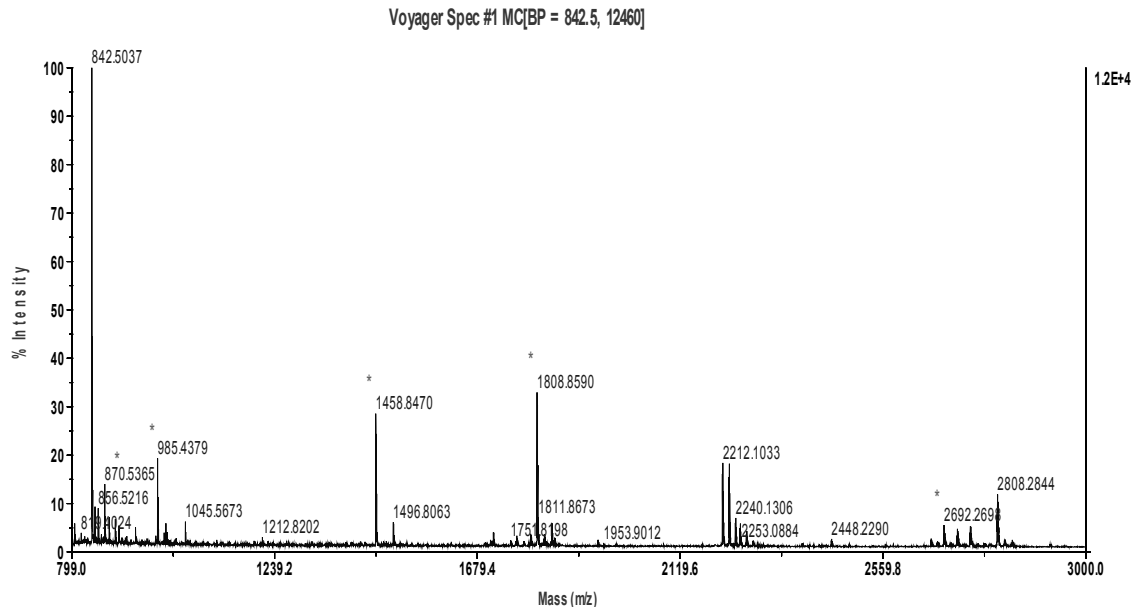


Lista de picos (las masas de los péptidos que se corresponden con los de la proteína identificada están subrayadas):

870.5433; 1157.5976; 1193.6295; 1288.6712; 1320.6024; 1434.7663; 1838.9191; 1940.9312; 2239.1243; 2564.1892; 2720.2364; 2831.1534

Valor de *score* de la siguiente proteína no-homóloga identificada: 36

- *Spot #1384; Espectro de MALDI TOF MS*

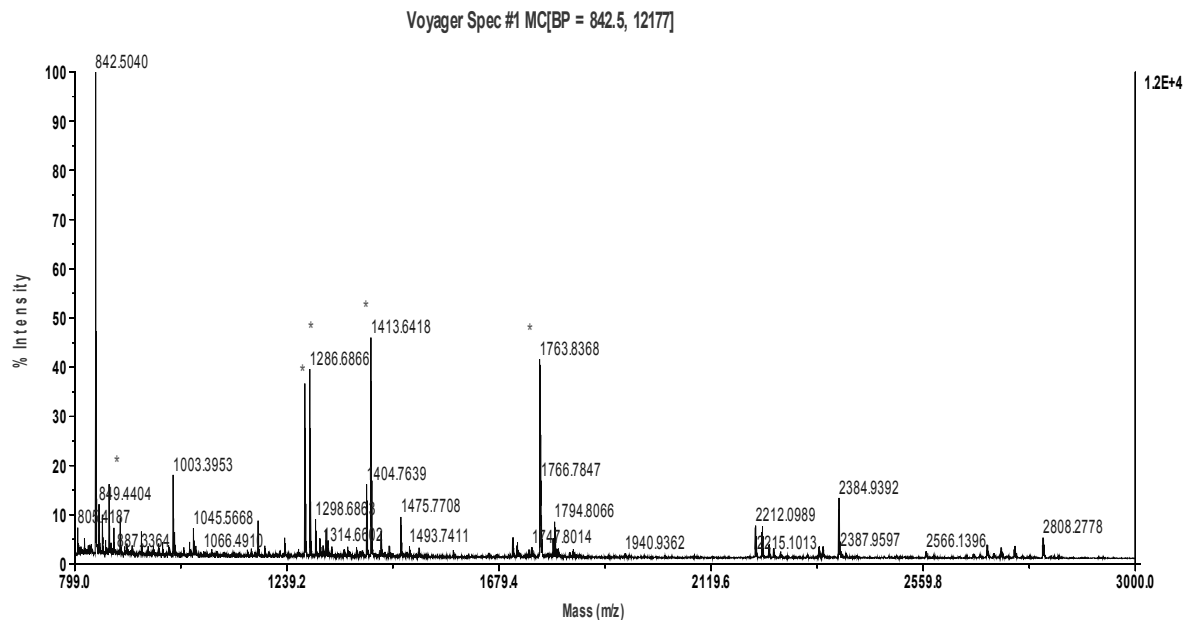


Lista de picos (las masas de los péptidos que se corresponden con los de la proteína identificada están subrayadas):

901.5003; 985.4437; 1458.8438; 1713.8758; 1764.8650; 1794.8332; 1808.8577; 1940.9441; 2239.1382; 2691.2664

Valor de *score* de la siguiente proteína no-homóloga identificada: 62

- Spot #1556, Espectro de MALDI TOF MS



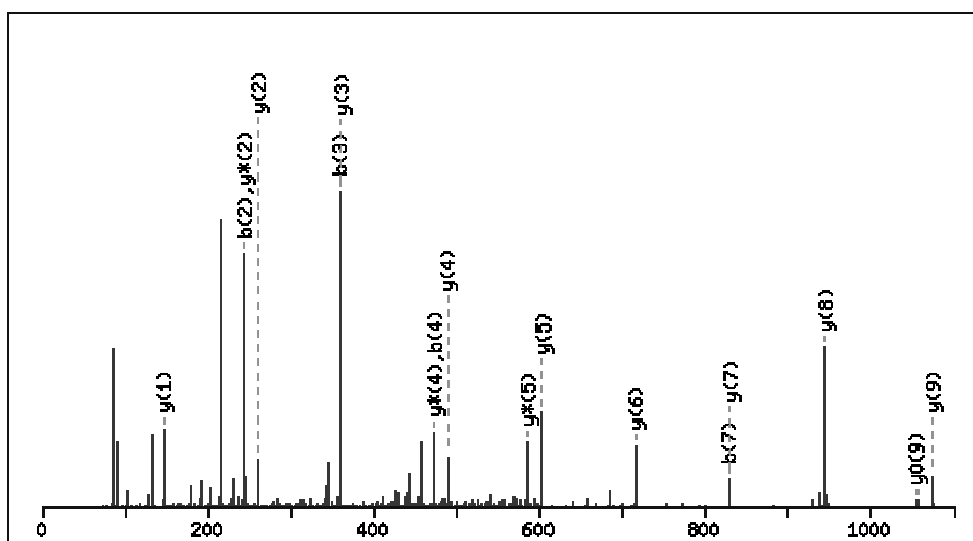
Lista de picos (las masas de los péptidos que se corresponden con los de la proteína identificada están subrayadas):

805.4226; 849.4402; 893.4628; 937.5033; 1234.6878; 1276.6738; 1286.6890; 1298.6876; 1404.7603; 1413.6404; 1434.7722; 1493.7455; 1513.7388; 1763.8451; 1794.8014; 2239.1278

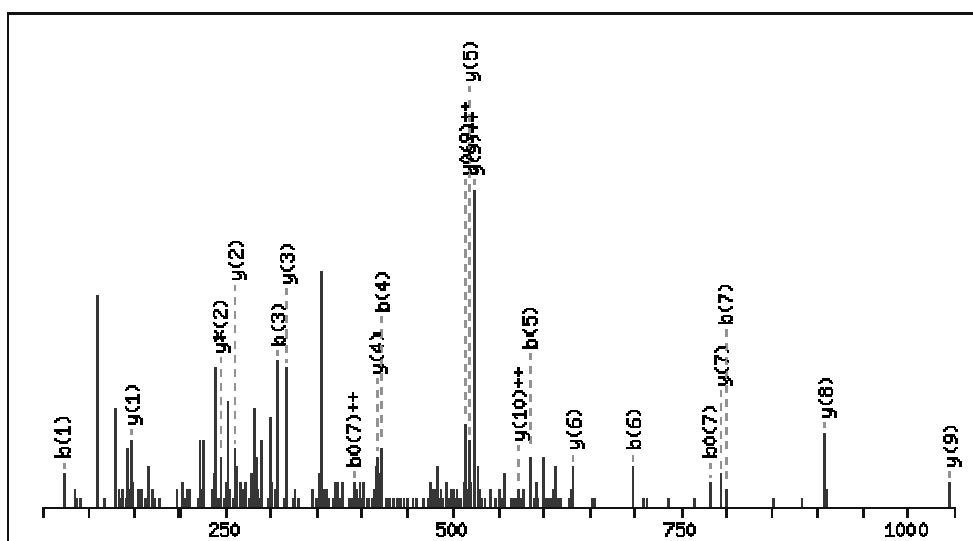
Valor de *score* de la siguiente proteína no-homóloga identificada: 60

B.4. IDENTIFICACIONES A PARTIR DE UN SOLO PÉPTIDO PRESENTES EN LA TABLA 6 (página 114)

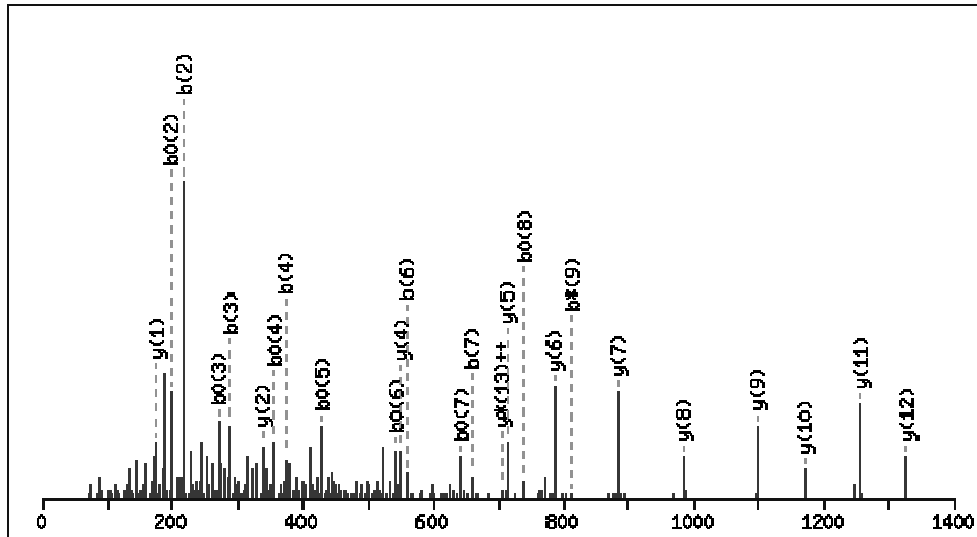
- *Spot #1385, Espectro de MS/MS*
Péptido: R.LEDLLDEVLK.N
Masa del ión precursor: 593.897408
Carga: 2+
Error de masa observado: 110 ppm
Ion score : 62 ($p < 0.005$)



- *Spot #1436 Espectro de MS/MS*
Péptido: K.AVHNYITVGNK.V
Masa del ión precursor: 608.409051
Carga: 2+
Error de masa observado: 134 ppm
Ion score : 51 ($p < 0.005$)



- *Spot #1578 Espectro de MS/MS*
Péptido: K.NTASADVVAAYNVYR.D
Masa del ión precursor: 771.9662
Carga: 2+
Error de masa observado: 110 ppm
Ion score : 70 ($p < 0.005$)



B.5. PROTEÍNAS IDENTIFICADAS EN EL ANÁLISIS iTRAQ

Tabla B1. Grupos de proteínas identificadas a un nivel de confianza del 95% ordenadas por el *Unused ProtScore*. La numeración de la primera columna (#) es la que asigna el programa *Protein Pilot*TM a cada proteína representativa de cada grupo de proteínas en función del *Unused ProtScore* y coincide con el resto de tablas asociadas a este análisis. En la columna dedicada al compartimento celular en el que se localizan las proteínas (Compart. celular), los códigos se refieren a: C = Citosol, MC = Membrana citoplasmática; ME = Membrana externa, E = Extracelular y P = Periplasma. La columna (%C) indica el porcentaje de cobertura por proteína identificada, la siguiente columna indica el número de péptidos únicos detectados por proteína identificada y la última columna indica el *Unused ProtScore* asignado a cada identificación.

#	NCBI nr (gi)	Descripción	Compart. celular	%C	Péptidos únicos	<i>Unused ProtScore</i>
1	75438841	<i>Outer membrane protein omp38 precursor (Outer membrane protein ompA) (Outer membrane protein ompAb)</i>	ME	96.63	160	117.88
	40287452	<i>outer membrane protein A [Acinetobacter baumannii]</i>				
2	83755429	<i>carbapenem-associated resistance protein precursor [Acinetobacter baumannii]</i>	ME	90.76	63	72.67
	72535025	<i>putative outer membrane protein [Acinetobacter baumannii]</i>				
3	126642712	<i>cell division protein [Acinetobacter baumannii ATCC 17978]</i>	MC	74.92	57	40.81
	126388596	<i>cell division protein [Acinetobacter baumannii ATCC 17978]</i>				
4	82654966	<i>34 kDa Outer Membrane Protein [Acinetobacter baumannii]</i>	ME	92.64	39	37.99
5	126640934	<i>putative outer membrane protein [Acinetobacter baumannii ATCC 17978]</i>	ME	82.49	43	35.97
	126386818	<i>putative outer membrane protein [Acinetobacter baumannii ATCC 17978]</i>				
6	126642784	<i>putative protein (DcaP-like) [Acinetobacter baumannii ATCC 17978]</i>	ME	72.33	35	35.75
	126388668	<i>putative protein (DcaP-like) [Acinetobacter baumannii ATCC 17978]</i>				
7	126642744	<i>succinate dehydrogenase flavoprotein subunit [Acinetobacter baumannii ATCC 17978]</i>	MC	70.27	38	35.69
	126388628	<i>succinate dehydrogenase flavoprotein subunit [Acinetobacter baumannii ATCC 17978]</i>				
8	88758806	<i>RND family drug transporter [Acinetobacter baumannii]</i>	ME	76.08	43	35.26
	60207558	<i>AdeK [Acinetobacter baumannii]</i>				
	126642768	<i>AdeK [Acinetobacter baumannii ATCC 17978]</i>				
	126388652	<i>AdeK [Acinetobacter baumannii ATCC 17978]</i>				
9	126642014	<i>putative outer membrane protein [Acinetobacter baumannii ATCC 17978]</i>	ME	37.27	29	34.58
	126387898	<i>putative outer membrane protein [Acinetobacter baumannii ATCC 17978]</i>				
10	126641341	<i>hypothetical protein A1S_1295 [Acinetobacter baumannii ATCC 17978]</i>	-	59.37	31	33.47
	126387225	<i>hypothetical protein A1S_1295 [Acinetobacter baumannii ATCC 17978]</i>				
11	126641348	<i>hypothetical protein A1S_1302 [Acinetobacter baumannii ATCC 17978]</i>	MC	39.87	36	32.12
	126387232	<i>putative membrane protein [Acinetobacter baumannii ATCC 17978]</i>				

#	NCBIInr (gi)	Descripción	Compart. celular	%C	Péptidos únicos	Unused ProtScore
12	160419217	50S ribosomal protein L2	-	74.09	32	26.74
13	126641969	cytochrome d terminal oxidase polypeptide subunit I [Acinetobacter baumannii ATCC 17978]	MC	42.16	28	24.32
	126387853	cytochrome d terminal oxidase polypeptide subunit I [Acinetobacter baumannii ATCC 17978]				
14	162286755	F0F1 ATP synthase subunit beta [Acinetobacter baumannii ATCC 17978]	MC, C	55.82	24	23.75
	81393960	ATP synthase subunit beta (ATPase subunit beta) (ATP synthase F1 sector subunit beta)				
	50083469	F0F1 ATP synthase subunit beta [Acinetobacter sp. ADP1]				
	49529445	membrane-bound ATP synthase, F1 sector, beta-subunit [Acinetobacter sp. ADP1]				
	126386140	membrane-bound ATP synthase F1 sector, beta-subunit [Acinetobacter baumannii ATCC 17978]				
15	126640815	NADH dehydrogenase subunit G [Acinetobacter baumannii ATCC 17978]	MC, C	52.53	33	23.22
	126386699	NADH dehydrogenase I chain G [Acinetobacter baumannii ATCC 17978]				
16	162286753	elongation factor Tu [Acinetobacter baumannii ATCC 17978]	C	79.29	31	23.15
	162286746	elongation factor Tu [Acinetobacter baumannii ATCC 17978]				
17	126643195	putative signal peptide [Acinetobacter baumannii ATCC 17978]	P	72.73	22	23.02
	126389079	putative signal peptide [Acinetobacter baumannii ATCC 17978]				
18	126642803	putative long-chain fatty acid transport protein [Acinetobacter baumannii ATCC 17978]	ME, E	60.17	26	22.95
	126388687	putative long-chain fatty acid transport protein [Acinetobacter baumannii ATCC 17978]				
19	88758802	RND family drug transporter [Acinetobacter baumannii]	MC	38	34	22.9
	60207557	AdeJ [Acinetobacter baumannii]				
	126642767	RND family drug transporter [Acinetobacter baumannii ATCC 17978]				
	126388651	RND family drug transporter [Acinetobacter baumannii ATCC 17978]				
20	126640380	putative outer membrane protein W [Acinetobacter baumannii ATCC 17978]	ME	84.15	42	22.68
	126386264	putative outer membrane protein W [Acinetobacter baumannii ATCC 17978]				
21	126641508	hypothetical protein AIS_1462 [Acinetobacter baumannii ATCC 17978]	-	72.73	21	22.67
	126387392	hypothetical protein AIS_1462 [Acinetobacter baumannii ATCC 17978]				
22	162286757	F0F1 ATP synthase subunit alpha [Acinetobacter baumannii ATCC 17978]	C	48.64	28	21.99
	81393961	ATP synthase subunit alpha (ATPase subunit alpha) (ATP synthase F1 sector subunit alpha)				
	50083467	F0F1 ATP synthase subunit alpha [Acinetobacter sp. ADP1]				
	49529443	membrane-bound ATP synthase, F1 sector, alpha-subunit [Acinetobacter sp. ADP1]				
23	126641077	putative signal peptide [Acinetobacter baumannii ATCC 17978]	-	81.45	23	21.75

#	NCBIInr (gi)	Descripción	Compart. celular	%C	Péptidos únicos	Unused ProtScore
	126386961	<i>putative signal peptide [Acinetobacter baumannii ATCC 17978]</i>				
24	72535027	<i>putative outer membrane protein [Acinetobacter baumannii]</i>	ME	80.26	21	21.02
	126643324	<i>putative outer membrane protein [Acinetobacter baumannii ATCC 17978]</i>				
	126389208	<i>putative outer membrane protein [Acinetobacter baumannii ATCC 17978]</i>				
25	126640892	<i>putative competence protein (ComL) [Acinetobacter baumannii ATCC 17978]</i>	ME	79.12	28	20.55
	126386776	<i>putative competence protein (ComL) [Acinetobacter baumannii ATCC 17978]</i>				
26	37933550	<i>CsuD [Acinetobacter baumannii]</i>	ME	38.22	22	20.48
	126642259	<i>CsuD [Acinetobacter baumannii ATCC 17978]</i>				
	126388143	<i>CsuD [Acinetobacter baumannii ATCC 17978]</i>				
27	38712	<i>glucose dehydrogenase [Acinetobacter calcoaceticus]</i>	P	48.06	32	19.31
	118558	<i>Quinoprotein glucose dehydrogenase A precursor (Glucose dehydrogenase A [pyrroloquinoline-quinone]) (Quinoprotein glucose DH) (GDH-A)</i>				
28	126640576	<i>hypothetical protein A1S_0505 [Acinetobacter baumannii ATCC 17978]</i>	MC, P, ME	56.08	19	19.1
	126386460	<i>hypothetical protein A1S_0505 [Acinetobacter baumannii ATCC 17978]</i>				
29	88758800	<i>RND family drug transporter [Acinetobacter baumannii]</i>	MC, ME	77.4	29	18.1
	60207556	<i>Adel [Acinetobacter baumannii]</i>				
	126642766	<i>Adel [Acinetobacter baumannii ATCC 17978]</i>				
	126388650	<i>Adel [Acinetobacter baumannii ATCC 17978]</i>				
30	61215533	<i>30S ribosomal protein S2</i>	C	78.71	24	18.02
	50085372	<i>30S ribosomal protein S2 [Acinetobacter sp. ADP1]</i>				
	49531348	<i>30S ribosomal protein S2 [Acinetobacter sp. ADP1]</i>				
31	126640252	<i>membrane-bound ATP synthase F0 sector, subunit b [Acinetobacter baumannii ATCC 17978]</i>	MC	91.11	13	18.01
	126386136	<i>membrane-bound ATP synthase F0 sector, subunit b [Acinetobacter baumannii ATCC 17978]</i>				
32	126641241	<i>OmpA/MotB [Acinetobacter baumannii ATCC 17978]</i>	ME	73.05	21	17.87
	126387125	<i>OmpA/MotB [Acinetobacter baumannii ATCC 17978]</i>				
33	126642211	<i>cytochrome o ubiquinol oxidase subunit II [Acinetobacter baumannii ATCC 17978]</i>	MC	65.34	22	17.65
	126388095	<i>cytochrome o ubiquinol oxidase subunit II [Acinetobacter baumannii ATCC 17978]</i>				
34	126642873	<i>putative glucose-sensitive porin (OprB-like) [Acinetobacter baumannii ATCC 17978]</i>	ME	39.11	11	16.02
	126388757	<i>putative glucose-sensitive porin (OprB-like) [Acinetobacter baumannii ATCC 17978]</i>				
35	126642630	<i>peptidoglycan-associated lipoprotein precursor [Acinetobacter baumannii ATCC 17978]</i>	ME	71.18	13	15.71
	126388514	<i>peptidoglycan-associated lipoprotein precursor [Acinetobacter baumannii ATCC 17978]</i>				

#	NCBIInr (gi)	Descripción	Compart. celular	%C	Péptidos únicos	Unused ProtScore
36	126642789	<i>putative membrane protease subunit [Acinetobacter baumannii ATCC 17978]</i>	-	77.39	14	15.53
	126388673	<i>putative membrane protease subunit [Acinetobacter baumannii ATCC 17978]</i>				
37	126642471	<i>D-ala-D-ala-carboxypeptidase; penicillin-binding protein 5 (precursor) [Acinetobacter baumannii ATCC 17978]</i>	MC	55.78	19	15.48
	126388355	<i>D-ala-D-ala-carboxypeptidase; penicillin-binding protein 5 (precursor) [Acinetobacter baumannii ATCC 17978]</i>				
38	126641683	<i>peptidyl-prolyl cis-trans isomerase precursor [Acinetobacter baumannii ATCC 17978]</i>	MC	56.64	12	14.59
	126387567	<i>peptidyl-prolyl cis-trans isomerase precursor [Acinetobacter baumannii ATCC 17978]</i>				
39	162286745	<i>malate:quinone oxidoreductase [Acinetobacter baumannii ATCC 17978]</i>	MC, C	51.1	26	14.5
	126386857	<i>malate dehydrogenase FAD/NAD(P)-binding domain [Acinetobacter baumannii ATCC 17978]</i>				
40	126641416	<i>Oxidoreductase [Acinetobacter baumannii ATCC 17978]</i>	-	38.84	18	14.24
	126387300	<i>Oxidoreductase [Acinetobacter baumannii ATCC 17978]</i>				
41	126641228	<i>putative Zn-dependent protease with chaperone function [Acinetobacter baumannii ATCC 17978]</i>	-	68.78	16	14.21
	126387112	<i>putative Zn-dependent protease with chaperone function [Acinetobacter baumannii ATCC 17978]</i>				
42	126641340	<i>hypothetical protein A1S_1294 [Acinetobacter baumannii ATCC 17978]</i>	-	67.09	9	14.01
	126387224	<i>hypothetical protein A1S_1294 [Acinetobacter baumannii ATCC 17978]</i>				
43	126641049	<i>putative signal peptide [Acinetobacter baumannii ATCC 17978]</i>	ME	51.46	22	13.85
	126386933	<i>putative signal peptide [Acinetobacter baumannii ATCC 17978]</i>				
44	126642556	<i>leader peptidase [Acinetobacter baumannii ATCC 17978]</i>	MC	62.56	13	13.61
	126388440	<i>leader peptidase [Acinetobacter baumannii ATCC 17978]</i>				
45	126643338	<i>cell division protein FtsZ [Acinetobacter baumannii ATCC 17978]</i>	MC, C	50.84	19	13.41
	126389222	<i>cell division proteintubulin-like GTP-binding protein and GTPase [Acinetobacter baumannii ATCC 17978]</i>				
	50086469	<i>cell division protein FtsZ [Acinetobacter sp. ADP1]</i>				
	49532445	<i>cell division protein,tubulin-like GTP-binding protein and GTPase, forms circumferential ring in cell division and participates in the septum formation [Acinetobacter sp. ADP1]</i>				
46	126641591	<i>organic solvent tolerance protein precursor [Acinetobacter baumannii ATCC 17978]</i>	ME	50.43	22	13.37
	126387475	<i>organic solvent tolerance protein precursor [Acinetobacter baumannii ATCC 17978]</i>				

#	NCBIInr (gi)	Descripción	Compart. celular	%C	Péptidos únicos	Unused ProtScore
47	162286749	<i>bifunctional NADH:ubiquinone oxidoreductase subunit C/D [Acinetobacter baumannii ATCC 17978]</i>	C	36.47	20	13.2
	50083951	<i>bifunctional NADH:ubiquinone oxidoreductase subunit C/D [Acinetobacter sp. ADP1]</i>				
	49529927	<i>NADH dehydrogenase I chain C,D [Acinetobacter sp. ADP1]</i>				
48	152060837	<i>30S ribosomal protein S3</i>	C	62	22	12.94
49	126640162	<i>protein tyrosine kinase [Acinetobacter baumannii ATCC 17978]</i>	MC	51.99	33	12.83
	126386046	<i>protein tyrosine kinase [Acinetobacter baumannii ATCC 17978]</i>				
50	126640221	<i>RND superfamily-like exporters [Acinetobacter baumannii ATCC 17978]</i>	MC	24.65	25	12.59
	126386105	<i>RND superfamily-like exporter [Acinetobacter baumannii ATCC 17978]</i>				
51	81613021	<i>50S ribosomal protein LA</i>	-	75.61	15	12.54
	50086214	<i>50S ribosomal protein LA [Acinetobacter sp. ADP1]</i>				
	49532190	<i>50S ribosomal protein LA, regulates expression of S10 operon [Acinetobacter sp. ADP1]</i>				
	126643094	<i>50S ribosomal protein LA [Acinetobacter baumannii ATCC 17978]</i>				
	126388978	<i>50S ribosomal protein LA [Acinetobacter baumannii ATCC 17978]</i>				
52	126642371	<i>putative acyl-CoA dehydrogenase [Acinetobacter baumannii ATCC 17978]</i>	-	58.54	24	12.43
	126388255	<i>putative acyl-CoA dehydrogenase [Acinetobacter baumannii ATCC 17978]</i>				
53	126642783	<i>lipid A phosphoethanolamine transferase [Acinetobacter baumannii ATCC 17978]</i>	MC	24.25	13	12.14
	126388667	<i>lipid A phosphoethanolamine transferase [Acinetobacter baumannii ATCC 17978]</i>				
54	50085541	<i>glutamine synthetase [Acinetobacter sp. ADP1]</i>	C	42.89	15	12.13
	49531517	<i>glutamine synthetase [Acinetobacter sp. ADP1]</i>				
55	126640332	<i>homoserine dehydrogenase [Acinetobacter baumannii ATCC 17978]</i>	-	41.85	10	12.08
	126386216	<i>homoserine dehydrogenase [Acinetobacter baumannii ATCC 17978]</i>				
56	126642745	<i>succinate dehydrogenase iron-sulfur subunit [Acinetobacter baumannii ATCC 17978]</i>	MC	71.5	20	11.98
	126388629	<i>succinate dehydrogenase iron-sulfur subunit [Acinetobacter baumannii ATCC 17978]</i>				
	50085917	<i>succinate dehydrogenase iron-sulfur subunit [Acinetobacter sp. ADP1]</i>				
	49531893	<i>succinate dehydrogenase, iron-sulfur subunit [Acinetobacter sp. ADP1]</i>				
57	126641353	<i>putative ClpA/B-type chaperone [Acinetobacter baumannii ATCC 17978]</i>	C	38.95	29	11.82
	126387237	<i>putative ClpA/B-type chaperone [Acinetobacter baumannii ATCC 17978]</i>				
58	126641105	<i>hypothetical protein A1S_1055 [Acinetobacter baumannii ATCC 17978]</i>	ME	40.74	36	11.75
	126386989	<i>hypothetical protein A1S_1055 [Acinetobacter baumannii ATCC 17978]</i>				

#	NCBIInr (gi)	Descripción	Compart. celular	%C	Péptidos únicos	Unused ProtScore
59	126643084	50S ribosomal protein L5 [<i>Acinetobacter baumannii</i> ATCC 17978]	-	69.93	17	11.46
	126388968	50S ribosomal protein L5 [<i>Acinetobacter baumannii</i> ATCC 17978]				
60	126388821	preprotein translocase HSP family, part of the channel [<i>Acinetobacter baumannii</i> ATCC 17978]	MC	46.76	23	11.43
	162286720	preprotein translocase subunit SecD [<i>Acinetobacter baumannii</i> ATCC 17978]				
61	126640805	ribonucleotide-diphosphate reductase subunit alpha [<i>Acinetobacter baumannii</i> ATCC 17978]	-	25.08	25	11.4
	126386689	ribonucleoside diphosphate reductase alpha subunit [<i>Acinetobacter baumannii</i> ATCC 17978]				
62	160177568	DNA-directed RNA polymerase subunit beta' (RNAP subunit beta') (Transcriptase subunit beta') (RNA polymerase subunit beta')	C	26.34	37	11.38
	126640376	DNA-directed RNA polymerase subunit beta' [<i>Acinetobacter baumannii</i> ATCC 17978]				
	126386260	DNA-directed RNA polymerase beta' chain [<i>Acinetobacter baumannii</i> ATCC 17978]				
63	126641432	Catalase [<i>Acinetobacter baumannii</i> ATCC 17978]	C	39.23	21	10.9
	126387316	Catalase [<i>Acinetobacter baumannii</i> ATCC 17978]				
64	126641700	putative ferric siderophore receptor protein [<i>Acinetobacter baumannii</i> ATCC 17978]	ME	30.83	17	10.86
	126387584	putative ferric siderophore receptor protein [<i>Acinetobacter baumannii</i> ATCC 17978]				
65	126643116	toluene tolerance efflux transporter [<i>Acinetobacter baumannii</i> ATCC 17978]	E	52.24	15	10.66
	126389000	toluene tolerance efflux transporter [<i>Acinetobacter baumannii</i> ATCC 17978]				
66	126641286	putative transport protein [<i>Acinetobacter baumannii</i> ATCC 17978]	MC, C	81.48	13	10.54
	126387170	putative transport protein [<i>Acinetobacter baumannii</i> ATCC 17978]				
67	126641924	hypothetical protein A1S_1879 [<i>Acinetobacter baumannii</i> ATCC 17978]	-	85.11	12	10.44
	126387808	hypothetical protein A1S_1879 [<i>Acinetobacter baumannii</i> ATCC 17978]				
68	126642692	heat shock protein HtpX [<i>Acinetobacter baumannii</i> ATCC 17978]	MC	62.3	16	10.39
	126388576	heat shock protein [<i>Acinetobacter baumannii</i> ATCC 17978]				
69	50086189	50S ribosomal protein L17 [<i>Acinetobacter</i> sp. ADP1]	C	56.8	15	10.26
	49532165	50S ribosomal protein L17 [<i>Acinetobacter</i> sp. ADP1]				
	126643070	50S ribosomal protein L17 [<i>Acinetobacter baumannii</i> ATCC 17978]				
	126388954	50S ribosomal protein L17 [<i>Acinetobacter baumannii</i> ATCC 17978]				
70	126642207	hypothetical protein YcdS precursor [<i>Acinetobacter baumannii</i> ATCC 17978]	ME	37.35	27	10.22
	126388091	hypothetical protein YcdS precursor [<i>Acinetobacter baumannii</i> ATCC 17978]				
71	73919023	30S ribosomal protein S5	C	74.55	18	10.14

#	NCBIInr (gi)	Descripción	Compart. celular	%C	Péptidos únicos	Unused ProtScore
	50086198	30S ribosomal protein S5 [<i>Acinetobacter</i> sp. ADP1]				
	49532174	30S ribosomal protein S5 [<i>Acinetobacter</i> sp. ADP1]				
	152112274	30S ribosomal protein S5				
	126643079	30S ribosomal protein S5 [<i>Acinetobacter baumannii</i> ATCC 17978]				
	126388963	30S ribosomal protein S5 [<i>Acinetobacter baumannii</i> ATCC 17978]				
72	126642212	cytochrome o ubiquinol oxidase subunit I [<i>Acinetobacter baumannii</i> ATCC 17978]	MC	18.88	17	10.08
	126388096	cytochrome o ubiquinol oxidase subunit I [<i>Acinetobacter baumannii</i> ATCC 17978]				
73	126640814	NADH dehydrogenase I chain F [<i>Acinetobacter baumannii</i> ATCC 17978]	MC, C	43.8	10	10.05
	126386698	NADH dehydrogenase I chain F [<i>Acinetobacter baumannii</i> ATCC 17978]				
74	126643008	putative lipoprotein precursor [<i>Acinetobacter baumannii</i> ATCC 17978]	MC	69.84	11	10
	126388892	putative lipoprotein precursor [<i>Acinetobacter baumannii</i> ATCC 17978]				
75	126641367	putative hemolysin [<i>Acinetobacter baumannii</i> ATCC 17978]	-	60.42	9	9.98
	126387251	putative hemolysin [<i>Acinetobacter baumannii</i> ATCC 17978]				
76	126643002	Inner membrane protein (IMP) integration factor [<i>Acinetobacter baumannii</i> ATCC 17978]	MC	43.17	16	9.84
	126388886	Inner membrane protein (IMP) integration factor [<i>Acinetobacter baumannii</i> ATCC 17978]				
77	126642858	mechanosensitive channel [<i>Acinetobacter baumannii</i> ATCC 17978]	MC	60.16	12	9.67
	126388742	mechanosensitive channel [<i>Acinetobacter baumannii</i> ATCC 17978]				
78	37933546	<i>CsuA/B</i> [<i>Acinetobacter baumannii</i>]	-	55.56	9	9.67
79	126640271	putative outer membrane copper receptor (OprC) [<i>Acinetobacter baumannii</i> ATCC 17978]	ME	29.39	15	9.58
	126386155	putative outer membrane copper receptor (OprC) [<i>Acinetobacter baumannii</i> ATCC 17978]				
80	126643106	glycerol-3-phosphate acyltransferase [<i>Acinetobacter baumannii</i> ATCC 17978]	MC	19.7	15	9.3
	126388990	glycerol-3-phosphate acyltransferase [<i>Acinetobacter baumannii</i> ATCC 17978]				
81	126643396	67-dimethyl-8-ribityllumazine synthase [<i>Acinetobacter baumannii</i> ATCC 17978]	-	80	7	9.3
	126389280	67-dimethyl-8-ribityllumazine synthase [<i>Acinetobacter baumannii</i> ATCC 17978]				
82	126642177	putative outer membrane protein [<i>Acinetobacter baumannii</i> ATCC 17978]	ME	37.18	26	9.18
	126388061	putative outer membrane protein [<i>Acinetobacter baumannii</i> ATCC 17978]				
83	126643158	Cu/Zn superoxide dismutase [<i>Acinetobacter baumannii</i> ATCC 17978]	P	70.78	10	9.17
	126389042	Cu/Zn superoxide dismutase [<i>Acinetobacter baumannii</i> ATCC 17978]				
84	126641386	Phenylacetate-CoA oxygenase/reductase PaaK subunit [<i>Acinetobacter baumannii</i> ATCC 17978]	-	44.36	13	9.16

#	NCBI Inr (gi)	Descripción	Compart. celular	%C	Péptidos únicos	Unused ProtScore
	126387270	<i>Phenylacetate-CoA oxygenase/reductase PaaK subunit [Acinetobacter baumannii ATCC 17978]</i>				
85	126641128	<i>putative lipoprotein [Acinetobacter baumannii ATCC 17978]</i>	MC	49.32	8	8.51
	126387012	<i>putative lipoprotein [Acinetobacter baumannii ATCC 17978]</i>				
86	126643020	<i>30S ribosomal protein S9 [Acinetobacter baumannii ATCC 17978]</i>	C	83.53	14	8.36
	126388904	<i>30S ribosomal protein S9 [Acinetobacter baumannii ATCC 17978]</i>				
87	126641059	<i>putative lipoprotein [Acinetobacter baumannii ATCC 17978]</i>	-	64.81	9	8.35
	126386943	<i>putative lipoprotein [Acinetobacter baumannii ATCC 17978]</i>				
88	126643089	<i>50S ribosomal protein L16 [Acinetobacter baumannii ATCC 17978]</i>	C	71.88	9	8.28
	126388973	<i>50S ribosomal protein L16 [Acinetobacter baumannii ATCC 17978]</i>				
89	126640161	<i>FKBP-type peptidyl-prolyl cis-trans isomerase (rotamase) [Acinetobacter baumannii ATCC 17978]</i>	ME	38.52	10	8.04
	126386045	<i>FKBP-type peptidyl-prolyl cis-trans isomerase (rotamase) [Acinetobacter baumannii ATCC 17978]</i>				
90	126642918	<i>aspartyl-tRNA synthetase [Acinetobacter baumannii ATCC 17978]</i>	C	29.96	17	8
	126388802	<i>aspartyl-tRNA synthetase [Acinetobacter baumannii ATCC 17978]</i>				
91	126643215	<i>septum formation penicillin binding protein 3, peptidoglycan synthetase [Acinetobacter baumannii ATCC 17978]</i>	MC	25.81	16	8
	126389099	<i>septum formation penicillin binding protein 3, peptidoglycan synthetase [Acinetobacter baumannii ATCC 17978]</i>				
92	126641381	<i>bifunctional aldehyde dehydrogenase/enoyl-CoA hydratase [Acinetobacter baumannii ATCC 17978]</i>	C	29.62	16	8
	126387265	<i>Phenylacetic acid degradation protein paaN [Acinetobacter baumannii ATCC 17978]</i>				
93	126642981	<i>chaperone Hsp70 [Acinetobacter baumannii ATCC 17978]</i>	C	24.92	10	8
	126388865	<i>chaperone Hsp70 [Acinetobacter baumannii ATCC 17978]</i>				
	81695717	<i>Chaperone protein dnaK (Heat shock protein 70) (Heat shock 70 kDa protein) (HSP70)</i>				
	50086596	<i>chaperone Hsp70 in DNA biosynthesis/cell division [Acinetobacter sp. ADP1]</i>				
	49532570	<i>chaperone Hsp70 in DNA biosynthesis/cell division [Acinetobacter sp. ADP1]</i>				
94	155029847	<i>hypothetical protein A1S_3626 [Acinetobacter baumannii ATCC 17978]</i>	-	66.67	8	8
95	126642235	<i>putative lipoprotein [Acinetobacter baumannii ATCC 17978]</i>	MC	44.19	5	8
	126388119	<i>putative lipoprotein [Acinetobacter baumannii ATCC 17978]</i>				

#	NCBIInr (gi)	Descripción	Compart. celular	%C	Péptidos únicos	Unused ProtScore
96	126640930	<i>minC</i> activating cell division inhibitor a membrane ATPase [<i>Acinetobacter baumannii</i> ATCC 17978]	MC, C	64.25	11	7.99
	126386814	<i>minC</i> activating cell division inhibitor a membrane ATPase [<i>Acinetobacter baumannii</i> ATCC 17978]				
97	126640689	putative lipoprotein precursor (Vac) transmembrane [<i>Acinetobacter baumannii</i> ATCC 17978]	ME	56.73	12	7.81
	126386573	putative lipoprotein precursor (Vac) transmembrane [<i>Acinetobacter baumannii</i> ATCC 17978]				
98	155029965	hypothetical protein A1S_3744 [<i>Acinetobacter baumannii</i> ATCC 17978]	-	58.9	6	7.8
99	126642370	putative acyl-CoA dehydrogenase [<i>Acinetobacter baumannii</i> ATCC 17978]	-	44.37	6	7.72
	126388254	putative acyl-CoA dehydrogenase [<i>Acinetobacter baumannii</i> ATCC 17978]				
100	126642325	hypothetical protein A1S_2284 [<i>Acinetobacter baumannii</i> ATCC 17978]	MC	40.17	30	7.39
	126388209	hypothetical protein A1S_2284 [<i>Acinetobacter baumannii</i> ATCC 17978]				
101	60390407	50S ribosomal protein L20	C	74.79	16	7.39
	50086059	50S ribosomal protein L20 [<i>Acinetobacter</i> sp. ADP1]				
	49532035	50S ribosomal protein L20, also posttranslational autoregulator [<i>Acinetobacter</i> sp. ADP1]				
	126640666	50S ribosomal protein L20 [<i>Acinetobacter baumannii</i> ATCC 17978]				
	126386550	50S ribosomal protein L20 [<i>Acinetobacter baumannii</i> ATCC 17978]				
102	126642706	putative signal peptide [<i>Acinetobacter baumannii</i> ATCC 17978]	-	49.22	7	7.23
	126388590	putative signal peptide [<i>Acinetobacter baumannii</i> ATCC 17978]				
103	126640164	putative outer membrane protein [<i>Acinetobacter baumannii</i> ATCC 17978]	ME	30.33	10	7.22
	126386048	putative outer membrane protein [<i>Acinetobacter baumannii</i> ATCC 17978]				
104	126643375	hypothetical protein A1S_3368 [<i>Acinetobacter baumannii</i> ATCC 17978]	-	48.36	5	7.22
	126389259	hypothetical protein A1S_3368 [<i>Acinetobacter baumannii</i> ATCC 17978]				
105	126640365	hypothetical protein A1S_0272 [<i>Acinetobacter baumannii</i> ATCC 17978]	MC	76.47	11	7.2
	126386249	hypothetical protein A1S_0272 [<i>Acinetobacter baumannii</i> ATCC 17978]				
106	126643355	putative signal peptide [<i>Acinetobacter baumannii</i> ATCC 17978]	-	43.17	5	7.05
	126389239	putative signal peptide [<i>Acinetobacter baumannii</i> ATCC 17978]				
107	126640876	putative peptidoglycan-binding LysM [<i>Acinetobacter baumannii</i> ATCC 17978]	-	82.41	11	6.95
	126386760	putative peptidoglycan-binding LysM [<i>Acinetobacter baumannii</i> ATCC 17978]				
108	126642380	HtrA-like serine protease [<i>Acinetobacter baumannii</i> ATCC 17978]	P	62.66	10	6.87

#	NCBIInr (gi)	Descripción	Compart. celular	%C	Péptidos únicos	Unused ProtScore
	126388264	<i>HtrA-like serine protease [Acinetobacter baumannii ATCC 17978]</i>				
109	126641977	<i>hypothetical protein A1S_1932 [Acinetobacter baumannii ATCC 17978]</i>	MC	60.5	10	6.83
	126387861	<i>hypothetical protein A1S_1932 [Acinetobacter baumannii ATCC 17978]</i>				
110	50085482	<i>bifunctional aconitate hydratase 2/2-methylisocitrate dehydratase [Acinetobacter sp. ADP1]</i>	-	35.49	24	6.76
	49531458	<i>aconitate hydratase 2 [Acinetobacter sp. ADP1]</i>				
111	152060924	<i>30S ribosomal protein S4</i>	-	55.77	12	6.69
112	162286747	<i>30S ribosomal protein S7 [Acinetobacter baumannii ATCC 17978]</i>	-	66.67	12	6.62
	126386801	<i>30S ribosomal protein S7 [Acinetobacter baumannii ATCC 17978]</i>				
113	126640829	<i>hypothetical protein A1S_0771 [Acinetobacter baumannii ATCC 17978]</i>	MC	26.11	13	6.51
	126386713	<i>putative membrane protein [Acinetobacter baumannii ATCC 17978]</i>				
114	126640611	<i>putative minor lipoprotein [Acinetobacter baumannii ATCC 17978]</i>	-	51.15	8	6.49
	126386495	<i>putative minor lipoprotein [Acinetobacter baumannii ATCC 17978]</i>				
115	126642557	<i>GTP-binding protein LepA [Acinetobacter baumannii ATCC 17978]</i>	MC	31.4	10	6.42
	126388441	<i>GTP-binding protein [Acinetobacter baumannii ATCC 17978]</i>				
116	126643230	<i>putative ABC transporter ATP-binding protein [Acinetobacter baumannii ATCC 17978]</i>	C	44.81	14	6.4
	126389114	<i>putative transport protein [Acinetobacter baumannii ATCC 17978]</i>				
117	126642007	<i>recombinase A [Acinetobacter baumannii ATCC 17978]</i>	C	26.85	7	6.36
	126387891	<i>DNA strand exchange and recombination protein [Acinetobacter baumannii ATCC 17978]</i>				
118	162286756	<i>F0F1 ATP synthase subunit gamma [Acinetobacter baumannii ATCC 17978]</i>	MC, C	40.14	7	6.35
	126386139	<i>membrane-bound ATP synthase F1 sector, gamma-subunit [Acinetobacter baumannii ATCC 17978]</i>				
119	50083514	<i>acyl-CoA synthetase (long-chain-fatty-acid-CoA ligase) [Acinetobacter sp. ADP1]</i>	C	24.51	12	6.16
	49529490	<i>acyl-CoA synthetase (long-chain-fatty-acid-CoA ligase) [Acinetobacter sp. ADP1]</i>				
120	78099422	<i>RNA polymerase subunit B [Acinetobacter baumannii]</i>	C	23.42	30	6.15
	158513683	<i>DNA-directed RNA polymerase subunit beta (RNAP subunit beta) (Transcriptase subunit beta) (RNA polymerase subunit beta)</i>				
	126640375	<i>DNA-directed RNA polymerase subunit beta [Acinetobacter baumannii ATCC 17978]</i>				
	126386259	<i>RNA polymerase subunit B [Acinetobacter baumannii ATCC 17978]</i>				
	78099428	<i>RNA polymerase subunit B [Acinetobacter calcoaceticus]</i>				
	78099438	<i>RNA polymerase subunit B [Acinetobacter genomosp. 3]</i>				

#	NCBIInr (gi)	Descripción	Compart. celular	%C	Péptidos únicos	Unused ProtScore
	78099434	RNA polymerase subunit B [<i>Acinetobacter genomosp.</i> 16]				
121	126643091	50S ribosomal protein L22 [<i>Acinetobacter baumannii</i> ATCC 17978]	C	83.52	7	6.1
	126388975	50S ribosomal protein L22 [<i>Acinetobacter baumannii</i> ATCC 17978]				
	81695747	50S ribosomal protein L22				
	50086210	50S ribosomal protein L22 [<i>Acinetobacter sp.</i> ADP1]				
	49532186	50S ribosomal protein L22 [<i>Acinetobacter sp.</i> ADP1]				
122	160166883	50S ribosomal protein L1	-	42.42	11	6.08
	126640372	50S ribosomal protein L1 [<i>Acinetobacter baumannii</i> ATCC 17978]				
	126386256	50S ribosomal protein [<i>Acinetobacter baumannii</i> ATCC 17978]				
123	162286722	preprotein translocase subunit SecA [<i>Acinetobacter baumannii</i> ATCC 17978]	MC, C	24.37	18	6.03
	126388770	preprotein translocase secretion protein of IISP family [<i>Acinetobacter baumannii</i> ATCC 17978]				
124	126643165	putative signal peptide [<i>Acinetobacter baumannii</i> ATCC 17978]	-	72.22	9	6.03
	126389049	putative signal peptide [<i>Acinetobacter baumannii</i> ATCC 17978]				
125	126640218	Acyl-CoA dehydrogenase [<i>Acinetobacter baumannii</i> ATCC 17978]	-	34.38	18	6.02
	126386102	Acyl-CoA dehydrogenase [<i>Acinetobacter baumannii</i> ATCC 17978]				
126	50085463	host factor I for bacteriophage Q beta replication, a growth-related protein [<i>Acinetobacter sp.</i> ADP1]	C	39.08	6	6.01
	49531439	host factor I for bacteriophage Q beta replication, a growth-related protein [<i>Acinetobacter sp.</i> ADP1]				
127	126642663	electron transfer flavoprotein beta-subunit [<i>Acinetobacter baumannii</i> ATCC 17978]	-	49.31	6	6
	126388547	electron transfer flavoprotein beta-subunit [<i>Acinetobacter baumannii</i> ATCC 17978]				
128	158706367	30S ribosomal protein S8	C	52.67	5	6
	126643082	30S ribosomal protein S8 [<i>Acinetobacter baumannii</i> ATCC 17978]				
	126388966	30S ribosomal protein S8 [<i>Acinetobacter baumannii</i> ATCC 17978]				
129	126640257	membrane-bound ATP synthase F1 sector, epsilon-subunit [<i>Acinetobacter baumannii</i> ATCC 17978]	MC, C	51.69	5	6
	126386141	membrane-bound ATP synthase F1 sector, epsilon-subunit [<i>Acinetobacter baumannii</i> ATCC 17978]				
	60389585	ATP synthase epsilon chain (ATP synthase F1 sector epsilon subunit)				
	50083470	membrane-bound ATP synthase, F1 sector, epsilon-subunit [<i>Acinetobacter sp.</i> ADP1]				
	49529446	membrane-bound ATP synthase, F1 sector, epsilon-subunit [<i>Acinetobacter sp.</i> ADP1]				
130	126641187	putative signal peptide [<i>Acinetobacter baumannii</i> ATCC 17978]	-	33.85	4	6

#	NCBI Inr (gi)	Descripción	Compart. celular	%C	Péptidos únicos	Unused ProtScore
	126387071	<i>putative signal peptide [Acinetobacter baumannii ATCC 17978]</i>				
131	126641684	<i>peptidyl-prolyl cis-trans isomerase precursor [Acinetobacter baumannii ATCC 17978]</i>	MC	49.44	10	5.99
	126387568	<i>peptidyl-prolyl cis-trans isomerase precursor [Acinetobacter baumannii ATCC 17978]</i>				
132	158706208	<i>30S ribosomal protein S13</i>	C	50	8	5.95
	126643074	<i>30S ribosomal protein S13 [Acinetobacter baumannii ATCC 17978]</i>				
	126388958	<i>30S ribosomal protein S13 [Acinetobacter baumannii ATCC 17978]</i>				
	81392282	<i>30S ribosomal protein S13</i>				
	50086193	<i>30S ribosomal protein S13 [Acinetobacter sp. ADP1]</i>				
	49532169	<i>30S ribosomal protein S13 [Acinetobacter sp. ADP1]</i>				
133	126641100	<i>putative signal peptide [Acinetobacter baumannii ATCC 17978]</i>	-	47.13	7	5.94
	126386984	<i>putative signal peptide [Acinetobacter baumannii ATCC 17978]</i>				
134	50085213	<i>hypothetical protein ACLAD2092 [Acinetobacter sp. ADP1]</i>	-	26.79	10	5.92
	49531189	<i>conserved hypothetical protein [Acinetobacter sp. ADP1]</i>				
135	126642759	<i>hypothetical protein A1S_2728 [Acinetobacter baumannii ATCC 17978]</i>	-	34.94	7	5.89
	126388643	<i>hypothetical protein A1S_2728 [Acinetobacter baumannii ATCC 17978]</i>				
136	126643125	<i>hypothetical protein A1S_3110 [Acinetobacter baumannii ATCC 17978]</i>	-	26.76	19	5.8
	126389009	<i>hypothetical protein A1S_3110 [Acinetobacter baumannii ATCC 17978]</i>				
137	126641619	<i>hypothetical protein A1S_1574 [Acinetobacter baumannii ATCC 17978]</i>	-	55.42	7	5.79
	126387503	<i>putative membrane protein [Acinetobacter baumannii ATCC 17978]</i>				
138	126642643	<i>putative protease; putative signal peptide peptidase sppA [Acinetobacter baumannii ATCC 17978]</i>	MC	42.6	11	5.7
	126388527	<i>putative protease; putative signal peptide peptidase sppA [Acinetobacter baumannii ATCC 17978]</i>				
139	126640448	<i>general secretion pathway protein G [Acinetobacter baumannii ATCC 17978]</i>	MC	54.4	9	5.7
	126386332	<i>general secretion pathway protein G [Acinetobacter baumannii ATCC 17978]</i>				
140	126641055	<i>putative hemolysin-related protein [Acinetobacter baumannii ATCC 17978]</i>	MC	23.01	7	5.7
	126386939	<i>putative hemolysin-related protein [Acinetobacter baumannii ATCC 17978]</i>				
141	126643086	<i>50S ribosomal protein L14 [Acinetobacter baumannii ATCC 17978]</i>	C	72.13	12	5.66
	126388970	<i>50S ribosomal protein L14 [Acinetobacter baumannii ATCC 17978]</i>				
	81695748	<i>50S ribosomal protein L14</i>				
	50086205	<i>50S ribosomal protein L14 [Acinetobacter sp. ADP1]</i>				

#	NCBIInr (gi)	Descripción	Compart. celular	%C	Péptidos únicos	Unused ProtScore
	49532181	50S ribosomal protein L14 [<i>Acinetobacter</i> sp. ADP1]				
142	126643066	hypothetical protein A1S_3051 [<i>Acinetobacter baumannii</i> ATCC 17978]	-	43.59	8	5.52
	126388950	hypothetical protein A1S_3051 [<i>Acinetobacter baumannii</i> ATCC 17978]				
143	126640944	outer membrane lipoprotein [<i>Acinetobacter baumannii</i> ATCC 17978]	-	86.36	5	5.3
	126386828	outer membrane lipoprotein [<i>Acinetobacter baumannii</i> ATCC 17978]				
144	156632697	NADH-quinone oxidoreductase subunit I (NADH dehydrogenase I subunit I) (NDH-1 subunit I)	MC, C	44.44	10	5.27
	81393674	NADH-quinone oxidoreductase subunit I (NADH dehydrogenase I subunit I) (NDH-1 subunit I)				
	50083956	NADH dehydrogenase subunit I [<i>Acinetobacter</i> sp. ADP1]				
	49529932	NADH dehydrogenase I chain I, 2Fe-2S ferredoxin-related [<i>Acinetobacter</i> sp. ADP1]				
	126640817	NADH dehydrogenase subunit I [<i>Acinetobacter baumannii</i> ATCC 17978]				
	126386701	NADH dehydrogenase I chain I 2Fe-2S ferredoxin-related [<i>Acinetobacter baumannii</i> ATCC 17978]				
145	126641414	Pyruvate ferredoxin/ flavodoxin oxidoreductase [<i>Acinetobacter baumannii</i> ATCC 17978]	-	34.64	6	5.21
	126387298	Pyruvate ferredoxin/ flavodoxin oxidoreductase [<i>Acinetobacter baumannii</i> ATCC 17978]				
146	126640575	hypothetical protein A1S_0504 [<i>Acinetobacter baumannii</i> ATCC 17978]	-	47.14	6	5.19
	126386459	hypothetical protein A1S_0504 [<i>Acinetobacter baumannii</i> ATCC 17978]				
147	126642205	haemin storage system HmsR protein [<i>Acinetobacter baumannii</i> ATCC 17978]	MC	24.23	9	5.16
	126388089	haemin storage system HmsR protein [<i>Acinetobacter baumannii</i> ATCC 17978]				
148	126642648	transport protein of outer membrane lipoproteins [<i>Acinetobacter baumannii</i> ATCC 17978]	MC	58.66	8	5.15
	126388532	transport protein of outer membrane lipoproteins [<i>Acinetobacter baumannii</i> ATCC 17978]				
149	126642216	30S ribosomal protein S6 [<i>Acinetobacter baumannii</i> ATCC 17978]	C	48.6	5	5.05
	126388100	30S ribosomal protein S6 [<i>Acinetobacter baumannii</i> ATCC 17978]				
	61215532	30S ribosomal protein S6				
	50085515	30S ribosomal protein S6 [<i>Acinetobacter</i> sp. ADP1]				
	49531491	30S ribosomal protein S6 [<i>Acinetobacter</i> sp. ADP1]				
150	126640202	D-amino acid dehydrogenase small subunit [<i>Acinetobacter baumannii</i> ATCC 17978]	MC	25.99	7	4.96
	126386086	D-amino acid dehydrogenase [<i>Acinetobacter baumannii</i> ATCC 17978]				
151	126642300	putative signal peptide [<i>Acinetobacter baumannii</i> ATCC 17978]	-	64.96	9	4.89

#	NCBI Inr (gi)	Descripción	Compart. celular	%C	Péptidos únicos	Unused ProtScore
	126388184	<i>putative signal peptide [Acinetobacter baumannii ATCC 17978]</i>				
152	126641415	<i>putative oxidoreductase protein [Acinetobacter baumannii ATCC 17978]</i>	-	40.82	15	4.76
	126387299	<i>putative oxidoreductase protein [Acinetobacter baumannii ATCC 17978]</i>				
153	126640173	<i>hypothetical protein A1S_0060 [Acinetobacter baumannii ATCC 17978]</i>	-	23.53	8	4.75
	126386057	<i>hypothetical protein A1S_0060 [Acinetobacter baumannii ATCC 17978]</i>				
154	59798697	<i>30S ribosomal protein S11</i>	C	46.09	6	4.74
	50086192	<i>30S ribosomal protein S11 [Acinetobacter sp. ADP1]</i>				
	49532168	<i>30S ribosomal protein S11 [Acinetobacter sp. ADP1]</i>				
	152060565	<i>30S ribosomal protein S11</i>				
	126643073	<i>30S ribosomal protein S11 [Acinetobacter baumannii ATCC 17978]</i>				
	126388957	<i>30S ribosomal protein S11 [Acinetobacter baumannii ATCC 17978]</i>				
155	126642762	<i>50S ribosomal protein L21 [Acinetobacter baumannii ATCC 17978]</i>	-	69.62	4	4.74
	126388646	<i>50S ribosomal protein L21 [Acinetobacter baumannii ATCC 17978]</i>				
156	148839593	<i>Outer membrane protein omp38 precursor</i>	ME	96.63	152	4.73
	126642864	<i>outer membrane protein A [Acinetobacter baumannii ATCC 17978]</i>				
	126388748	<i>outer membrane protein A [Acinetobacter baumannii ATCC 17978]</i>				
157	126642904	<i>putative signal peptide [Acinetobacter baumannii ATCC 17978]</i>	-	23.98	5	4.64
	126388788	<i>putative signal peptide [Acinetobacter baumannii ATCC 17978]</i>				
158	126642245	<i>L-sorbose dehydrogenase [Acinetobacter baumannii ATCC 17978]</i>	MC	47.59	14	4.63
	126388129	<i>L-sorbose dehydrogenase [Acinetobacter baumannii ATCC 17978]</i>				
159	126640854	<i>putative cell division protein (ZipA-like) [Acinetobacter baumannii ATCC 17978]</i>	-	22.84	7	4.44
	126386738	<i>putative cell division protein (ZipA-like) [Acinetobacter baumannii ATCC 17978]</i>				
160	37933549	<i>CsuC [Acinetobacter baumannii]</i>	-	41.52	10	4.31
	126642260	<i>CsuC [Acinetobacter baumannii ATCC 17978]</i>				
	126388144	<i>CsuC [Acinetobacter baumannii ATCC 17978]</i>				
161	126641957	<i>hypothetical protein A1S_1912 [Acinetobacter baumannii ATCC 17978]</i>	-	44.7	8	4.31
	126387841	<i>hypothetical protein A1S_1912 [Acinetobacter baumannii ATCC 17978]</i>				
162	126640182	<i>L-lactate dehydrogenase FMN linked [Acinetobacter baumannii ATCC 17978]</i>	-	30.09	11	4.26
	126386066	<i>L-lactate dehydrogenase FMN linked [Acinetobacter baumannii ATCC 17978]</i>				
163	126640627	<i>hypothetical protein A1S_0556 [Acinetobacter baumannii ATCC 17978]</i>	-	30.18	7	4.26
	126386511	<i>hypothetical protein A1S_0556 [Acinetobacter baumannii ATCC 17978]</i>				

#	NCBIInr (gi)	Descripción	Compart. celular	%C	Péptidos únicos	Unused ProtScore
164	126642705	<i>MFS permease [Acinetobacter baumannii ATCC 17978]</i>	MC	21.64	6	4.23
	126388589	<i>MFS permease [Acinetobacter baumannii ATCC 17978]</i>				
165	126640383	<i>hypothetical protein A1S_0297 [Acinetobacter baumannii ATCC 17978]</i>	ME	20.56	8	4.2
	126386267	<i>hypothetical protein A1S_0297 [Acinetobacter baumannii ATCC 17978]</i>				
166	126640296	<i>putative outer membrane protein [Acinetobacter baumannii ATCC 17978]</i>	ME	23.11	9	4.14
	126386180	<i>putative outer membrane protein [Acinetobacter baumannii ATCC 17978]</i>				
167	126643023	<i>hypothetical protein A1S_3004 [Acinetobacter baumannii ATCC 17978]</i>	-	30.6	4	4.14
	126388907	<i>hypothetical protein A1S_3004 [Acinetobacter baumannii ATCC 17978]</i>				
168	126642389	<i>glutamine synthetase [Acinetobacter baumannii ATCC 17978]</i>	C	57.09	11	4.1
	126388273	<i>glutamine synthetase [Acinetobacter baumannii ATCC 17978]</i>				
169	126642936	<i>putative preprotein translocase IISF family membrane subunit [Acinetobacter baumannii ATCC 17978]</i>	MC	63.1	4	4.04
	126388820	<i>putative preprotein translocase IISF family membrane subunit [Acinetobacter baumannii ATCC 17978]</i>				
170	50085756	<i>hypothetical protein ACLAD2690 [Acinetobacter sp. ADP1]</i>	-	53.82	37	4.02
	49531732	<i>conserved hypothetical protein; putative secretion system (EspB) [Acinetobacter sp. ADP1]</i>				
171	126642752	<i>hypothetical protein A1S_2721 [Acinetobacter baumannii ATCC 17978]</i>	MC	31.82	9	4.02
	126388636	<i>putative membrane protein [Acinetobacter baumannii ATCC 17978]</i>				
172	126641080	<i>DNA-binding ATP-dependent protease La [Acinetobacter baumannii ATCC 17978]</i>	C	33.53	16	4.01
	126386964	<i>DNA-binding ATP-dependent protease La [Acinetobacter baumannii ATCC 17978]</i>				
173	126642629	<i>tolerance to colicins E2 E, A, and K [Acinetobacter baumannii ATCC 17978]</i>	P	21.26	9	4.01
	126388513	<i>tolerance to colicins E2 E, A, and K [Acinetobacter baumannii ATCC 17978]</i>				
174	126640822	<i>NADH dehydrogenase I chain N [Acinetobacter baumannii ATCC 17978]</i>	MC	13.35	9	4.01
	126386706	<i>NADH dehydrogenase I chain N [Acinetobacter baumannii ATCC 17978]</i>				
175	126642236	<i>putative lipoprotein [Acinetobacter baumannii ATCC 17978]</i>	-	29.29	3	4.01
	126388120	<i>putative lipoprotein [Acinetobacter baumannii ATCC 17978]</i>				
176	126640364	<i>putative general secretion pathway protein [Acinetobacter baumannii ATCC 17978]</i>	ME	30.28	13	4
	126386248	<i>putative general secretion pathway protein [Acinetobacter baumannii ATCC 17978]</i>				
177	126640675	<i>acetyl-coenzyme A carboxylase carboxyl transferase (alpha subunit) [Acinetobacter baumannii ATCC 17978]</i>	C	49.55	8	4

#	NCBIInr (gi)	Descripción	Compart. celular	%C	Péptidos únicos	Unused ProtScore
	126386559	<i>acetyl-coenzyme A carboxylase carboxyl transferase (alpha subunit) [Acinetobacter baumannii ATCC 17978]</i>				
	50086048	<i>acetyl-coenzyme A carboxylase carboxyl transferase (alpha subunit) [Acinetobacter sp. ADP1]</i>				
	49532024	<i>acetyl-coenzyme A carboxylase carboxyl transferase (alpha subunit) [Acinetobacter sp. ADP1]</i>				
178	126641597	<i>chromosome partitioning protein [Acinetobacter baumannii ATCC 17978]</i>	C	37.1	7	4
	126387481	<i>chromosome partitioning protein [Acinetobacter baumannii ATCC 17978]</i>				
	50085456	<i>chromosome partitioning protein [Acinetobacter sp. ADP1]</i>				
	49531432	<i>chromosome partitioning protein [Acinetobacter sp. ADP1]</i>				
179	126640232	<i>hypothetical protein A1S_0129 [Acinetobacter baumannii ATCC 17978]</i>	MC	17.78	7	4
	126386116	<i>hypothetical protein A1S_0129 [Acinetobacter baumannii ATCC 17978]</i>				
180	126640253	<i>membrane-bound ATP synthase F1 sector, delta-subunit [Acinetobacter baumannii ATCC 17978]</i>	C	63.45	6	4
	126386137	<i>membrane-bound ATP synthase F1 sector, delta-subunit [Acinetobacter baumannii ATCC 17978]</i>				
181	50086234	<i>magnesium and cobalt transport protein [Acinetobacter sp. ADP1]</i>	MC	19.34	4	4
	49532210	<i>magnesium and cobalt transport protein [Acinetobacter sp. ADP1]</i>				
	126643113	<i>magnesium and cobalt transport protein [Acinetobacter baumannii ATCC 17978]</i>				
	126388997	<i>magnesium and cobalt transport protein [Acinetobacter baumannii ATCC 17978]</i>				
182	126640887	<i>outer-membrane lipoprotein precursor [Acinetobacter baumannii ATCC 17978]</i>	-	22.4	4	4
	126386771	<i>outer-membrane lipoprotein precursor [Acinetobacter baumannii ATCC 17978]</i>				
183	126642833	<i>bacteriolytic lipoprotein entericidin B [Acinetobacter baumannii ATCC 17978]</i>	-	51.06	3	4
	126388717	<i>bacteriolytic lipoprotein entericidin B [Acinetobacter baumannii ATCC 17978]</i>				
184	126640811	<i>NADH dehydrogenase I chain B [Acinetobacter baumannii ATCC 17978]</i>	MC	25.93	3	4
	126386695	<i>NADH dehydrogenase I chain B [Acinetobacter baumannii ATCC 17978]</i>				
	50083950	<i>NADH dehydrogenase subunit B [Acinetobacter sp. ADP1]</i>				
	49529926	<i>NADH dehydrogenase I chain B [Acinetobacter sp. ADP1]</i>				
185	126640492	<i>hypothetical protein A1S_0419 [Acinetobacter baumannii ATCC 17978]</i>	-	21.89	3	4
	126386376	<i>hypothetical protein A1S_0419 [Acinetobacter baumannii ATCC 17978]</i>				

#	NCBIInr (gi)	Descripción	Compart. celular	%C	Péptidos únicos	Unused ProtScore
186	126640426	2-octaprenylphenol hydroxylase of ubiquinone biosynthetic pathway [<i>Acinetobacter baumannii</i> ATCC 17978]	MC	19.08	7	3.93
	126386310	2-octaprenylphenol hydroxylase of ubiquinone biosynthetic pathway [<i>Acinetobacter baumannii</i> ATCC 17978]				
187	126643081	50S ribosomal protein L6 [<i>Acinetobacter baumannii</i> ATCC 17978]	-	40.79	5	3.89
	126388965	50S ribosomal protein L6 [<i>Acinetobacter baumannii</i> ATCC 17978]				
188	52783351	30S ribosomal protein S12	C	59.68	11	3.87
	50084092	30S ribosomal protein S12 [<i>Acinetobacter</i> sp. ADP1]				
	49530068	30S ribosomal protein S12 [<i>Acinetobacter</i> sp. ADP1]				
	162286748	30S ribosomal protein S12 [<i>Acinetobacter baumannii</i> ATCC 17978]				
	158513668	30S ribosomal protein S12				
	126386800	30S ribosomal protein S12 [<i>Acinetobacter baumannii</i> ATCC 17978]				
189	126642537	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase [<i>Acinetobacter baumannii</i> ATCC 17978]	C	25.05	13	3.72
	126388421	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase [<i>Acinetobacter baumannii</i> ATCC 17978]				
190	126640915	hypothetical protein A1S_0865 [<i>Acinetobacter baumannii</i> ATCC 17978]	-	23.31	7	3.7
	126386799	hypothetical protein A1S_0865 [<i>Acinetobacter baumannii</i> ATCC 17978]				
191	126643199	putative signal peptide [<i>Acinetobacter baumannii</i> ATCC 17978]	-	44.29	6	3.7
	126389083	putative signal peptide [<i>Acinetobacter baumannii</i> ATCC 17978]				
192	126640601	hypothetical protein A1S_0530 [<i>Acinetobacter baumannii</i> ATCC 17978]	-	48.39	4	3.7
	126386485	hypothetical protein A1S_0530 [<i>Acinetobacter baumannii</i> ATCC 17978]				
	50086124	hypothetical protein ACLAD3120 [<i>Acinetobacter</i> sp. ADP1]				
	49532100	conserved hypothetical protein [<i>Acinetobacter</i> sp. ADP1]				
193	126642788	hypothetical protein A1S_2757 [<i>Acinetobacter baumannii</i> ATCC 17978]	-	24.14	2	3.7
	126388672	putative membrane protein [<i>Acinetobacter baumannii</i> ATCC 17978]				
194	126640333	thiol:disulfide interchange protein [<i>Acinetobacter baumannii</i> ATCC 17978]	P	74.3	10	3.56
	126386217	thiol:disulfide interchange protein [<i>Acinetobacter baumannii</i> ATCC 17978]				
	50083542	thiol:disulfide interchange protein [<i>Acinetobacter</i> sp. ADP1]				
	49529518	thiol:disulfide interchange protein [<i>Acinetobacter</i> sp. ADP1]				
195	126642294	dihydroorotate dehydrogenase 2 [<i>Acinetobacter baumannii</i> ATCC 17978]	MC	38.06	7	3.52
	126388178	dihydroorotate oxydase [<i>Acinetobacter baumannii</i> ATCC 17978]				

#	NCBIInr (gi)	Descripción	Compart. celular	%C	Péptidos únicos	Unused ProtScore
	73913668	<i>Dihydroorotate dehydrogenase (Dihydroorotate oxidase) (DHObase) (DHODase) (DHOD)</i>				
	50084503	<i>dihydroorotate dehydrogenase 2 [Acinetobacter sp. ADP1]</i>				
	49530479	<i>dihydroorotate oxydase [Acinetobacter sp. ADP1]</i>				
196	126643052	<i>putative ribonuclease (Rbn) [Acinetobacter baumannii ATCC 17978]</i>	MC	15.85	5	3.52
	126388936	<i>putative ribonuclease (Rbn) [Acinetobacter baumannii ATCC 17978]</i>				
197	126642091	<i>putative ferredoxin-dependent glutamate synthase [Acinetobacter baumannii ATCC 17978]</i>	-	30.52	4	3.4
	126387975	<i>putative ferredoxin-dependent glutamate synthase [Acinetobacter baumannii ATCC 17978]</i>				
	50085073	<i>putative ferredoxin-dependent glutamate synthase. [Acinetobacter sp. ADP1]</i>				
	49531049	<i>putative glutamate synthase. [Acinetobacter sp. ADP1]</i>				
198	126642890	<i>hypothetical protein A1S_2866 [Acinetobacter baumannii ATCC 17978]</i>	ME, E	34.46	9	3.3
	126388774	<i>hypothetical protein A1S_2866 [Acinetobacter baumannii ATCC 17978]</i>				
	50083877	<i>hypothetical protein ACLAD0645 [Acinetobacter sp. ADP1]</i>				
	49529853	<i>conserved hypothetical protein [Acinetobacter sp. ADP1]</i>				
199	7532784	<i>outer membrane protein [Acinetobacter sp.]</i>	ME	57.34	71	3.19
200	126640228	<i>hypothetical protein A1S_0125 [Acinetobacter baumannii ATCC 17978]</i>	-	33.33	3	3.1
	126386112	<i>hypothetical protein A1S_0125 [Acinetobacter baumannii ATCC 17978]</i>				
201	126643305	<i>putative high affinity choline transport protein (Bet-like) [Acinetobacter baumannii ATCC 17978]</i>	MC	22.76	9	3.08
	126389189	<i>putative high affinity choline transport protein (Bet-like) [Acinetobacter baumannii ATCC 17978]</i>				
202	126641356	<i>hypothetical protein A1S_1310 [Acinetobacter baumannii ATCC 17978]</i>	-	28.84	6	3.06
	126387240	<i>hypothetical protein A1S_1310 [Acinetobacter baumannii ATCC 17978]</i>				
	50085762	<i>hypothetical protein ACLAD2697 [Acinetobacter sp. ADP1]</i>				
	49531738	<i>conserved hypothetical protein [Acinetobacter sp. ADP1]</i>				
203	126640220	<i>Amino acid adenylation [Acinetobacter baumannii ATCC 17978]</i>	MC	15.07	13	3.05
	126386104	<i>Amino acid adenylation [Acinetobacter baumannii ATCC 17978]</i>				
204	54036348	<i>30S ribosomal protein S19</i>	C	37.36	5	3.05
	50086211	<i>30S ribosomal protein S19 [Acinetobacter sp. ADP1]</i>				
	49532187	<i>30S ribosomal protein S19 [Acinetobacter sp. ADP1]</i>				
205	126640856	<i>bacterioferritin [Acinetobacter baumannii ATCC 17978]</i>	C	42.86	6	3.01

#	NCBIInr (gi)	Descripción	Compart. celular	%C	Péptidos únicos	Unused ProtScore
	126386740	<i>bacterioferritin</i> [<i>Acinetobacter baumannii</i> ATCC 17978]				
	50084064	<i>bacterioferritin</i> [<i>Acinetobacter</i> sp. ADP1]				
	49530040	<i>bacterioferritin</i> [<i>Acinetobacter</i> sp. ADP1]				
206	126642662	<i>electron transfer flavoprotein alpha-subunit</i> [<i>Acinetobacter baumannii</i> ATCC 17978]	-	35.32	7	3
	126388546	<i>electron transfer flavoprotein alpha-subunit</i> [<i>Acinetobacter baumannii</i> ATCC 17978]				
	50085723	<i>electron transfer flavoprotein alpha-subunit</i> [<i>Acinetobacter</i> sp. ADP1]				
	49531699	<i>electron transfer flavoprotein alpha-subunit</i> [<i>Acinetobacter</i> sp. ADP1]				
207	126641294	<i>hypothetical protein A1S_1248</i> [<i>Acinetobacter baumannii</i> ATCC 17978]	-	15.25	6	2.89
	126387178	<i>hypothetical protein A1S_1248</i> [<i>Acinetobacter baumannii</i> ATCC 17978]				
208	126640392	<i>beta-hydroxylase</i> [<i>Acinetobacter baumannii</i> ATCC 17978]	-	33.46	6	2.77
	126386276	<i>beta-hydroxylase</i> [<i>Acinetobacter baumannii</i> ATCC 17978]				
209	126640918	<i>elongation factor G</i> [<i>Acinetobacter baumannii</i> ATCC 17978]	C	23.83	11	2.63
	126386802	<i>protein chain elongation factor EF-G GTP-binding</i> [<i>Acinetobacter baumannii</i> ATCC 17978]				
210	126642491	<i>putative signal peptide</i> [<i>Acinetobacter baumannii</i> ATCC 17978]	-	33.8	5	2.63
	126388375	<i>putative signal peptide</i> [<i>Acinetobacter baumannii</i> ATCC 17978]				
211	126640165	<i>WecC protein</i> [<i>Acinetobacter baumannii</i> ATCC 17978]	C	22.03	6	2.6
	126386049	<i>WecC protein</i> [<i>Acinetobacter baumannii</i> ATCC 17978]				
212	126642326	<i>hypothetical protein A1S_2285</i> [<i>Acinetobacter baumannii</i> ATCC 17978]	P	23.53	4	2.59
	126388210	<i>hypothetical protein A1S_2285</i> [<i>Acinetobacter baumannii</i> ATCC 17978]				
213	126643207	<i>putative penicillin binding protein (PonA)</i> [<i>Acinetobacter baumannii</i> ATCC 17978]	E	25.53	11	2.58
	126389091	<i>putative penicillin binding protein (PonA)</i> [<i>Acinetobacter baumannii</i> ATCC 17978]				
214	81613022	<i>50S ribosomal protein L16</i>	C	56.93	10	2.55
	50086208	<i>50S ribosomal protein L16</i> [<i>Acinetobacter</i> sp. ADP1]				
	49532184	<i>50S ribosomal protein L16</i> [<i>Acinetobacter</i> sp. ADP1]				
215	141770	<i>citrate synthase precursor</i>	C	23.82	7	2.54
	116463	<i>Citrate synthase</i>				
	126642741	<i>hypothetical protein A1S_2710</i> [<i>Acinetobacter baumannii</i> ATCC 17978]				
	126388625	<i>hypothetical protein A1S_2710</i> [<i>Acinetobacter baumannii</i> ATCC 17978]				
216	126641347	<i>hypothetical protein A1S_1301</i> [<i>Acinetobacter baumannii</i> ATCC 17978]	-	11.4	4	2.51
	126387231	<i>putative membrane protein</i> [<i>Acinetobacter baumannii</i> ATCC 17978]				

#	NCBIInr (gi)	Descripción	Compart. celular	%C	Péptidos únicos	Unused ProtScore
217	126642023	<i>response regulator protein [Acinetobacter baumannii ATCC 17978]</i>	C	16.15	6	2.48
	126387907	<i>response regulator protein [Acinetobacter baumannii ATCC 17978]</i>				
	50084547	<i>response regulator in two-component regulatory system with GlnL, nitrogen regulation (EBP family) [Acinetobacter sp. ADP1]</i>				
	49530523	<i>response regulator in two-component regulatory system with GlnL, nitrogen regulation (EBP family) [Acinetobacter sp. ADP1]</i>				
218	126641662	<i>30S ribosomal protein S20 [Acinetobacter baumannii ATCC 17978]</i>	C	71.59	7	2.45
	126387546	<i>30S ribosomal protein S20 [Acinetobacter baumannii ATCC 17978]</i>				
219	126640240	<i>hypothetical protein A1S_0137 [Acinetobacter baumannii ATCC 17978]</i>	-	30.77	2	2.44
	126386124	<i>hypothetical protein A1S_0137 [Acinetobacter baumannii ATCC 17978]</i>				
220	126641992	<i>phosphotransferase system fructose-specific IIBC component [Acinetobacter baumannii ATCC 17978]</i>	MC	12	3	2.4
	126387876	<i>phosphotransferase system fructose-specific IIBC component [Acinetobacter baumannii ATCC 17978]</i>				
221	88758886	<i>putative RND family drug transporter [Acinetobacter baumannii]</i>	ME	15.09	8	2.38
	126640606	<i>putative RND family drug transporter [Acinetobacter baumannii ATCC 17978]</i>				
	126386490	<i>putative RND family drug transporter [Acinetobacter baumannii ATCC 17978]</i>				
222	126640249	<i>F0F1 ATP synthase subunit A [Acinetobacter baumannii ATCC 17978]</i>	MC	23.31	6	2.38
	126386133	<i>membrane-bound ATP synthase F0 sector, subunit a [Acinetobacter baumannii ATCC 17978]</i>				
223	81613002	<i>30S ribosomal protein S16</i>	C	54.12	4	2.38
	50086298	<i>30S ribosomal protein S16 [Acinetobacter sp. ADP1]</i>				
	49532274	<i>30S ribosomal protein S16 [Acinetobacter sp. ADP1]</i>				
	126643179	<i>30S ribosomal protein S16 [Acinetobacter baumannii ATCC 17978]</i>				
	126389063	<i>30S ribosomal protein S16 [Acinetobacter baumannii ATCC 17978]</i>				
224	126641113	<i>TonB-dependent siderophore receptor [Acinetobacter baumannii ATCC 17978]</i>	ME	27.13	12	2.37
	126386997	<i>TonB-dependent siderophore receptor [Acinetobacter baumannii ATCC 17978]</i>				
225	126640172	<i>putative glycosyltransferase [Acinetobacter baumannii ATCC 17978]</i>	-	31.13	7	2.32
	126386056	<i>putative glycosyltransferase [Acinetobacter baumannii ATCC 17978]</i>				
226	126643432	<i>phosphoribosylaminoimidazole-succinocarboxamide synthase [Acinetobacter baumannii ATCC 17978]</i>	-	41.76	5	2.28

#	NCBIInr (gi)	Descripción	Compart. celular	%C	Péptidos únicos	Unused ProtScore
	126389316	<i>phosphoribosylaminoimidazole-succinocarboxamide synthase</i> [<i>Acinetobacter baumannii</i> ATCC 17978]				
227	126641617	<i>30S ribosomal protein S1</i> [<i>Acinetobacter baumannii</i> ATCC 17978]	C	17.12	7	2.21
	126387501	<i>30S ribosomal protein S1</i> [<i>Acinetobacter baumannii</i> ATCC 17978]				
228	50084848	<i>acyl-CoA dehydrogenase</i> [<i>Acinetobacter</i> sp. ADP1]	C	30.47	11	2.18
	49530824	<i>acyl-CoA dehydrogenase</i> [<i>Acinetobacter</i> sp. ADP1]				
	15812042	<i>DcaA</i> [<i>Acinetobacter</i> sp. ADP1]				
229	126642453	<i>starvation-induced peptide utilization protein</i> [<i>Acinetobacter baumannii</i> ATCC 17978]	MC	34.75	4	2.17
	126388337	<i>starvation-induced peptide utilization protein</i> [<i>Acinetobacter baumannii</i> ATCC 17978]				
230	50086524	<i>6,7-dimethyl-8-ribityllumazine synthase (Lumazine synthase)(riboflavin synthase beta chain)</i> [<i>Acinetobacter</i> sp. ADP1]	-	81.41	9	2.12
	49532500	<i>6,7-dimethyl-8-ribityllumazine synthase (Lumazine synthase)(riboflavin synthase beta chain)</i> [<i>Acinetobacter</i> sp. ADP1]				
231	126642872	<i>glucose dehydrogenase</i> [<i>Acinetobacter baumannii</i> ATCC 17978]	P	41.73	11	2.12
	126388756	<i>glucose dehydrogenase</i> [<i>Acinetobacter baumannii</i> ATCC 17978]				
232	126643000	<i>tRNA modification GTPase TrmE</i> [<i>Acinetobacter baumannii</i> ATCC 17978]	MC, C	34.73	10	2.12
	126388884	<i>tRNA modification GTPase</i> [<i>Acinetobacter baumannii</i> ATCC 17978]				
233	126642811	<i>rod shape-determining protein</i> [<i>Acinetobacter baumannii</i> ATCC 17978]	C	34.62	9	2.12
	126388695	<i>rod shape-determining protein</i> [<i>Acinetobacter baumannii</i> ATCC 17978]				
234	126640974	<i>choline dehydrogenase</i> [<i>Acinetobacter baumannii</i> ATCC 17978]	MC	17.16	4	2.09
	126386858	<i>choline dehydrogenase</i> [<i>Acinetobacter baumannii</i> ATCC 17978]				
235	126640321	<i>hypothetical protein A1S_0228</i> [<i>Acinetobacter baumannii</i> ATCC 17978]	MC	19.35	5	2.07
	126386205	<i>putative membrane protein</i> [<i>Acinetobacter baumannii</i> ATCC 17978]				
236	126643194	<i>hypothetical protein A1S_3179</i> [<i>Acinetobacter baumannii</i> ATCC 17978]	MC	40.43	7	2.05
	126389078	<i>putative membrane protein</i> [<i>Acinetobacter baumannii</i> ATCC 17978]				
237	126641070	<i>penicillin-binding protein 2</i> [<i>Acinetobacter baumannii</i> ATCC 17978]	MC	31.78	14	2.04
	126386954	<i>penicillin-binding protein 2</i> [<i>Acinetobacter baumannii</i> ATCC 17978]				
238	126642916	<i>putative TonB-dependent receptor protein</i> [<i>Acinetobacter baumannii</i> ATCC 17978]	ME	22.53	10	2.04
	126388800	<i>putative TonB-dependent receptor protein</i> [<i>Acinetobacter baumannii</i> ATCC 17978]				
239	50085757	<i>hypothetical protein ACLAD2691</i> [<i>Acinetobacter</i> sp. ADP1]	-	33.14	7	2.03

#	NCBIInr (gi)	Descripción	Compart. celular	%C	Péptidos únicos	Unused ProtScore
	49531733	<i>conserved hypothetical protein; putative secretion system (EvpA) [Acinetobacter sp. ADP1]</i>				
240	126641349	<i>hypothetical protein A1S_1303 [Acinetobacter baumannii ATCC 17978]</i>	-	38.83	11	2.03
	126387233	<i>putative membrane protein [Acinetobacter baumannii ATCC 17978]</i>				
241	126642823	<i>putative amino-acid transport protein [Acinetobacter baumannii ATCC 17978]</i>	MC	19.96	10	2.03
	126388707	<i>putative amino-acid transport protein [Acinetobacter baumannii ATCC 17978]</i>				
242	81827372	<i>50S ribosomal protein L3</i>	C	56.6	9	2.03
	50086215	<i>50S ribosomal protein L3 [Acinetobacter sp. ADP1]</i>				
	49532191	<i>50S ribosomal protein L3 [Acinetobacter sp. ADP1]</i>				
	126643095	<i>50S ribosomal protein L3 [Acinetobacter baumannii ATCC 17978]</i>				
	126388979	<i>50S ribosomal protein L3 [Acinetobacter baumannii ATCC 17978]</i>				
243	126643019	<i>50S ribosomal protein L13 [Acinetobacter baumannii ATCC 17978]</i>	C	40.85	4	2.03
	126388903	<i>50S ribosomal protein L13 [Acinetobacter baumannii ATCC 17978]</i>				
244	126640336	<i>putative ferrous iron transport protein B [Acinetobacter baumannii ATCC 17978]</i>	MC	23.67	12	2.02
	126386220	<i>putative ferrous iron transport protein B [Acinetobacter baumannii ATCC 17978]</i>				
245	126640572	<i>hypothetical protein A1S_0501 [Acinetobacter baumannii ATCC 17978]</i>	-	35.05	5	2.02
	126386456	<i>hypothetical protein A1S_0501 [Acinetobacter baumannii ATCC 17978]</i>				
246	126641319	<i>hypothetical protein A1S_1273 [Acinetobacter baumannii ATCC 17978]</i>	-	44.76	4	2.02
	126387203	<i>hypothetical protein A1S_1273 [Acinetobacter baumannii ATCC 17978]</i>				
247	50084413	<i>D-ala-D-ala-carboxypeptidase; penicillin-binding protein 5 (precursor) [Acinetobacter sp. ADP1]</i>	MC, E	34.29	12	2.01
	49530389	<i>D-ala-D-ala-carboxypeptidase; penicillin-binding protein 5 (precursor) [Acinetobacter sp. ADP1]</i>				
248	50083568	<i>putative general secretion pathway protein [Acinetobacter sp. ADP1]</i>	ME	27.59	14	2.01
	49529544	<i>putative general secretion pathway protein [Acinetobacter sp. ADP1]</i>				
249	126642747	<i>dihydrolipoamide succinyltransferase component of 2-oxoglutarate dehydrogenase complex (E2) [Acinetobacter baumannii ATCC 17978]</i>	C	43.7	14	2.01
	126388631	<i>dihydrolipoamide succinyltransferase component of 2-oxoglutarate dehydrogenase complex (E2) [Acinetobacter baumannii ATCC 17978]</i>				
250	126642915	<i>putative phospholipase D endonuclease domain [Acinetobacter baumannii ATCC 17978]</i>	-	31.02	11	2.01
	126388799	<i>putative phospholipase D endonuclease domain [Acinetobacter baumannii ATCC 17978]</i>				
251	126640289	<i>hypothetical protein A1S_0190 [Acinetobacter baumannii ATCC 17978]</i>	MC	23.09	8	2.01
	126386173	<i>putative membrane protein [Acinetobacter baumannii ATCC 17978]</i>				

#	NCBIInr (gi)	Descripción	Compart. celular	%C	Péptidos únicos	Unused ProtScore
252	126643435	<i>putative glucose dehydrogenase precursor</i> [<i>Acinetobacter baumannii</i> ATCC 17978]	-	13.9	6	2.01
	126389319	<i>putative glucose dehydrogenase precursor</i> [<i>Acinetobacter baumannii</i> ATCC 17978]				
253	50085918	<i>succinate dehydrogenase flavoprotein subunit</i> [<i>Acinetobacter</i> sp. ADP1]	MC	43.51	28	2
	49531894	<i>succinate dehydrogenase, flavoprotein subunit</i> [<i>Acinetobacter</i> sp. ADP1]				
254	50085990	<i>conserved hypothetical protein; putative membrane protease subunit</i> [Acinetobacter sp. ADP1]	-	57.19	16	2
	49531966	<i>conserved hypothetical protein; putative membrane protease subunit</i> [Acinetobacter sp. ADP1]				
255	50085388	<i>cytochrome d terminal oxidase, polypeptide subunit I</i> [Acinetobacter sp. ADP1]	MC	16.45	11	2
	49531364	<i>cytochrome d terminal oxidase, polypeptide subunit I</i> [Acinetobacter sp. ADP1]				
256	50083953	<i>NADH dehydrogenase I chain F</i> [Acinetobacter sp. ADP1]	-	34.09	11	2
	49529929	<i>NADH dehydrogenase I chain F</i> [Acinetobacter sp. ADP1]				
257	50084528	<i>HtrA-like serine protease</i> [Acinetobacter sp. ADP1]	P	48.21	12	2
	49530504	<i>HtrA-like serine protease</i> [Acinetobacter sp. ADP1]				
258	6009986	<i>protein tyrosine kinase</i> [Acinetobacter <i>hwoffii</i>]	MC	25.9	14	2
259	50086363	<i>sensory histidine kinase in two-component regulatory system with OmpR</i> [Acinetobacter sp. ADP1]	MC	27.01	11	2
	49532339	<i>sensory histidine kinase in two-component regulatory system with OmpR</i> [Acinetobacter sp. ADP1]				
	126643238	<i>sensory histidine kinase (OmpR)</i> [Acinetobacter <i>baumannii</i> ATCC 17978]				
	126389122	<i>sensory histidine kinase (OmpR)</i> [Acinetobacter <i>baumannii</i> ATCC 17978]				
260	126641054	<i>citrate transporter</i> [Acinetobacter <i>baumannii</i> ATCC 17978]	MC	16.32	7	2
	126386938	<i>citrate transporter</i> [Acinetobacter <i>baumannii</i> ATCC 17978]				
261	81695907	<i>Choline dehydrogenase (CHD) (CDH)</i>	MC	30.38	13	2
	50084211	<i>choline dehydrogenase</i> [Acinetobacter sp. ADP1]				
	49530187	<i>choline dehydrogenase, a flavoprotein</i> [Acinetobacter sp. ADP1]				
	126640976	<i>choline dehydrogenase</i> [Acinetobacter <i>baumannii</i> ATCC 17978]				
	126386860	<i>choline dehydrogenase</i> [Acinetobacter <i>baumannii</i> ATCC 17978]				
262	155029840	<i>hypothetical protein A1S_3619</i> [Acinetobacter <i>baumannii</i> ATCC 17978]	-	21.59	9	2
263	155030006	<i>hypothetical protein A1S_3785</i> [Acinetobacter <i>baumannii</i> ATCC 17978]	C			2
264	126641339	<i>hypothetical protein A1S_1293</i> [Acinetobacter <i>baumannii</i> ATCC 17978]	-	53.06	3	2
	126387223	<i>hypothetical protein A1S_1293</i> [Acinetobacter <i>baumannii</i> ATCC 17978]				

#	NCBIInr (gi)	Descripción	Compart. celular	%C	Péptidos únicos	Unused ProtScore
265	126643119	<i>putative ATP-dependent RNA helicase</i> [<i>Acinetobacter baumannii</i> ATCC 17978]	C	20.16	12	2
	126389003	<i>putative ATP-dependent RNA helicase</i> [<i>Acinetobacter baumannii</i> ATCC 17978]				
266	50086364	<i>putative acetyl-CoA hydrolase/transferase</i> [<i>Acinetobacter</i> sp. ADP1]	-	18.45	10	2
	49532340	<i>putative acetyl-CoA hydrolase/transferase</i> [<i>Acinetobacter</i> sp. ADP1]				
	126643239	<i>putative acetyl-CoA hydrolase/transferase</i> [<i>Acinetobacter baumannii</i> ATCC 17978]				
	126389123	<i>putative acetyl-CoA hydrolase/transferase</i> [<i>Acinetobacter baumannii</i> ATCC 17978]				
267	50084542	<i>ATP-binding protease component</i> [<i>Acinetobacter</i> sp. ADP1]	C	13.72	10	2
	49530518	<i>ATP-binding protease component</i> [<i>Acinetobacter</i> sp. ADP1]				
	126641955	<i>ATP-binding protease component</i> [<i>Acinetobacter</i> <i>baumannii</i> ATCC 17978]				
	126387839	<i>ATP-binding protease component</i> [<i>Acinetobacter</i> <i>baumannii</i> ATCC 17978]				
268	126643080	<i>50S ribosomal protein L18</i> [<i>Acinetobacter</i> <i>baumannii</i> ATCC 17978]	C	71	10	2
	126388964	<i>50S ribosomal protein L18</i> [<i>Acinetobacter</i> <i>baumannii</i> ATCC 17978]				
269	57491218	<i>carbapenem-hydrolyzing oxacillinase OXA-75</i> [<i>Acinetobacter baumannii</i>]	-	41.24	9	2
	115252907	<i>Betalactamase</i> [<i>Acinetobacter baumannii</i>]				
	94960153	<i>beta-lactamase OXA-95</i> [<i>Acinetobacter</i> <i>baumannii</i>]				
	94960151	<i>beta-lactamase OXA-94</i> [<i>Acinetobacter</i> <i>baumannii</i>]				
	94960146	<i>beta-lactamase OXA-91</i> [<i>Acinetobacter</i> <i>baumannii</i>]				
	88697141	<i>beta-lactamase OXA-88</i> [<i>Acinetobacter</i> <i>baumannii</i>]				
	84782429	<i>blaOXA-92</i> [<i>Acinetobacter baumannii</i>]				
	83628254	<i>beta-lactamase OXA-83</i> [<i>Acinetobacter</i> <i>baumannii</i>]				
	61661226	<i>OXA-66</i> [<i>Acinetobacter baumannii</i>]				
	61661224	<i>OXA-76</i> [<i>Acinetobacter baumannii</i>]				
	58701176	<i>beta-lactamase OXA-69</i> [<i>Acinetobacter</i> <i>baumannii</i>]				
	58701172	<i>beta-lactamase OXA-66</i> [<i>Acinetobacter</i> <i>baumannii</i>]				
	58701170	<i>beta-lactamase OXA-65</i> [<i>Acinetobacter</i> <i>baumannii</i>]				
	57491158	<i>carbapenem-hydrolyzing oxacillinase OXA-69</i> [<i>Acinetobacter baumannii</i>]				
	160623398	<i>beta-lactamase OXA-51-like protein</i> [<i>Acinetobacter baumannii</i>]				
	160623396	<i>beta-lactamase OXA-51-like protein</i> [<i>Acinetobacter baumannii</i>]				
	160623392	<i>beta-lactamase OXA-51-like protein</i> [<i>Acinetobacter baumannii</i>]				
	160623388	<i>beta-lactamase OXA-51-like protein</i> [<i>Acinetobacter baumannii</i>]				

#	NCBIInr (gi)	Descripción	Compart. celular	%C	Péptidos únicos	Unused ProtScore
160623382		<i>beta-lactamase OXA-51-like protein</i> [<i>Acinetobacter baumannii</i>]				
159160001		<i>carbapenem-hydrolyzing beta-lactamase OXA-117</i> [Acinetobacter baumannii]				
159159999		<i>carbapenem-hydrolyzing beta-lactamase OXA-116</i> [Acinetobacter baumannii]				
157779407		<i>beta-lactamase OXA-82</i> [Acinetobacter baumannii]				
157285911		<i>beta-lactamase OXA-112</i> [Acinetobacter baumannii]				
157285907		<i>beta-lactamase OXA-110</i> [Acinetobacter baumannii]				
157285903		<i>beta-lactamase OXA-108</i> [Acinetobacter baumannii]				
157285901		<i>beta-lactamase OXA-107</i> [Acinetobacter baumannii]				
157285899		<i>beta-lactamase OXA-106</i> [Acinetobacter baumannii]				
147886441		<i>beta-lactamase OXA-104</i> [Acinetobacter baumannii]				
145581361		<i>carbapenem-hydrolyzing beta-lactamase OXA-66</i> [Acinetobacter baumannii]				
126641562		<i>beta-lactamase OXA-95</i> [Acinetobacter baumannii ATCC 17978]				
126387446		<i>beta-lactamase OXA-95</i> [Acinetobacter baumannii ATCC 17978]				
119444190		<i>OXA-66 carbapenemase</i> [Acinetobacter baumannii]				
117572553		<i>beta-lactamase OXA-66</i> [Acinetobacter baumannii]				
117414819		<i>OXA-66</i> [Acinetobacter baumannii]				
115583749		<i>class D carbapenemase OXA-66-like protein</i> [Acinetobacter baumannii]				
115583747		<i>class D carbapenemase OXA-66</i> [Acinetobacter baumannii]				
94960149		<i>beta-lactamase OXA-93</i> [Acinetobacter baumannii]				
90992730		<i>oxacillinase OXA-89</i> [Acinetobacter baumannii]				
88659521		<i>beta-lactamase OXA-51</i> [Acinetobacter baumannii]				
73622525		<i>OXA-86</i> [Acinetobacter baumannii]				
58701212		<i>beta-lactamase OXA-78</i> [Acinetobacter baumannii]				
58701174		<i>beta-lactamase OXA-68</i> [Acinetobacter baumannii]				
58701168		<i>beta-lactamase OXA-64</i> [Acinetobacter baumannii]				
56541834		<i>beta-lactamase</i> [Acinetobacter baumannii]				
160623394		<i>beta-lactamase OXA-51-like protein</i> [Acinetobacter baumannii]				
160623390		<i>beta-lactamase OXA-51-like protein</i> [Acinetobacter baumannii]				
160623384		<i>beta-lactamase OXA-51-like protein</i> [Acinetobacter baumannii]				
157779403		<i>beta-lactamase OXA-79</i> [Acinetobacter baumannii]				

#	NCBIInr (gi)	Descripción	Compart. celular	%C	Péptidos únicos	Unused ProtScore
	95070669	<i>beta-lactamase OXA-67 [Acinetobacter baumannii]</i>				
	85812759	<i>OXA-87 [Acinetobacter baumannii]</i>				
	74273334	<i>OXA-51-like beta-lactamase [Acinetobacter baumannii]</i>				
	58701180	<i>beta-lactamase OXA-71 [Acinetobacter baumannii]</i>				
	58701178	<i>beta-lactamase OXA-70 [Acinetobacter baumannii]</i>				
	57491188	<i>carbapenem-hydrolyzing oxacillinase OXA-71 [Acinetobacter baumannii]</i>				
	160623386	<i>beta-lactamase OXA-51-like protein [Acinetobacter baumannii]</i>				
	158518998	<i>beta-lactamase OXA-113 [Acinetobacter baumannii]</i>				
	157285909	<i>beta-lactamase OXA-111 [Acinetobacter baumannii]</i>				
	114159818	<i>beta-lactamase OXA-99 [Acinetobacter baumannii]</i>				
270	126641580	<i>putative transport protein [Acinetobacter baumannii ATCC 17978]</i>	MC	12.59	9	2
	126387464	<i>putative transport protein [Acinetobacter baumannii ATCC 17978]</i>				
271	126643176	<i>50S ribosomal protein L19 [Acinetobacter baumannii ATCC 17978]</i>	C	60.66	8	2
	126389060	<i>50S ribosomal protein L19 [Acinetobacter baumannii ATCC 17978]</i>				
272	126642375	<i>510-methylenetetrahydrofolate reductase [Acinetobacter baumannii ATCC 17978]</i>	-	30.07	8	2
	126388259	<i>510-methylenetetrahydrofolate reductase [Acinetobacter baumannii ATCC 17978]</i>				
	50085383	<i>5,10-methylenetetrahydrofolate reductase [Acinetobacter sp. ADP1]</i>				
	49531359	<i>5,10-methylenetetrahydrofolate reductase [Acinetobacter sp. ADP1]</i>				
273	126641025	<i>hypothetical protein A1S_0975 [Acinetobacter baumannii ATCC 17978]</i>	-	32.09	8	2
	126386909	<i>hypothetical protein A1S_0975 [Acinetobacter baumannii ATCC 17978]</i>				
	50084250	<i>hypothetical protein ACLAD1049 [Acinetobacter sp. ADP1]</i>				
	49530226	<i>conserved hypothetical protein [Acinetobacter sp. ADP1]</i>				
274	893355	<i>L-2,4-diaminobutyrate decarboxylase [Acinetobacter baumannii]</i>	-	23.53	7	2
	6685376	<i>L-2,4-diaminobutyrate decarboxylase (DABA decarboxylase) (DABA-DC)</i>				
	126642489	<i>L-24-diaminobutyrate decarboxylase [Acinetobacter baumannii ATCC 17978]</i>				
	126388373	<i>L-24-diaminobutyrate decarboxylase [Acinetobacter baumannii ATCC 17978]</i>				
275	50084280	<i>putative transcriptional regulator [Acinetobacter sp. ADP1]</i>	C	33.43	7	2
	49530256	<i>putative transcriptional regulator [Acinetobacter sp. ADP1]</i>				
	126641057	<i>putative transcriptional regulator [Acinetobacter baumannii ATCC 17978]</i>				

#	NCBIInr (gi)	Descripción	Compart. celular	%C	Péptidos únicos	Unused ProtScore
	126386941	<i>putative transcriptional regulator [Acinetobacter baumannii ATCC 17978]</i>				
276	49175779	<i>BauA [Acinetobacter baumannii]</i>	ME	15.59	7	2
	35210425	<i>probable ferric acinetobactin receptor [Acinetobacter baumannii]</i>				
277	126643376	<i>hypothetical protein A1S_3369 [Acinetobacter baumannii ATCC 17978]</i>	-	25.3	7	2
	126389260	<i>putative membrane protein [Acinetobacter baumannii ATCC 17978]</i>				
278	126643335	<i>pyruvate dehydrogenase subunit E1 [Acinetobacter baumannii ATCC 17978]</i>	-	15.11	7	2
	126389219	<i>pyruvate decarboxylase E1 component of the pyruvate dehydrogenase complex [Acinetobacter baumannii ATCC 17978]</i>				
279	126642806	<i>hypothetical protein A1S_2776 [Acinetobacter baumannii ATCC 17978]</i>	-	18.35	7	2
	126388690	<i>hypothetical protein A1S_2776 [Acinetobacter baumannii ATCC 17978]</i>				
280	126642500	<i>glutamate-1-semialdehyde aminotransferase [Acinetobacter baumannii ATCC 17978]</i>	C	21.74	7	2
	126388384	<i>glutamate-1-semialdehyde aminotransferase [Acinetobacter baumannii ATCC 17978]</i>				
281	126642454	<i>starvation-induced peptide utilization protein [Acinetobacter baumannii ATCC 17978]</i>	MC	22.55	7	2
	126388338	<i>starvation-induced peptide utilization protein [Acinetobacter baumannii ATCC 17978]</i>				
282	126641964	<i>putative phospholipase A1 precursor (PldA) [Acinetobacter baumannii ATCC 17978]</i>	ME	23.74	7	2
	126387848	<i>putative phospholipase A1 precursor (PldA) [Acinetobacter baumannii ATCC 17978]</i>				
283	126640174	<i>putative UDP-galactose phosphate transferase [Acinetobacter baumannii ATCC 17978]</i>	MC	43.23	7	2
	126386058	<i>putative UDP-galactose phosphate transferase [Acinetobacter baumannii ATCC 17978]</i>				
284	9836656	<i>aldehyde dehydrogenase 1 [Acinetobacter sp. M-1]</i>	C	8.95	6	2
	126642147	<i>aldehyde dehydrogenase 1 [Acinetobacter baumannii ATCC 17978]</i>				
	126388031	<i>aldehyde dehydrogenase 1 [Acinetobacter baumannii ATCC 17978]</i>				
	50085153	<i>aldehyde dehydrogenase [Acinetobacter sp. ADP1]</i>				
	49531129	<i>Acetaldehyde dehydrogenase 2 (Acetaldehyde dehydrogenase II) (ACDH-II) [Acinetobacter sp. ADP1]</i>				
285	62899953	<i>Chaperone protein dnaJ</i>	C	29.08	6	2
	50086568	<i>heat shock protein (Hsp40), co-chaperone with DnaK [Acinetobacter sp. ADP1]</i>				
	49532542	<i>heat shock protein (Hsp40), co-chaperone with DnaK [Acinetobacter sp. ADP1]</i>				
	126643450	<i>heat shock protein Hsp40 [Acinetobacter baumannii ATCC 17978]</i>				
	126389334	<i>heat shock protein Hsp40 [Acinetobacter baumannii ATCC 17978]</i>				
286	126642468	<i>lipoprotein precursor [Acinetobacter baumannii ATCC 17978]</i>	ME	44.53	6	2

#	NCBIInr (gi)	Descripción	Compart. celular	%C	Péptidos únicos	Unused ProtScore
	126388352	<i>lipoprotein precursor [Acinetobacter baumannii ATCC 17978]</i>				
287	126640888	<i>putative signal peptide [Acinetobacter baumannii ATCC 17978]</i>	-	15.41	6	2
	126386772	<i>putative signal peptide [Acinetobacter baumannii ATCC 17978]</i>				
288	126640495	<i>putative transcriptional regulator (AraC family) [Acinetobacter baumannii ATCC 17978]</i>	C	26.56	6	2
	126386379	<i>putative transcriptional regulator (AraC family) [Acinetobacter baumannii ATCC 17978]</i>				
289	126640277	<i>hypothetical protein A1S_0178 [Acinetobacter baumannii ATCC 17978]</i>	-	30.91	6	2
	126386161	<i>hypothetical protein A1S_0178 [Acinetobacter baumannii ATCC 17978]</i>				
290	50084040	<i>rod shape-determining protein [Acinetobacter sp. ADP1]</i>	-	26.32	5	2
	49530016	<i>rod shape-determining protein [Acinetobacter sp. ADP1]</i>				
	126642810	<i>rod shape-determining protein [Acinetobacter baumannii ATCC 17978]</i>				
	126388694	<i>rod shape-determining protein [Acinetobacter baumannii ATCC 17978]</i>				
291	126643394	<i>hypothetical protein A1S_3387 [Acinetobacter baumannii ATCC 17978]</i>	-	14.21	5	2
	126389278	<i>hypothetical protein A1S_3387 [Acinetobacter baumannii ATCC 17978]</i>				
292	126642321	<i>C4-dicarboxylate transporter DctA [Acinetobacter baumannii ATCC 17978]</i>	MC	15.35	5	2
	126388205	<i>aerobic C4-dicarboxylate transport protein [Acinetobacter baumannii ATCC 17978]</i>				
293	126640810	<i>NADH dehydrogenase I chain A [Acinetobacter baumannii ATCC 17978]</i>	MC	25.68	5	2
	126386694	<i>NADH dehydrogenase I chain A [Acinetobacter baumannii ATCC 17978]</i>				
294	126640519	<i>putative transport protein (CPA2 family) [Acinetobacter baumannii ATCC 17978]</i>	MC	20.44	5	2
	126386403	<i>putative transport protein (CPA2 family) [Acinetobacter baumannii ATCC 17978]</i>				
295	126643342	<i>UDP-N-acetylmuramate--alanine ligase [Acinetobacter baumannii ATCC 17978]</i>	C	17.86	4	2
	126389226	<i>UDP-N-acetylmuramate--alanine ligase [Acinetobacter baumannii ATCC 17978]</i>				
296	126643153	<i>putative signal peptide [Acinetobacter baumannii ATCC 17978]</i>	-	16.77	4	2
	126389037	<i>putative signal peptide [Acinetobacter baumannii ATCC 17978]</i>				
297	126642908	<i>two component signal transduction system kinase sensor component [Acinetobacter baumannii ATCC 17978]</i>	MC, ME	7.3	4	2
	126388792	<i>two component signal transduction system kinase sensor component [Acinetobacter baumannii ATCC 17978]</i>				
298	126642761	<i>50S ribosomal protein L27 [Acinetobacter baumannii ATCC 17978]</i>	C	49.41	4	2
	126388645	<i>50S ribosomal protein L27 [Acinetobacter baumannii ATCC 17978]</i>				
	67461399	<i>50S ribosomal protein L27</i>				

#	NCBIInr (gi)	Descripción	Compart. celular	%C	Péptidos únicos	Unused ProtScore
	50085965	50S ribosomal protein L27 [<i>Acinetobacter</i> sp. ADP1]				
	49531941	50S ribosomal protein L27 [<i>Acinetobacter</i> sp. ADP1]				
299	126642544	aspartate aminotransferase A [<i>Acinetobacter baumannii</i> ATCC 17978]	-	19.68	4	2
	126388428	aspartate aminotransferase A [<i>Acinetobacter baumannii</i> ATCC 17978]				
300	126642248	hypothetical protein A1S_2203 [<i>Acinetobacter baumannii</i> ATCC 17978]	-	29.95	4	2
	126388132	hypothetical protein A1S_2203 [<i>Acinetobacter baumannii</i> ATCC 17978]				
301	126640932	hypothetical protein A1S_0882 [<i>Acinetobacter baumannii</i> ATCC 17978]	MC	16.35	4	2
	126386816	putative membrane protein [<i>Acinetobacter baumannii</i> ATCC 17978]				
302	81613024	50S ribosomal protein L30	C	43.1	3	2
	50086197	50S ribosomal protein L30 [<i>Acinetobacter</i> sp. ADP1]				
	49532173	50S ribosomal protein L30 [<i>Acinetobacter</i> sp. ADP1]				
	126643078	50S ribosomal protein L30 [<i>Acinetobacter baumannii</i> ATCC 17978]				
	126388962	50S ribosomal protein L30 [<i>Acinetobacter baumannii</i> ATCC 17978]				
303	50083671	magnesium and cobalt efflux protein [<i>Acinetobacter</i> sp. ADP1]	MC	16.85	3	2
	49529647	magnesium and cobalt efflux protein [<i>Acinetobacter</i> sp. ADP1]				
304	49532141	xanthine phosphoribosyltransferase [<i>Acinetobacter</i> sp. ADP1]	C	14.78	3	2
	161349958	xanthine phosphoribosyltransferase [<i>Acinetobacter</i> sp. ADP1]				
305	126642748	dihydrolipoamide dehydrogenase [<i>Acinetobacter baumannii</i> ATCC 17978]	C	4.57	3	2
	126388632	dihydrolipoamide dehydrogenase [<i>Acinetobacter baumannii</i> ATCC 17978]				
306	126642523	hypothetical protein A1S_2487 [<i>Acinetobacter baumannii</i> ATCC 17978]	MC	19.23	3	2
	126388407	hypothetical protein A1S_2487 [<i>Acinetobacter baumannii</i> ATCC 17978]				
307	126642522	hypothetical protein A1S_2486 [<i>Acinetobacter baumannii</i> ATCC 17978]	-	7.19	3	2
	126388406	hypothetical protein A1S_2486 [<i>Acinetobacter baumannii</i> ATCC 17978]				
308	126641618	integration host factor beta subunit [<i>Acinetobacter baumannii</i> ATCC 17978]	C	34.44	3	2
	126387502	integration host factor beta subunit [<i>Acinetobacter baumannii</i> ATCC 17978]				
309	126641555	Fimbrial protein [<i>Acinetobacter baumannii</i> ATCC 17978]	E, Fimbria	32.79	3	2
	126387439	Fimbrial protein [<i>Acinetobacter baumannii</i> ATCC 17978]				
310	126640669	hypothetical protein A1S_0600 [<i>Acinetobacter baumannii</i> ATCC 17978]	-	24.34	3	2
	126386553	hypothetical protein A1S_0600 [<i>Acinetobacter baumannii</i> ATCC 17978]				

#	NCBIInr (gi)	Descripción	Compart. celular	%C	Péptidos únicos	Unused ProtScore
311	126640371	50S ribosomal protein [Acinetobacter baumannii ATCC 17978]	C	64.49	3	2
	126386255	50S ribosomal protein [Acinetobacter baumannii ATCC 17978]				
312	68566129	UPF0345 protein ACLAD0356	-	27.78	2	2
	50083618	hypothetical protein ACLAD0356 [Acinetobacter sp. ADP1]				
	49529594	conserved hypothetical protein [Acinetobacter sp. ADP1]				
	156630428	UPF0345 protein A1S_0323				
	126640405	hypothetical protein A1S_0323 [Acinetobacter baumannii ATCC 17978]				
	126386289	hypothetical protein A1S_0323 [Acinetobacter baumannii ATCC 17978]				
313	50085919	succinate dehydrogenase, hydrophobic subunit [Acinetobacter sp. ADP1]	MC	12.4	2	2
	49531895	succinate dehydrogenase, hydrophobic subunit [Acinetobacter sp. ADP1]				
314	50084107	conserved hypothetical protein; putative phospholipid/glycerol acyltransferase [Acinetobacter sp. ADP1]	MC	12.99	2	2
	49530083	conserved hypothetical protein; putative phospholipid/glycerol acyltransferase [Acinetobacter sp. ADP1]				
	126640933	putative phospholipid/glycerol acyltransferase [Acinetobacter baumannii ATCC 17978]				
	126386817	putative phospholipid/glycerol acyltransferase [Acinetobacter baumannii ATCC 17978]				
315	126643402	glucosamine-fructose-6-phosphate aminotransferase [Acinetobacter baumannii ATCC 17978]	C	15.81	2	2
	126389286	glucosamine-fructose-6-phosphate aminotransferase [Acinetobacter baumannii ATCC 17978]				
316	126643156	putative partition-related protein [Acinetobacter baumannii ATCC 17978]	-	12.12	2	2
	126389040	putative partition-related protein [Acinetobacter baumannii ATCC 17978]				
317	126642944	putative intracellular septation protein (IspZ) [Acinetobacter baumannii ATCC 17978]	MC	9.31	2	2
	126388828	putative intracellular septation protein (IspZ) [Acinetobacter baumannii ATCC 17978]				
318	126642769	hypothetical protein A1S_2738 [Acinetobacter baumannii ATCC 17978]	-	27.16	2	2
	126388653	hypothetical protein A1S_2738 [Acinetobacter baumannii ATCC 17978]				
319	126642090	putative ferredoxin-dependent glutamate synthase [Acinetobacter baumannii ATCC 17978]	-	34.15	2	2
	126387974	putative ferredoxin-dependent glutamate synthase [Acinetobacter baumannii ATCC 17978]				
320	126641682	DNA-binding protein HU-beta [Acinetobacter baumannii ATCC 17978]	C	37.78	2	2
	126387566	DNA-binding protein HU-beta [Acinetobacter baumannii ATCC 17978]				
321	126641391	PaaK [Acinetobacter baumannii ATCC 17978]	-	29.71	2	2
	126387275	PaaK [Acinetobacter baumannii ATCC 17978]				
322	126640166	MviM protein [Acinetobacter baumannii ATCC 17978]	-	7.72	2	2

#	NCBIInr (gi)	Descripción	Compart. celular	%C	Péptidos únicos	Unused ProtScore
	126386050	<i>MviM protein [Acinetobacter baumannii ATCC 17978]</i>				
323	50085920	<i>succinate dehydrogenase, cytochrome b556 subunit [Acinetobacter sp. ADP1]</i>	MC	13.53	1	2
	49531896	<i>succinate dehydrogenase, cytochrome b556 subunit [Acinetobacter sp. ADP1]</i>				
	126642742	<i>succinate dehydrogenase cytochrome b556 subunit [Acinetobacter baumannii ATCC 17978]</i>				
	126388626	<i>succinate dehydrogenase cytochrome b556 subunit [Acinetobacter baumannii ATCC 17978]</i>				
324	50084327	<i>conserved hypothetical protein; putative signal peptide [Acinetobacter sp. ADP1]</i>	-	5.19	1	2
	49530303	<i>conserved hypothetical protein; putative signal peptide [Acinetobacter sp. ADP1]</i>				
325	155030013	<i>hypothetical protein A1S_3792 [Acinetobacter baumannii ATCC 17978]</i>	MC	11.5	1	2
326	126642117	<i>putative universal stress protein family [Acinetobacter baumannii ATCC 17978]</i>	-	14.15	1	2
	126388001	<i>putative universal stress protein family [Acinetobacter baumannii ATCC 17978]</i>				
327	126640745	<i>putative sigma(54) modulation protein RpoX [Acinetobacter baumannii ATCC 17978]</i>	-	25.32	1	2
	126386629	<i>putative sigma(54) modulation protein RpoX [Acinetobacter baumannii ATCC 17978]</i>				
328	126640533	<i>prolipoprotein diacylglycerol transferase [Acinetobacter baumannii ATCC 17978]</i>	MC	8.87	1	2
	126386417	<i>prolipoprotein diacylglycerol transferase [Acinetobacter baumannii ATCC 17978]</i>				
329	126640308	<i>Universal stress protein [Acinetobacter baumannii ATCC 17978]</i>	-	4.42	1	2
	126386192	<i>Universal stress protein [Acinetobacter baumannii ATCC 17978]</i>				
330	126640259	<i>hypothetical protein A1S_0158 [Acinetobacter baumannii ATCC 17978]</i>	-	8.84	1	2
	126386143	<i>hypothetical protein A1S_0158 [Acinetobacter baumannii ATCC 17978]</i>				
331	126642467	<i>putative transcriptional regulator [Acinetobacter baumannii ATCC 17978]</i>	C	30.94	8	1.95
	126388351	<i>putative transcriptional regulator [Acinetobacter baumannii ATCC 17978]</i>				
332	126643208	<i>putative penicillin binding protein (PonA) [Acinetobacter baumannii ATCC 17978]</i>	MC	20.29	6	1.94
	126389092	<i>putative penicillin binding protein (PonA) [Acinetobacter baumannii ATCC 17978]</i>				
333	22121838	<i>Cpn60 [Acinetobacter calcoaceticus]</i>	C	45.95	4	1.85
	126642698	<i>chaperonin GroEL [Acinetobacter baumannii ATCC 17978]</i>				
	126388582	<i>chaperone Hsp60 [Acinetobacter baumannii ATCC 17978]</i>				
	73918485	<i>60 kDa chaperonin [Acinetobacter genomosp. 13TU]</i>				
	73918483	<i>60 kDa chaperonin [Acinetobacter genomosp. 13TU]</i>				
	73918473	<i>60 kDa chaperonin [Acinetobacter baumannii]</i>				
	73918471	<i>60 kDa chaperonin [Acinetobacter baumannii]</i>				
	73918489	<i>60 kDa chaperonin [Acinetobacter baumannii]</i>				

#	NCBIInr (gi)	Descripción	Compart. celular	%C	Péptidos únicos	Unused ProtScore
	73918487	60 kDa chaperonin [Acinetobacter baumannii]				
	73918481	60 kDa chaperonin [Acinetobacter baumannii]				
	73918479	60 kDa chaperonin [Acinetobacter baumannii]				
	73918477	60 kDa chaperonin [Acinetobacter baumannii]				
	73918475	60 kDa chaperonin [Acinetobacter baumannii]				
	73918469	60 kDa chaperonin [Acinetobacter baumannii]				
	73918467	60 kDa chaperonin [Acinetobacter baumannii]				
	73918465	60 kDa chaperonin [Acinetobacter baumannii]				
	73918463	60 kDa chaperonin [Acinetobacter baumannii]				
	73918461	60 kDa chaperonin [Acinetobacter baumannii]				
	73918459	60 kDa chaperonin [Acinetobacter baumannii]				
	73918457	60 kDa chaperonin [Acinetobacter baumannii]				
	73918453	60 kDa chaperonin [Acinetobacter baumannii]				
	73918447	60 kDa chaperonin [Acinetobacter baumannii]				
	73918445	60 kDa chaperonin [Acinetobacter baumannii]				
	73918443	60 kDa chaperonin [Acinetobacter baumannii]				
	73918441	60 kDa chaperonin [Acinetobacter calcoaceticus]				
	73918439	60 kDa chaperonin [Acinetobacter baumannii]				
	73918437	60 kDa chaperonin [Acinetobacter baumannii]				
	73918435	60 kDa chaperonin [Acinetobacter baumannii]				
	73918433	60 kDa chaperonin [Acinetobacter calcoaceticus]				
	73918431	60 kDa chaperonin [Acinetobacter baumannii]				
	73918429	60 kDa chaperonin [Acinetobacter baumannii]				
	73918427	60 kDa chaperonin [Acinetobacter baumannii]				
	73918425	60 kDa chaperonin [Acinetobacter baumannii]				
	73918421	60 kDa chaperonin [Acinetobacter baumannii]				
	73918419	60 kDa chaperonin [Acinetobacter baumannii]				
	73918417	60 kDa chaperonin [Acinetobacter baumannii]				
	73918415	60 kDa chaperonin [Acinetobacter baumannii]				
	73918413	60 kDa chaperonin [Acinetobacter baumannii]				
	73918411	60 kDa chaperonin [Acinetobacter baumannii]				
	73918409	60 kDa chaperonin [Acinetobacter baumannii]				
	73918407	60 kDa chaperonin [Acinetobacter baumannii]				
	73918405	60 kDa chaperonin [Acinetobacter baumannii]				
	73918403	60 kDa chaperonin [Acinetobacter baumannii]				
	73918401	60 kDa chaperonin [Acinetobacter baumannii]				
	73918399	60 kDa chaperonin [Acinetobacter baumannii]				
	73918397	60 kDa chaperonin [Acinetobacter baumannii]				
	73918395	60 kDa chaperonin [Acinetobacter baumannii]				
	73918393	60 kDa chaperonin [Acinetobacter baumannii]				
	22121812	Cpn60 [Acinetobacter baumannii]				
	22121790	Cpn60 [Acinetobacter junii]				
	160222634	60 kDa chaperonin [Acinetobacter sp. mA3]				
	73918455	60 kDa chaperonin [Acinetobacter calcoaceticus]				
	73918451	60 kDa chaperonin [Acinetobacter calcoaceticus]				
	73918449	60 kDa chaperonin [Acinetobacter calcoaceticus]				
	73918423	60 kDa chaperonin [Acinetobacter baumannii]				
334	126640373	50S ribosomal protein [Acinetobacter baumannii ATCC 17978]	C	26.36	3	1.79
	126386257	50S ribosomal protein [Acinetobacter baumannii ATCC 17978]				

#	NCBIInr (gi)	Descripción	Compart. celular	%C	Péptidos únicos	Unused ProtScore
335	155029703	<i>hypothetical protein A1S_3482 [Acinetobacter baumannii ATCC 17978]</i>	-	22.62	8	1.74
336	50086030	<i>30S ribosomal protein S9 [Acinetobacter sp. ADP1]</i>	C	65.63	17	1.7
	49532006	<i>30S ribosomal protein S9 [Acinetobacter sp. ADP1]</i>				
337	81695773	<i>50S ribosomal protein L21</i>	-	27.18	5	1.7
	50085966	<i>50S ribosomal protein L21 [Acinetobacter sp. ADP1]</i>				
	49531942	<i>50S ribosomal protein L21 [Acinetobacter sp. ADP1]</i>				
338	50085209	<i>glutaminase-asparaginase [Acinetobacter sp. ADP1]</i>	P	20	7	1.7
	49531185	<i>glutaminase-asparaginase [Acinetobacter sp. ADP1]</i>				
	126641512	<i>glutaminase-asparaginase [Acinetobacter baumannii ATCC 17978]</i>				
	126387396	<i>glutaminase-asparaginase [Acinetobacter baumannii ATCC 17978]</i>				
339	126642210	<i>hypothetical protein A1S_2165 [Acinetobacter baumannii ATCC 17978]</i>	MC	15.28	4	1.7
	126388094	<i>putative membrane protein [Acinetobacter baumannii ATCC 17978]</i>				
340	126641071	<i>putative signal peptide [Acinetobacter baumannii ATCC 17978]</i>	-	22.84	3	1.7
	126386955	<i>putative signal peptide [Acinetobacter baumannii ATCC 17978]</i>				
341	126640431	<i>hypothetical protein A1S_0353 [Acinetobacter baumannii ATCC 17978]</i>	-	63.93	7	1.69
	126386315	<i>hypothetical protein A1S_0353 [Acinetobacter baumannii ATCC 17978]</i>				
342	126641392	<i>phenylacetyl-CoA ligase [Acinetobacter baumannii ATCC 17978]</i>	-	34.4	4	1.66
	126387276	<i>phenylacetyl-CoA ligase [Acinetobacter baumannii ATCC 17978]</i>				
343	126642560	<i>putative serine protease [Acinetobacter baumannii ATCC 17978]</i>	P	28.95	11	1.6
	126388444	<i>putative serine protease [Acinetobacter baumannii ATCC 17978]</i>				
344	126643334	<i>dihydrolipoamide S-acetyltransferase E2 component of the pyruvate dehydrogenase complex [Acinetobacter baumannii ATCC 17978]</i>	C	23.53	14	1.55
	126389218	<i>dihydrolipoamide S-acetyltransferase E2 component of the pyruvate dehydrogenase complex [Acinetobacter baumannii ATCC 17978]</i>				
	50086464	<i>dihydrolipoamide S-acetyltransferase, E2 component of the pyruvate dehydrogenase complex [Acinetobacter sp. ADP1]</i>				
	49532440	<i>dihydrolipoamide S-acetyltransferase, E2 component of the pyruvate dehydrogenase complex [Acinetobacter sp. ADP1]</i>				
345	126641980	<i>hypothetical protein A1S_1935 [Acinetobacter baumannii ATCC 17978]</i>	-	40.18	5	1.54
	126387864	<i>hypothetical protein A1S_1935 [Acinetobacter baumannii ATCC 17978]</i>				
346	126642094	<i>hypothetical protein A1S_2049 [Acinetobacter baumannii ATCC 17978]</i>	-	44.72	8	1.52

#	NCBIInr (gi)	Descripción	Compart. celular	%C	Péptidos únicos	Unused ProtScore
	126387978	<i>hypothetical protein A1S_2049 [Acinetobacter baumannii ATCC 17978]</i>				
347	81827541	<i>Translation initiation factor IF-2</i>	C	26.81	20	1.52
	50083629	<i>translation initiation factor IF-2 [Acinetobacter sp. ADP1]</i>				
	49529605	<i>protein chain initiation factor IF-2 [Acinetobacter sp. ADP1]</i>				
348	126642176	<i>hypothetical protein A1S_2131 [Acinetobacter baumannii ATCC 17978]</i>	-	27.5	6	1.52
	126388060	<i>hypothetical protein A1S_2131 [Acinetobacter baumannii ATCC 17978]</i>				
349	126643087	<i>30S ribosomal protein S17 [Acinetobacter baumannii ATCC 17978]</i>	C	43.53	4	1.52
	126388971	<i>30S ribosomal protein S17 [Acinetobacter baumannii ATCC 17978]</i>				
350	126643077	<i>50S ribosomal protein L15 [Acinetobacter baumannii ATCC 17978]</i>	-	28.08	4	1.52
	126388961	<i>50S ribosomal protein L15 [Acinetobacter baumannii ATCC 17978]</i>				
351	126640150	<i>alkali-inducible disulfide interchange protein [Acinetobacter baumannii ATCC 17978]</i>	P	13.51	2	1.52
	126386034	<i>alkali-inducible disulfide interchange protein [Acinetobacter baumannii ATCC 17978]</i>				
352	126642190	<i>putative kinase [Acinetobacter baumannii ATCC 17978]</i>	MC	21.68	7	1.49
	126388074	<i>putative kinase [Acinetobacter baumannii ATCC 17978]</i>				
353	50083464	<i>membrane-bound ATP synthase, F0 sector, subunit c [Acinetobacter sp. ADP1]</i>	MC	44.44	3	1.41
	49529440	<i>membrane-bound ATP synthase, F0 sector, subunit c [Acinetobacter sp. ADP1]</i>				
	126640251	<i>membrane-bound ATP synthase F0 sector, subunit c [Acinetobacter baumannii ATCC 17978]</i>				
	126386135	<i>membrane-bound ATP synthase F0 sector, subunit c [Acinetobacter baumannii ATCC 17978]</i>				
354	50083463	<i>F0F1 ATP synthase subunit A [Acinetobacter sp. ADP1]</i>	MC	18.56	6	1.4
	49529439	<i>membrane-bound ATP synthase, F0 sector, subunit a, important for FO assembly [Acinetobacter sp. ADP1]</i>				
355	162286728	<i>hypothetical protein A1S_2163 [Acinetobacter baumannii ATCC 17978]</i>	-	16.55	5	1.4
	126388092	<i>hypothetical protein A1S_2163 [Acinetobacter baumannii ATCC 17978]</i>				
	81392713	<i>UPF0085 protein ACLAD2422</i>				
	50085507	<i>hypothetical protein ACLAD2422 [Acinetobacter sp. ADP1]</i>				
	49531483	<i>conserved hypothetical protein [Acinetobacter sp. ADP1]</i>				
356	59798698	<i>30S ribosomal protein S18</i>	C	36	2	1.4
	50085516	<i>30S ribosomal protein S18 [Acinetobacter sp. ADP1]</i>				
	49531492	<i>30S ribosomal protein S18 [Acinetobacter sp. ADP1]</i>				

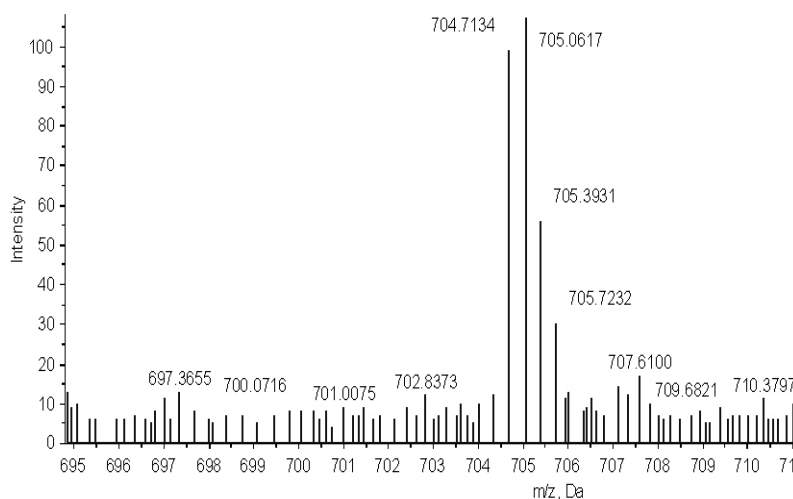
#	NCBIInr (gi)	Descripción	Compart. celular	%C	Péptidos únicos	Unused ProtScore
	126642217	<i>30S ribosomal protein S18 [Acinetobacter baumannii ATCC 17978]</i>				
	126388101	<i>30S ribosomal protein S18 [Acinetobacter baumannii ATCC 17978]</i>				
357	160358721	<i>Serine/ threonine transporter sstT (Na(+))/ serine-threonine symporter)</i>	MC	7	2	1.4
	126641583	<i>transporter sodium-dicarboxylate symporter family [Acinetobacter baumannii ATCC 17978]</i>				
	126387467	<i>transporter sodium-dicarboxylate symporter family [Acinetobacter baumannii ATCC 17978]</i>				
358	126640418	<i>pH adaptation potassium efflux system E transmembrane protein [Acinetobacter baumannii ATCC 17978]</i>	-	22	2	1.4
	126386302	<i>pH adaptation potassium efflux system E transmembrane protein [Acinetobacter baumannii ATCC 17978]</i>				
359	126642124	<i>putative mechanosensitive ion channel [Acinetobacter baumannii ATCC 17978]</i>	MC	3.08	1	1.4
	126388008	<i>putative mechanosensitive ion channel [Acinetobacter baumannii ATCC 17978]</i>				
360	126643466	<i>hypothetical protein A1S_3459 [Acinetobacter baumannii ATCC 17978]</i>	ME	28.14	6	1.38
	126389350	<i>hypothetical protein A1S_3459 [Acinetobacter baumannii ATCC 17978]</i>				

B.6. PROTEÍNAS IDENTIFICADAS A PARTIR DE UN SOLO PÉPTIDO EN EL ANÁLISIS iTRAQ

#	NCBI nr (gi)	Secuencia	m/z ión precursor	Carga (z)	Score /E-value
323	50085920	SNRPVNLSMGQVLAVNLR	704,7156	3	22
324	50084327	SLGQVFIDSSIK	527,9974	3	16
325	155030013	IILHYDEQGYLTR	588,99	3	15
326	126642117	LILGSFAQDVLNSTK	632,0323	3	14
327	126640745	LPGIELFAQATADDMYTSIK	824,7631	3	14
328	126640533	AVTDPNYPFGMIFPTDPLHLVR	882,1506	3	15
329	126640308	IELEHGQILLR	488,9633	3	14
330	126640259	AQLEGLNQALLGLDIR	623,3839	3	15
359	126642124	DFLLLDQYLNK	581,0201	3	13

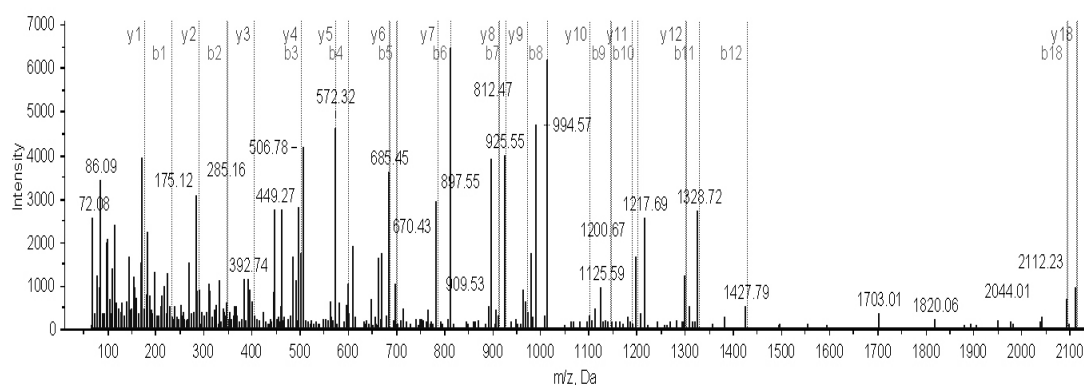
#323

MS del ión precursor



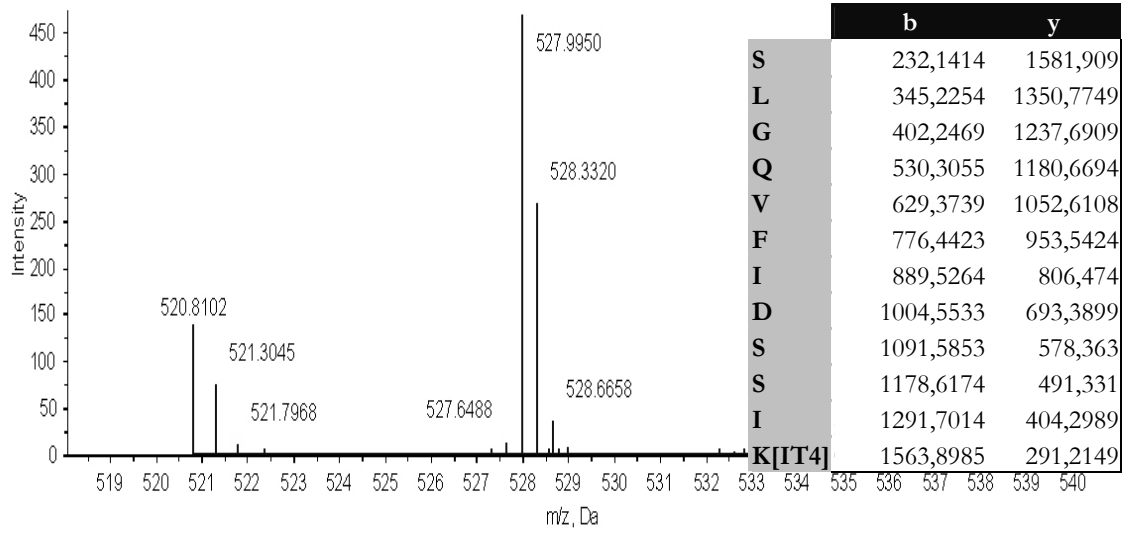
	b	y
S	232,1414	2112,1828
N	346,1843	1881,0487
R	502,2854	1767,0058
P	599,3382	1610,9047
V	698,4066	1513,8519
N	812,4495	1414,7835
L	925,5336	1300,7406
S	1012,5656	1187,6565
M	1143,6061	1100,6245
G	1200,6276	969,584
Q	1328,6861	912,5625
V	1427,7545	784,5039
L	1540,8386	685,4355
A	1611,8757	572,3515
V	1710,9441	501,3144
N	1824,9871	402,2459
L	1938,0711	288,203
R	2094,1722	175,119

Espectro MS/MS

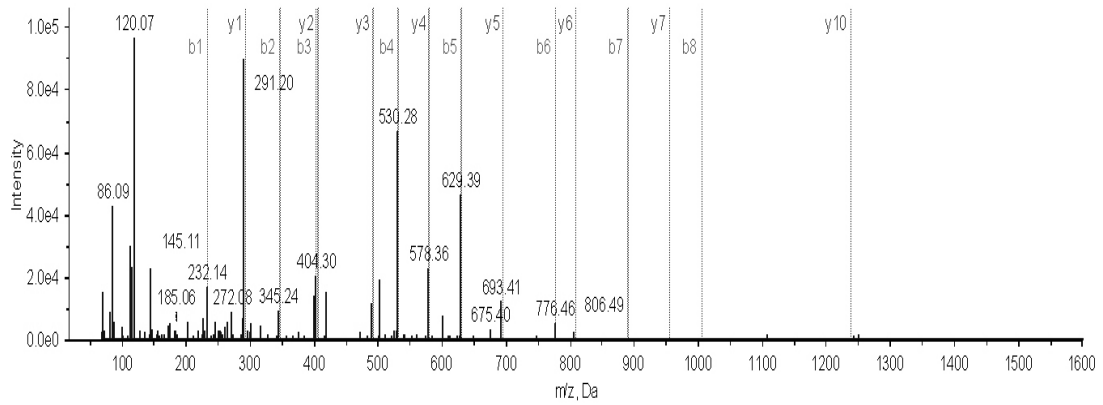


#324

MS del ión precursor

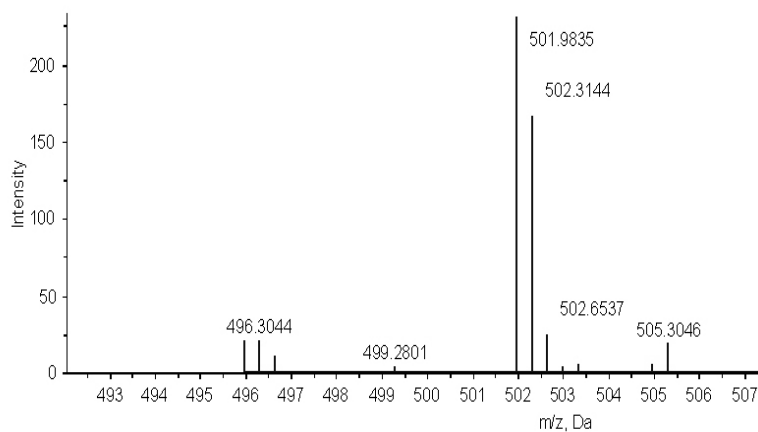


Espectro de MS/MS



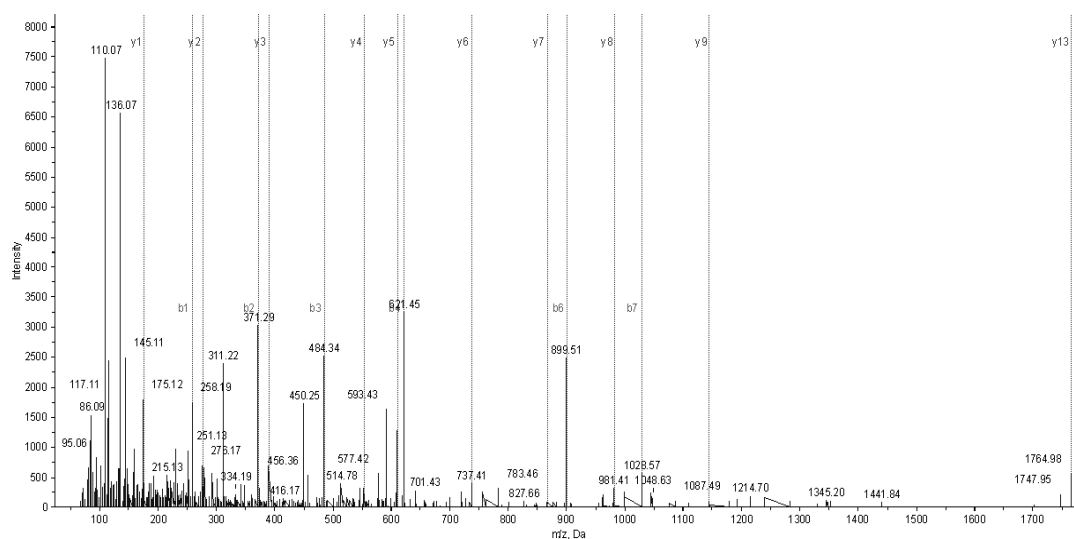
#325

MS del ión precursor



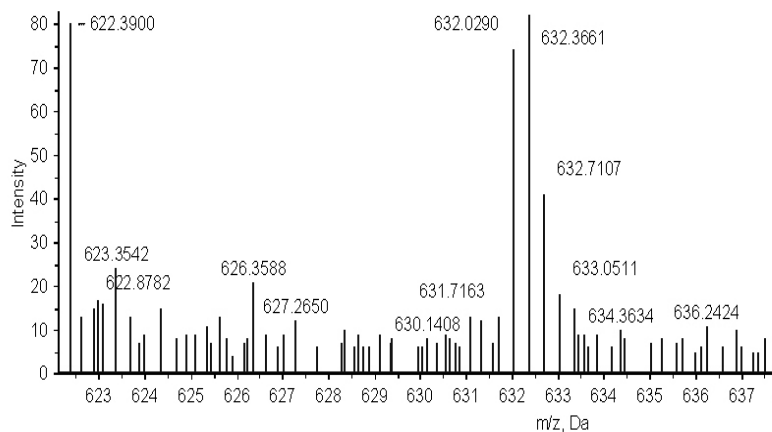
	b	y
I	258,1934	1764,9401
I	371,2775	1507,754
L	484,3615	1394,6699
H	621,4204	1281,5858
Y	784,4838	1144,5269
D	899,5107	981,4636
E	1028,5533	866,4367
Q	1156,6119	737,3941
G	1213,6333	609,3355
Y	1376,6967	552,314
L	1489,7807	389,2507
T	1590,8284	276,1666
R	1746,9295	175,119

Espectro de MS/MS



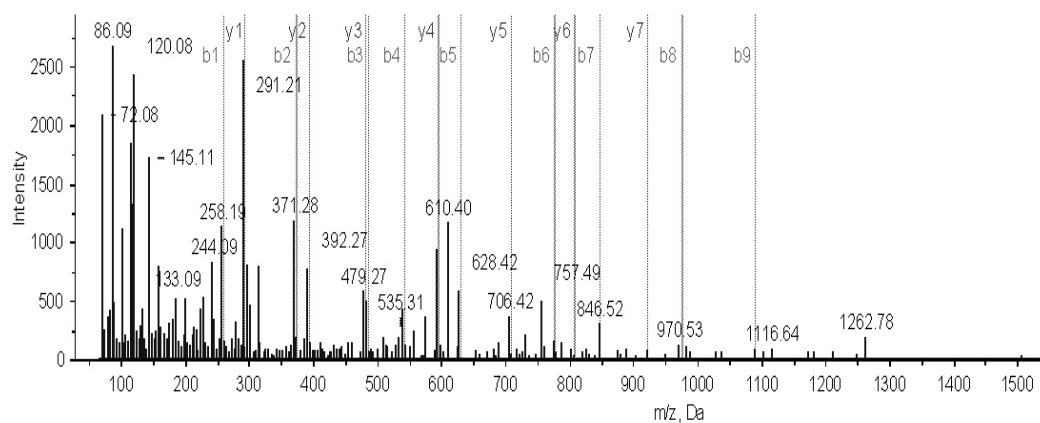
#326

MS del ión precursor



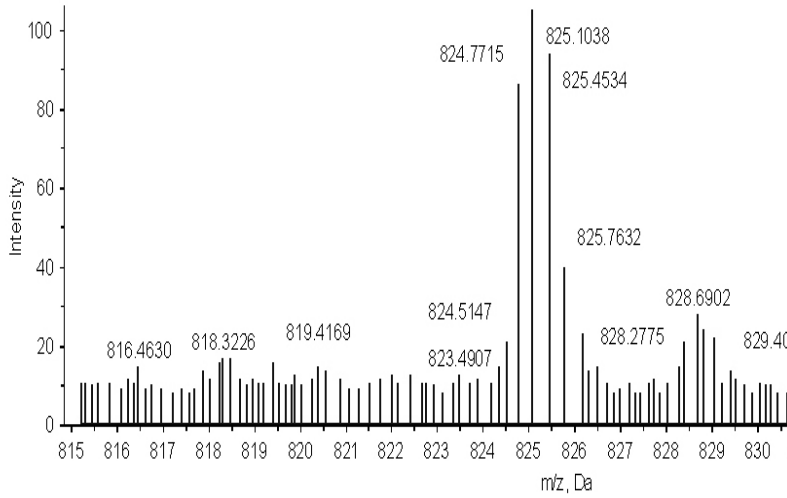
	b	y
L	258,1934	1894,0888
I	371,2775	1636,9026
L	484,3615	1523,8186
G	541,383	1410,7345
S	628,415	1353,7131
F	775,4834	1266,681
A	846,5206	1119,6126
Q	974,5791	1048,5755
D	1089,6061	920,5169
V	1188,6745	805,49
L	1301,7585	706,4216
N	1415,8015	593,3375
S	1502,8335	479,2946
T	1603,8812	392,2625
K[IT4]	1876,0782	291,2149

Espectro de MS/MS



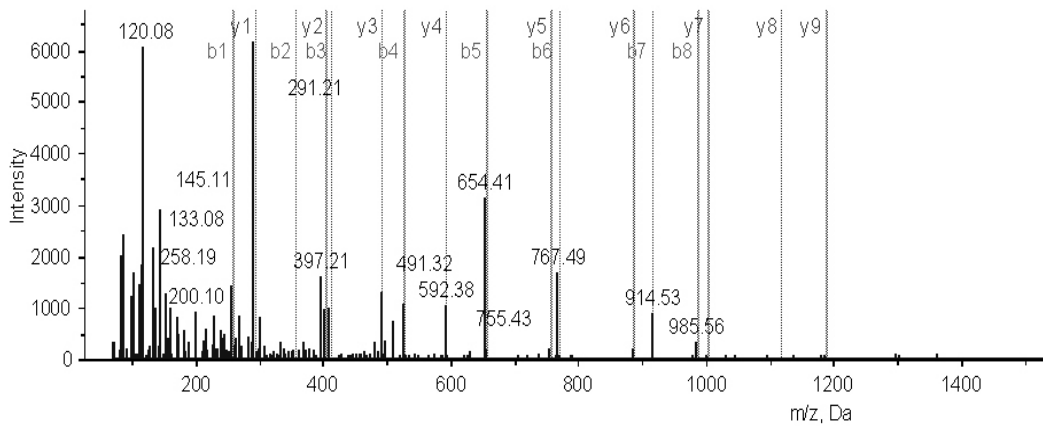
#327

MS del ión precursor



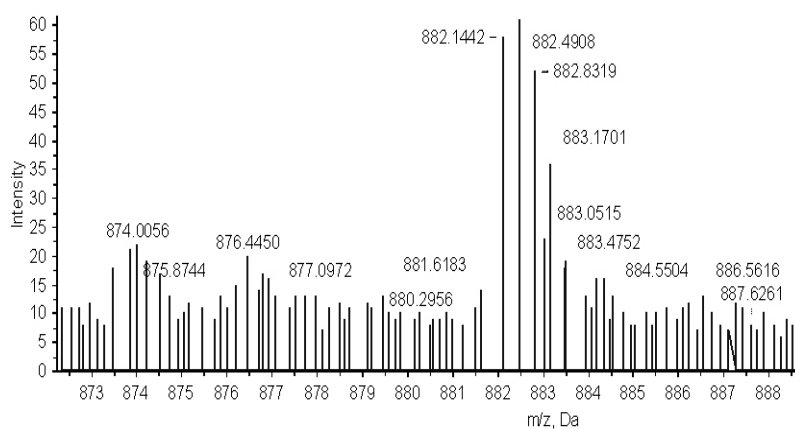
	b	y
L	258,1934	2472,2934
P	355,2462	2215,1073
G	412,2676	2118,0545
I	525,3517	2061,0331
E	654,3943	1947,949
L	767,4784	1818,9064
F	914,5468	1705,8223
A	985,5839	1558,7539
Q	1113,6425	1487,7168
A	1184,6796	1359,6582
T	1285,7272	1288,6211
A	1356,7644	1187,5735
D	1471,7913	1116,5363
D	1586,8182	1001,5094
M	1717,8587	886,4825
Y	1880,9221	755,442
T	1981,9697	592,3786
S	2069,0018	491,331
I	2182,0858	404,2989
K[IT4]	2454,2829	291,2149

Espectro de MS/MS



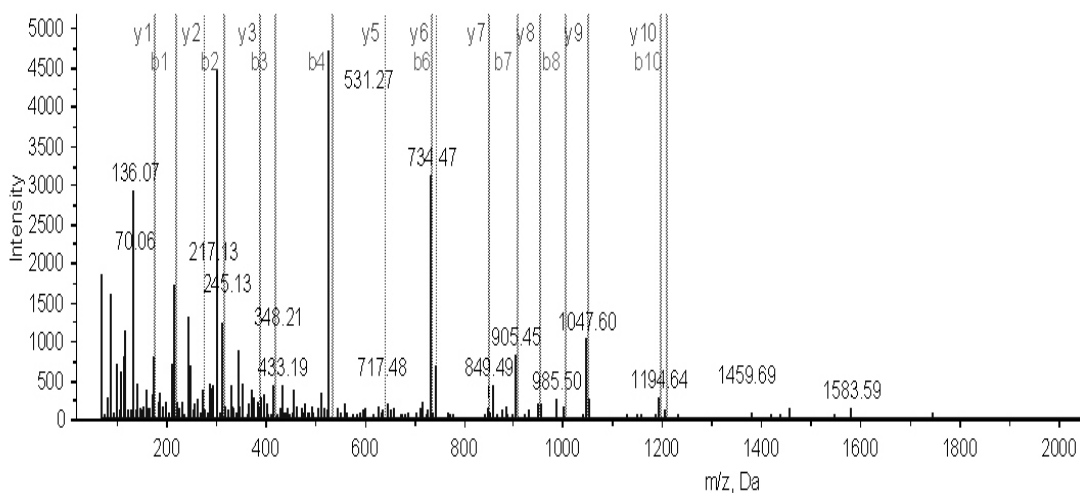
#328

MS del ión precursor



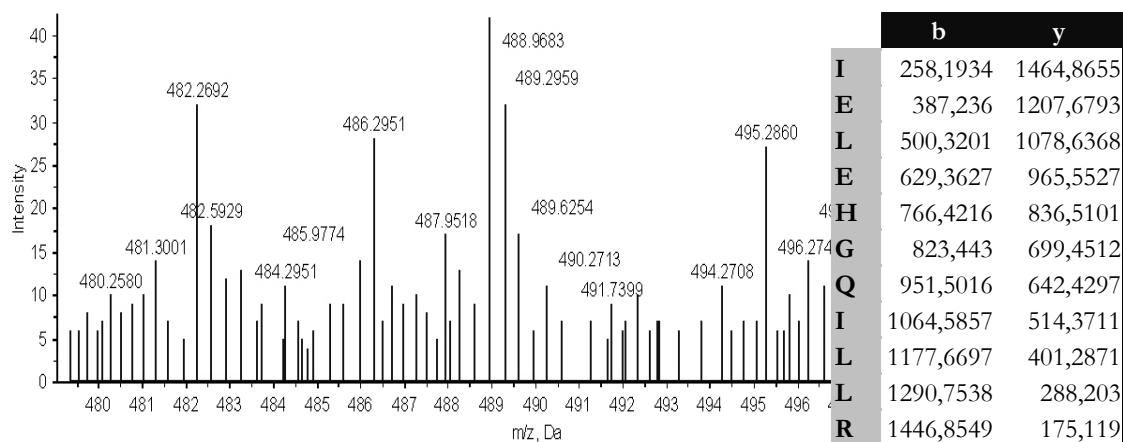
	b	y
A	216.1465	2644.3714
V	315.2149	2429.2322
T	416.2625	2330.1638
D	531.2895	2229.1161
P	628.3423	2114.0892
N	742.3852	2017.0364
Y	905.4485	1902.9935
P	1002.5013	1739.9302
F	1149.5697	1642.8774
G	1206.5911	1495.8090
M	1337.6316	1438.7875
I	1450.7157	1307.7470
F	1597.7841	1194.6630
P	1694.8369	1047.5946
T	1795.8846	950.5418
D	1910.9115	849.4941
P	2007.9643	734.4672
L	2121.0483	637.4144
H	2258.1072	524.3303
L	2371.1913	387.2714
V	2470.2597	274.1874
R	2626.3608	175.1190

Espectro MS/MS

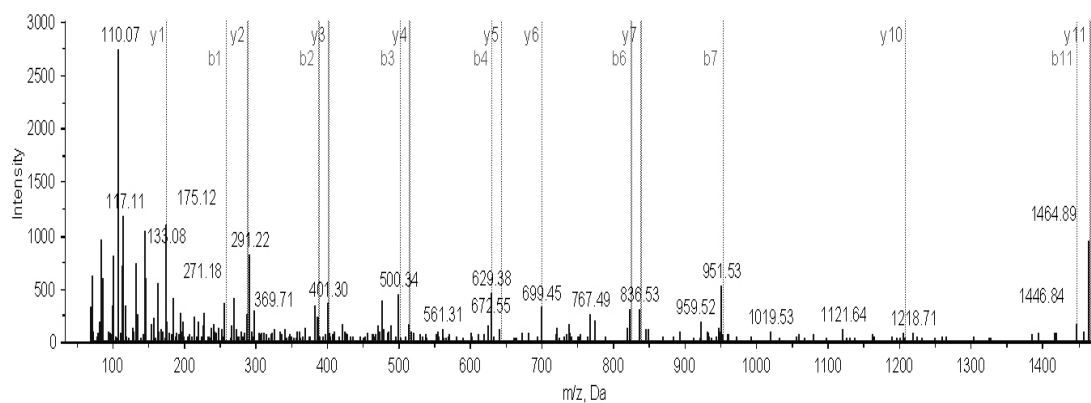


#329

MS del ión precursor

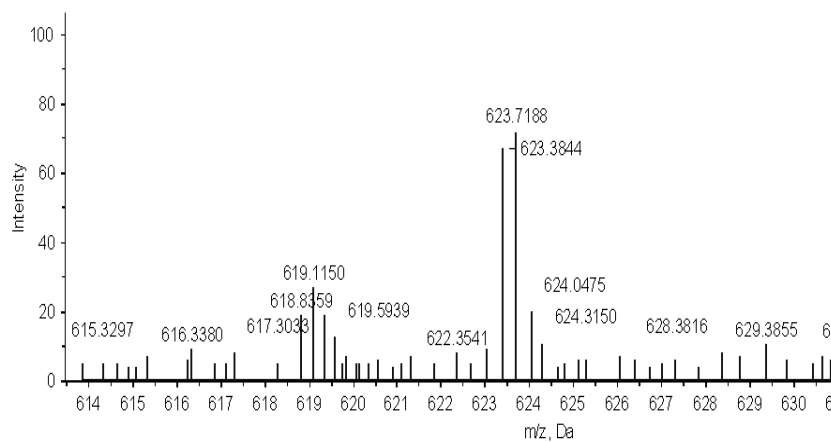


Espectro de MS/MS



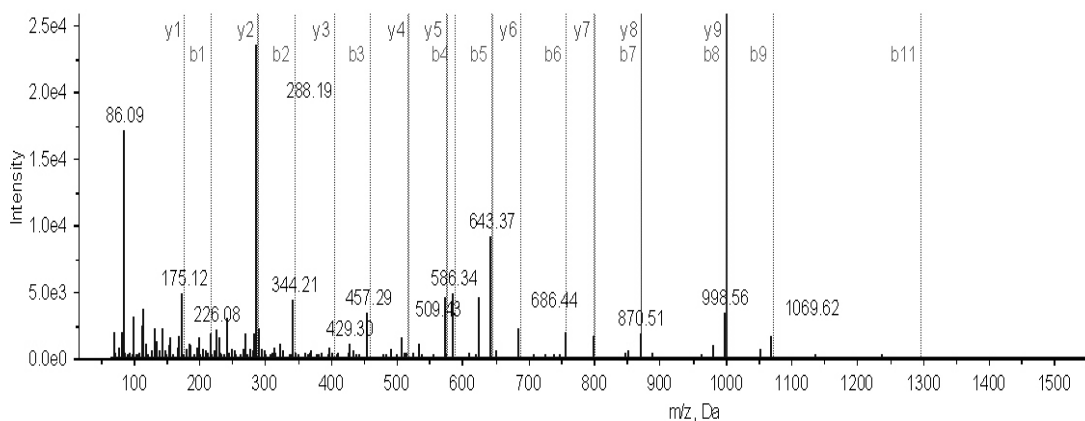
#330

MS del ión precursor



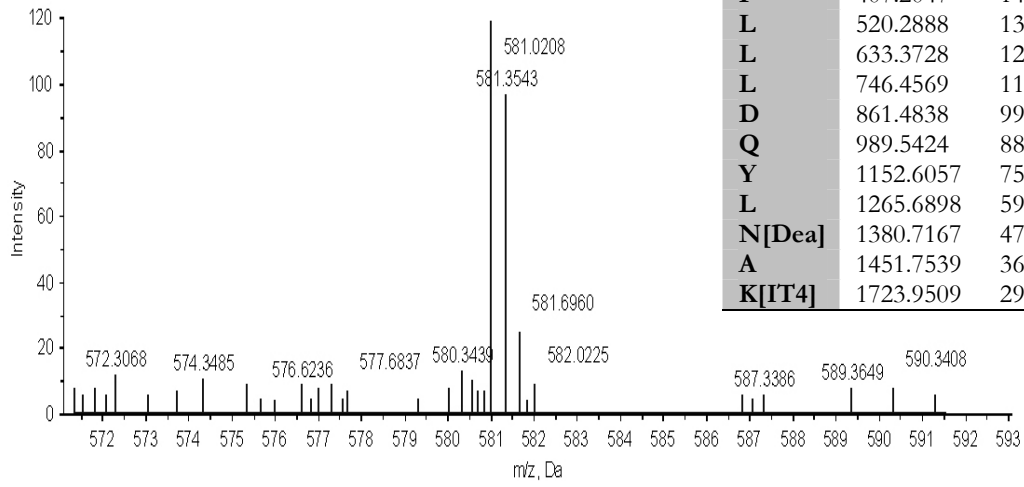
	b	y
A	216,1465	1868,0722
Q	344,205	1652,933
L	457,2891	1524,8744
E	586,3317	1411,7904
G	643,3532	1282,7478
L	756,4372	1225,7263
N	870,4801	1112,6422
Q	998,5387	998,5993
A	1069,5758	870,5407
L	1182,6599	799,5036
L	1295,744	686,4196
G	1352,7654	573,3355
L	1465,8495	516,314
D	1580,8764	403,23
I	1693,9605	288,203
R	1850,0616	175,119

Espectro MS/MS



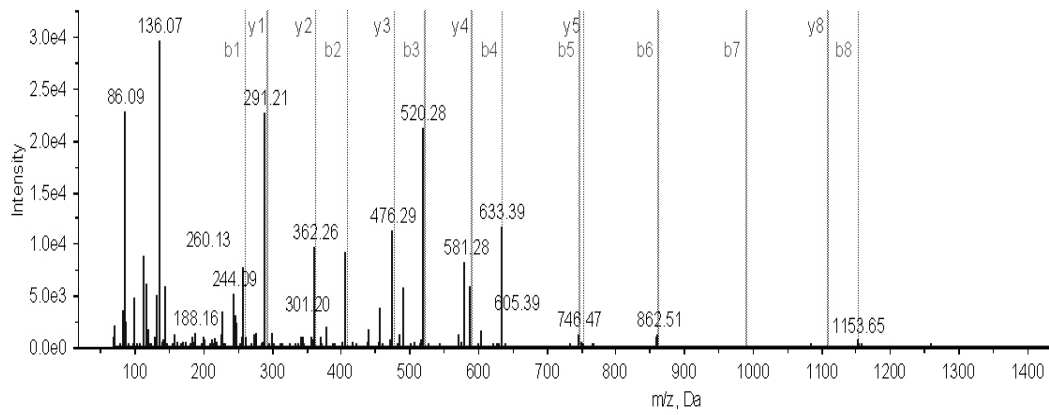
#359

MS del ión precursor



	b	y
D	260.1363	1741.9614
F	407.2047	1482.8324
L	520.2888	1335.7640
L	633.3728	1222.6800
L	746.4569	1109.5959
D	861.4838	996.5118
Q	989.5424	881.4849
Y	1152.6057	753.4263
L	1265.6898	590.3630
N[Dea]	1380.7167	477.2789
A	1451.7539	362.2520
K[IT4]	1723.9509	291.2149

Espectro de MS/MS



ANEXO C: ARTÍCULOS DERIVADOS DE ESTA TESIS

C.1. The cost of resistance to colistin in *Acinetobacter baumannii*: a proteomic perspective

C.2. iTRAQ[®] monitoring of membrane architecture changes in colistin-resistant *Acinetobacter baumannii*

Fernández-Reyes M, Rodríguez-Falcón M, Chiva C, Pachón J, Andreu D, Rivas L. [The cost of resistance to colistin in *Acinetobacter baumannii*: a proteomic perspective](#). *Proteomics*. 2009; 9(6): 1632-45.

**iTRAQ[®] monitoring of membrane architecture changes in colistin-resistant
*Acinetobacter baumannii***

Manuel Rodríguez-Falcón¹, María Fernández-Reyes², Cristina Chiva¹, Luis Rivas^{2*},
David Andreu^{1*}

¹Proteomics Unit, Department of Experimental and Health Sciences, Pompeu Fabra
University, Barcelona Biomedical Research Park, 08003 Barcelona, Spain

²Center for Biological Research (CIB-CSIC), 28040 Madrid, Spain

Corresponding authors:

Dr. Luis Rivas
Center for Biological Research, CIB-CSIC
Ramiro de Maeztu 9
28040 Madrid, Spain
luis.rivas@cib.csic.es

Prof. David Andreu
Department of Experimental and Health Sciences
Pompeu Fabra University
Barcelona Biomedical Research Park
Dr. Aiguader 88
08003 Barcelona, Spain
david.andreu@upf.edu

ABSTRACT

A resistant strain of *Acinetobacter baumannii*, a clinically relevant pathogen, was obtained by growing the susceptible strain ATCC 19606 under increasing pressure of colistin, regarded as the only universally active drug against multi-resistant strains. The membrane fraction from resistant and the wild-type phenotypes were compared in iTRAQ experiments where several down-regulated proteins appeared as a significant feature of the resistant strain. These included peptidoglycan-associated proteins, porins, outer membrane proteins, as well as several metabolic enzymes, all of them consistent with previous findings. A few over-expressed proteins were also found, including some related to cellular stress, electron transport, membrane transport, lipopolysaccharide synthesis, cell envelope biogenesis and efflux pumps. The overall pattern of protein differential expression was suggestive of extensive membrane remodeling with decreased membrane permeability and substantial loss of biological fitness in the resistant phenotype, confirming previous work from our group (Fernández-Reyes et al., *Proteomics* 2009, 9, 1632-1645). Results agree with the decreased proliferation rate observed for the resistant strains in the absence of antibiotic pressure.

INTRODUCTION

The standard approaches for investigating and quantifying differential protein expression are broadly divided into gel- and non-gel based techniques. Differential gel electrophoresis (DIGE) is best known among the former, while non-gel techniques largely rely on nanoLC-MS/MS analysis. Both approaches have been compared [1, 2] and their respective merits contrasted. For gel-based methods, the downside includes difficulties in reproducibility [3] and automation [4], not least the limitations derived from the large range of protein expression levels [5, 6], resulting in under-representation of proteins of lower abundance or extreme size, acidity/basicity, or hydrophobicity. Although less intuitive from a visual perspective, some of these challenges are to a significant extent addressed in non-gel methods where protein digests are separated in one or several LC steps and the resolved peptides then analyzed by tandem MS. In combination with stable-isotope labeling [7], this approach has resulted in useful quantitation technologies such as ICAT (isotope-coded affinity tags) [8], SILAC (stable isotope labeling with amino acids in cell culture)[9, 10], or the more recent and increasingly favored iTRAQ (isobaric tags for relative and absolute quantitation) [11]. This latter method allows multiplexed protein quantitation by using a set of isobaric reagents that react with N^α and N^ε-amino groups of peptides. Since practically all peptides in a tryptic digest have at least one labeling position, the protein coverage of the iTRAQ technology is significantly improved over methods such as ICAT, where only low abundance residues such as Cys are labeled. Although in the first MS dimension the iTRAQ isobaric tags are indistinguishable, in the fragmentation MS/MS step four different signature ions are generated that can be used to provide quantitative data by peak area integration.

In a recent paper [12], we examined by DIGE the differential proteomic profiles of the soluble and membrane fractions of both wild type and colistin (polymyxin E)-resistant strains of *Acinetobacter baumannii*, an opportunistic Gram-negative bacterium causing nosocomial infections with high morbidity and mortality rates among intensive care patients [13]. A total of 35 (11 in the membrane fraction) differentially expressed proteins, mostly down-regulated in the resistant strain, were found by this gel-based approach, and conclusively associated to a substantial loss of biological fitness in the resistant phenotype, consistent with the relative paucity of widespread clinical outbreaks.

Given our presently limited knowledge of the biology of *A. baumannii*, it seems appropriate to apply more than one comparative proteomics approach to understanding the changes associated to colistin resistance in this pathogen [14-16]. Thus, in the present paper, we have examined by iTRAQ, a gel-free technology complementary to DIGE, the membrane-enriched subproteomes of the reference strain *A. baumannii* ATCC19606 before and after inducing its resistance to colistin. To our knowledge, this is the first time that iTRAQ techniques are used to determine differential protein expression in *Acinetobacter*. Compared to other isotope labeling techniques, iTRAQ reagents have the distinct advantage that multiple tags are available, thus allowing simultaneous monitoring of multiple samples, or duplicate analysis of the same sample for increased statistical confidence. At the time of our experiment, of the four available tags (an 8-plex kit has recently been introduced) the 114 and 115 were assigned to the colistin-sensible and the 116 and 117 to the colistin-resistant strains. The present results confirm our earlier findings, in the sense that *Acinetobacter* undergoes a substantial loss of metabolic fitness under the pressure of the antibiotic, a situation likely to account for

the hitherto comparatively scarce dissemination of colistin-resistant isolates relative to resistance against other clinically used antibiotics [17].

MATERIALS AND METHODS

Bacteria. *Acinetobacter baumannii* strain ATCC 19606 (a gift of Prof. M. López-Brea, Hospital de la Princesa, Madrid, Spain), sensitive to colistin (MIC= 2 μ M), was grown in Luria Bertani medium at 37°C. MIC was determined as described [18]. Resistance was achieved by liquid culturing under increasing concentration of colistin sulfate (Sigma, Madrid, Spain). Once a maximal level of resistance was obtained (MIC= 36 μ M), bacteria were grown for 2 months at constant colistin concentration. A single clone was isolated, expanded and aliquots in freezing medium (65% glycerol, 0.1 M MgSO₄, 25 mM Tris-HCl, pH 8.0) were taken and kept at -80°C. From this frozen stock, new samples for massive bacterial growth were taken and used only once for each new preparation.

Extraction of membrane-enriched protein fraction. Cells resulting from the growth of 25 or 35 mL culture medium for sensitive or resistant clones, respectively, were harvested at exponential growth phase (OD₆₀₀= 1.5 or 1.0 for ATCC 19606 and its colistin resistant isolate, respectively) by centrifugation (20 min, 4°C, 4,500×g), washed twice with phosphate buffered saline (PBS, 10 mM Na₂HPO₄, 1 mM KH₂PO₄, 140 mM NaCl, 3 mM KCl, pH 7.0), and once with doubly distilled water. Pellets were stored at -80°C until protein extraction. To extract the membrane-enriched protein fraction the Molloy protocol [19] was followed. Briefly, cells were disrupted at 12,000 psi in a French press (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA). EDTA potassium salt was added to the resulting lysate to a final 15 mM concentration. Unbroken cells were removed by centrifugation at 4500 × g for 20 min, 4°C, and the resulting pellet re-extracted with the same buffer and combined with the previous supernatant. The crude membrane fraction was obtained by ultracentrifugation (140,000 × g, 50 min, 4°C);

contamination by soluble material was removed by two consecutive washes with 10 mL of the same buffer. The pellet was next resuspended in 20 mL of 0.1 M Na₂CO₃, pH 11, and gently shaken for 1 h at 4°C, then ultracentrifuged as described above. The resulting pellet was resuspended in 2 mL of 50 mM Tris-HCl pH 7.3 containing 1% of the zwitterionic sulfobetaine detergent 3-[N,N-dimethyl(3-myristoylamino)propyl] ammonium] propanesulfonate (ASB-14, Sigma) and 2 mM tributylphosphine. Protein concentration was measured by the bicinchoninic acid (BCA) method using a commercial kit (Pierce, Rockford, IL) and cleaning up with the Ready Prep 2D kit (Bio-Rad), according to manufacturer's directions.

Trypsin digestion and labeling with iTRAQ reagents. The general protocol for trypsin digestion and iTRAQ peptide labeling recommended by Applied Biosystems (Foster City, CA) was followed [20]. All reagents were from Applied Biosystems unless otherwise stated. Briefly, protein pellets from two colistin-sensitive (S1 and S2) and two colistin-resistant (R1 and R2) cultures were dissolved in 60 µL of the dissolution buffer (0.5 M triethylammonium bicarbonate). Protein concentration was measured by the BCA method. For trypsin digestion, 100 µg of protein from each sample was diluted to 20 µL with dissolution buffer, 1 µL of denaturant (2% SDS) and 2 µL of reducing agent [50 mM tris-(2-carboxyethyl)phosphine] were added and incubation was performed for 1 h at 60°C. Tubes were brought to room temperature, 1 µL of cysteine blocking reagent (200 mM methyl methanethiosulfonate (MMTS) in isopropanol) was added and incubated for 10 min at room temperature, then 10 µL of 1 µg/µL solution of trypsin (Promega, Madison, WI) in MilliQ water were added to each tube and incubated overnight at 37°C. Next, one unit (1 vial) of each iTRAQ reagent (114, 115, 116 and 117) was dissolved in 70 µL absolute ethanol and added separately into each tube and

incubated at room temperature for 1 h. The four labeled peptide solutions were then pooled into a new vial.

SCX chromatographic fractionation. The peptide pool was separated into 6 fractions in an SCX cation exchange column prior to RP-LC-MS/MS. Briefly, the sample was diluted 10 times with loading buffer (10 mM KH_2PO_4 in 25% acetonitrile pH 3), the pH was adjusted to 2.5-3.3, and applied to a cation exchange cartridge (Applied Biosystems). Peptides were eluted with six 1 mL fractions of loading buffer containing increasing concentrations of KCl (25, 50, 100, 150, 250, and 375 mM). Each of the six resulting SCX fractions was desalted in a reverse phase cartridge (Spec 3 mL C18 cartridges, Varian Inc., Palo Alto, CA), dried *in vacuo* and reconstituted in 10 μL 0.1% TFA.

NanoLC-mass spectrometric analysis. 4 μL of each peptide fraction were separated in an Atlantis dC18 NanoEase, 75 $\mu\text{m} \times 150$ mm column (Waters) fitted to an Ultimate II nanoLC system (LC Packings – Dionex, Sunnyvale, CA). Peptides were eluted with a linear 5-50% acetonitrile gradient into 0.1% formic acid over 180 min at 0.2 $\mu\text{L}/\text{min}$ and then analyzed in a Q-Star Pulsar instrument (Applied Biosystems) fitted with a nanoESI source (Proxeon). Each peptide fraction was analyzed in duplicate. The mass spectrometer operated in positive ion mode, with an electrospray voltage of 2400 V and a selected mass range of m/z 350-1700. Data were acquired in an information-dependent acquisition (IDA) mode; only precursor charge states +2, +3 and +4 were considered, and the three most abundant charged peptides above 20 counts were selected for MS/MS and dynamically excluded for 60 s, with a 50 mmu mass tolerance.

In the equation defining collision energies for each charge state, slope was maintained and the intercept was increased from 5 to 12V.

Database search and quantification. Protein identification and quantitation was performed by means of the Protein Pilot software v.2.0.1 (Applied Biosystems) using the Paragon algorithm [21]. Data were processed by a search against a custom database of all *Acinetobacter* genus proteins plus all human keratins available in the NCBI non-redundant database and their reversed sequence (36342 entries, 01/23/2008) using the thorough mode. MMTS-labeled Cys was set as fixed modification. Other parameters such as peptide tolerance in MS and MS/MS mode, trypsin efficiency, or any other residue modification are built in functions of Protein Pilot. Protein identification was based on the ProtScore, with the cut-off set at 1.3 that means a confidence level of 95%. For quantitation, the program excluded peptides with confidence level <1%, peptides shared between different proteins, or peptides whose spectrum is also claimed by a different protein but with unrelated peptide sequence (precursor overlap). Peptides not having an iTRAQ modification were also excluded. The accuracy of each protein ratio is given by a calculated 'error factor' in the software, and a p-value that assesses whether the protein is significantly differentially expressed.

For the identification of differential expression, each experimental run was initially considered separately. To be classified as significantly differentially expressed, a protein had to be quantified from at least three spectra (allowing generation of a p-value), have a p-value ≤ 0.05 , and a >1.2- or <0.8-fold ratio change in both analysis sets (116/114 and 117/115). For proteins not annotated in the database, homology searches were done with BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi>).

RESULTS

By growing the colistin-sensitive strain under antibiotic pressure (see Materials and Methods and ref. [12]), an 18-fold increase in resistance was induced, and a proteomic signature correlating with colistin resistance was sought for. iTRAQ analysis was used to investigate quantitative differences in protein expression between the membrane-enriched protein fraction of the colistin-susceptible and -resistant strains. The reason for the present iTRAQ study to focus on the membrane fraction was the above-mentioned limitations (see Introduction) of gel-based methods (e.g., DIGE) as far as high-hydrophobicity proteins such as those found on membranes are concerned, thus making a gel-free approach advisable.

Each sample was digested with trypsin, labeled with iTRAQ reagents, and analyzed with an LC-MS/MS system after SCX fractionation. Unlike other isotope labels, iTRAQ tags are isobaric, thus yielding the same m/z for the same peptide for the first stage MS, regardless of its 114, 115, 116 or 117 tags. However, in the second-stage MS/MS analysis, peptide ions are fragmented with suitable collision energies, giving rise to product ions that include the m/z 114-to-117 reporter ions, and to peptide fragment ions from which amino acid sequences can be deduced. Thus, in the iTRAQ method the MS/MS spectra are used for both protein identification and quantitation.

Database search of MS/MS spectra identified 360 proteins at 95% confidence level (see Supporting Information). For protein quantitation, peak areas for iTRAQ tag peaks (114-117 m/z) were determined, and after normalization of sample amounts using median ratios (Protein Pilot™ 2.0.1 software, 2007), differential expression between susceptible and resistant was evaluated for both 116/114 and 117/115 sets. Differential expression was considered significant for those ratios with p -value less or equal to 0.05 and an error factor (EF) less than 2 in both analysis sets. Comparison of 116 and 114

yielded 51 proteins that were differentially expressed between susceptible and resistant samples, while comparison of 117 and 115 led to 42 differentially expressed proteins. A total of 25 proteins appeared as differentially expressed in both data sets and are listed on Table 1.

Nine out of the 25 (36%) differentially expressed proteins showed resistant/susceptible average ratios higher than 1.2 (between 1.58 and 3.93) in both sets, indicating over-expression. The remaining 16 proteins (64%) displayed resistant/susceptible average ratios lower than 0.8 (between 0.38 and 0.72), indicating under-expression. The 116/114 and 117/115 ratios for the 25 differentially expressed proteins (Fig. 1) show a very good agreement between both data sets.

DISCUSSION

Omics techniques have opened new vistas on the metabolic pathways underlying bacterial survival and pathogenesis. A surprising finding in this regard is the limited repertory of essential metabolic targets susceptible of therapeutic exploitation. The case of *Salmonella* is paradigmatic in this regard [22], and may possibly be extended to other bacteria such as *Acinetobacter*, known for its remarkable metabolic versatility. Thus, in attempting to expand the antimicrobial arsenal, a focus on adaptation mechanisms [23] [24] enabling the bacteria to strive under antibiotic challenge may be a clearer-sighted strategy than a relatively fruitless search for novel (scarce) bactericidal targets. By way of its emphasis on the key players of bacterial metabolism, proteomics affords a better perspective of adaptation mechanisms than, e.g., transcriptomics (which, on the other hand, has not yet been developed for *Acinetobacter*) and may ideally help to identify bacterial proteins precluding -or at least impairing- the onset of resistant phenotypes [25-27]. In this work we have investigated the differential expression of *A. baumannii* membrane proteins between colistin-susceptible and resistant strains. A slightly reductionistic approach has been adopted to define a specific colistin-resistant signature. It is worth mentioning that this is the first time that the iTRAQ technique has been performed on *Acinetobacter baumannii* to determine the differential protein expression between sensitive and colistin resistant-induced strains. The results in Table 1 for the 25 differentially expressed proteins identified show 9 overexpressed and 16 underexpressed proteins (36% and 64%, respectively) in the colistin-resistant strain. Below is a detailed analysis of these findings and their possible biological significance.

Overexpressed proteins in colistin-resistant strains

Of the nine overexpressed proteins found in the colistin-resistant strains, two are related to efflux pumps (membrane transporters) and resistance acquisition. In Gram-negative bacteria, the outer membrane limits the rate of antimicrobials entering the cell and the multidrug efflux pumps actively export multiple, structurally distinct classes of antimicrobials out of the bacteria. Bacterial multidrug resistance has often been associated with overexpression of these transporters [28], which have been grouped into six families: the ATP binding cassette (ABC) family, the major facilitator superfamily (MFS), the resistance-nodulation-division (RND) family, the multidrug and toxic compound extrusion (MATE) family, the small multidrug resistance (SMR) family and the drug/metabolite transporter (DMT) superfamily.

The protein with the highest level of overexpression, gi|126643230 (#1, Table 1), is a member of the ABC family, the only one using ATP hydrolysis as a driving force to pump out substrates. In *Acinetobacter*, as in other Gram negative bacteria, ABC transporters are not primarily responsible for extrusion of antibiotics such as aminoglycosides, erythromycin, tetracyclines and in part fluoroquinolones [29]. Instead, the process appears to be mainly carried out by members of the RND family, to which the other overexpressed efflux protein in this study (gi|126640221, Table 1, #4) belongs, and for which overexpression in clinical isolates of resistant *Acinetobacter* has already been documented [30].

Two other overexpressed proteins are enzymes related to metabolic pathways. The phenylacetate-CoA oxygenase/reductase Paak subunit (#2, gi|126641386) is responsible for the hydroxylation of phenylacetate-CoA -and analogues such as phenylalanine-CoA- as the second stage step in their catabolic degradation. Genomic comparison of three different *Acinetobacter* strains showed the AYE multiresistant clinical isolate being more metabolically versatile than other susceptible isolates [31]. Also, *A. calcoaceticus*

clinical isolates capable of growing on phenylacetate were associated to a mild antibiotic resistance pattern [32], suggesting diminished metabolic fitness of the colistin-resistant trait under clinical conditions [12]. In another important opportunistic pathogen, *Burkholderia cenocepacia*, a functional phenylacetic acid catabolic pathway has been found to be required for full pathogenicity [33].

A second overexpressed metabolic protein, flavoprotein β -subunit (#5, gi|126642663), is a member of the large family of electron transfer flavoproteins (EFTs) family, which feed electrons to ubiquinone substrates for respiration. Its gene in *A. baumannii* is adjacent to that of the α -subunit with which it forms a functional dimer. Overexpression may potentially increase the respiration rate, hence the proton gradient, which in turn may secure an adequate motive force that may be used, among other purposes, to activate the aforementioned RND transporters. A down side of increased respiratory rates is that, in the event of uncoupling or short supply of substrates, a oxidative stress by increased superoxide production may ensue.

Entry #9 in Table 1, annotated as catalase (gi|126641432) by BLAST analysis, is an ubiquitous enzyme, highly analogous to type II hydroperoxidase (HP II), that catalyzes the conversion of hydrogen peroxide into water and molecular oxygen and thus protects cells from the toxic effects of peroxides generated under oxidative stress conditions. The involvement of HP II-like catalase in the stationary phase may decrease the impact of oxidative stress resulting from the increased respiration rates mentioned above [34]. In *E. coli*, catalase expression is dependent on RpoS, a transcription factor induced, among other stimuli, by hyperosmotic conditions [35]. Although this factor is absent in *A. baumannii*, the induction of osmotic stress by colistin is well documented [36], even though the precise mechanism remains to be ascertained. ,

The glutamate-1-semialdehyde aminotransferase (entry #8, Table 1, gi|126642500) catalyzes the formation of 5-aminolevulinic acid within the heme synthesis pathway, and exhibits high sequence conservation among bacteria [37]. In *Salmonella*, mutations of its *hemL* gene lead to formation of small colony variants, a phenotype characterized by much higher intracellular persistence but reduced in vivo virulence [38]. Interestingly, in *E. coli* *hemL* is one of the genes controlled by the PhoP-PhoQ system that lowers the anionic character of LPS and increases resistance to colistin [39]. However, a similar role for PhoP-PhoQ has not yet been described in *Acinetobacter*.

Other proteins found to be overexpressed in the colistin-resistant strain are those directly involved in the insertion of membrane proteins, which in Gram negative bacteria, e.g., *E. coli*, account for 20% (inner membrane) and 2% (outer membrane) of the proteome [40] and constitute a main target for colistin. Thus, translocase subunit SecA (entry #4, Table 1, gi|162286722) is involved in translocation of unfolded protein across the membrane, a job that includes both translocation of hydrophilic domains and integration of hydrophobic segments into the membrane [40], with ATP hydrolysis as a driving force. Thus, association of SecA with precursors of the OmpA family such as proOmpA (vide infra) [41] is necessary for their translocation and correct membrane insertion, in an ATP-dependent manner [42]. On the other hand, faulty expression of SecA is linked to low expression of the outer membrane receptor for acinetobactin, an *Acinetobacter* siderophore necessary for iron acquisition [43].

Also overexpressed is entry #7, Table 1 (gi|126641353), an ATP-dependent ClpA/B-type chaperone thought to protect cells from stress by controlling the aggregation and denaturation of vital cellular structures. The ATP-binding domain is found in one or two copies at the amino terminus of ClpA and ClpB and regulates the activity of ClpP, a non-specific proteinase that plays a role on the survival of slow-dividing or non-

growing cells, as well as in heat-shock and oxidative stress [44]. Mutants of this proteinase are unable to reach late exponential phase, with some similarity to the stasis produced by colistin.

Finally, the last overexpressed protein (#3, Table 1, gi|155029703), annotated as 27 kDa hypothetical protein A1S_3482, has no known biological function. A BLAST search showed appealing but low homology with the LPS glycosyl transferase of *Thermus thermophilus* (gi|46198588). The wide genetic gap calls for caution in any attempt to find parallels between *Thermus*, a eubacterium, and *Acinetobacter*. On the other hand, the presence of highly cationic stretches in A1S_3482, which might somehow compete for colistin binding, is worth mentioning.

Underexpressed proteins in colistin-resistant strains

Of the sixteen proteins underexpressed in colistin-resistant *Acinetobacter* strains (Table 1), only two are directly involved in cellular metabolism, and both related to the same metabolic pathway, namely the use of fatty acids as metabolic fuel.

Entry #16, the putative long chain fatty acid transport protein (gi|126642803), is shown by BLAST to belong to the FadL/Tox outer membrane protein family, involved in the translocation from the external medium into the periplasm of highly hydrophobic substrates such as long chain fatty acids (FadL) or aromatic hydrocarbons (Todx) [45,46]. FadL mutants show impaired ability to grow on long fatty acid chains as carbon source, hence limiting the metabolic versatility of *A. baumannii*. On the other hand, underexpression of FadL has been related to resistance to nalidixic acid in *E. coli* [47], as well as to other antibiotics in *Hemophylus* [48], probably by precluding the entrance of the corresponding noxious agents.

The putative acyl CoA dehydrogenase (#15, Table 1, gi|126642370), regulates fatty acid catabolism of fatty acids, specifically by catalyzing α,β dehydrogenation to trans-enoyl CoA. In *Salmonella*, the expression of this protein has been shown to be part of the adaptive response to starvation [49]. It can be readily seen that such a deficient processing of the fatty acid substrates, coupled with their faulty transport across the membrane (see previous paragraph), can cause substantial impairment to the metabolic versatility of the colistin-resistant strain of *Acinetobacter*.

Aside from this metabolic unfitness, the most salient proteomic feature of the colistin-resistant strain is the decreased expression of many outer membrane structural proteins (10 out of 16 entries, 62%), including porins and particularly members of the OmpA family, whose relevance in host-bacteria relationships has become increasingly clear in recent years. OmpA is known to be cytotoxic to mammalian cells, being capable to translocate across the host plasma membrane and localize in the nucleus [50],[51]. Porins, for their part, in addition to their channel-forming properties allowing the transport of preferentially hydrophobic solutes across the membrane, are also involved in adhesion to other cells and in the binding of bactericidal compounds to the surface of Gram-negative bacteria. Variations in their structure and/or regulation of their expression are well-known survival strategies developed by bacteria, *Acinetobacter* included [29], to evade antibiotic pressure.

The 34 kDa outer membrane protein (#11, Table 1, gi|82654966), found underexpressed in the colistin-resistant *A. baumannii* strains of the present study, has also been reported as underexpressed in imipenem-resistant clinical isolates [52]. In functional terms, we have not observed any significant decreased susceptibility to the latter antibiotic in colistin-resistant strain [12]. Other proteins containing an OmpA-like domain and underexpressed in the colistin-resistant strain are #12, (gi|126642177), also known as

Bac surface antigen, and involved in different secretory processes across the outer membrane, and the putative outer membrane protein (# 13, gi|126640934), with the OmpA domain at the C-terminus.

Entry #24 (gi|126641241), annotated as OmpA/MotB, is a heterodimer involved in proton translocation coupled to flagellum motility in *E. coli*. However, a flagellar superstructure is absent in *Acinetobacter*. While dysfunction of this system leads to the intracellular acidification in *E. coli* [53], in *A. baumannii* one might speculate that its underexpression contributes to partially sorting out proton leakage due to the higher leakiness of the outer membrane described in the colistin resistant strain [12].

The underexpression of entry #21, (gi|5008563), a 17 kDa protein annotated as host factor for bacteriophage Q, may plausibly be related to the levels of expression of OmpA. The most salient feature of this protein is its Hfq domain, close to the N-terminus, acting as a chaperone that promotes the binding of small RNAs with their respective mRNA counterparts [54]. Mutation in this protein leads to the loss of virulence inside macrophages for *Salmonella* [55], *E. coli* [56] or *Neisseria* [57]. This host factor is an abundant protein, with 50,000-60,000 copies/cell, mostly cytoplasmic, which makes interpretation of the variation of its expression in a membrane fraction more uncertain. Tentatively, one may propose that in *A. baumannii* Hfq may govern the half-life for OmpA, with destabilization of the OmpA mRNA [58]. While a decreased expression in the resistant strain could result in an increase in the expression of the OmpA, opposite to the observed outcome, an alternative interpretation in the absence of data about mRNA levels is also possible, namely that Hfq may compensate, in terms of protein expression, for an even more drastic drop in mRNA of the OmpA.

Two other underexpressed proteins, entries #22 and #20a, are annotated as outer membrane protein Omp38 precursor (gi|148839593) and outer membrane protein

Omp38 (gi|75438841), respectively. The latter shows a perfect alignment except for the replacement of a Thr residue (gi|148839593) at position 216 for an Ala residue (gi|75438841). This protein is described as responsible for the apoptosis induced by *A. baumannii* in mammalian cells [59], hence acting as a virulence factor. Its underexpression may consequently contribute to the lower virulence observed for the colistin-resistant strain when tested in *Dictyostelium* as virulence model (Fernández-Reyes, unpublished data). Entry #25 (gi|72535027), for its part, is a 233-residue putative OM protein with poor homology (30%) to Omp25, calling for some caution in the interpretation.

The hypothetical 54 kDa outer membrane protein (#14, gi|126640829) has three predicted transmembrane domains, which would make it structurally different from the β -barrel motif most abundant in porins. Whether its underexpression may be related to the reorganization of the outer membrane, due to changes in the protein pattern or to modification of LPS, remains speculative.

The putative glucose-sensitive porin (entry #17, gi|126642873), with homology to OprB, is a porin involved in the access of carbohydrates to the periplasm in *Pseudomonas* [60]. No other effect related to carbohydrate uptake was found in our analysis; however, in DIGE experiments, encompassing global changes in *A. baumannii* related to colistin resistance [12], the metabolism of the resistant strain appeared to be shifted into a higher activity of the TCA cycle, rather than to carbohydrate degradation, hence the decrease in this porin might plausibly be a consequence of poor utilization of the glycolysis route, or simply belong into a global rearrangement of the OM imposed by the colistin resistance.

Finally, our analysis has uncovered four proteins with unknown function. Two of them (entry#18, gi|126643355 and entry #23, gi|126641077) are respectively annotated as

183 and 277-residue putative signal peptides. However, due precisely to their considerable size, both of them would appear to be excluded from such classification. The latter one, gi|126641077, shows homology to a domain of the META superfamily, but also 99% homology to a heat-shock Hs IJ protein of the *A. baumannii* ACICU strain [61]. In *E. coli*, mutants defective in this protein showed an increased susceptibility to novobiocin [62,63]. The former protein, gi|126643355, showed no significant homologies, aside from other proteins also annotated as hypothetical, therefore any interpretation of its underexpression in the colistin resistance strain is at present unwise. Entry #10 (gi|126642630), annotated in different *A. baumannii* isolates as peptidoglycan-associated lipoprotein precursor, or as peptidoglycan associated lipoprotein, or just as an outer membrane protein, in all cases with 99-100% identity, possesses an OmpA domain whose closer homology is with OprL from *Pseudomonas aeruginosa*. In this organism, the double mutant OprL, OxyR, shows an increased susceptibility to H₂O₂ relative to OxyR, especially in biofilm isolates. It would therefore appear that OprL acts by preventing membrane swelling under oxidative stress, as well as playing a role in nutrient uptake [34].

Finally, entry #19 (gi|126640876) is a putative peptidoglycan-binding protein with two well-differentiated domains, an N-terminal BON domain involved in phospholipid binding, and a C-terminal LysM domain with sites for peptidoglycan binding [64], often found in enzymes involved in degradation of the peptidoglycan layer. This protein might presumably act as a bridge between peptidoglycan and phospholipid membrane in the periplasm.

In summary, three major general trends emerge from our iTRAQ® analysis of colistin resistance in *Acinetobacter baumannii*. First, an overexpression of transporters. Second, a change in the ability to thrive on fatty acid, a finding perhaps partially biased due to

the fact that our analysis is confined to the membrane fraction. Still, we find particularly remarkable the increased ability to metabolize phenylacetate, supported by the overexpression of phenylacetate –CoA oxygenase/reductase (gi126641386), in conjunction with the reduced use of linear fatty acids as fuel, as shown by the down-regulation of both acyl-CoA dehydrogenase (gi126642370) and long-chain fatty acid transport protein (gi126642803) in the resistant strain. Third, and more important, a substantial reorganization of the membrane composition and architecture of the organism, with special impact on the members of the OmpA family of outer membrane proteins.

Acknowledgements. Work supported by the Spanish Ministry of Science and Innovation (grants BIO2005-07592-CO2-02 and BIO2008-04487-CO3-02 to D.A., Fondo de Investigaciones sanitarias PI061125 and RD06/0021/0006 to L.R., and PET2006-2006_00139 to D.A. and L.R.), and by the regional governments of Catalunya (SGR2005-00494 and SGR2008-00492). The Proteomics Unit at the Pompeu Fabra University is a member and follows the quality standards of ProteoRed, the Spanish Proteomics Institute promoted by Genoma España. L.R. is a member of Red COMBACT de Investigación Cooperativa, Comunidad Autónoma de Madrid).

REFERENCES

- [1] Wu, W. W., Wang, G., Baek, S. J., Shen, R. F., Comparative study of three proteomic quantitative methods, DIGE, cICAT, and iTRAQ, using 2D gel- or LC-MALDI TOF/TOF. *J Proteome Res* 2006, *5*, 651-658.
- [2] Tan, H. T., Tan, S., Lin, Q., Lim, T. K., *et al.*, Quantitative and temporal proteome analysis of butyrate-treated colorectal cancer cells. *Mol Cell Proteomics* 2008, *7*, 1174-1185.
- [3] Lilley, K. S., Razzaq, A., Dupree, P., Two-dimensional gel electrophoresis: recent advances in sample preparation, detection and quantitation. *Curr Opin Chem Biol* 2002, *6*, 46-50.
- [4] Hamdan, M., Righetti, P. G., Modern strategies for protein quantification in proteome analysis: advantages and limitations. *Mass Spectrom Rev* 2002, *21*, 287-302.
- [5] Gygi, S. P., Rist, B., Aebersold, R., Measuring gene expression by quantitative proteome analysis. *Curr Opin Biotechnol* 2000, *11*, 396-401.
- [6] Ong, S. E., Pandey, A., An evaluation of the use of two-dimensional gel electrophoresis in proteomics. *Biomol Eng* 2001, *18*, 195-205.
- [7] Leitner, A., Lindner, W., Current chemical tagging strategies for proteome analysis by mass spectrometry. *J Chromatogr B* 2004, *813*, 1-26.
- [8] Gygi, S. P., Rist, B., Gerber, S. A., Turecek, F., *et al.*, Quantitative analysis of complex protein mixtures using isotope-coded affinity tags. *Nat Biotechnol* 1999, *17*, 994-999.
- [9] Ong, S. E., Blagoev, B., Kratchmarova, I., Kristensen, D. B., *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*, 376-386.
- [10] Colzani, M., Schutz, F., Potts, A., Waridel, P., Quadroni, M., Relative protein quantification by isobaric SILAC with ammonium ion splitting (ISIS). *Mol Cell Proteomics* 2008, *7*, 927-937.
- [11] Ross, P. L., Huang, Y. N., Marchese, J. N., Williamson, B., *et al.*, Multiplexed protein quantitation in *Saccharomyces cerevisiae* using amine-reactive isobaric tagging reagents. *Mol Cell Proteomics* 2004, *3*, 1154-1169.
- [12] Fernández-Reyes, M., Rodríguez-Falcón, M., Chiva, C., Pachón, J., *et al.*, The cost of resistance to colistin in *Acinetobacter baumannii*: a proteomic perspective. *Proteomics* 2009, *9*, 1632-1645.
- [13] Bergogne-Berezin, E., Towner, K. J., *Acinetobacter* spp. as nosocomial pathogens: microbiological, clinical, and epidemiological features. *Clin Microbiol Rev* 1996, *9*, 148-165.
- [14] Dupont, M., Pages, J. M., Lafitte, D., Siroy, A., Bollet, C., Identification of an OprD homologue in *Acinetobacter baumannii*. *J Proteome Res* 2005, *4*, 2386-2390.
- [15] Marti, S., Sanchez-Céspedes, J., Oliveira, E., Bellido, D., *et al.*, Proteomic analysis of a fraction enriched in cell envelope proteins of *Acinetobacter baumannii*. *Proteomics* 2006, *6 Suppl 1*, S82-87.
- [16] Siroy, A., Cosette, P., Seyer, D., Lemaitre-Guillier, C., *et al.*, Global comparison of the membrane subproteomes between a multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* strain and a reference strain. *J Proteome Res* 2006, *5*, 3385-3398.
- [17] Wisplinghoff, H., Hippler, C., Bartual, S. G., Haefs, C., *et al.*, Molecular epidemiology of clinical *Acinetobacter baumannii* and *Acinetobacter* genomic species 13TU isolates using a multilocus sequencing typing scheme. *Clin Microbiol Infect* 2008, *14*, 708-715.

- [18] Saugar, J. M., Rodriguez-Hernandez, M. J., de la Torre, B. G., Pachon-Ibanez, M. E., *et al.*, Activity of cecropin A-melittin hybrid peptides against colistin-resistant clinical strains of *Acinetobacter baumannii*: molecular basis for the differential mechanisms of action. *Antimicrob Agents Chemother* 2006, 50, 1251-1256.
- [19] Molloy, M. P., Herbert, B. R., Slade, M. B., Rabilloud, T., *et al.*, Proteomic analysis of the *Escherichia coli* outer membrane. *Eur J Biochem / FEBS* 2000, 267, 2871-2881.
- [20] Anonymous, Applied Biosystems iTRAQ Reagents, Applied Biosystems, Foster City, CA 2004.
- [21] Shilov, I. V., Seymour, S. L., Patel, A. A., Loboda, A., *et al.*, The Paragon Algorithm, a next generation search engine that uses sequence temperature values and feature probabilities to identify peptides from tandem mass spectra. *Mol Cell Proteomics* 2007, 6, 1638-1655.
- [22] Becker, D., Selbach, M., Rollenhagen, C., Ballmaier, M., *et al.*, Robust *Salmonella* metabolism limits possibilities for new antimicrobials. *Nature* 2006, 440, 303-307.
- [23] Smith, P. A., Romesberg, F. E., Combating bacteria and drug resistance by inhibiting mechanisms of persistence and adaptation. *Nat Chem Biol* 2007, 3, 549-556.
- [24] Clatworthy, A. E., Pierson, E., Hung, D. T., Targeting virulence: a new paradigm for antimicrobial therapy. *Nat Chem Biol* 2007, 3, 541-548.
- [25] Sender, U., Bandow, J., Engelmann, S., Lindequist, U., Hecker, M., Proteomic signatures for daunomycin and adriamycin in *Bacillus subtilis*. *Pharmazie* 2004, 59, 65-70.
- [26] Xu, C., Lin, X., Ren, H., Zhang, Y., *et al.*, Analysis of outer membrane proteome of *Escherichia coli* related to resistance to ampicillin and tetracycline. *Proteomics* 2006, 6, 462-473.
- [27] Yun, S. H., Choi, C. W., Park, S. H., Lee, J. C., *et al.*, Proteomic analysis of outer membrane proteins from *Acinetobacter baumannii* DU202 in tetracycline stress condition. *J Microbiol* 2008, 46, 720-727.
- [28] Poole, K., Outer membranes and efflux: the path to multidrug resistance in Gram-negative bacteria. *Curr Pharm Biotechnol* 2002, 3, 77-98.
- [29] Vila, J., Marti, S., Sanchez-Cespedes, J., Porins, efflux pumps and multidrug resistance in *Acinetobacter baumannii*. *J Antimicrob Chemother* 2007, 59, 1210-1215.
- [30] Nemec, A., Maixnerova, M., van der Reijden, T. J., van den Broek, P. J., Dijkshoorn, L., Relationship between the AdeABC efflux system gene content, netilmicin susceptibility and multidrug resistance in a genotypically diverse collection of *Acinetobacter baumannii* strains. *J Antimicrob Chemother* 2007, 60, 483-489.
- [31] Vallenet, D., Nordmann, P., Barbe, V., Poirel, L., *et al.*, Comparative analysis of *Acinetobacter*: three genomes for three lifestyles. *PLoS ONE* 2008, 3, e1805.
- [32] Vila, J., Almela, M., Jimenez de Anta, M. T., Laboratory investigation of hospital outbreak caused by two different multiresistant *Acinetobacter calcoaceticus* subsp. *anitratus* strains. *J Clin Microbiol* 1989, 27, 1086-1089.
- [33] Law, R. J., Hamlin, J. N., Sivro, A., McCorrister, S. J., *et al.*, A functional phenylacetic acid catabolic pathway is required for full pathogenicity of *Burkholderia cenocepacia* in the *Caenorhabditis elegans* host model. *J Bacteriol* 2008, 190, 7209-7218.
- [34] Panmanee, W., Gomez, F., Witte, D., Pancholi, V., *et al.*, The peptidoglycan-associated lipoprotein OprL helps protect a *Pseudomonas aeruginosa* mutant devoid of the transactivator OxyR from hydrogen peroxide-mediated killing during planktonic and biofilm culture. *J Bacteriol* 2008, 190, 3658-3669.

- [35] Vijayakumar, S. R., Kirchhof, M. G., Patten, C. L., Schellhorn, H. E., RpoS-regulated genes of *Escherichia coli* identified by random lacZ fusion mutagenesis. *J Bacteriol* 2004, *186*, 8499-8507.
- [36] Barbe, V., Vallenet, D., Fonknechten, N., Kreimeyer, A., *et al.*, Unique features revealed by the genome sequence of *Acinetobacter* sp. ADP1, a versatile and naturally transformation competent bacterium. *Nucleic Acids Res* 2004, *32*, 5766-5779.
- [37] Hungerer, C., Troup, B., Romling, U., Jahn, D., Regulation of the hemA gene during 5-aminolevulinic acid formation in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* 1995, *177*, 1435-1443.
- [38] Cano, D. A., Pucciarelli, M. G., Martinez-Moya, M., Casadesus, J., Garcia-del Portillo, F., Selection of small-colony variants of *Salmonella enterica* serovar typhimurium in nonphagocytic eucaryotic cells. *Infect Immun* 2003, *71*, 3690-3698.
- [39] Minagawa, S., Ogasawara, H., Kato, A., Yamamoto, K., *et al.*, Identification and molecular characterization of the Mg²⁺ stimulon of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 2003, *185*, 3696-3702.
- [40] Xie, Y., Parthasarathy, G., Di Cello, F., Teng, C. H., *et al.*, Transcriptome of *Escherichia coli* K1 bound to human brain microvascular endothelial cells. *Biochem Bioph Res Comm* 2008, *365*, 201-206.
- [41] Lill, R., Cunningham, K., Brundage, L. A., Ito, K., *et al.*, SecA protein hydrolyzes ATP and is an essential component of the protein translocation ATPase of *Escherichia coli*. *EMBO J* 1989, *8*, 961-966.
- [42] Mori, H., Sugiyama, H., Yamanaka, M., Sato, K., *et al.*, Amino-terminal region of SecA is involved in the function of SecE for protein translocation into *Escherichia coli* membrane vesicles. *J Biochem* 1998, *124*, 122-129.
- [43] Zimmler, D. L., Penwell, W. F., Gaddy, J. A., Menke, S. M., *et al.*, Iron acquisition functions expressed by the human pathogen *Acinetobacter baumannii*. *Biometals* 2009, *22*, 23-32.
- [44] Weichart, D., Querfurth, N., Dreger, M., Hengge-Aronis, R., Global role for ClpP-containing proteases in stationary-phase adaptation of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 2003, *185*, 115-125.
- [45] Hearn, E. M., Patel, D. R., Lepore, B. W., Indic, M., van den Berg, B., Transmembrane passage of hydrophobic compounds through a protein channel wall. *Nature* 2009, *458*, 367-370.
- [46] Hearn, E. M., Patel, D. R., van den Berg, B., Outer-membrane transport of aromatic hydrocarbons as a first step in biodegradation. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008, *105*, 8601-8606.
- [47] Lin, G. M., Lin, J. C., Chen, P. J., Siu, L. K., *et al.*, Pan-drug resistant *Acinetobacter baumannii* bacteremia following endoscopic retrograde cholangiopancreatography. *Am J Gastroenterol* 2008, *103*, 498-499.
- [48] Lerner, C. G., Kakavas, S. J., Wagner, C., Chang, R. T., *et al.*, Novel approach to mapping of resistance mutations in whole genomes by using restriction enzyme modulation of transformation efficiency. *Antimicrob Agents Chemother* 2005, *49*, 2767-2777.
- [49] Spector, M. P., DiRusso, C. C., Pallen, M. J., Garcia del Portillo, F., *et al.*, The medium-/long-chain fatty acyl-CoA dehydrogenase (fadF) gene of *Salmonella typhimurium* is a phase 1 starvation-stress response (SSR) locus. *Microbiology-SGM* 1999, *145 (Pt 1)*, 15-31.
- [50] Boso-Ribelles, V., Roma-Sanchez, E., Carmena, J., Caceres, C., Bautista, D., Tigecycline: a new treatment choice against *Acinetobacter baumannii*. *Recent Pat Anti-Infect* 2008, *3*, 117-122.

- [51] Choi, C. H., Hyun, S. H., Kim, J., Lee, Y. C., *et al.*, Nuclear translocation and DNase I-like enzymatic activity of *Acinetobacter baumannii* outer membrane protein A. *FEMS Microbiol Lett* 2008, 288, 62-67.
- [52] del Mar Tomas, M., Beceiro, A., Perez, A., Velasco, D., *et al.*, Cloning and functional analysis of the gene encoding the 33- to 36-kilodalton outer membrane protein associated with carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother* 2005, 49, 5172-5175.
- [53] Hosking, E. R., Vogt, C., Bakker, E. P., Manson, M. D., The *Escherichia coli* MotAB proton channel unplugged. *J Mol Biol* 2006, 364, 921-937.
- [54] Brennan, R. G., Link, T. M., Hfq structure, function and ligand binding. *Current Opin Microbiol* 2007, 10, 125-133.
- [55] Updegrave, T., Wilf, N., Sun, X., Wartell, R. M., Effect of Hfq on RprA-rpoS mRNA pairing: Hfq-RNA binding and the influence of the 5' rpoS mRNA leader region. *Biochemistry* 2008, 47, 11184-11195.
- [56] Kulesus, R. R., Diaz-Perez, K., Slechta, E. S., Eto, D. S., Mulvey, M. A., Impact of the RNA chaperone Hfq on the fitness and virulence potential of uropathogenic *Escherichia coli*. *Infect Immun* 2008, 76, 3019-3026.
- [57] Fantappie, L., Metruccio, M. M., Seib, K. L., Oriente, F., *et al.*, The RNA chaperone Hfq is involved in stress response and virulence in *Neisseria meningitidis* and is a pleiotropic regulator of protein expression. *Infect Immun* 2009, 77, 1842-1853.
- [58] Rasmussen, A. A., Eriksen, M., Gilany, K., Udesen, C., *et al.*, Regulation of ompA mRNA stability: the role of a small regulatory RNA in growth phase-dependent control. *Mol Microbiol* 2005, 58, 1421-1429.
- [59] Choi, C. H., Lee, E. Y., Lee, Y. C., Park, T. I., *et al.*, Outer membrane protein 38 of *Acinetobacter baumannii* localizes to the mitochondria and induces apoptosis of epithelial cells. *Cell Microbiol* 2005, 7, 1127-1138.
- [60] Wylie, J. L., Worobec, E. A., The OprB porin plays a central role in carbohydrate uptake in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* 1995, 177, 3021-3026.
- [61] Iacono, M., Villa, L., Fortini, D., Bordoni, R., *et al.*, Whole-genome pyrosequencing of an epidemic multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* strain belonging to the European clone II group. *Antimicrob Agents Chemother* 2008, 52, 2616-2625.
- [62] Jovanovic, M., Lilic, M., Savic, D. J., Jovanovic, G., The LysR-type transcriptional regulator CysB controls the repression of hslJ transcription in *Escherichia coli*. *Microbiology-SGM* 2003, 149, 3449-3459.
- [63] Lilic, M., Jovanovic, M., Jovanovic, G., Savic, D. J., Identification of the CysB-regulated gene, hslJ, related to the *Escherichia coli* novobiocin resistance phenotype. *FEMS Microbiol Lett* 2003, 224, 239-246.
- [64] Buist, G., Steen, A., Kok, J., Kuipers, O. P., LysM, a widely distributed protein motif for binding to (peptido)glycans. *Mol Microbiol* 2008, 68, 838-847.

Table 1. Differentially expressed proteins between colistin-resistant and sensible strains, with p-value lower or equal to 0.05 and error factor lower than 2, common in both 116/114 and 117/115 analysis sets.

Protein ID number	Protein Name	Accession (gi)	116/114 ratio	95% CI ^{a)}	117/115 ratio	95% CI ^{a)}	Average ^{b)} ratio	Function
1	Putative ABC transporter ATP-binding protein	126643230	4.48	(2.6, 7.7)	3.39	(2.5, 4.6)	3.93	Resistance to antibiotic
2	Phenylacetate-CoA oxygenase/reductase PaaK subunit	126641386	3.68	(2.7, 5.0)	2.95	(2.2, 3.9)	3.31	Metabolism
3	Hypothetical protein A1S_3482	155029703	2.53	(1.7, 3.8)	3.27	(2.1, 5.1)	2.90	Metabolism
4	RND superfamily-like exporters	126640221	2.56	(1.6, 4.2)	3.09	(1.9, 5.0)	2.82	Resistance to antibiotic
5	Electron transfer flavoprotein beta-subunit	126642663	2.85	(2.1, 3.9)	1.88	(1.5, 2.4)	2.36	Metabolism
6	Preprotein translocase subunit SecA	162286722	2.31	(1.8, 3.0)	1.59	(1.1, 2.2)	1.95	Metabolism
7	Putative ClpA/B-type chaperone	126641353	1.91	(1.7, 2.1)	1.69	(1.5, 2.0)	1.80	Metabolism
8	Glutamate-1-semialdehyde aminotransferase	126642500	1.57	(1.2, 2.1)	1.64	(1.0, 2.6)	1.61	Metabolism
9	Catalase	126641432	1.81	(1.5, 2.2)	1.36	(1.2, 1.6)	1.58	Metabolism
10	Peptidoglycan-associated lipoprotein precursor	126642630	0.76	(0.7, 0.8)	0.68	(0.6, 0.7)	0.72	Outer membrane protein
11	34 kDa Outer Membrane Protein	82654966	0.71	(0.6, 0.7)	0.65	(0.6, 0.7)	0.68	Resistance to antibiotic Outer membrane protein
12	Putative outer membrane protein	126642177	0.71	(0.6, 0.8)	0.56	(0.4, 0.7)	0.64	Outer membrane protein
13	Putative outer membrane protein	126640934	0.78	(0.7, 0.8)	0.48	(0.4, 0.5)	0.63	Outer membrane protein
14	Putative membrane protein	126640829	0.59	(0.5, 0.6)	0.63	(0.6, 0.7)	0.61	Osmotic shock protection
15	Putative acyl-CoA dehydrogenase	126642370	0.56	(0.4, 0.8)	0.66	(0.6, 0.8)	0.61	Metabolism
16	Putative long-chain fatty acid transport protein	126642803	0.60	(0.5, 0.6)	0.59	(0.5, 0.6)	0.59	Metabolism
17	Putative glucose-sensitive porin (OprB-like)	126642873	0.55	(0.5, 0.6)	0.57	(0.5, 0.6)	0.56	Porin
18	Putative signal peptide	126643355	0.56	(0.5, 0.6)	0.48	(0.4, 0.5)	0.52	Unknown
19	Putative peptidoglycan-binding LysM	126640876	0.28	(0.2, 0.4)	0.66	(0.6, 0.7)	0.47	Osmotic shock protection
20	Outer membrane protein omp38 precursor	75438841	0.58	(0.5, 0.6)	0.34	(0.3, 0.4)	0.46	Porin
21	Host factor I for bacteriophage Q beta replication	50085463	0.47	(0.4, 0.5)	0.42	(0.4, 0.5)	0.44	Metabolism
22	Outer membrane protein omp38 precursor	148839593	0.56	(0.5, 0.6)	0.33	(0.3, 0.4)	0.44	Porin
23	Putative signal peptide	126641077	0.48	(0.4, 0.5)	0.37	(0.3, 0.4)	0.43	Porin
24	OmpA/MotB	126641241	0.43	(0.4, 0.5)	0.40	(0.3, 0.5)	0.41	Porin
25	Putative outer membrane protein	72535027	0.49	(0.4, 0.5)	0.27	(0.2, 0.3)	0.38	Porin

a) CI = Confidence Interval

b) Average ratios were calculated in log scale

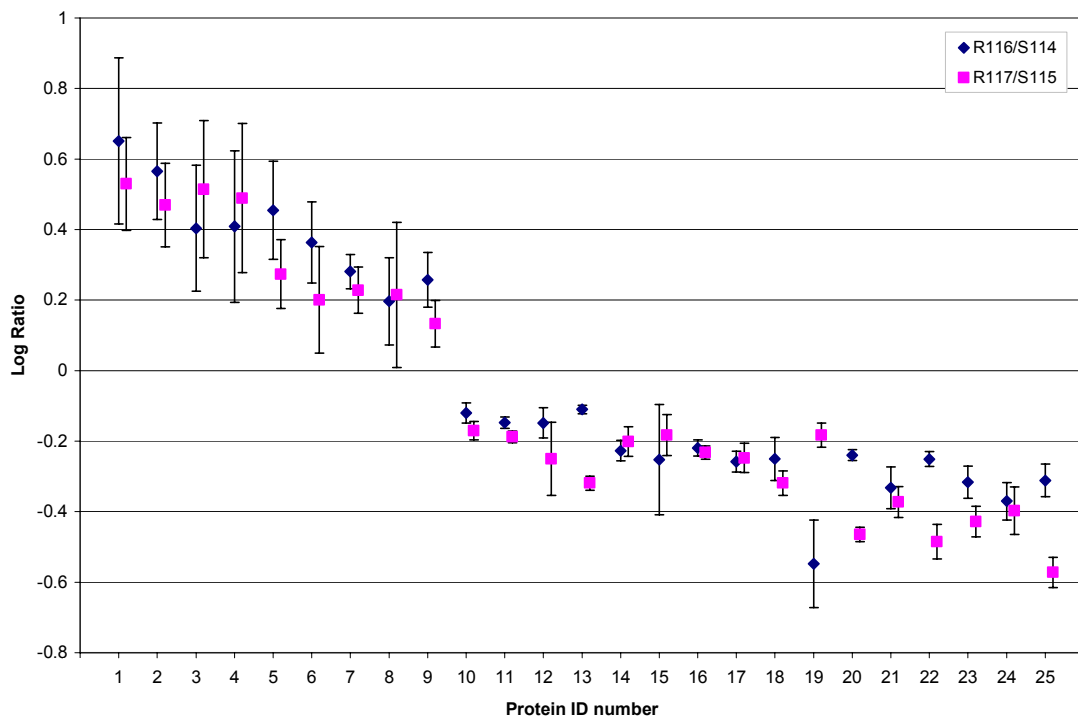


Figure 1 116/114 and 117/115 ratios were plotted in log scale for the 25 differentially expressed proteins that were common in both datasets. Protein ID numbers correspond to the numbers listed in Table 1. Error bars are logarithmic. Plotted ratios closely matched between 116/114 and 117/115 for most of all proteins.