

Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro

**Análise proteómica de uma estirpe clínica de
Staphylococcus aureus ST398 resistente à meticilina**

Dissertação de Mestrado em Genética Molecular Comparativa e
Tecnológica

Ricardo Jorge Rego Monteiro

Professor Doutor Gilberto Igrejas

Professora Doutora Patrícia Poeta



Vila Real, 2013



Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro

**Análise proteómica de uma estirpe clínica de
Staphylococcus aureus ST398 resistente à metilina**

Dissertação de Mestrado em Genética Molecular Comparativa e
Tecnológica

Ricardo Jorge Rego Monteiro

Professor Doutor Gilberto Igrejas

Professora Doutora Patrícia Poeta

Composição do Júri:

Vila Real, 2013

As doutrinas apresentadas neste trabalho são da exclusiva responsabilidade do autor. É autorizada a reprodução parcial desta tese apenas para efeitos de investigação, mediante declaração escrita do interessado, que a tal se compromete.

Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro

O autor:

Ricardo Monteiro

Vila Real, 2013

Orientação

Orientador

Professor Doutor Gilberto Paulo Peixoto Igrejas
Departamento de Genética e Biotecnologia, UTAD

Co-orientador

Professora Doutora Patrícia Alexandra Curado Quintas Dinis Poeta
Departamento de Ciências Veterinárias, UTAD

Este trabalho foi desenvolvido no âmbito de
dissertação do curso de 2º ciclo em Genética
Molecular Comparativa e Tecnológica.

Agradecimentos

Ao Magnífico Reitor da UTAD, na pessoa do Prof. Doutor Carlos Sequeira, Reitor da UTAD, pela disponibilidade e facilidades concedidas durante a realização deste trabalho.

À Direcção do Curso de Mestrado em Genética Molecular, Comparativa e Tecnológica, nas pessoas da Professora Doutora Paula Lopes e da Professora Doutora Raquel Chaves, pela óptima condução do meu percurso académico

À anterior Direcção do Curso de Mestrado em Genética Molecular, Comparativa e Tecnológica nas pessoas do Professor Doutor Valdemar Carnide e da Professora Doutora Raquel Chaves.

Ao Programa de Acções Universitárias Integadas Luso-Francesas Acção N° F-TC09/11, intitulado Análise proteómica de estirpes de *Escherichia coli* produtoras de β -lactamases de amplo espectro com potencial enterohemorrágico isoladas de gaivotas das Ilhas Berlengas.

Ao Professor Doutor Gilberto Igrejas, por ter aceite ser meu orientador científico. Gostaria também de mostrar o meu total reconhecimento pelos ensinamentos, conselhos, estímulos e pelo empenho em proporcionar-me as melhores condições, assim como o rigor e organização científica. Além do seu elevado valor científico, não posso deixar de me referir às qualidades humanas, mostrando-se acima de tudo um amigo e um exemplo.

À Professora Doutora Patrícia Poeta por ter aceite ser co-orientadora deste trabalho, pela disponibilidade, simpatia e apreço.

Ao Doutor Rui Vitorino do Departamento de Química da Universidade de Aveiro por ter posto à disposição, sem qualquer restrição todo o equipamento necessário para a identificação das proteínas.

Ao INRA, Clermont-Ferrand, França. À Doutora Régine Talon por me ter aceite na Unidade de Microbiologia e pôr ao meu dispor todas as condições.

Ao Doutor Michel Hébraud por me ter recebido no seu laboratório e por facilmente fazer de Clermont-Ferrand um sítio agradável e onde facilmente me inseri.

A todas as pessoas da Unidade de Microbiologia e da Plataforma de proteómica do INRA-Theix: Sandra, Caroline, Aurore, Nelly, Jean-Paul, Ivette, Priscilla, Carine, Mickaël, Sabine e em especial à Ingrid por orientar todo o meu trabalho prático durante a minha estadia em França.

Um obrigado ao pessoal que, durante 4 meses, todas as sexta-feiras me mostraram o quão interessante o Badminton pode ser.

E ao Pierre, um grande Engenheiro pelas boleias, noitadas, convívio e boa disposição.

A Hajer, pela disponibilidade mostrada durante o trabalho, mesmo sabendo que muito tinha a fazer. Pelos ensinamentos transmitidos e pela boa disposição e amabilidade com que sempre o fazia. Pelas gargalhadas e convívios extra-laborais.

Ao Alexandre, pelos conhecimentos adquiridos em microbiologia, pelo seu espírito de sacrifício e vontade de mais e melhor.

A todo o grupo de investigação, pelo rigor científico e pelo grande exemplo de um grupo de trabalho. Um obrigado especial por enaltecerem o meu primeiro contacto com o mundo da investigação.

A todos os colegas da Licenciatura em Genética e Biotecnologia e Mestrado em Genética Molecular, Comparativa e Tecnológica.

Ao Eduardo pelo companheirismo e cumplicidade.

À Ângela pela amizade e carinho. Pelos ensinamentos pessoais transmitidos, frontalidade e conversas. Um muito obrigado.

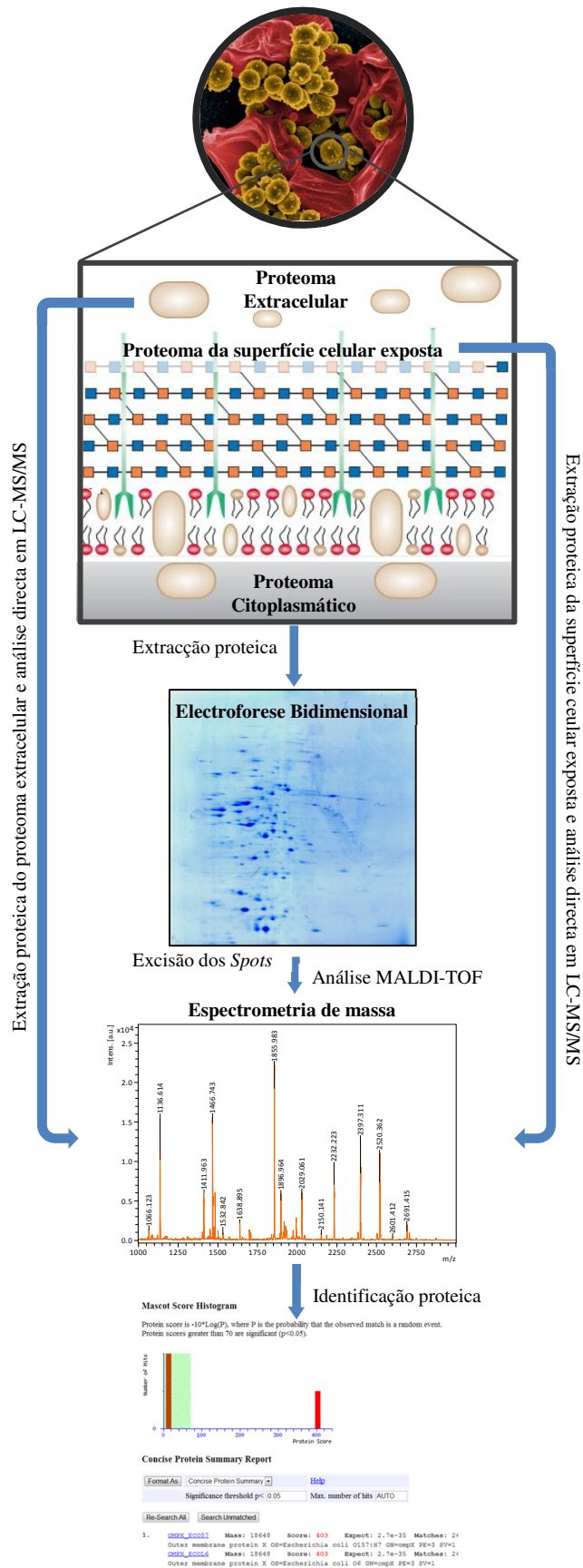
À minha família pela presença, apoio e alegrias ao longo de toda a minha vida.

Aos meus pais e ao meu irmão, pelo sim e pelo não, por nunca me deixarem desanimar, pela palavra certa no momento certo, por nunca permitirem que me faltasse nada ao longo da vida e carreira académica. À minha mãe, em especial, por todos os sacrifícios, pelas dores de cabeça e constrangimentos que a minha maneira de ser provocaram. Um obrigado de quem gosta muito de vocês.

Por fim um obrigado a todas as pessoas que influenciaram directa e indirectamente este trabalho.

Graphical Abstract

Staphylococcus aureus resistente à metilina (MRSA)



Resumo

Actualmente a proteómica é uma ferramenta muito utilizada na análise das diferenças na expressão de genes em estirpes bacterianas. Há muitos anos que *Staphylococcus aureus* tem sido reconhecido como um importante agente patogénico responsável por doenças humanas. A dificuldade no tratamento e o surgimento constante de múltiplas resistências a antibióticos têm feito deste organismo um importante foco de estudo.

Para investigar este patógeno foram determinados, através de técnicas de electroforese bidimensional e técnicas de cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa, três proteomas diferentes de uma estirpe clínica de *S. aureus* resistente à meticilina (MRSA). Recorrendo à técnica 2-DE para obtenção do proteoma citoplasmático, foram excisados um total de 105 *spots*, nos quais, por correlação com as bases de dados de bioinformática, permitiram a identificação de 227 proteínas. No proteoma da superfície celular exposta foram identificadas 236 proteínas, assim como no proteoma extracelular foi possível identificar 99 proteínas. Identificaram-se proteínas relacionadas com funções-base da célula, mas também proteínas relacionadas com virulência e patogenicidade, tais como a catalase e a proteína *isdA*, principal responsável pela infecção em *S. aureus*, e proteínas relacionadas com a resistência aos antibióticos como as proteínas de membrana PBP. As duas classes com mais proteínas identificadas foram a glicólise, no proteoma intracelular, e a tradução nos outros proteomas da membrana celular exposta e extracelular, reflectindo assim um metabolismo activo.

Estes resultados revelam a importância da proteómica no desenvolvimento do conhecimento da expressão proteica da estirpe de MRSA, microrganismo este com diversos e importantes mecanismos de resistência e patogenicidade. Este mapa proteómico global permite uma melhor compreensão deste agente patogénico, fornecendo assim novos dados para bancos de dados de proteínas.

Palavras-chave: MRSA, Proteómica, Proteínas de superfície, Proteoma extracelular, Espectrometria de massa.

Abstract

Proteomics is presently a powerful tool to analyze the differences in gene expression in bacterial strains. For many years *Staphylococcus aureus* has been recognized as an important pathogen and responsible for human diseases. The difficulty in treatment and constant new appearance of multiple antibiotic resistance has made this organism an important focus of study.

To investigate this pathogen three different proteomes of a methicillin-resistant clinical strains *S. aureus* (MRSA) were determined by techniques of two-dimensional electrophoresis and liquid chromatography-mass spectrometry. Using 2-DE for cellular proteome were excised 105 spots, in which, for correlation with bioinformatics databases, we identified 227 proteins. Considering the exposed cell surface proteome and the exoproteome, 236 and 99 proteins were identified respectively. Proteins related to basic cell functions were found, but also proteins related to virulence and pathogenicity, like catalase and *isdA*, main responsible for *S. aureus* infection, and proteins related to antibiotic resistance membrane proteins PBP. The two classes with more proteins identified were glycolysis in the intracellular proteome and translation in the othe exposed cell membrane and exoproteome, this reflects an active metabolism.

These results highlight the importance of proteomics to development knowledge of protein expression of MRSA, this microorganism with several important mechanisms of resistance and pathogenicity. This global proteomics allows a better understanding of this pathogen, also providing new data for proteins databases.

Keywords: MRSA, Proteomics, Surface proteins, Exoproteome, Mass spectrometry.

Índice Geral

1. Revisão Bibliográfica.....	1
1.1. <i>Staphylococcus aureus</i>	1
1.1.1. Genoma <i>Staphylococcus aureus</i>	1
1.1.2. Factores de virulência e toxinas em <i>S. aureus</i>	2
1.2. <i>S. aureus</i> resistente à meticilina (MRSA)	2
1.2.1. Epidemiologia.....	2
1.2.2. Mecanismos de resistência à meticilina	5
1.2.3. <i>S. aureus</i> ST398.....	7
1.2.3.1. Presença de novos genes de resistência em MRSA ST398	7
1.3. Genómica Funcional e Proteómica	7
1.4. Progresso recente em Proteómica Bacteriana	10
1.4.1. Progresso nas técnicas de identificação e separação de proteínas.....	10
1.4.2. Proteómica bacteriana.....	11
1.4.3. Proteínas Celulares	12
1.4.4. Proteínas da superfície celular	13
1.4.4.1. Proteínas membranares.....	13
1.4.4.2. Lipoproteínas.....	14
1.4.4.3. Proteínas ligadas covalentemente à parede celular	15
1.4.4.4. Proteínas ligadas não-covalentemente à parede celular	15
1.4.4.5. <i>Cell Shaving</i>	16
1.4.5. Proteoma Extracelular.....	17
1.4.5.1. Ferramentas e estratégias para análise do exoproteoma	19
1.4.5.2. Estudo da patogenicidade através de exoproteomas	19
1.4.6. Espectrometria de massa.....	20
1.4.7. Técnicas associadas à detecção de proteínas	21
1.5. Aplicações biotecnológicas da proteómica ao nível da ciência, indústria e medicina	21
2. Objectivos	23
3. Material e Métodos.....	25
3.1. Proteoma citoplasmático	25
3.1.1. Estirpe bacteriana e condições de crescimento	25
3.1.2. Extracção e quantificação proteica	25
3.1.3. Electroforese monodimensional e coloração	25
3.1.4. Electroforese bidimensional.....	26
3.1.5. Identificação proteica.....	27
3.2. <i>Shaving</i> das células de MRSA	27
3.2.1. Condições de crescimento da amostra de MRSA C2355.....	27

3.2.2. Recolha e <i>Shaving</i> celular.....	28
3.3. Proteoma Extracelular	29
3.3.1. Condições de crescimento da amostra	29
3.3.2. Recuperação das proteínas extracelulares e quantificação.....	29
3.3.3. Concentração das proteínas (SDS-PAGE)	31
4. Resultados	33
4.1. Proteoma citoplasmático	33
4.1.1. Electroforese monodimensional.....	33
4.1.2. Electroforese bidimensional.....	34
4.1.3. Identificação proteica.....	34
4.2. Proteoma do envelope celular (<i>Shaving Celular</i>).....	35
4.2.1. Identificação proteica.....	35
4.3. Proteoma Extracelular	36
4.3.1. Identificação proteica.....	36
5. Discussão	39
5.1. Proteoma citoplasmático	39
5.2. Proteoma do envelope celular (<i>Shaving Celular</i>)	43
5.3. Proteoma Extracelular	46
5.4. Integração dos três proteomas	48
6. Conclusão e perspectivas futuras	51
7. Referências bibliográficas.....	53
Publicações	67
Anexo	69

Índice de Figuras

Figura 1. Mapa europeu e gráfico relativo aos valores de isolados anuais de MRSA em cada país. Estes dados são relativos ao ano de 2011 e são fornecidos pelo Centro Europeu de Prevenção e Controlo de Doenças [25].....	4
Figura 2. Representação esquemática da localização do gene <i>blaZ</i> e da deslocação e actuação das enzimas β -lactamases. (Adaptado de HIV web study) [31].....	6
Figura 3. Representação esquemática da localização do gene <i>mecA</i> e da localização da proteína PBP2a. (Adaptado de HIV web study) [31].....	6
Figura 4. Representação esquemática das diferentes classes de proteínas que são retidas na membrana ou na parede celular de <i>S. aureus</i> . (Adaptado de Dreisbach, A., 2011) [70].....	14
Figura 5. Esquema ilustrativo do processo de <i>Shaving</i> celular. Uma solução com tripsina é adicionada à cultura celular; a tripsina hidrolisa os péptidos expostos na superfície celular; os péptidos resultantes são sujeitos a análise por LC-MS/MS (Adaptado de Solis <i>et al.</i> , 2010) [78].....	17
Figura 6. Ilustração dos conceitos de secretoma, exoproteoma e proteoma da superfície celular num modelo bacteriano Gram-negativo (Adaptado de Armengaud J., 2012) [87].....	18
Figura 7. Representação esquemática do protocolo de utilização da coluna de separação Sep-Pak C18 Plus Light Cartridge.....	29
Figura 8. Coluna ViVacell 100 Centrifugal Concentrator.....	30
Figura 9. Perfil monodimensional de MRSA ST398 com Coomassie R-250 coloração (lado esquerdo) e perfil monodimensional esquemático com pesos moleculares do gel SDS-PAGE. Imagem do gel 2-DE com coloração Coomassie G-250, onde se marcaram os spots (lado direito). Legenda: Verde: Glicólise, Azul: biossíntese de proteínas, Roxo: processo de oxidação-redução, Laranja: resposta ao <i>stress</i> , Gray: Hidrólise de ATP acoplado ao transporte de prótons, Rosa: Metabolismo <i>one-carbon</i> , Amarelo: Outros processos celulares [107].....	33
Figura 10. Percentagem das proteínas identificadas e relacionadas com cada função [107].....	35
Figura 11. Gráfico onde o número (azul) e as percentagens (Vermelho) de proteínas identificadas estão associadas às funções biológicas. A função à qual mais proteínas foram associadas é a tradução com 15%. Na coluna “Outras funções” estão englobadas 40 funções com 5 ou menos proteínas identificadas, com cada função individual a não ultrapassar os 2%.....	36
Figura 12. Gráfico onde o número (azul) e as percentagens (Laranja) de proteínas identificadas estão associadas às funções biológicas. A função à qual mais proteínas foram associadas é a tradução com 16%. Na coluna “Outras funções” estão englobadas 36 funções com 2 ou menos proteínas identificadas, com cada função individual a não ultrapassar os 2%.....	37
Figura 13. Diagrama de Venn integrante de todas as proteínas identificadas.....	49

Índice de Tabelas

Tabela 1. Proteínas ribossomais identificadas na superfície exposta da célula.....46

Tabela 2. Proteínas identificadas no exoproteoma e respectivas localizações prevista pela *Uniprot*.....47

Lista de abreviaturas e unidades

A

ACN	Acetonitrilo
APS	Persulfato de amónio
ATP	Adenosina trifosfato

B

BHI	<i>Brain heart infusion</i>
bp	Par de base

C

CC	Complexo clonal
cm	Centímetro
CV	<i>Core Variable</i>

D

Da	<i>Dalton</i>
DIGE	<i>Diferencial gel electrophoresis</i>
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DTT	Ditiotreitol

E

<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ESI	<i>Electrospray ionization</i>
ESI-MS/MS	<i>Electrospray ionization tandem mass spectrometry</i>
EU	União Europeia

G

g	Grama
g	Velocidade g

H

h	Hora
HCl	Ácido clorídrico
HGT	Transferência horizontal de genes

I

IEF	Focalização isoeletrica
IEF x SDS-PAGE	Focalização isoeletrica x electroforese em gel de poliacrilamida dodecil sulfato de sódio
IPG	Gradiente de pH imobilizado

K

kV	Quilovolt
----	-----------

L

LC	Cromatografia líquida
----	-----------------------

M

M	Molar
mA	Miliampére
MALDI	<i>Matrix-assisted laser desorption ionization</i>
MALDI-TOF/MS	<i>Matrix assisted laser desorption ionization - time of flight mass spectrometry</i>
MALDI-TOF/TOF MS	<i>Matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight/time of flight mass spectrometry</i>
mg	Miligrama
min	Minuto

mL	Mililitro
MLST	<i>Multilocus sequence typing</i>
mM	Millimolar
mm	Milímetro
MRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> resistente à metilina
MS	Espectrometria de massa
MS/MS	Espectrometria de massa em <i>tandem</i>
Mw	Peso Molecular

N

NaCl	Cloreto de sódio
NL	Não linear

O

°C	Grau <i>Celsius</i>
ORF	<i>Open reading frame</i>

P

PBP	Proteína de ligação à penicilina
PBS	Tampão fosfato-salino
PCR	Reacção em cadeia por acção da polimerase
pH	Potencial de hidrogénio
pI	Ponto isoelectrico
ppm	Partes por milhão
PTM	Modificação pós-tradução

R

RNA	Ácido ribonucleico
-----	--------------------

S

s	Segundo
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE	Electroforese em gel de poliacrilamida na presença de dodecil sulfato de sódio
ST	Sequência tipo

T

TCA	Ácido tricloroacético
TOF	Tempo de voo
Tris	Tris(hidroximetil)aminometano

U

US	Estados Unidos
----	----------------

V

VF	Factor de virulência
VRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> resistente à vancomicina
V	Volt

%	Porcentagem
1-DE	Electroforese monodimensional
2-DE	Electroforese bidimensional
µg	Micrograma
µL	Microlitro

1. Revisão Bibliográfica

1.1. *Staphylococcus aureus*

1.1.1. Genoma *Staphylococcus aureus*

O genoma de *Staphylococcus aureus* foi sequenciado por Kuroda e colaboradores em 2001 [1]. Actualmente existem, na base de dados GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank>), 18 genomas totalmente sequenciados e mais estirpes encontram-se parcialmente sequenciadas [2]. Com auxílio destes dados foram propostas três componentes principais para a estrutura do genoma. Em primeiro lugar, um grupo de genes essenciais altamente conservados (> 97%). Disperso neste primeiro grupo encontra-se um segundo grupo de mais de 700 genes denominados de genes *core variable* (CV). Os genes CV estão distribuídos variavelmente e o seu padrão de distribuição define as linhagens de *S. aureus*. Por último, existem os elementos genéticos móveis (*mobile genetic elements*, MGEs), grandes porções discretas de DNA que codificam funções de mobilização, mostrando evidência de transferência frequente e, menos frequente, recombinação [3, 4]. Apesar da ampla disposição dos genes e, presumivelmente, da diversidade selectiva, *S. aureus* pode ser agrupado em linhagens, cada uma definida por uma única combinação de centenas de genes CV. A maioria dos genes CV com função conhecida codifica proteínas de superfície ou estruturais, que são conhecidas por interagirem com células do hospedeiro, bem como com os seus reguladores [3].

A nomenclatura actual para classificar uma linhagem é baseada em *multilocus sequence typing* (MLST) e complexos clonais (CCs) [5]. As linhagens antigas e mais bem-sucedidas têm adquirido polimorfismos de nucleótido único (SNPs) em sete genes *housekeeping* sequenciados utilizados para definir a sequência tipo ou *sequence typing* (STs) e, portanto, os intimamente relacionados são agrupados no respectivo CC. No entanto, algumas linhagens têm STs estáveis e têm mantido a sua nomenclatura [exemplo: ST239 (CC8) e ST80 (CC80)] [6].

Diferentes classes de MGEs foram identificadas em *S. aureus*, designadamente bacteriófagos; ilhas de patogenicidade; plasmídeos, transposões, *staphylococcal cassette chromosomes* (SCC) e ilhas genómicas [7]. Elementos genéticos móveis importantes incluem o gene *mecA* responsável pela resistência à meticilina em várias SCCmec, o bacteriófago com a toxina Pantón-Valentine Leucocidina (PVL), e

1. Revisão Bibliográfica

muitos determinantes de resistência em plasmídeos e transposões [4, 8]. A presença de MGEs em determinadas estirpes de *S. aureus* promove, claramente, o sucesso, o potencial patogénico e a resistência da estirpe. [3].

1.1.2. Factores de virulência e toxinas em *S. aureus*

Os factores de virulência em *S. aureus* são responsáveis pela adesão a superfícies, danos e/ou evasão ao sistema imunitário e efeitos tóxicos [9]. Todas as estirpes de *S. aureus* podem causar infecções purulentas e, ainda, algumas delas produzir exotoxinas que resultam em doenças específicas desta bactéria, como por exemplo, a toxina de choque tóxico 1 (TSST-1), um superantigénio, responsável pelo síndrome do choque tóxico e as toxinas exfoliativas A e B que provocam a morte das células da epiderme (síndrome da pele escaldada). Além disso, *S. aureus* produz várias enterotoxinas quando cresce em produtos alimentares. Estas enterotoxinas pré-formadas são responsáveis por gastroenterites (intoxicação alimentar). Algumas estirpes de *S. aureus* codificam a toxina PVL, que pode provocar necrose dos tecidos, destruição dos leucócitos e graves inflamações [9, 10]. Os genes PVL têm sido geralmente associados a estirpes hospitalares de *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (MRSA) [10, 11]. A toxina PVL, por sua vez, tem sido associada a infecções da pele e dos tecidos moles e pneumonia grave, [9, 11, 12].

1.2. *S. aureus* resistente à meticilina (MRSA)

1.2.1. Epidemiologia

S. aureus resistente à meticilina foi classificado pela primeira vez em 1961, logo após a introdução da meticilina em medicina humana para o tratamento de *Staphylococcus spp.* resistentes à penicilina. Desde então, este grupo de microrganismos tornou-se uma séria preocupação clínica [13]. Esta bactéria foi descrita pela primeira vez como um organismo patogénico nosocomial em hospitais. Desde os anos 90 do século passado, MRSA tornou-se também uma preocupação em pessoas sem hospitalizações prévias ou sem historial recente de procedimentos invasivos. As estirpes responsáveis por estas infecções são chamadas de MRSA associada a comunidades (*Community-Associated MRSA*, CA-MRSA) [14]. As estirpes CA-MRSA surgiram inicialmente em

populações de alto risco (toxicodependentes, idosos em lares e doentes crónicos), mas, actualmente, também são relatadas em casos de crianças saudáveis [15, 16].

MRSA pode ser transmitido entre pessoas e animais por contacto próximo [15]. A linhagem de MRSA CC398 associada ao porco é, actualmente, uma preocupação particular. Entre 2003 e 2005, a linhagem CC398 propagou-se rapidamente entre os suínos em algumas regiões, chegando a ser considerada uma zoonose na Holanda, onde a insuficiência de informação desta linhagem constituía a principal dificuldade [17, 18]. Desde então, a estirpe MRSA CC398 foi detectada em vários países da Europa e na América do Norte [19].

Estudos recentes relatam a possibilidade de estirpes de MRSA terem a capacidade de se transmitir de animais para humanos, especialmente aqueles que se encontram em estado imunodeprimido, doentes crónicos, ou susceptíveis por variadas razões [20].

Na era pré-antibiótica, as bacteriemias por *S. aureus* eram, geralmente, fatais. Num estudo do início dos anos 40, a mortalidade entre os 122 pacientes estudados apresentou um valor de 82%, sendo 98% da mortalidade em indivíduos na faixa etária superior a 50 anos [21]. Actualmente estima-se que 25-35% dos indivíduos saudáveis possuam *S. aureus* sobre a pele ou membranas mucosas [22]. Isto significa que, a nível mundial, cerca de dois mil milhões de pessoas são portadores de *S. aureus*, contudo, as estimativas conservadoras baseadas em dados holandeses e americanos preveem que apenas entre 2 e 53 milhões de pessoas estejam colonizadas com MRSA [23].

Na Europa as taxas de isolados de MRSA também se verificam elevadas. Segundo dados do Centro Europeu de Prevenção e Controlo de Doenças, Portugal ocupa a primeira posição no número de isolados anuais com 1307 isolados no ano de 2011 (Figura 1).

As taxas de MRSA têm vindo a aumentar rapidamente nas últimas décadas sendo, por isso, endémico em ambientes hospitalares por todo o mundo. Clones de CA-MRSA como ST8 (USA300), ST30, ST59 e ST80 propagaram-se rapidamente ultrapassando facilmente as barreiras impostas pelos sistemas de saúde. Até à data, MRSA associado a pecuária (*Livestock associated MRSA*, LA-MRSA) só é prevalente em certos grupos de trabalhadores de alto risco que estão em contacto directo com animais vivos. O registo recente de casos/propagação de CA-MRSA tornou-se um desafio para os países que até agora mantiveram taxas baixas de infecções por MRSA. Tal mudança no

1. Revisão Bibliográfica

sistema epidemiológico de MRSA tornou-se uma grande ameaça para a saúde pública mundial [24].

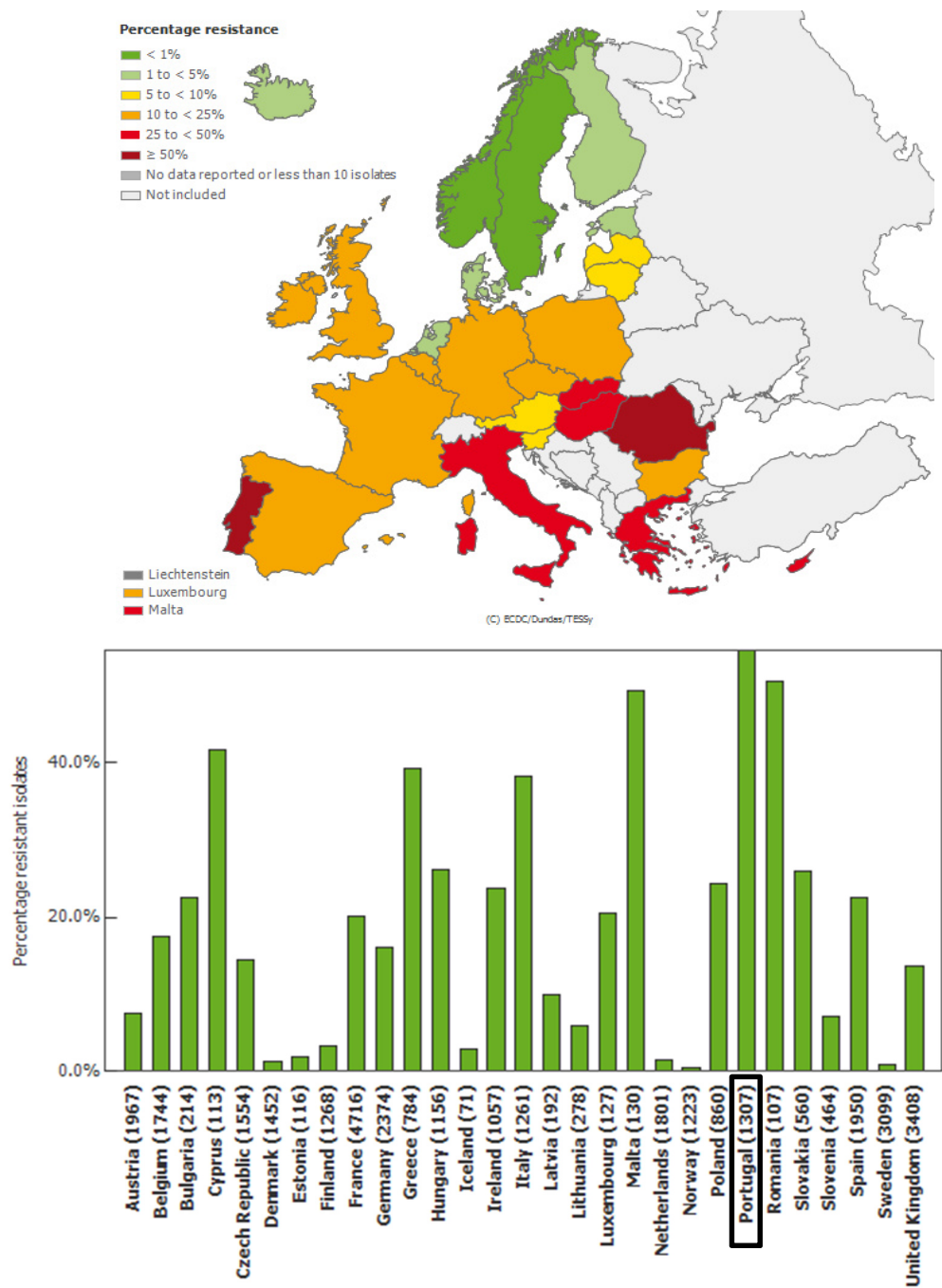


Figura 1. Mapa europeu e gráfico relativo aos valores de isolados anuais de MRSA em cada país. Estes dados são relativos ao ano de 2011 e são fornecidos pelo Centro Europeu de Prevenção e Controlo de Doenças [25].

As estirpes de *S. aureus* resistentes à penicilina permaneceram susceptíveis a penicilinas β -lactamase-estável, até meados dos anos 80, onde estirpes de *S. aureus* emergiram resistentes a penicilinas β -lactamase-estáveis. Estas estirpes foram então denominadas de “*S. aureus* resistente à meticilina” (MRSA), devido à meticilina ter sido inicialmente utilizada para detectar a sua resistência a penicilina β -lactamase-estável (oxacilina, meticilina, nafcilina). Mesmo já não sendo a meticilina um antibiótico usado para o tratamento, a sigla MRSA continua a ser usada. Mais tarde, o uso de oxacilina como alternativa à meticilina nos testes de susceptibilidade resultou no aparecimento de “*S. aureus* resistente à oxacilina” o termo (ORSA). Estas designações são usadas alternadamente na literatura e são sinónimos.

1.2.2. Mecanismos de resistência à meticilina

Em *S. aureus*, dois mecanismos são responsáveis pela resistência a meticilina: a produção da enzima β -lactamase codificada no plasmídeo pelo gene *blaZ* (Figura 2) e a produção de uma proteína de ligação a penicilina alterada (PBP2a), codificada no cromossoma pelo gene *mecA* (Figura 3). A proteína β -lactamase produzida por *Staphylococcus aureus* cliva a estrutura em anel do antibiótico β -lactâmico, este mecanismo é responsável pela resistência à penicilina convencional mas não a penicilinas semi-sintéticas, tais como meticilina, oxacilina ou cloxacilina (Figura 2) [26].

Em MRSA, o gene *mecA*, adquirido horizontalmente, codifica uma proteína de ligação à penicilina, a PBP2a (Figura 3), a qual promove uma característica de insensibilidade à meticilina e todos os antibióticos β -lactâmicos que têm sido desenvolvidos, incluindo as penicilinas isoxazole (por exemplo, oxacilina), e ainda os β -lactâmicos de amplo espectro (terceira geração: cefalosporinas, cefamicinas e carbapenemos) que foram introduzidos primeiramente no tratamento de infecções causadas por bactérias Gram-negativas [27].

O glicopéptido vancomicina foi o último medicamento disponível para o tratamento de MRSA até, recentemente, terem sido relatadas estirpes de baixo nível de resistência e, muito recentemente, a transferência de alto nível de resistência à vancomicina de *Enterococcus* spp. para *S. aureus* [28]. Mesmo com a introdução de novos fármacos, incluindo linezolida e *Synercid*, no tratamento de infecções por MRSA, existe uma preocupante falta de novos medicamentos para responder às necessidades clínicas [29, 30].

1. Revisão Bibliográfica

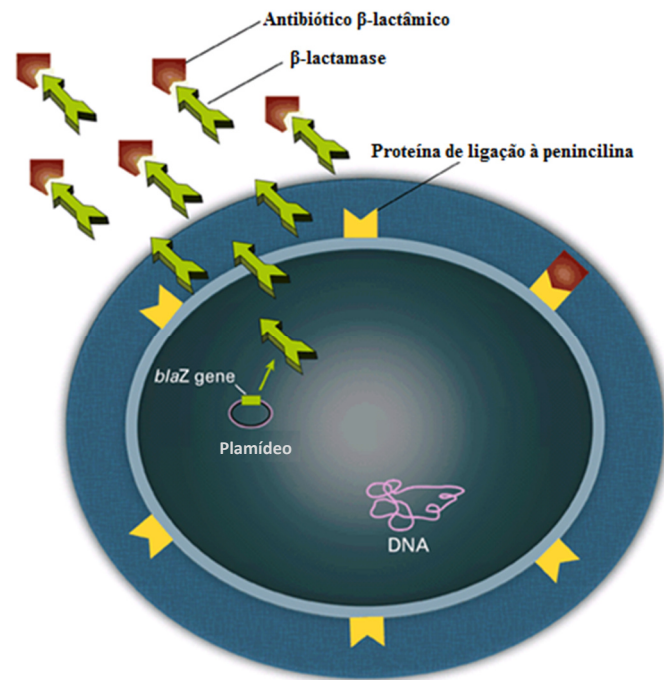


Figura 2. Representação esquemática da localização do gene *blaZ* e da deslocação e actuação das enzimas β -lactamases. (Adaptado de HIV web study) [31].

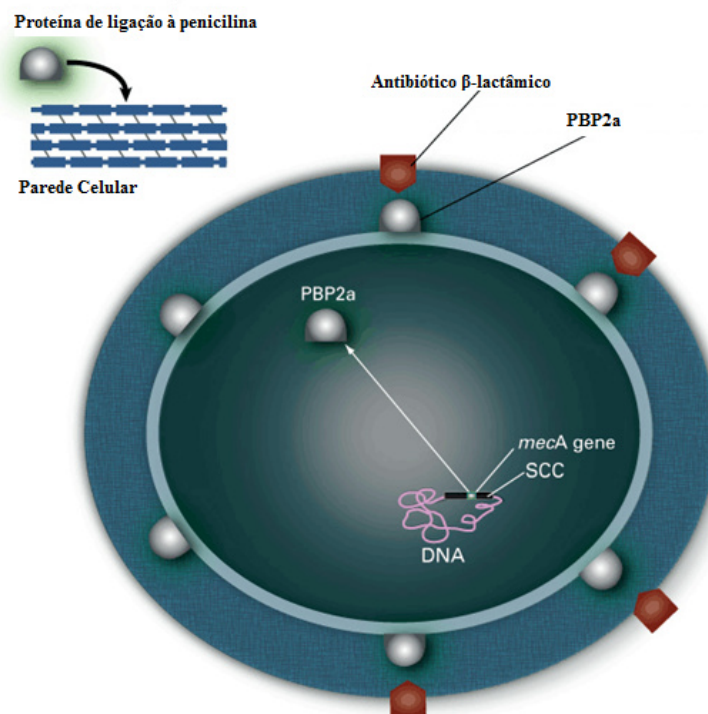


Figura 3. Representação esquemática da localização do gene *mecA* e da localização da proteína PBP2a. (Adaptado de HIV web study) [31].

1.2.3. *S. aureus* ST398

A estirpe de MRSA ST398 foi originalmente relatada em suinocultores franceses, num estudo sobre a prevalência de *S. aureus* em agricultores [32]. Os agricultores apresentaram uma elevada taxa de prevalência de *S. aureus* (44,6%). A grande maioria dos isolados era sensível à meticilina (MSSA). Nesse mesmo estudo foram ainda identificados 19 tipos diferentes de estirpes, incluindo MRSA ST398. As estirpes encontradas nos agricultores, incluindo a ST398 e a ST9 (outra estirpe sensível), eram tidas como normais nos suínos [32, 33].

A estirpe ST398 foi reconhecida pela primeira vez em 2005 como um problema por Voss e colaboradores [34]. No ano seguinte um estudo demonstrou a transmissão de MRSA ST398 entre porcos e seres humanos [35]. Desde então, a estirpe MRSA ST398 tem sido documentada em diferentes países, e tornou-se uma pandemia [36].

1.2.3.1. Presença de novos genes de resistência em MRSA ST398

Para além dos genes de resistência *mecA* e *blaZ* presentes, geralmente, entre outras estirpes de MRSA, vários estudos têm descoberto a presença de novos genes de resistência na estirpe ST398. Kadlec e Schwarz [37] encontraram o gene *dfrK* para a resistência a trimetoprim. Este gene foi localizado próximo do gene *tetL*, que permitiria a selecção destes genes, quer através da utilização de tetraciclina, trimetoprim ou ambos, os quais são utilizados em medicina veterinária. A mesma equipa também encontrou um novo gene do transportador ABC, *vga(C)*.

O gene *cfr* confere resistência a vários antibióticos, incluindo oxazolidinona e pleuromutilinas, *phenicols*, lincosamidas e estreptogramina A [38]. Este gene de resistência a múltiplas drogas foi encontrado em dois isolados de suínos na Alemanha, um MRSA ST398 e um MSSA ST9 [37].

1.3. Genómica Funcional e Proteómica

A genómica funcional emergiu recentemente como uma nova área de investigação, em que surgem reunidas as tecnologias mais inovadoras de análise genómica suportadas pela bioinformática, tendo como objectivo a descoberta da função de genes específicos e compreender de que forma é que determinados conjuntos de genes e seus produtos se relacionam a nível celular. Directamente relacionadas com a genómica

1. Revisão Bibliográfica

funcional estão a proteómica, envolvida na identificação e caracterização de proteínas e também a transcriptómica designadamente através de *microarrays* [39].

Através da correlação entre a genómica funcional e a proteómica é possível estudar, avaliar e relacionar os vários mecanismos e as várias etapas que constituem o dogma central da biologia molecular, como a expressão génica e a sua correspondência ao nível da expressão proteica, os mecanismos que levam à expressão/inibição de uma proteína e os próprios níveis de expressão que podem ser indicadores de situações de *stress*.

O principal foco de estudo da proteómica consiste na identificação de proteínas envolvidas em processos celulares específicos (proteómica de mapas celulares) e de proteínas que exibam perfis de expressão alterados devido a modificações nas condições fisiológicas do meio (proteómica de expressão) [40].

A electroforese 2D-PAGE apresenta-se, actualmente, como o método mais apropriado para a separação de proteínas, enquanto o desenvolvimento de tecnologias de identificação e mapeamento proteico, como a espectrometria de massa, permitem a identificação e caracterização das proteínas [40].

A electroforese bidimensional de alta resolução (High resolution 2D-PAGE) utilizada para a separação de misturas proteicas complexas foi introduzida por O'Farrell em 1975 ao combinar a focalização isoeléctrica (IEF) como primeira dimensão na presença de ureia, detergentes iónicos e DTT, com a electroforese em gel de poliacrilamida na presença de dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) como segunda dimensão [41]. Esta técnica separa as proteínas de acordo com o seu ponto isoeléctrico (pI) e a sua massa molecular (MW) sendo quantificadas consoante a sua abundância relativa. A focalização isoeléctrica permite separar proteínas por apenas uma carga unitária de pI [42].

A tecnologia IPG (Immobiline pH Gradient), introduzida em 1975 por Gasparic, Bjellqvist e Rosengren contribuiu para o sucesso da electroforese bidimensional, pois veio substituir a utilização de anfólitos na formação de um gradiente de pH aplicado nos trabalhos em electroforese 2-D de O'Farrell [43]. A utilização de anfólitos estava destinada à focalização isoeléctrica, um método electroforético com a capacidade de separar as proteínas pelo ponto isoeléctrico (pI). Uma vez que as proteínas são moléculas anfotéricas, podem apresentar diferentes cargas dependendo da sua composição em aminoácidos e do pH no ambiente em seu redor. O ponto isoeléctrico corresponde ao pH específico no qual a carga da proteína é zero, estando as proteínas

carregadas positivamente em valores de pH abaixo do pI e carregadas negativamente em valores de pH acima do pI [44].

Na focalização isoelétrica a presença de um gradiente de pH é fundamental pois permite que as proteínas se movam, sob um campo elétrico, para a posição do gradiente onde a sua carga é zero (ponto isoelétrico). No trabalho realizado por O'Farrell (1975) os anfólitos utilizados não eram suficientemente capazes de garantir um gradiente de pH estável ao longo de períodos prolongados de focalização, estando também associados a fenómenos de *drift* catódico (quando o gradiente de pH se move para o cátodo) e de *plateau* (achatamento na zona central), garantindo baixos níveis de reprodutibilidade.

Os problemas gerados pela utilização de anfólitos foram solucionados com a introdução de gradientes imobilizados de pH (IPG), baseados no princípio de que o gradiente era gerado por um conjunto limitado de soluções químicas específicas (Immobiline) que eram assim co-polimerizados com a matriz de poliacrilamida permitindo eliminar o *drift* catódico, aumentar a reprodutibilidade e facilitar a comparação de resultados entre géis 2D. O IPG permite gerar gradientes de pH entre 2,5 e 12 com amplitudes variadas permitindo também o uso de volumes maiores de amostra, tornando assim a electroforese 2-D com o uso de IPG o método preferencial para a separação proteica e a identificação de *spots* [45]. Através da electroforese 2-D é possível obterem-se informações sobre as modificações e/ou alterações nos níveis de expressão proteica e o isolamento de proteínas para posterior análise estrutural através de espectrometria de massa (MS) correlacionando os dados obtidos, com os já existentes em bases de dados bioinformáticas [44].

A electroforese 2-D é um método amplamente aceite a nível científico e de custos acessíveis, com capacidade de separar até milhares de proteínas num mesmo gel. O método de 2-DE é aquele que apresenta melhor resolução na separação de proteínas, com os géis 2-D a funcionarem como a primeira fase de análise, sendo que neste processo de separação das proteínas é altamente sensível a modificações. A electroforese 2-D torna possível avaliar tanto a integridade como o estado de modificação em espécies individuais.

Através deste método é também possível quantificar, de forma absoluta ou relativa, espécies proteicas intactas usando diferentes abordagens, recorrendo para isso aos géis 2D que permitem uma avaliação qualitativa imediata da qualidade e do resultado global da experiência [46]. No entanto, electroforese 2-D apresenta limitações

relacionadas com problemas de resolução e de reprodutibilidade na separação de proteínas muito ácidas e muito básicas, na detecção de proteínas de baixa abundância e de proteínas integrais membranares, tendo igualmente complicações em detectar todas as proteínas que apresentem níveis de expressão e diferenças de solubilidade muito díspares, numa mesma amostra biológica [45].

1.4. Progresso recente em Proteómica Bacteriana

1.4.1. Progresso nas técnicas de identificação e separação de proteínas

O campo de análise proteómica evoluiu rapidamente durante a última década. A electroforese bidimensional (2-DE), seguida da análise de imagem permitiu a comparação de milhares de proteínas presentes em células bacterianas, podendo ser detectadas proteínas com apenas uma cópia por célula [47]. A excisão local de *spots* e subsequente identificação dos péptidos por espectrometria de massa permite, na maioria dos casos, identificar positivamente as proteínas de interesse e, consequentemente, realizar estudos de expressão proteica entre bactérias que crescem em condições diferentes, entre diferentes estirpes e entre bactérias tratadas ou estimuladas com produtos químicos, incluindo antibióticos [48, 49].

Paralelamente às técnicas de identificação proteicas, as técnicas e tecnologias de separação como 2-DE evoluíram também. Por exemplo, através da técnica electroforese bidimensional diferencial (DIGE), proteínas de amostras diferentes são marcadas e identificadas no mesmo gel. A intensidade da marcação reflecte a sua abundância proteica relativa [50]. Assim, evita-se a comparação de imagem *cross-gel*, o que simplifica a análise dos dados. Isto permitiu incluir mais amostras num mesmo estudo, aumentando assim o poder estatístico das análises. Acompanhando a evolução da proteómica com base em gel, registou-se um grande progresso na interface de espectrometria de massa como a cromatografia líquida (LC-MS/MS), e a velocidade de aquisição de resultados permitiu uma nova abordagem designada de “proteómica *shotgun*” [51]. Estas técnicas foram rapidamente combinadas com estratégias utilizando isótopos estáveis para quantificação relativa. Na verdade, a espectrometria de massa não é uma técnica directa de quantificação, e a adição de um padrão interno é necessária para a quantificação. A espectrometria de massa e a bioinformática são tecnologias, especialmente direccionadas para a proteómica [52].

Instrumentos híbridos que combinam *ion-trap* com análise *Fourier-transform* são capazes de fornecer maior precisão e resolução na medida de massa. Estes instrumentos, agora comercialmente disponíveis e muito populares, permitem uma elevada qualidade de dados de espectrometria de massa em laboratórios não especializados em espectrometria de massa. Assim, vários obstáculos foram superados e ensaios avançados foram realizados em espectrometria de massa em laboratórios de proteómica. Por exemplo, mais de dois terços do proteoma de levedura foram quantificados com sucesso num estudo comparando organismos haplóides e diplóides [53]. Uma combinação de diferentes técnicas de fraccionamento de péptidos, isto é, a focalização isoelectrica em fase líquida, bem como fraccionamento peptídico em fase gasosa (no interior do espectrómetro de massa) foram utilizados neste estudo [54].

1.4.2. Proteómica bacteriana

Na investigação bacteriana, a proteómica apresenta-se actualmente como uma área crucial. A variedade de técnicas é grande, e pelo menos uma técnica está adaptada para cada amostra ou tipo de análise. No entanto, até à data, estes métodos foram aplicados, principalmente em organismos modelo. Em casos reais, tais como infecções por *S. aureus*, são ainda limitados [52].

As metodologias e tecnologias em proteómica bacteriana estão a evoluir do estudo qualitativo de proteínas para o nível quantitativo. Historicamente, estas técnicas foram primeiro aplicadas em fluídos biológicos para a identificação de potenciais biomarcadores e estudos de organismos modelo tais como *Escherichia coli* e *B. subtilis*. Uma vez desenvolvidas, estas metodologias passaram a ser utilizadas em vários estudos sobre outras bactérias, incluindo *S. aureus*. No entanto, a investigação fundamental para compreender o mecanismo de infecção bacteriana, a patogénese e adaptação ainda não foi desenvolvida. Isto deve-se ao facto de as técnicas que permitem efectuar tais estudos estarem a ser desenvolvidas em paralelo, tornando os estudos em proteómica mais morosos que em outras áreas das ciências biológicas. De facto, estes estudos necessitam de quantificar precisamente o teor de proteína em diferentes estirpes e em múltiplas condições, tornando assim o estudo proteómico de estirpes bacterianas de extrema importância [52].

1.4.3. Proteínas Celulares

A resistência à meticilina em estirpes de *S. aureus* é produto do gene *mecA*, proteínas de ligação a penicilina, assim como de vários outros genes (gene *fem* e genes auxiliares), que não se encontram em elementos genéticos móveis e os quais se encontram conservados entre as estirpes resistentes e sensíveis à meticilina. Nesses genes auxiliares incluem-se o gene *glmM* (codifica a proteína fosfoglicosamina mutase que está envolvida na síntese do precursor de peptidoglicano) [55], o gene *femABCD* [56], o gene *fntAB* e o gene *llm* [57]. As funções das proteínas codificadas por estes genes são, na sua maioria desconhecidas, no entanto, perturbações nestas proteínas podem afectar a composição da parede celular e consequente a estabilidade celular, levando a uma redução, na resistência a antibióticos [58].

Ao nível celular, os antibióticos β -lactâmicos, foram desenhados para actuar removendo ácidos lipoteicóicos (LTAs) das paredes celulares [59]. Estes ácidos podem, por sua vez, regular a produção das hidrolases de peptidoglicano (enzimas que quebram a parede celular antes da divisão celular), assim, a sua remoção por β -lactâmicos pode induzir a auto-lise celular irregular. Os reguladores de virulência *agr* e *sar* também regulam estas hidrolases [60]. No entanto, a sobre-expressão do regulão de choque térmico pode inibir a auto-lise celular e aumentar a resistência aos antibióticos [61].

O factor alternativo σ^B regula a produção da generalidade das proteínas de resposta ao *stress* em *Bacillus subtilis* e outras bactérias Gram-positivas, incluindo *S. aureus*. As proteínas de resposta ao *stress* permitem, na sua maioria que a bactéria sobreviva em condições ambientais extremas, como choque térmico e danos oxidativos induzidos por H_2O_2 [62]. Foram descritas algumas proteínas em *S. aureus* como sendo dependentes de σ^B : a proteína de choque alcalino 23 (asp23), a coagulase e algumas proteínas hipotéticas [63]. O factor σ^B foi também sugerido por Kullik e colaboradores como sendo um regulador de factores de virulência em *Staphylococcus spp.* [64].

Ziebandt mostrou, em 2001, que o factor σ^B regula negativamente alguns factores de patogenicidade extracelulares, incluindo a *staphopain*, proteases serinas, β -haemolisina e leucotoxina D [65]. Estirpes mutantes para o factor σ^B são drasticamente mais susceptíveis à meticilina que as estirpes selvagens, sugerindo que os genes de resposta ao *stress* regulados por este factor, assim como as proteínas codificados pelos genes, estão envolvidos na resistência a antibióticos [55].

O gene *sarA* em associação com o gene *agr*, ou individualmente, também regula alguns factores de virulência [66]. Esta regulação consiste, em parte, na repressão das proteínas da superfície celular, como as proteínas de ligação à fibronectina e a PBPa; também regula através do controlo positivo de factores extracelulares como a β -hemolisina, lipase e autolisina. A relação entre σ^B , *sarA*, patogenicidade e a resistência a antibióticos ainda não se encontra totalmente compreendida [65].

1.4.4. Proteínas da superfície celular

As proteínas de superfície em *S. aureus* são muito importantes para a colonização e subversão do hospedeiro [67]. As funções específicas destas proteínas são altamente diversas, incluindo a evasão das defesas biológicas do hospedeiro, adesão aos tecidos e competição com outras bactérias [68].

Em geral, as proteínas expostas da superfície de bactérias patogénicas são excelentes alvos para o desenho de ferramentas de diagnóstico, vacinas e anticorpos terapêuticos, tendo sido desenvolvidas estratégias de imunização, tanto passivas como activas, para combater infecções [69].

Até à data, pelo menos quatro classes diferentes de proteínas do envelope celular em *S. aureus* foram distinguidas: proteínas de membrana, lipoproteínas, proteínas ligadas covalentemente à parede celular e proteínas não-covalentemente ligadas à parede celular (Figura 4) [70].

1.4.4.1. Proteínas membranares

Actualmente existe uma classificação geral das proteínas da membrana para as estirpes de *S. aureus* N315 e do COL (<http://www.membranetransport.org/>). Além disso, em 2008, Wolff e colaboradores apresentaram um estudo abrangente sobre o proteoma membranar de *S. aureus* [71]. Contudo, o conhecimento referente às proteínas da superfície exposta da membrana de *S. aureus* ainda é muito limitado e o desenvolvimento de metodologias para estudar o proteoma da superfície membranar exposta é extremamente difícil, pois facilmente este proteoma é contaminado por proteínas extra- e intracelulares [70].

1. Revisão Bibliográfica

1.4.4.2. Lipoproteínas

Sibbald e colaboradores [72] revelaram que o número de lipoproteínas em *S. aureus* varia entre 45 a 66, através de previsões e análises comparativas de sequenciação de estirpes de *S. aureus* [72]. Muitas das lipoproteínas são proteínas de ligação envolvidas no transporte de nutrientes através da membrana ou envolvidas no processamento de outras proteínas [70].

Após a infecção do hospedeiro, as lipoproteínas desempenham um papel na aquisição de ferro, melhoria da invasão e fagocitose, da sobrevivência intracelular e da persistência de infecções. No entanto, a maioria das lipoproteínas em *S. aureus* tem função ainda desconhecida [73]. A libertação de lipoproteínas para o meio de crescimento, devido à clivagem proteolítica secundária após o processamento inicial pela peptidase tem sido estudada para algumas lipoproteínas em *S. aureus* [72].

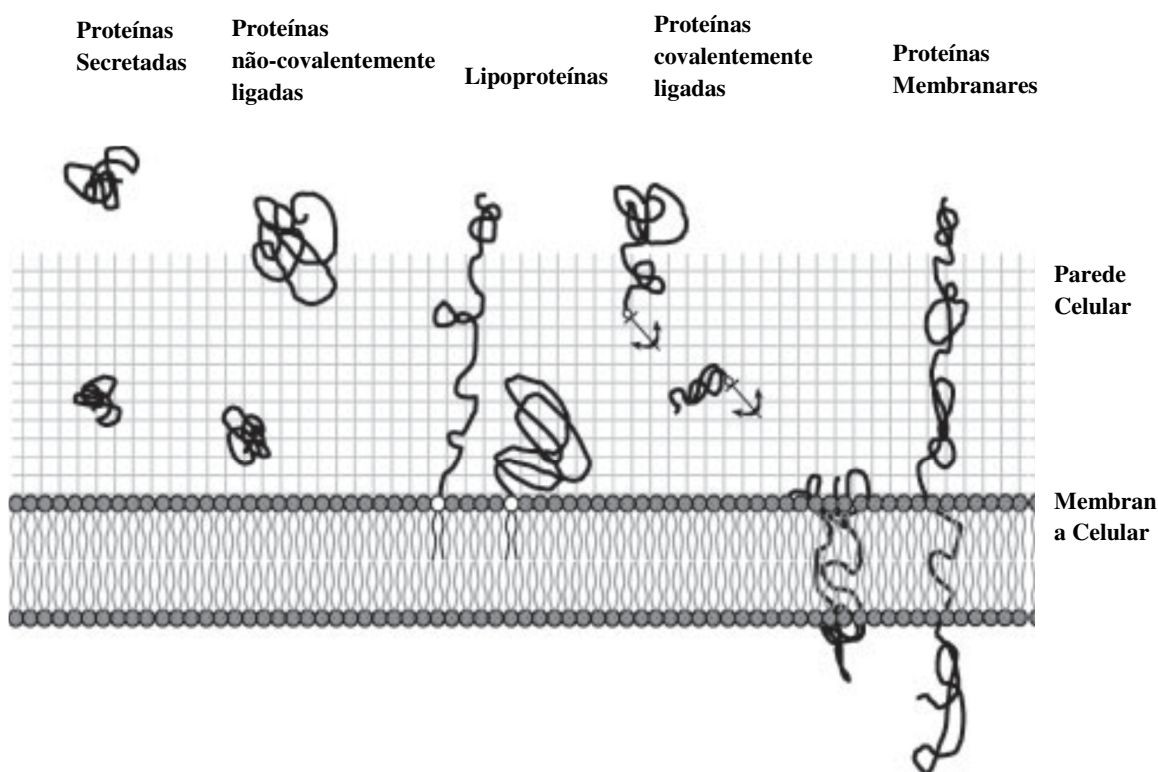


Figura 4. Representação esquemática das diferentes classes de proteínas que são retidas na membrana ou na parede celular de *S. aureus*. (Adaptado de Dreisbach, A., 2011) [70].

O conhecimento actual sobre o complexo de formação proteico das proteínas de secreção e da parede celular é reduzido, no entanto, é provável que a localização das lipoproteínas na parede celular esteja relacionada a interacções com outras proteínas exportadas [74].

1.4.4.3. Proteínas ligadas covalentemente à parede celular

S. aureus expressa uma variedade de adesinas de superfície, as quais permitem que a bactéria adira à matriz extracelular e componentes do plasma. Estes incluem proteínas de superfície ligadas covalentemente que reconhecem moléculas adesivas da matriz (MSCRAMMs), tais como a ClfA, ClfB, FnBPA e FnBPB. Estas proteínas de superfície estão ligadas covalentemente à parede celular, mais especificamente, ao peptidoglicano através de um sinal de ordenação C-terminal. Este processo é catalisado por transpeptidases específicas, também conhecidas como sortases (LRF) [70].

As proteínas ancoradas na parede celular através da sortase contêm um sinal N-terminal *Sec* e um sinal C-terminal composto por um motivo LPXTG [75]. Após a translocação proteica, estas proteínas são mantidas na membrana por um domínio C-terminal hidrofóbico, clivado pela sortase e ligado a um lípido precursor II. Este é depois integrado por uma ligação covalente no sáculo de mureína. A sub-classe de proteínas LPXTG é a serina-aspartato *repeat containin*, proteínas que estão envolvidas na ligação à matriz extracelular, fibronectina e fibrinogénio. A sortase, em si, pode ser um excelente alvo para a nova terapia contra infecções por *S. aureus* [76].

1.4.4.4. Proteínas ligadas não-covalentemente à parede celular

Existem grupos diferentes de proteínas ligadas não-covalentemente à parede celular: proteínas com domínios específicos de ligação à parede celular, *secretable expanded repertoire adhesive molecules* (SERAMs) e proteínas de ligação à parede citoplasmática [70].

S. aureus carece da camada S, geralmente, encontrada no peptidoglicano das bactérias Gram-positivas, estando apenas presente o domínio lisina (LysM) e as proteínas do módulo GW. Os domínios LysM consistem em repetições em *tandem* (até seis) e são encontrados em várias lisinas bacterianas que podem estar directamente envolvidos na virulência. O motivo GW contém repetições dipeptídicas Gly-Trp, sendo o número de repetições responsável pelo aumento da força de ancoragem [77].

1.4.4.5. *Cell Shaving*

A análise da superfície hidrofóbica exposta da membrana e das proteínas integradas na membrana (IMP) continua a ser um dos grandes desafios para as tecnologias de proteômica. As IMP importantes na patogenicidade da bactéria constituem canais para a aquisição de nutrientes e remoção de compostos antimicrobianos e actuam como aparelho de secreção de factores de virulência, uma vez que medeiam interacções com células do hospedeiro e com a resposta imunitária [78].

Vários métodos para a análise de proteínas de membrana têm sido propostos [79]: precipitação, ultracentrifugação em gradiente de densidade e extracção com detergente forte [80]; extracção líquido-líquido e biotinylation [81] e captura através da afinidade com estreptavidina [82]. Estas técnicas, quando combinadas com uma análise proteómica envolvendo 2-DE ou técnicas onde não seja usado um gel, como 2 D LC acoplado a MS/MS (2-DLC-MS/MS), permitiram o sucesso na identificação de proteínas associadas à membrana. No entanto, a identificação das IMP e informações específicas sobre as superfícies expostas e epítomos permanecem muito reduzidas [78].

O conceito de *surfacome*, definido como a recolha de proteínas da superfície exposta (e os seus epítomos extracelulares), tem sido desenvolvido [83]. Tjalsma e colaboradores apresentaram, em 2008, pela primeira vez o conceito de *cell shaving* em bactérias [84], usando uma protease para digerir as proteínas da membrana exposta nas células intactas em solução isotónica com o objectivo de libertar péptidos expostos para análise por LC-MS/MS (Figura 5).

O trabalho original que descreve esta abordagem foi realizado em *Streptococcus pyogenes* [85] e resultou na identificação de 68 proteínas de superfície, uma das quais foi validada em ratinho, como um potencial candidato para a vacina. Desde então, outros estudos têm utilizado a mesma técnica em *S. pyogenes* e *Bacillus subtilis*, incrementando cada vez mais o rendimento das identificações proteicas [78, 84, 86].

Os estudos e proteomas resultantes do *Cell Shaving* são constantemente contaminados por proteínas citosólicas, e a maioria dos estudos com sucesso relativo foram alcançados em bactérias Gram-positivas onde as paredes celulares espessas de peptidoglicano são mais resistentes à lise espontânea em solução [78].

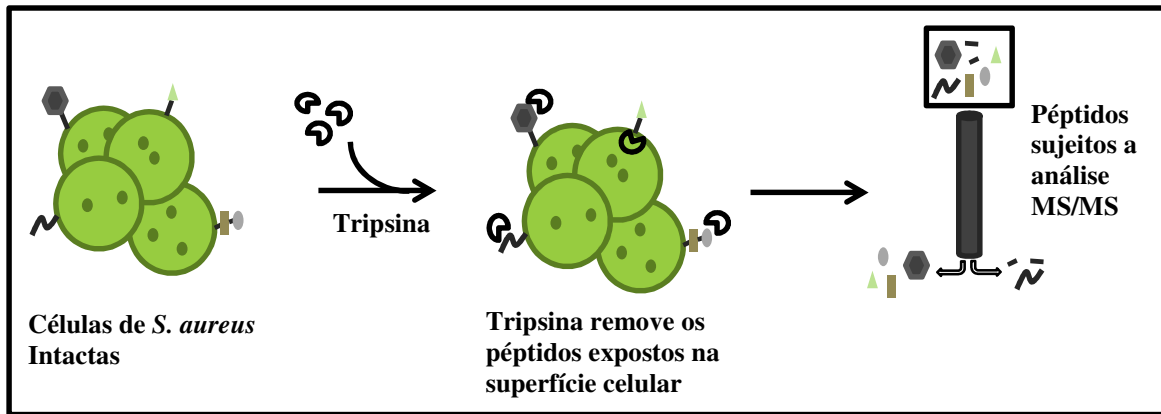


Figura 5. Esquema ilustrativo do processo de *Shaving* celular. Uma solução com tripsina é adicionada à cultura celular; a tripsina hidrolisa os péptidos expostos na superfície celular; os péptidos resultantes são sujeitos a análise por LC-MS/MS (Adaptado de Solis *et al.*, 2010) [78].

1.4.5. Proteoma Extracelular

O termo “Exoproteoma” descreve as proteínas que podem ser encontradas no meio extracelular próximo de um dado sistema biológico. Estas proteínas resultam de secreção celular, de sistemas de exportação proteica ou mecanismos de lise celular. As proteínas presentes no meio reflectem o estado fisiológico das células numa determinada condição e são indicadores de como os sistemas vivos interagem com o ambiente. Abordagens proteómicas com base em estratégias *shotgun* de rendimento elevado e a alta resolução em espectrometria de massa têm modificado a visão da comunidade científica relativamente aos exoproteomas [87].

As proteínas secretadas para o meio representam uma fracção específica do proteoma bacteriano no sentido em que elas têm de ser transportadas através das membranas para garantir a biogénese das membranas e paredes celulares, absorção de nutrientes, motilidade e interações extracelulares. Uma significativa parte destas proteínas estão activas fora da célula. A proteólise no ambiente extracelular pode ser importante e apenas as proteínas mais estáveis permanecem em abundância no ambiente extracelular. A maioria das proteínas secretadas são sintetizadas como precursoras, com uma sequência de N-terminal de sinal clivável; contudo, uma fracção significativa destas proteínas não são secretadas pelas vias clássicas de secreção, ou seja, sem sinalização peptídica. Esta sinalização é responsável pelo direccionamento da proteína para os sistemas e maquinaria de exportação da membrana. As vias dependentes de péptidos de sinalização predominantes são as vias de secreção *Sec* e *Tat* [88].

1. Revisão Bibliográfica

Em bactérias Gram-positivas, substratos proteicos das sortases são translocadas pela via secretora *Sec*, mas estão ancoradas covalentemente à parede celular. As lipoproteínas são também secretadas (em bactérias Gram-positivas) ou exportadas (em bactérias Gram-negativas) através da via *Sec* (ou *Tat* em alguns casos), mas estão ancoradas na membrana citoplasmática (em ambos os tipos de bactérias) ou na membrana exterior (no lado periplasmático em bactérias Gram-negativas).

As proteínas integrais da membrana são inseridas através da via *YidC*, dependente ou independente da via dependente de *Sec*. As vias de secreção dependentes de *Sec* e *Tat* também levam à libertação de algumas proteínas no meio extracelular (Figura 6).

Em bactérias Gram-positivas, algumas proteínas exportadas compartilham um determinante nas suas extremidades carboxilo para ligação covalente com a parede celular. Tal sinal é constituído por um motivo de assinatura (como LPXTG ou sequências de aminoácidos PEP), uma α -hélice transmembranar hidrofóbica, e um conjunto base de aminoácidos (principalmente arginina) e é processado por sortases [89].

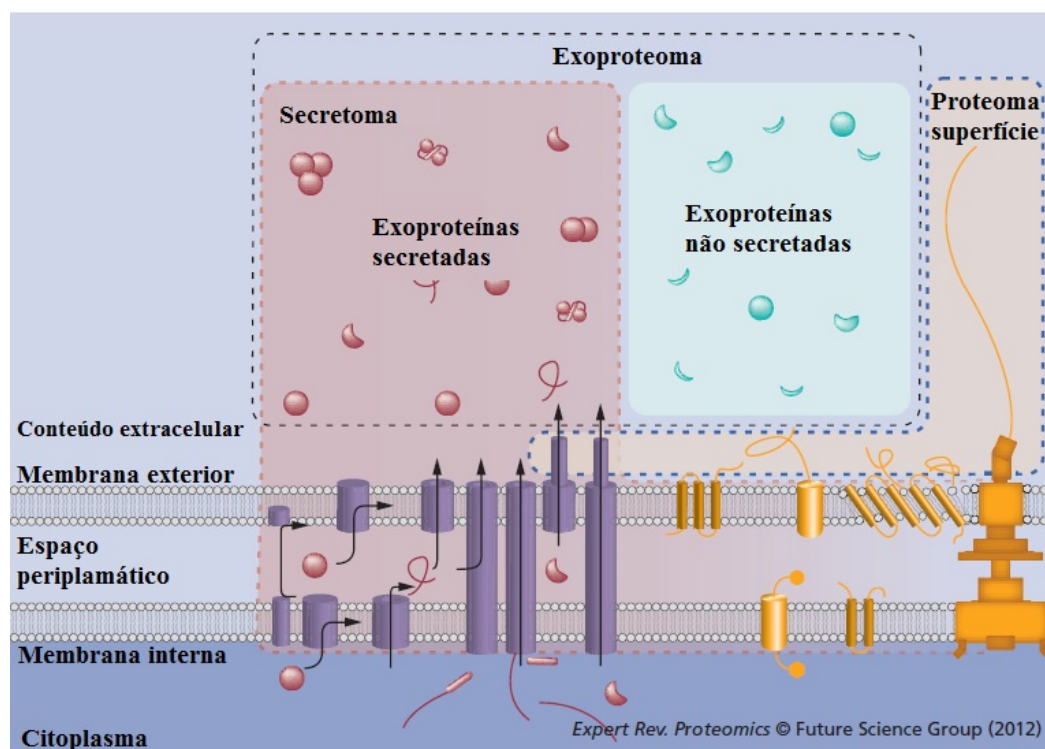


Figura 6. Ilustração dos conceitos de secretoma, exoproteoma e proteoma da superfície celular num modelo bacteriano Gram-negativo (Adaptado de Armengaud J., 2012) [87].

1.4.5.1. Ferramentas e estratégias para análise do exoproteoma

Durante a última década, as melhorias na espectrometria de massa na análise de proteínas e péptidos têm levado a mudanças fundamentais no campo da proteômica. Estudos pioneiros sobre exoproteomas foram realizados por fracionamento de amostras complexas em géis 2D-PAGE, seguido de identificação das proteínas em *spots* isolados, usando MALDI-TOF.

Actualmente, as misturas de péptidos complexos são, na maioria dos casos, separadas por cromatografia de fase reversa (nano-HPLC), antes de serem analisadas por espectrometria de massa. Esta nova abordagem facilita a identificação de centenas de proteínas a partir de uma única amostra. Estratégias *Bottom-Up*, em que as proteínas da amostra são proteolisadas com tripsina e as massas e sequências dos péptidos trípticos resultantes são determinados por MS/MS, são as mais frequentemente utilizadas neste tipo de estudos proteicos [87].

Com o advento das estratégias *shotgun* e o desenvolvimento de espectrómetros de massa de alto rendimento, tais como Q-TOF, Q-Trap e Orbitrap, bases de dados mais exaustivas de proteínas foram construídas sem a necessidade do tradicional fracionamento. No entanto, as amostras de exoproteomas são obtidas e mantidas em fase aquosa e/ou soluções que contêm grandes quantidades de outros componentes químicos que, por vezes, são incompatíveis com a espectrometria de massa. Por esta razão, deve ser prestado especial cuidado nas etapas de extracção e purificação proteica [90].

O método mais simples de obter uma solução de péptidos sem contaminantes do meio para a análise em espectrometria de massa é a separação da amostra através um gel desnaturante de SDS-PAGE. Depois de uma migração electroforética curta, as exoproteínas purificadas são concentradas numa só banda pequena, que pode ser proteolisada com tripsina. A mistura peptídica resultante pode, então, ser analisada por nano-LC-MS/MS. A maioria dos estudos recentes sobre exoproteomas têm utilizado esta abordagem de alto rendimento; no entanto a técnica de 2D-PAGE ainda tem interesse na resolução de isoformas que resultam da modificação pós-tradução [91].

1.4.5.2. Estudo da patogenicidade através de exoproteomas

Nos últimos anos, análises proteómicas baseadas em 2D-PAGE têm sido desenvolvidas para explorar os diferentes componentes envolvidos na patogenicidade de diferentes bactérias e as suas capacidades para se adaptar às condições ambientais [92].

Entre os vários exemplos de estudos neste campo podem-se citar dois trabalhos: a análise 2D-PAGE do exoproteoma de *Pseudomonas aeruginosa* e a análise dos exoproteomas de *Corynebacterium diphtheriae* e *Mycobacterium tuberculosis*. O primeiro estudo levou à identificação de proteínas envolvidas na adaptação à temperatura, característica esta que facilita infecções nosocomiais [93]. O segundo estudo permitiu a construção de mapas de referência para estes dois patógenos humanos e a identificação de novas proteínas envolvidas na adesão celular e invasão [94, 95].

Dumas e colaboradores analisaram o exoproteoma de 12 estirpes representativas de *Listeria monocytogenes* com serótipos de diferentes origens e níveis de virulência [96]. Como resultado destes estudos, os autores propuseram a primeira definição do exoproteoma nuclear e variante da espécie. Da mesma forma, exoproteomas de 25 estirpes clínicas de *Staphylococcus aureus* foram analisadas, destacando-se a importância de estudos de proteômica para complementar a informação genómica [97]. Estudos em proteômica foram, recentemente, direccionados para uma compreensão mais profunda dos mecanismos moleculares responsáveis pela patogenicidade [98].

1.4.6. Espectrometria de massa

A espectrometria de massa tornou-se o principal método de caracterização proteica com aplicações para a proteómica devido à capacidade de rapidamente identificar proteínas com base em *fingerprints* de massa peptídica e sequências de aminoácidos, por apresentar uma elevada sensibilidade à detecção proteica, elevadas capacidades de *throughput* e integração com métodos quantitativos de identificação de proteínas diferencialmente expressas [99].

O principal método para identificação proteica é baseado na fragmentação de um ou mais péptidos por MS tandem (MS/MS). A sequência peptídica é obtida pela quebra de ligações peptídicas preferenciais de polipéptidos por colisões com um gás inerte [99].

A espectrometria de massa, nomeadamente a *matrix assisted laser desorption/ionization time-of-flight* (MALDI-TOF), tem-se tornado indispensável em proteómica, na visualização e caracterização de proteínas assim como na investigação clínica [100]. Inventada na década de 80, este tipo de espectrometria de massa é utilizada como técnica para análise de péptidos e proteínas de amostras com relativa complexidade,

com a vantagem de não requerer grandes quantidades de amostra para produzir resultados fiáveis [101].

1.4.7. Técnicas associadas à detecção de proteínas

A proteómica tem por base o estudo, identificação e caracterização das proteínas resultantes de genes relacionados com vias metabólicas específicas. Para analisar as proteínas de uma dada amostra biológica, é necessário recorrer a técnicas e procedimentos de extracção, preparação, solubilização e purificação. O procedimento de extracção e solubilização descrito por Görg em 2000 é utilizado na preparação de amostras proteicas, onde é fundamental que as proteínas sejam completamente solubilizadas para obter resultados válidos e fiáveis. Dependendo do estudo a realizar e do tipo de proteínas que se pretendem obter, os procedimentos podem ser adaptados [44]. Este trabalho parte de proteínas provenientes de microrganismos, com características de crescimento e desenvolvimento específicas exigindo para esse efeito que o procedimento de extracção proteica seja optimizado [44]. Uma vez extraídas as proteínas é possível proceder ao passo seguinte, ou seja, a separação proteica. A 2-DE surge associada a procedimentos, técnicas e equipamentos de espectrometria de massa e de bioinformática que permitem a caracterização, identificação e quantificação das proteínas presentes. Após a identificação das proteínas, existe ainda o estudo das vias metabólicas ou *pathway analysis* onde são analisadas as alterações verificadas na expressão proteica em resposta a estímulos ou específicas condições de *stress* [45, 102].

1.5. Aplicações biotecnológicas da proteómica ao nível da ciência, indústria e medicina

As bactérias são microrganismos amplamente utilizados na biotecnologia, desde a produção de proteínas e substâncias químicas até à sua utilidade como modelos para testar novas tecnologias analíticas.

Aplicada ao nível do estudo das proteínas, esta área tecnológica tem recebido muita atenção de várias áreas da ciência, podendo ser usada para a expressão proteica e na elaboração de mapas funcionais ou celulares proteómicos [103]. Nos últimos anos, a proteómica surge também como uma ferramenta muito útil na investigação de processos bioquímicos complexos assim como na descoberta de novas proteínas e de interacções proteína-proteína. A proteómica apresenta ainda grande utilidade na área da medicina,

nomeadamente no estudo do cancro e de doenças neurodegenerativas, dando um contributo importante no tratamento médico [104]. A proteómica pode ser útil na diferenciação entre pacientes e humanos saudáveis e definir entre os pacientes, quais os que apresentam melhores condições de diagnóstico ao nível do cancro. Desta forma, seria possível detectar precocemente biomarcadores únicos para a neoplasia e desenvolver ensaios com elevada especificidade e sensibilidade para a sua detecção, podendo mesmo levar à definição das várias fases neoplásicas [105].

Na indústria a proteómica é utilizada, ao nível do controlo de qualidade e no seguimento de vários processos industriais. De facto, a proteómica pode ser utilizada no reconhecimento da variabilidade na qualidade de carne e marisco, em possíveis contaminações bacterianas e na adição de proteínas de outras espécies. A proteómica poderá também ser aplicada como prova do uso de esteróides anabólicos em produtos de carne e de leite [104].

2. Objectivos

Na realização deste trabalho, pretendeu-se:

- Obter proteomas completos através de electroforese bidimensional do tipo IEF x SDS-PAGE e extracções directas para LC-MS/MS da estirpe de *S. aureus* ST398, a nível do proteoma citoplasmático, proteoma da superfície celular exposta e proteoma extracelular.
- Identificar proteínas relacionadas com actividade normal da célula, virulência e resistência a antibióticos.

3. Material e Métodos

3.1. Proteoma citoplasmático

3.1.1. Estirpe bacteriana e condições de crescimento

A estirpe de MRSA C2355 foi recolhida de uma amostra do líquido pleural de um paciente com empiema descrito e caracterizado por Lozano e colaboradores [106]. Esta estirpe foi associada ao *spa-type* t011 e ao *sequence type* ST398. Apresenta um fenótipo multirresistente a β -lactâmicos, tetraciclina, clindamicina e ciproflaxacina. Os genes de resistência *mecA*, *tetK* e *tetM* foram também identificados [106].

As células congeladas da estirpe C2355 foram plaqueadas em estria em placas de agar-sangue para crescimento a 37 °C. Uma colónia foi transferida para 250 mL de meio mínimo M9, suplementado com 4 g/L⁻¹ de glucose e incubada a 37 °C durante 24 h [107].

3.1.2. Extração e quantificação proteica

As células em meio M9 foram colectadas na fase pós-exponencial em todos os ensaios (OD_{540 nm}=6 correspondendo a cerca de $2-3 \times 10^9$ células/mL) [107]. As células foram precipitadas através de uma centrifugação a 10 000 g durante 3 minutos à temperatura de 4 °C. O *pellet* resultante foi ressuscitado num volume igual de PBS (pH 7,4) pré-aquecido [108]. A amostra sofreu outra centrifugação nas condições da anterior e foi ressuscitada em 0,2 mL de tampão de solubilização. A disrupção celular foi realizada por sonicação (3×10 s, 4 °C, 20 kHz, 100 W) e os detritos celulares foram removidos por centrifugação (14 000 g, 30 min, 4 °C) [107].

O resultado da extração de proteínas foi adicionado em *eppendorfs* com o reagente de *Coomassie Plus™ Protein Assay Reagent* (1:50). As amostras foram medidas no espectrofotómetro *NanoDrop v1000* com o programa *Protein Bradford* [109]. A curva padrão foi desenhada com a solução padrão de Albumina (Albumina de Soro Bovino, 2 mg/mL).

3.1.3. Electroforese monodimensional e coloração

A reprodutibilidade da técnica de electroforese em gel de poliacrilamida (PAGE) na presença de Dodecil Sulfato de Sódio (SDS) ou SDS-PAGE para a caracterização de MRSA foi confirmada com 3 repetições biológicas e técnicas. Na

realização da técnica de SDS-PAGE, ao sobrenadante, resultante da extracção, foi adicionado igual volume de tampão (Tris HCl 0,5 M, pH 8,0; glicerol; SDS e azul de bromofenol).

A electroforese foi conduzida num gel de poliacrilamida vertical (T=12,52%, C=0,97%), no sistema de tinas *Hoefer™SE 600 Ruby®* (Amersham Biosciences), seguindo *Laemmli* [110].

As proteínas foram separadas segundo o seu peso molecular com corrente constante de 30 mA por gel durante o tempo necessário para que a frente de migração atingisse o limite inferior do gel. Posteriormente à electroforese, os géis foram corados com *Coomassie Brilliant Blue R250* durante 24 h, tendo sofrido depois, um passo de lavagem com água. Finalmente foram fixados com ácido tricloroacético a 6% durante 4 h e glicerol a 5% durante 2 h [111].

3.1.4. Electroforese bidimensional

As soluções proteicas após o processo de extracção (secção 3.1.2) foram mantidas a uma temperatura de -70 °C. Após descongeladas as amostras foram limpas com o kit *2D-Clean-up* (Amersham Biosciences) para eliminar detergentes, sais, lípidos, fenóis e ácidos nucleicos.

A electroforese bidimensional (2-DE) seguiu os princípios de O'Farrell [41], mas usando a tecnologia IPG (*Immobiline™pH Gradient*) [112].

Para a focalização isoeléctrica (IEF), *strips* IPG de gradiente não-linear de pH 4-7 foram rehidratadas passivamente *overnight* (12-16 h) com tampão de rehidratação (ureia 8 M, CHAPS 1%, DTT 0,4%, anfólitos pH 3 – 100, 0,5%). À temperatura ambiente, as *strips* foram cobertas com a solução *Dry-Strip Cover Fluid (Plus One, Amersham Biosciences)* para evitar a evaporação e a cristalização da ureia. Antes de carregar as amostras nas *strips*, estas amostras foram adicionadas na proporção de 1:1 ao tampão de lise [ureia 9,5 M, DTT 1% (w/v), CHAPS 2% (w/v), anfólitos 2% (v/v) (pH 3 – 10) e *Pefabloc® proteinase inhibitor* 10 mM]. Amostras, contendo 150 µg de proteínas foram carregadas por *cup loading* nas *strips*, previamente rehidratadas. A focalização foi realizada no focalizador *Ettan™IPGPhor II™* (Amersham Biosciences, Uppsala, Suécia), seguindo um programa sequencial: 500 V, 1 h; 1 000 V, 2 h; 8 000 V, 2 h; 10 000 V, 4 h e finalmente 10 000 V durante 55 min até atingir 24 000 V/h. Terminada a focalização, as *strips* foram mantidas a -80 °C.

Para a segunda dimensão, as *strips* foram equilibradas 2 vezes durante 15 minutos, com tampão de equilíbrio [ureia 6 M, glicerol 30% (w/v), SDS 2% (w/v), Tris-HCl 0,05 M (pH 8,8)]. Na primeira equilíbrio, ao tampão de equilíbrio foi adicionado DTT 1% e na segunda, 4% iodoacetamida, assim como azul de bromofenol a ambas as soluções. Para eliminar os excessos de tampão, as *strips* foram lavadas em tampão de electroforese (Glicina 0,2 M, Tris-HCl 25 mM, SDS 3,5 mM) e foram inseridas nos géis de poliacrilamida a 12,55%, no sistema *Hoefer™SE 600 Ruby®* (Amersham Biosciences).

Após SDS-PAGE, os géis 2-DE foram fixados em metanol a 40% e ácido acético a 10% durante 1 h, tendo sido posteriormente corados em *Coomassie Brilliant Blue G-250* durante 24h [108]. Os géis corados foram digitalizados com a ajuda de um scanner específico (*Umax PowerLook 1100; Fremont, CA, USA*) e com recurso a dois softwares de gestão de imagens, *Image Scanner II* e *Image Master 5.0* (Amersham Biosciences e GE Healthcare, respectivamente).

3.1.5. Identificação proteica

Os *spots* proteicos de todos os géis foram excisados manualmente e enviados para análise por MALDI-TOF/TOF (*Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry*) para o Departamento de Química da Universidade de Aveiro.

3.2. Shaving das células de MRSA

3.2.1. Condições de crescimento da amostra de MRSA C2355

A amostra mantida em criotubos a -80 °C, foi cultivada em suspensão em meio TSB (*tryptic soy broth*) *overnight*, sendo este passo designado de pré-cultura (três repetições biológicas). No fim do crescimento das pré-culturas as três repetições biológicas foram transferidas dos tubos de pré-cultura para os tubos de cultura, sendo que as três repetições iniciaram o seu crescimento com aproximadamente uma densidade óptica (OD 600) de 0,02, garantido um crescimento igual.

As culturas foram mantidas a 37 °C e a 200 rpm em meio aeróbio até atingirem uma densidade óptica de cerca de 0,5 (fase exponencial média).

3.2.2. Recolha e *Shaving* celular

Após atingirem uma densidade óptica de ~0,5, as células foram recolhidas através de uma centrifugação de 5 minutos a 1 000 g e 4 °C, para manter a integridade celular. Os *pellets* resultantes foram lavados com solução de lavagem (Tris-HCl 20 mM, NaCl 150 mM, pH 7,6, 4 °C) nas mesmas condições de centrifugação.

Após as lavagens, os *pellets* foram ressuspensos em 2 mL de tampão de ressuspensão ou tampão de hidrólise (Tris-HCl 20 mM, NaCl 150mM, CaCl₂ 10 mM, L-arabinose ou D-arabinose 1 M, pH 7,6, 2 µg tripsina). A tripsina hidrolisou as proteínas da superfície externa celular durante 1 hora em ligeira agitação a 37 °C.

Posteriormente, os péptidos foram recolhidos por centrifugação (1 000 g, 15 minutos, 4 °C). A solução foi filtrada com um filtro 0,22 µm para reter as células bacterianas. A digestão dos péptidos por parte da tripsina foi completada *overnight* a uma temperatura de 37 °C com a adição de 0,6 µg de tripsina [78].

Após a hidrólise completa, os péptidos foram purificados e concentrados com um coluna Sep-Pak C18 Plus Light Cartridge (WATERS, Guyancourt, França) (Figura 7) seguindo as instruções da empresa:

- 500 µL de metanol
- 500 µL água
- Amostra
- 500 µL água
- 500 µL Acetonitrilo (ACN) 80%

O acetonitrilo foi evaporado no *SpeedVac* e foi adicionado ao *pellet* 20 µL de tampão (98/2 H₂O/ACN, TFA 0,06%) [78].

A identificação dos péptidos foi efectuada em LC-MS-MS (Plataforma de Proteómica, INRA, Clermont-Ferrand, França).

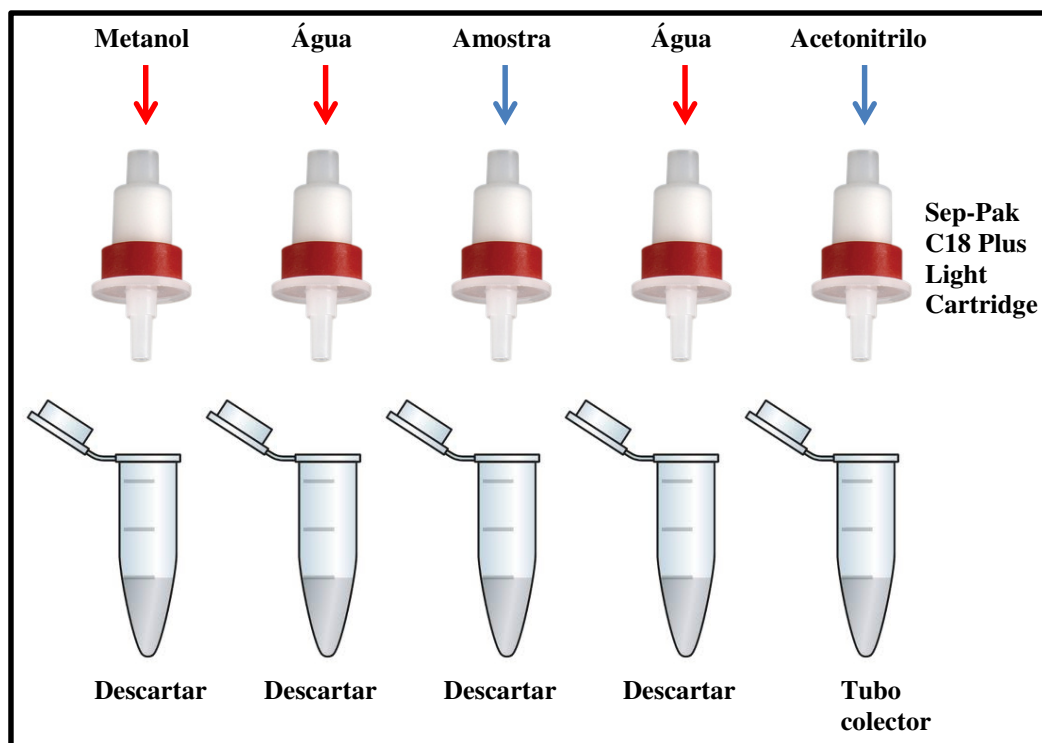


Figura 7. Representação esquemática do protocolo de utilização da coluna de separação Sep-Pak C18 Plus Light Cartridge.

3.3. Proteoma Extracelular

3.3.1. Condições de crescimento da amostra

A amostra mantida em criotubos a -80°C , foi cultivada em suspensão em meio SSD (*Staphylococcus Siderophores Detection*) overnight, sendo este passo designado de pré-cultura (três repetições biológicas). Este meio foi escolhido por ser um meio químico mínimo, que facilita a identificação posterior das proteínas em LC-MS/MS, evitando as contaminações peptídicas dos constituintes de meios bacterianos ricos.

As pré-culturas foram diluídas até ter uma densidade óptica inicial de 0,02 (OD 600 nm) e transferidas para as frascos de cultura num volume de 200 mL. As culturas cresceram a 37°C , 200 rpm até atingir fase estacionária.

3.3.2. Recuperação das proteínas extracelulares e quantificação

As culturas de 200 mL, em fase estacionária, foram sujeitas a uma centrifugação de 15 minutos a $7\,000\,g$ à temperatura de 4°C . O sobrenadante foi filtrado com um filtro de 250 mL com $0,2\,\mu\text{m}$, para que as células bacterianas que se encontrassem

3. Material e Métodos

em suspensão ficassem retidas no filtro e, o meio com as proteínas extracelulares passasse através dos poros do filtro.

No decorrer do protocolo foi necessário evitar a degradação proteica com a adição de uma anti-protease PMSF (*phenylmethanesulfonylfluoride*), 2 mL de PMSF adicionados aos 200 mL.

Dado o volume de cultura inicial ser demasiado elevado, foi necessário reduzir 200 mL para cerca de 10-15 mL e manter o mesmo conteúdo proteico. Para este efeito foi utilizada uma coluna *ViVacell 100 Centifugal Concentrator* (Figura 8). Estas colunas foram primeiramente centrifugadas com água para eliminar a glicerina presente na membrana. Para reduzir o volume foram realizadas centrifugações com 50 mL a 4 °C e a 3150 g, durante o tempo necessário até o volume descer dos 50 mL até cerca de 10-15 mL, em seguida, a coluna era cheia novamente e sujeita a outra centrifugação nas mesmas condições e assim sucessivamente até todo o sobrenadante ter sido passado na coluna. No final os 10-15 mL resultantes foram transferidos para tubos de 40 mL de *teflon*.



Figura 8. Coluna ViVacell 100 Centifugal Concentrator.

Nos tubos de *teflon*, foi feito um tratamento com DNase a 1% (v/v) e RNase a 1% (v/v) durante 30 minutos à temperatura ambiente e um tratamento com desoxicolato a 1% (v/v) em gelo, para ajudar na precipitação de baixas quantidades de proteínas em TCA (ácido tricloroacético).

Foi adicionado TCA a 50% na proporção de 1/3 ao concentrado proteico de maneira a obter-se 10% de TCA. A precipitação deu-se *overnight* a 4 °C.

Finalizada a precipitação com TCA, submeteram-se os tubos com as amostras a uma centrifugação de recuperação de proteínas (12 000 g, 30 minutos, 4 °C). Descartou-se o sobrenadante e adicionou-se 15 mL de acetona glacial que actuou durante 16 h à temperatura -20 °C.

Posteriormente realizaram-se 3 lavagens com acetona glacial (12 000 g, 30 minutos, 4 °C). Os *pellets* ficaram em contacto com a acetona glacial 15 minutos entre cada centrifugação. Estas lavagens permitiram eliminar completamente a acidez do tratamento resultante do tratamento com TCA.

Finalmente a acetona evaporou *overnight*, deixando os *pellets* completamente desidratados. Os *pellets* foram ressuspensos em 250 µL de tampão *Laemmli* (Tris-Cl 60 mM, pH 6,8, SDS 2%, glicerol 10%, β-mercaptoetanol 5%, azul de bromofenol 0,01%).

As amostras proteicas foram quantificadas seguindo o protocolo de *Bradford* como descrito na secção 3.1.2.

3.3.3. Concentração das proteínas (SDS-PAGE)

Antes da análise em LC-MS/MS foi efectuada uma electroforese do tipo SDS-PAGE curta que permitiu eliminar alguns sais restantes que pudessem interferir com a posterior análise e concentrar todas as proteínas numa só banda em gel. Na realização dessa electroforese foi usado o sistema de electroforese *BioRad Mini Protean II*. O gel deste sistema consiste em 1/3 de gel de concentração a 5% (1,7 mL Acrilamida/Bisacrilamida *Rotiphere* a 30%, Tris 1 M pH 6,8, 100 µL SDS 10%, 100 µL Persulfato de Amónio (APS), 10 µL TEMED (*Tetramethylethylenediamine*) e 6,8 mL água MiliQ). O gel de separação a 10% constitui os restantes 2/3 do gel total (6,6 mL Acrilamida/Bisacrilamida *Rotiphere* a 30%, 5 mL Tris 1,5 M pH 8,8, 200 µL SDS 10%, 200 µL Persulfato de Amónio (APS), 8 µL TEMED e 8 mL água miliQ). O APS e o TEMED são sempre adicionados imediatamente antes de se carregar os géis nos vidros dos suportes. Para a electroforese usou-se um tampão de electroforese constituído por: 95 mM Tris-HCl, Glicina 0,95 M e SDS 17 mM.

Foram carregadas 10 µg de proteína em cada poço para uma migração com as seguintes condições: 15 minutos, 100 V e 15 mA/gel constante. A migração deve ser finalizada quando a frente de migração atingir o limite entre o gel de concentração e o de separação.

3. Material e Métodos

Durante 15 minutos, fixou-se o gel com ácido acético a 10% e isopropanol 25%. Em seguida o gel foi ligeiramente corado com uma solução de *Coomassie Blue Brilliant G250* 0,25%, ácido acético a 10% e etanol a 50%, esta coloração serve apenas para se conseguir visualizar as bandas e, assim, tornar-se mais fácil a sua excisão. As bandas coradas foram excisadas e a mesma banda dividida em 4 partes para facilitar posteriormente a digestão pela tripsina.

As bandas receberam uma primeira etapa de descoloração durante 20 minutos com ácido acético a 10% e etanol a 15%, seguido de duas lavagens de 5 minutos com água MilliQ.

Posteriormente, foi necessário um processo de desnaturação para que as estruturas quaternárias e pontes dissulfeto sejam destruídas; para tal as proteínas são mantidas 45 minutos a 55 °C numa solução de NH_4HCO_3 100 mM e DTT 10 mM. Para manter estas condições, evitar que as pontes dissulfeto se voltem a formar e bloquear os resíduos de cisteína, foi realizada uma etapa de alquilação através de uma solução com NH_4HCO_3 100 mM e de iodoacetamida 55 mM durante 20 minutos no escuro.

As bandas foram totalmente descoradas, tendo sofrido 4 passos de descoloração:

- 100 μL ACN 50%, NH_4HCO_3 100 mM, 20 minutos;
- 100 μL ACN 100%, 20 minutos;
- 100 μL NH_4HCO_3 100 mM, 20 minutos;
- 100 μL ACN 100%, 20 minutos.

Finalmente as amostras sofreram uma desidratação completa em *SpeedVac* e foram enviadas para a Plataforma de Proteómica, INRA, Clermont-Ferrand, França, para a identificação proteica por LC-MS/MS.

4. Resultados

4.1. Proteoma citoplasmático

4.1.1. Electroforese monodimensional

Um total de 14 bandas com elevado nível de expressão foi separado em todas as repetições SDS-PAGE do proteoma citoplasmático (Figura 9). A maioria das proteínas de MRSA foi agrupada na região entre os 30 e 85 kDa. Diferentes níveis de expressão foram observados entre as diferentes proteínas, confirmados por 2-DE. Posteriormente, procedeu-se a um estudo proteico completo, a fim de caracterizar e identificar as proteínas presentes.

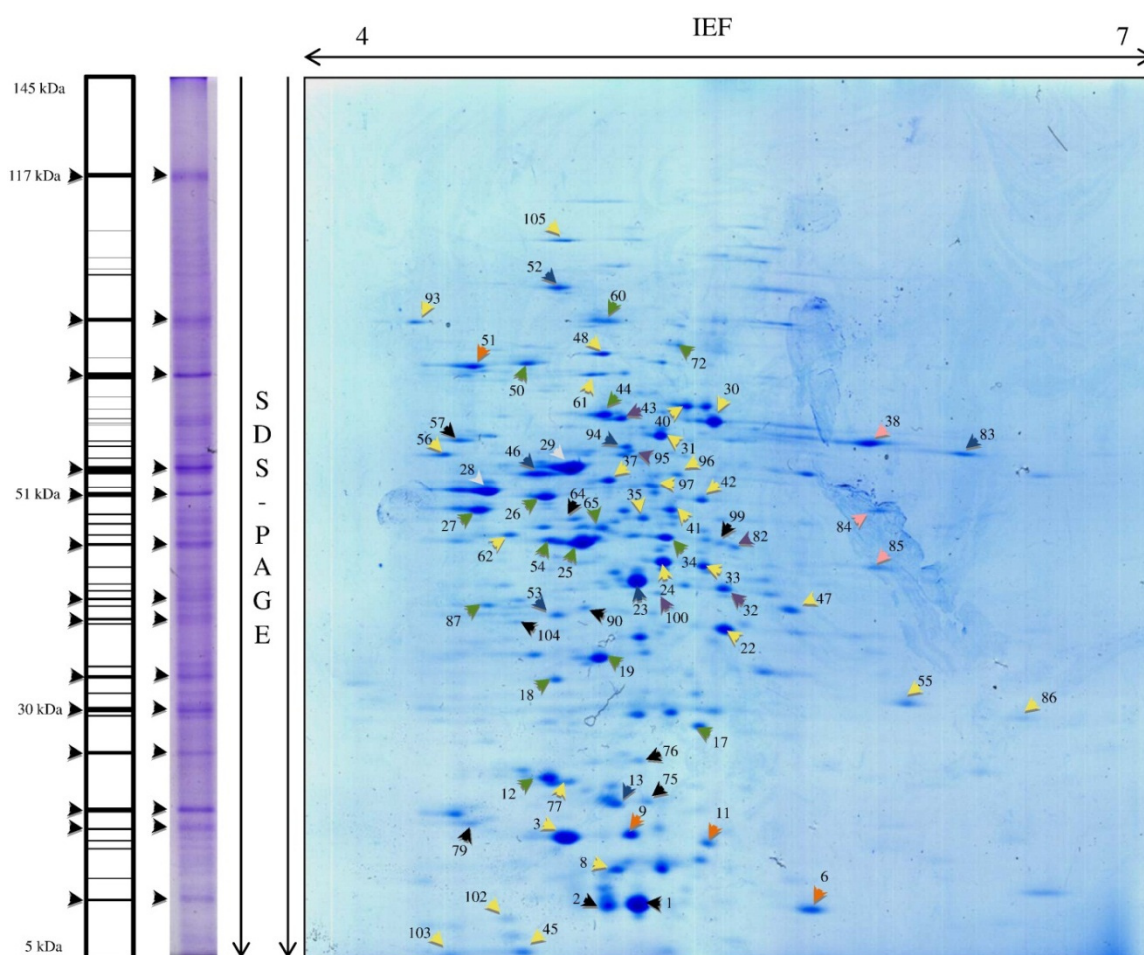


Figura 9. Perfil monodimensional de MRSA ST398 com *Coomassie R-250* coloração (lado esquerdo) e perfil monodimensional esquemático com pesos moleculares do gel SDS-PAGE. Imagem do gel 2-DE com coloração *Coomassie G-250*, onde se marcaram os spots (lado direito). Legenda: Verde: Glicólise, Azul: biossíntese de proteínas, Roxo: processo de oxidação-redução, Laranja: resposta ao *stress*, Gray: Hidrólise de ATP acoplado ao transporte de prótons, Rosa: Metabolismo *one-carbon*, Amarelo: Outros processos celulares [107].

4.1.2. Electroforese bidimensional

A expressão das proteínas da estirpe de MRSA ST398 C2355 [106], foi observada em géis 2-DE (Figura 9). O uso de *strips* IPG de pH 4-7 resultou em *spots* proteicos muito bem distribuídos, que permitiram a excisão segura e precisa, assim como a identificação na imagem. Os *spots* foram distribuídos ao longo da região de pI 4-7 com pesos moleculares relativos (Mr) entre 5 e 145 kDa (Figura 9).

No total, foram excisados 105 *spots* de proteínas relevantes e individualizados em *ependorfs* para posterior análise através de espectrometria de massa por MALDI-TOF/TOF. Esta análise permitiu identificar 227 proteínas diferentes. As proteínas obtidas presentes nos *spots* foram identificadas e caracterizadas (Tabela A1, tabela em anexo) por meio da correlação com bases de dados bioinformáticas (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Verificou-se que a maioria das proteínas em MRSA está agrupada entre pH 4,5 e 6 e 30 e 75 kDa.

A utilização da base de dados bioinformática *Uniprot* (<http://www.Uniprot.org/>) permitiu determinar a função biológica das proteínas, assim como a relação com um processo biológico específico no nível celular (Tabela A1).

4.1.3. Identificação proteica

Todos os *spots* proteicos foram excisados do gel e incubados com tripsina para digerir as proteínas no gel. Estes foram, posteriormente seleccionados e sujeitos a identificação por análise MALDI-TOF/TOF. Os picos de massa dos péptidos foram comparados com os da base de dados NCBI. Além disso os dados relativos à identificação de proteínas, incluindo os ID, MW, valor PI, *mascot score* e função são listados na Tabela A1. As proteínas identificadas apresentam diversas actividades funcionais, incluindo glicólise, hidrólise de ATP acoplada ao transporte de protões, metabolismo *one-carbon*, processo de oxidação-redução, biossíntese de proteínas, resposta ao *stress* e muitas outras (Figura 10). A glicólise foi o processo biológico no qual se identificou o maior número de proteínas, cerca de 17%.

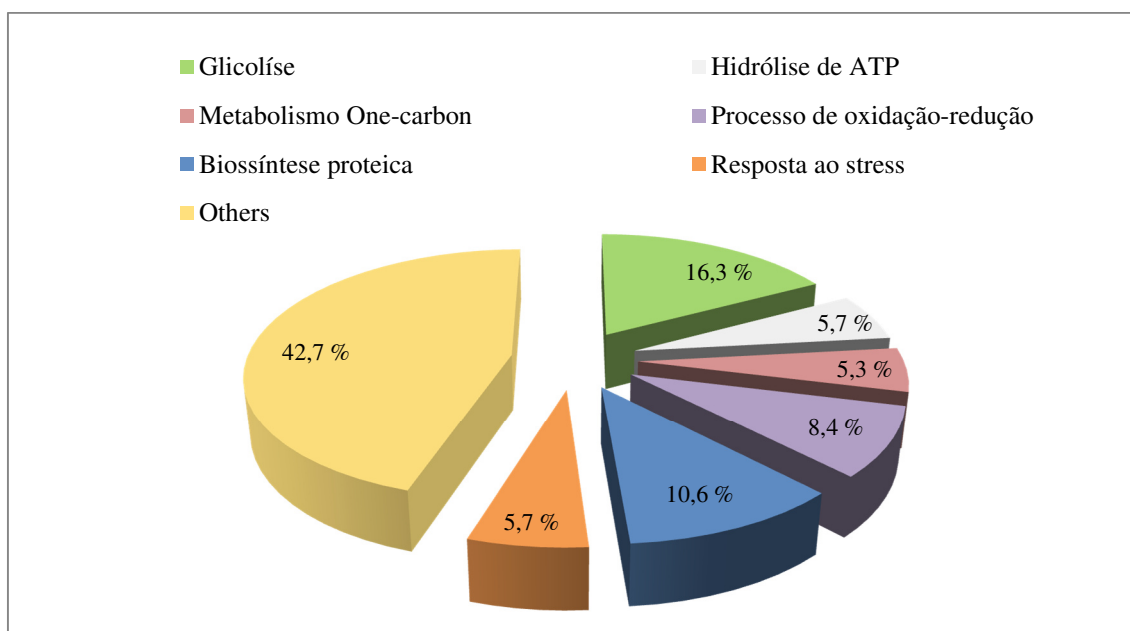


Figura 10. Percentagem das proteínas identificadas e relacionadas com cada função [107].

4.2. Proteoma do envelope celular (*Shaving Celular*)

4.2.1. Identificação proteica

Os picos de massa obtidos dos péptidos resultantes do processo de *Shaving* foram comparados com os da base de dados NCBI e *Uniprot*. Identificaram-se 236 proteínas que se encontram descritas na Tabela A2 (tabela em anexo). Na mesma tabela encontram-se também especificados os dados relativos ao ID, MW, valor PI, função, processo biológico e localização, obtidos por interrogação da base de dados da *Uniprot*. Nesta fracção celular (a membrana exterior) as proteínas identificadas apresentaram também várias actividades funcionais, tais como, biossíntese de aminoácidos, processo biossintético de carboidratos, divisão celular, glicólise, biossíntese de nucleótidos, biossíntese de proteínas, transcrição, tradução, entre outras 40 funções que, individualmente, não superam os 2% das proteínas identificadas. A tradução mostrou ser a função à qual mais proteínas foram identificadas (15%), no entanto não está qualquer função biológica associada a cerca de 21% das proteínas identificadas. Esta informação encontra-se sumariada na Figura 11.

No global, das 236 proteínas identificadas e interrogadas na *Uniprot*, 116 (cerca de 49%) não apresentaram localização na base de dados, sendo consideradas como localização desconhecida; 117 (50%) proteínas mostraram estar presentes no citoplasma e 3 (aproximadamente 1%) mostraram serem componentes da membrana celular.

4. Resultados

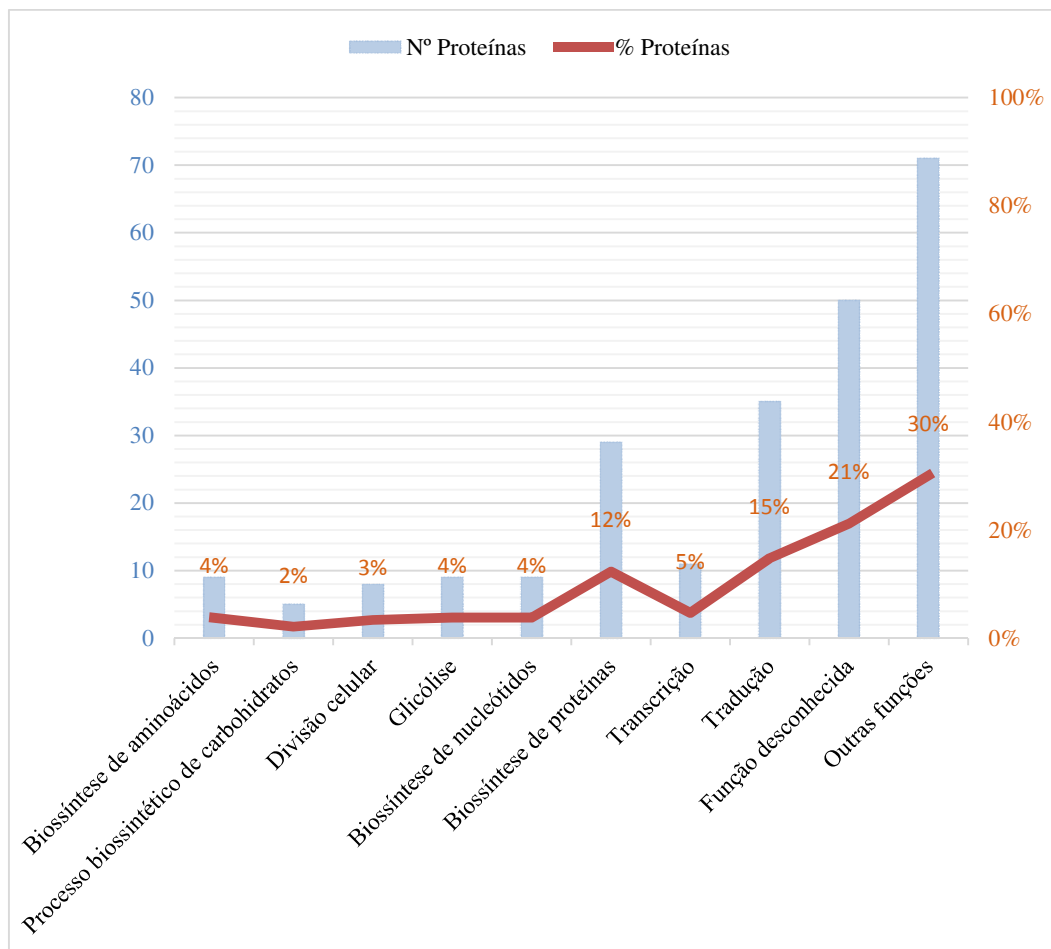


Figura 11. Gráfico onde o número (azul) e as percentagens (vermelho) de proteínas identificadas estão associadas às funções biológicas. A função à qual mais proteínas foram associadas é a tradução com 15%. Na coluna “Outras funções” estão englobadas 40 funções com 5 ou menos proteínas identificadas, com cada função individual a não ultrapassar os 2%.

4.3. Proteoma Extracelular

4.3.1. Identificação proteica

Os picos de massa obtidos dos péptidos foram comparados com os da base de dados NCBI e *Uniprot*. Identificaram-se para o proteoma extracelular 99 proteínas que se encontram descritas na Tabela A3 (tabela em anexo). Na mesma tabela encontram-se também especificados os dados relativos ao ID, MW, valor PI, função, processo biológico e localização obtidos por interrogação da base de dados da *Uniprot*. No exterior celular as proteínas identificadas apresentaram várias actividades funcionais, tais como, divisão celular, biossíntese de ácidos gordos, glicólise, biossíntese de GMP, patogénese, biossíntese de proteínas, transcrição, tradução, entre outras 36 funções que, individualmente, não superam os 2% das proteínas identificadas.

A tradução apresentou-se como a função à qual mais proteínas estão relacionadas, cerca de 16%. Nesta fracção do proteoma apenas 10% das proteínas identificadas não possui qualquer função associada nas duas bases de dados interrogadas (Figura 12).

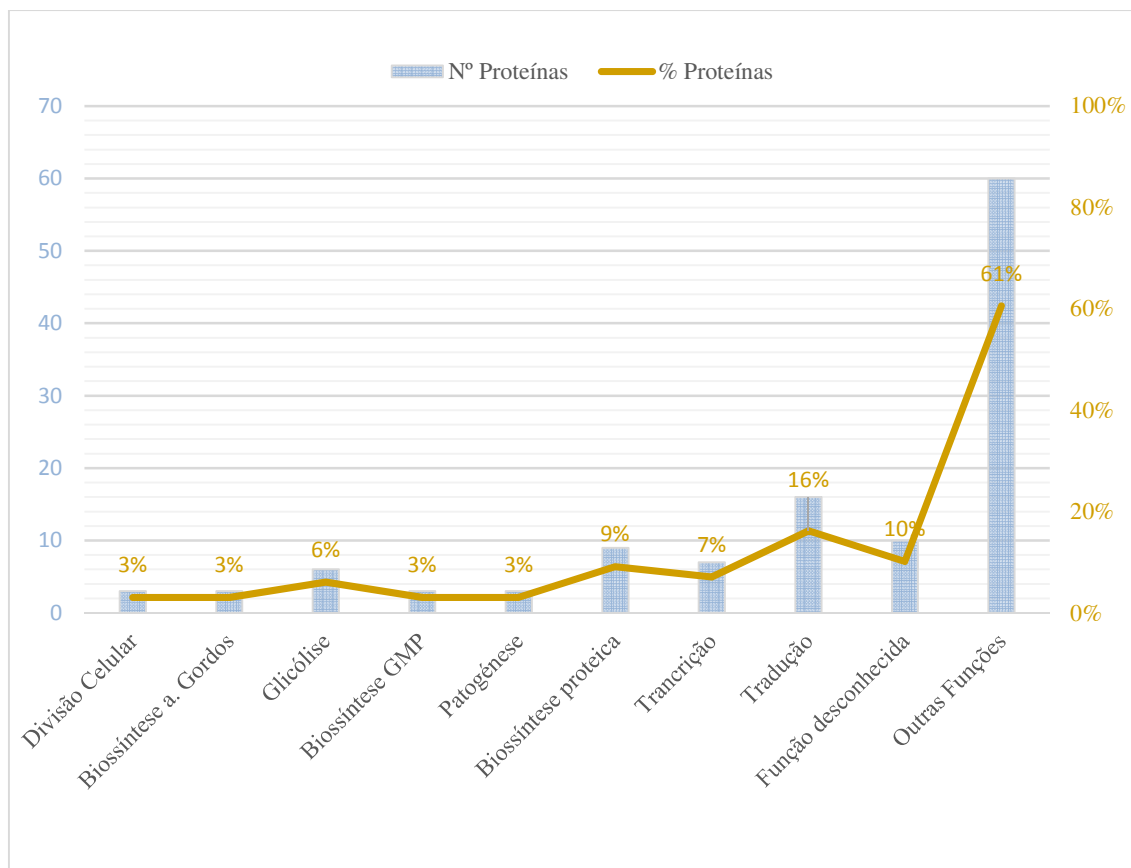


Figura 12. Gráfico onde o número (azul) e as percentagens (laranga) de proteínas identificadas estão associadas às funções biológicas. A função à qual mais proteínas foram associadas é a tradução com 16%. Na coluna “Outras funções” estão englobadas 36 funções com 2 ou menos proteínas identificadas, com cada função individual a não ultrapassar os 2%.

Quanto à sua localização, das 99 proteínas idenficadas e interrogadas na *Uniprot*, 51 (cerca de 52%) não apresentaram localização nestas duas bases de dados, sendo consideradas como localização desconhecida; 39 proteínas mostraram estar presentes no citoplasma e 9 (aproximadamente 9%) mostrou serem componentes do meio extra-celular.

5. Discussão

Neste estudo a estirpe de MRSA C2355, previamente caracterizada com sequência tipo ST398, com fenótipo de multirresistência a antibióticos e transportadora de vários genes de resistência [106], foi submetida a uma análise proteômica dividida em três fases distintas: análise do proteoma citoplasmático, análise do proteoma exposto da superfície celular (técnica de *Shaving* celular) e por fim análise do proteoma extracelular.

5.1. Proteoma citoplasmático

Verifica-se uma grande diferença entre a bactéria, tanto ao nível das proteínas codificadas como ao nível das variações nas sequências de aminoácidos [113]. Além disso, a resposta a determinado *stress* pode aumentar a resistência a outros tipos de stress (*cross-protection*), podendo alterar inúmeros outros aspectos do metabolismo bacteriano e potencializar a interação com o organismo hospedeiro.

As novas linhagens podem servir como biomarcadores proteicos para a actividade biológica ou a resposta fisiológica de bactérias para diversas condições ambientais de *stress*. O contínuo aparecimento de mecanismos de resistência em bactérias, tais como MRSA, exige uma revitalização urgente na procura de novos antibióticos. Por outro lado, a plasticidade do genoma de *S. aureus* é apenas um dos diversos factores envolvidos na heterogeneidade dos perfis exoproteicos. A regulação da expressão, bem como a secreção de proteínas e os processos de modificação acrescentam novas dimensões à heterogeneidade do potencial de virulência de *S. aureus*. Tais efeitos podem ser melhorados e aperfeiçoados por mutações no promotor, actividades diferenciadas de moléculas regulatórias e mecanismos de regulação pós-transcricional [97]. A presença em *S. aureus* de 24 genes codificadores de proteínas envolvidas na adesão superficial e 13 genes para proteínas secretadas envolvidas na evasão imunitária foram recentemente identificados nos 58 genomas sequenciados disponíveis [2].

Na análise do proteoma obtido, a frequência mais elevada de proteínas identificadas está relacionada ao processo da glicólise (16,3%), a síntese proteica (10,6%), processo de oxidação-redução (8,4%), resposta ao *stress* (5,7%), a hidrólise de ATP acoplado ao transporte de prótons (5,7%), e metabolismo *one-carbon* (5,3%). Todos estes processos desempenham funções importantes na manutenção das funções normais das células (Figura 10). As informações detalhadas relativamente ao número de proteínas identificadas e aos detalhes da análise proteómica são apresentados na Tabela A1.

Proteínas com funções mais específicas, como a catalase (*spot* 30; Accession Number Q2FYU7; MW 58 343,2; pI 5,27) e a superóxido dismutase (SOD) (*spot* 9; Accession Number P0A0J3; MW 22 697,33; pI 5,08), foram identificadas (Figura 9). De acordo com Mandellet e colaboradores. [114], verificou-se uma elevada correlação entre a actividade da catalase em *Staphylococcus spp.* e a letalidade em ratos ($r = 0,88$), sendo esta actividade específica das espécies de *S. aureus*. Estes resultados sugerem que a catalase protege os microrganismos intrafagocíticos destruindo o peróxido de hidrogénio produzido pela fagocitose. Este facto impõe a possibilidade de que a catalase pode ser um factor de virulência importante em *S. aureus* [114]. Enzimas como a catalase e a superóxido dismutase permitem que as bactérias resistam ao *stress* oxidativo e, assim, constituam um factor de virulência importante em *S. aureus*.

S. aureus produz três enzimas SOD, codificadas por dois genes, *sodA* e *sodM* [115]. A SOD está, geralmente, relacionada com o *stress* induzido por espécies reactivas de oxigénio (ROS), que são geradas endogenamente por O_2^- , e que são normalmente produzidas no interior das células e são tóxicos para os sistemas biológicos [116]. Estas três proteínas são em parte responsáveis pela virulência elevada desta estirpe de MRSA, especialmente em ambiente hospitalar [106]. Estas proteínas, associadas à *sodM* (MW 23 026,35 e pI 5,32, *spot* 11, Figura 9), estão relacionadas com a resposta ao *stress*.

A proteína *chaperone dnaK* (MW 66 280,98 e pI 4,66) foi identificada no *spot* 51 (Figura 9), e parece estar envolvida no mecanismo de resposta ao *stress* provocado pelo choque térmico. Esta é uma resposta celular muito importante para a sobrevivência das bactérias, tais como *Enterococcus*, e contribui para a capacidade de resistência a antibióticos [117]. Estas proteínas devem ser testadas sob condições de *stress*, como por exemplo sob pressão selectiva antibiótica, a fim de determinar as variações na expressão da proteína. Além disso, existe a possibilidade de testar potenciais alvos através da concepção de novos medicamentos para inibir o crescimento das bactérias resistentes aos antibióticos [118].

O *Trigger factor* (TF, *spot* 93) representa o único *chaperone* conhecido em bactérias associado ao ribossoma. TF está localizado directamente no local de saída ribossomal onde crescem as cadeias polipeptídicas em direcção ao citosol. TF interage com a maioria dos polipéptidos precoces durante a síntese contínua e, como primeira proteína associada com cadeias nascentes, restringe o acesso de factores a jusante, tais como a *dnaK* e *groEL* que cooperam com TF no enovelamento *de novo* de proteínas citosólicas. Além disso a avaliação de perfis proteicos em resposta a vários mecanismos

de *stress*, tais como a sensibilidade a antibióticos ou modificações relacionadas com a resistência aos antibióticos, podem representar uma válida e integrada abordagem para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas.

O desenvolvimento de novos instrumentos que possibilitam um *screening* mais rápido e com maior limite de detecção de massa molecular também permitirá identificar um maior número de péptidos e assim uma maior cobertura do proteoma. Como resultado, será mais fácil a análise de proteínas de membrana [119]. Por outro lado, as proteínas da superfície membranar bacteriana são importantes para a interacção patógeno-hospedeiro, e estão frequentemente envolvidas na patogénese. Uma grande variedade de proteínas de superfície está representada pelas lipoproteínas que são componentes importantes do sistema de transporte bacteriano: estruturas transmembranares envolvidas na importação/exportação de substratos, incluindo açúcares, aminoácidos, oligopéptidos, poliaminas, iões metálicos e minerais. Estes sistemas contribuem para muitos processos bacterianos, tais como a aquisição de nutrientes, resposta ao *stress* e sinalização intercelular, muitos dos quais podem ser vitais para o crescimento bacteriano e sobrevivência dentro do hospedeiro [120]. De facto, as proteínas de membrana integradas (PIM) estão entre as proteínas mais importantes dentro de uma célula, devido à sua implicação forte na sobrevivência celular. Elas representam um terço das proteínas codificadas pelo genoma humano, e são muitas vezes sub-representadas nos perfis proteómicos [121-123].

No *spot* 96 foi identificada a glutamato desidrogenases (GDHS) que desempenha um papel importante nos metabolismos do azoto e do carbono. Esta enzima tem um potencial considerável na produção de novos aminoácidos não-proteogénicos para a indústria farmacêutica [124, 125].

O peptidoglicano (ou mureína) é uma estrutura que confere rigidez à parede celular das bactérias, determinando a forma da bactéria e protegendo-a da lise osmótica quando em meio hipotónico. [54]. A proteína alanina desidrogenase 2 (ald2), identificada no *spot* 85 (Figura 9, MW 40 089,01, pI 5,66), é uma proteína importante para a formação da camada de peptidoglicano. Esta camada contém L-alanina que está associada com o mecanismo de resistência que altera a afinidade ao antibiótico alvo [126]. Uma série de genes envolvidos na biossíntese de peptidoglicano e da parede celular foram encontrados no genoma de *S. aureus* resistente à metilina [127]. Um destes genes é o *glmM*, que codifica a fosfoglicosimina mutase, que catalisa a reacção da glucosamina 6-fosfato para glucosamina 1-fosfato durante a fase inicial da biossíntese do peptidoglicano [55, 128,

129]. Como evidenciado num estudo anterior, conduzido por Cordwell e respectiva equipa, a resistência a antibióticos pode estar ligada à biossíntese de L-alanina como precursor para a formação de peptidoglicano [130]. Nem o gene *ald* nem o *glmM* parecem conter um promotor dependente de σ^B [131]; no entanto, foi demonstrado que σ^B controla a produção de pelo menos 14 proteínas reguladoras em *B. subtilis* [132]. Outros relatos sugerem que a sobreexpressão de σ^B resulta num aumento da espessura da parede da célula e hiper-resistência a β -lactâmicos [133], evidenciando ainda mais o papel significativo que σ^B desempenha na biossíntese da parede celular e na resistência a antibióticos em *S. aureus*.

O ácido fusídico é um antibiótico bacteriostático frequentemente usado topicamente em pomadas e gotas oftálmicas, mas pode ser também administrado de modo sistémico em comprimidos ou injeções para tratamento de infecção da pele e algumas infecções sistémicas causadas por *S. aureus* [134]. Um dos dois principais mecanismos de resistência do ácido fusídico em *S. aureus* é a alteração do local alvo da acção do antibiótico [135], devido a mutações no gene *fusA* (gene codificador da proteína factor de alongamento G, [EF-G]). Esta propriedade também é evidenciada pelas proteínas integradas na membrana que englobam uma variedade de funções requeridas pela célula, incluindo: 1) comunicação com o ambiente celular externo, 2) reconhecimento de resposta imunitária, 3) alvo para a maioria dos compostos farmacêuticos, 4) controlo da adesão das células aos tecidos e 5) controlo de processos metabólicos (como o equilíbrio osmótico) [119]. Devido à natureza hidrofóbica das proteínas integradas na membrana, certos detergentes e soluções de solubilização fortes são necessárias para fornecer estabilidade em solução. Contudo, estes produtos químicos podem interferir com a análise por espectrometria de massa. O factor de alongamento G (EF-G) foi identificado no *spot* 52 (MW 76 563,96, pI 4,8). Mutações pontuais no gene *fusA* provocam principalmente alterações no domínio III do EF-G e geralmente não se verificam alterações no tamanho das colónias, assim como na taxa de crescimento [136].

A ATP sintase [(*spot* 28 - *ATP synthase subunit beta* (atpD), *spot* 29 - *ATP synthase subunit alpha* (atpA), *spot* 55 - *ATP synthase gamma chain* (atpG), *spot* 86 - *ATP synthase subunit delta* (atpH)], também denominada de F1Fo-ATPase, catalisa a síntese de ATP durante a fosforilação oxidativa. A enzima é reversível e é capaz de utilizar ATP para conduzir um gradiente de prótons com propósitos de transporte. Este complexo enzimático é constituído por duas partes principais: um sector F1 solúvel em água dividido em três subunidades *a*, três subunidades *b* e uma cópia de cada uma das

subunidades *g*, *d* e *e*, e uma membrana onde se incorpora o sector Fo que consiste numa subunidade *a*, duas *b* e doze *c*. A massa molecular global do complexo é de 520 kDa. Tem três locais de ligação a nucleótidos catalíticos localizados nas subunidades *b* de F1 e um canal de prótons formado pelas subunidades *a* e *c* na membrana do sector Fo [137].

Na Tabela A1 estão descritas três proteínas relacionadas com a actividade ribossomal. O *Ribosome-recycling factor*, *frr*, (Figura 9, *spot* 13, MW 20 340,58, pI 5,04), é o responsável pela libertação dos ribossomas do RNA mensageiro no término da biossíntese de proteínas e possivelmente aumenta a eficiência da tradução [65]. Por outro lado, o factor de alongamento P, *efp* (Figura 9, *spot* 53, MW 20 541,31, pI 4,75), está envolvido na síntese da ligação peptídica. As proteínas *frr* e *efp* aumentam a eficiência da tradução e da síntese das ligações peptídicas nos ribossomas 70S, *in vitro*, nativos ou reconstituídos. Provavelmente funciona indirectamente, alterando a afinidade do ribossoma para com o aminoacil-tRNA aumentando, assim, a sua reactividade, como aceitadores de peptidil transferase [138].

A proteína ribossomal 30S S1 (*rpsA*) foi identificada no *spot* 56 (accession number Q99U14, MW 43 283,15, pI 4,55). Esta proteína liga-se ao mRNA, facilitando, assim, o reconhecimento do ponto de iniciação. Isto é necessário para traduzir o mRNA com recurso ao uso de uma sequência Shine Dalgarno (SD) curta e rica em purinas [70].

5.2. Proteoma do envelope celular (*Shaving* Celular)

A identificação de epítomos expostos na superfície celular, sem contaminação com proteínas citoplasmáticas, é a maior prioridade e dificuldade em ensaios de *shaving* celular.

Neste estudo, o crescimento de *S. aureus* foi interrompido em fase exponencial média, uma vez que estas células não secretam uma grande quantidade de proteínas e, nesta fase, são menos susceptíveis de sofrer *turnover* bacteriano do que durante a fase estacionária. No entanto, é possível que a fase de crescimento dependente de regulação possa impossibilitar a identificação de proteínas específicas da fase estacionária ou proteínas expressas com base em sinais extracelulares, tais como a densidade populacional ou formação de biofilme.

Todos os estudos anteriores de *Shaving* celular usaram bactérias Gram-positivas como o *S. aureus* e, estas têm uma morfologia da parede celular que é fortemente resistente à lise, em comparação com bactérias Gram-negativas ou células animais.

Segundo Solis e colaboradores [78], as proteínas expostas na superfície celular de *S. aureus* apresentam um potencial grande para desvendar a base molecular da patogenicidade. No seu estudo, esta equipa, afirma ser a primeira a utilizar a técnica de *Shaving* na superfície celular para identificar os péptidos expostos de proteínas de *S. aureus*. A questão na técnica da *Shaving* permanece sobre as proteínas que estão verdadeiramente expostas na superfície e aquelas que são teoricamente citoplasmáticas mas rotineiramente identificadas em extractos de superfície [78].

O método original de *Shaving* celular [85] utilizou forças centrífugas baixas para a lavagem celular (3500 g) e uma breve digestão proteica (30 minutos). Estudos subsequentes [86] passaram a realizar lavagens mais agressivas (12 000 g) e uma digestão trípica mais longa (4 horas). Outro estudo, mas em *B. subtilis* [84], introduziu o uso de esferas de tripsina, permitindo que a enzima pudesse ser capaz de penetrar através de poros na parede celular. Nenhum destes exemplos de estudos assumiu que a lise celular ocorreu, para isso realizaram contagens de placas, um método que não é indicativo de células intactas, apenas de células viáveis.

Em 2006 um estudo analisou estirpes de *S. aureus* resistente à vancomicina e identificou 48 proteínas classificadas como presentes na parede celular ou segregadas [139]. Um trabalho consequente destas identificações sugeriu que a proteína transglicosilase SCED poderia ser um excelente biomarcador da resistência à vancomicina [140]. Solis [78], por sua vez, fornece informações adicionais sobre a topologia das proteínas de superfície de *S. aureus*, bem como informação para identificar novas proteínas não detectadas nos estudos anteriores. No total, foram identificadas 42 proteínas expostas à superfície.

Os modelos de proteínas citoplasmáticas associadas à superfície membranar são gerados e baseados em secreção inespecífica e, em seguida, re-associação com a superfície celular [141]. Existem vários exemplos, em bactérias Gram-positivas, de proteínas metabólicas associadas com os processos de virulência, como por exemplo a enolase (*spot 27*, Tabela A1). Esta proteína é teoricamente exportada por mecanismos de secreção actualmente desconhecidos, difundida através de *holins* ou re-associada à parede celular seguindo-se de autólise celular [78]. As proteínas que são associadas com a superfície por interacções de carga (ou de outros mecanismos) são referidas como proteínas *shed* por Tjalsma e colaboradores. [84].

No presente estudo apenas foi associada a 3 proteínas (na base de dados *Uniprot*) uma localização na membrana externa celular: uma proteína da família

FtsK/SpoIIIE (Accession Number C8ACW8, Tabela A1) sem função atribuída; a subunidade SecA da translocase (Accession Number H3XAB0, Tabela A1) também sem função atribuída e a proteína LepA de ligação ao GTP (Accession Number G5JLS2, Tabela A1) que actua como um factor de fidelidade da reacção de tradução.

Sendo a técnica de *Shaving* muito recente e dado que o principal problema desta técnica reside na veracidade da localização dos péptidos identificados [78], foi necessário proceder à interrogação de base de dados específicas de previsão da localização celular das proteínas, nomeadamente a ferramenta bioinformática PSORTb (<http://psort.hgc.jp/>) que utiliza diferentes modelos para prever a localização celular de resíduos. Com esta ferramenta foi possível identificar mais 2 proteínas expostas na superfície celular para além das 3 identificadas pela *Uniprot*. A proteína de ligação à penicilina PBP2' (Accession Number C5N5L3, Tabela A1), é essencial na síntese da parede celular e integrante do processo de ligação de antibiótico à parede celular, e a proteína de divisão celular ftsZ (Accession Number A6U106, Tabela A1), essencial na divisão e responsável pela formação do anel contráctil (anel Z) no futuro local de divisão celular, regulando assim o tempo e o local de divisão celular. Uma outra função do anel FtsZ é recrutar outras proteínas de divisão celular para produzirem uma nova membrana celular entre as células em divisão. A ftsZ foi, também, anteriormente identificada por Dreisbach e colaboradores em 2010 [142]. Esta proteína foi identificada originalmente por Copeland em 2007 [143] e localizada no citoplasma por esta equipa. Dreisbach provou que esta proteína também estava associada à parede celular [142] reforçando a ideia, já defendida pelos investigadores na área da proteómica de superfície exposta, de que possa ser necessário rever a previsão e os modelos de previsão da localização das proteínas nas células.

A plasticidade genómica e a heterogeneidade de expressão pode ter um impacto profundo sobre a composição dos envelopes celulares em diferentes linhagens de *S. aureus*, ou mesmo em diferentes estirpes de uma linhagem. A presença de 24 genes em *S. aureus* para proteínas de superfície envolvidas na adesão e 13 genes para proteínas secretadas envolvidas na evasão imune foram recentemente identificados nas 58 sequências completas disponíveis [2].

A detecção de proteínas previstas como intracelulares na superfície da célula é surpreendente, mas não inesperada. Numerosos estudos têm sido publicados identificando uma função *moonlighting* destas proteínas na superfície da célula. Curiosamente, algumas destas proteínas também estão envolvidas na patogenicidade.

Na Tabela 1 encontram-se descritas as proteínas que, em trabalhos prévios foram localizadas na superfície celular de *S. aureus*. Embora as proteínas ribossomais estejam, teoricamente, associadas a funções citoplasmáticas, estudos recentes têm identificado cada vez mais estas proteínas na superfície celular [142].

Tabela 1. Proteínas ribossomais identificadas na superfície exposta da célula.

Accession (Uniprot)	Nome da proteína	Estirpe onde foi identificada	Referência
Q6GFY8	30S ribosomal protein	USA300	[142]
A7X5B4	50S ribosomal protein L13		
A7WYW0	50S ribosomal protein L11		
A7WY58	30S ribosomal protein S6		
B0FZE8	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase 1		

Apesar de numa primeira análise aos resultados da identificação por LC-MS/MS através da base proteica *Uniprot*, apenas 3 proteínas apresentaram localização associada à superfície exposta da célula, por revisão de bibliografia ou com ajuda do PSORTb foi atribuída a 10 proteínas uma localização na superfície exposta da célula. Tal como os trabalhos apresentados nesta discussão cada vez mais são identificadas proteínas que teoricamente não estariam presentes neste local celular. Neste estudo apenas foi possível identificar 10 proteínas, mas o desafio mantém-se, pois cerca de 49% das proteínas identificadas não apresentam localização associada.

5.3. Proteoma Extracelular

De forma semelhante a outras bactérias Gram-positivas, a patogenicidade de *S. aureus* é, em grande medida, dependente da secreção de inúmeros factores de virulência extracelulares. Por conseguinte, o desempenho clínico de antibióticos para o tratamento de *S. aureus* é determinado não só pela sua actividade bactericida ou bacteriostática, mas também pelos seus efeitos sobre a libertação de factores de virulência [144].

Neste estudo das nove proteínas previstas como extracelulares, duas delas relacionam-se com virulência: a proteína de ligação à imunoglobulina sbi (Accession Number A7X659, Tabela 2) e a subunidade F da Leucocidina. A sbi é uma das adesinas que facilitam a evasão à resposta imune do hospedeiro e a colonização do hospedeiro através da ligação às proteínas do citoplasma às células endoteliais hospedeiras. A subunidade F da Leucocidina pertence à *Panton-Valentine Leukocidin* (PVL), uma das

toxinas mais importantes no processo de infecção de *S. aureus*. PVL é um bicomponente de leucotoxina de formação de poros que esteve associado a infecções da pele e tecidos moles em 1932 por Panton e Valentine [145]. Esta toxina é codificada por dois genes, contíguos: *lukF-PV* e *lukS-PV*, que residem no genoma de vários bacteriófagos [146].

Para além destas 2 proteínas classificadas como extracelulares, também foram identificadas mais 2 proteínas associadas à patogenicidade de *S. aureus*, mas às quais não foi possível atribuir localização na *Uniprot*. As 2 proteínas (Accession Number F9KZ14 e H4BPR3, Tabela 2) pertencem à família das proteínas hemolíticas e como tal possuem uma actividade hemolítica e no caso da proteína antibacteriana 1 (F9KZ14), inibe a crescimento de gonococci. No conjunto das 9 proteínas extracelulares, identificaram-se duas proteínas putativas não caracterizadas (Accession Number H7G701 e D2FNS2). São proteínas de função desconhecida cuja localização foi atribuída unicamente pela sequência aminoacídica.

A capacidade de *S. aureus* colonizar o sistema respiratório superior humano é um pré-requisito essencial para a doença. A *isdA* é uma das principais proteínas de superfície de *S. aureus* que é expressa durante a infecção humana, sendo necessária para a colonização nasal e sobrevivência sobre a pele humana [147]. No presente estudo, a proteína *isdA* (Accession Number H7G3A4, Tabela 2) foi identificada. Esta proteína actua também como adesina celular e promove a ligação de células inteiras a proteínas imobilizadas [147].

Tabela 2. Proteínas identificadas no proteoma extracelular e respectivas localizações prevista pela *Uniprot*.

Accession (<i>Uniprot</i>)	Nome da Proteína	Localização
H7G701	Proteína não caracterizada	Região extracelular
H7G3A4	<i>isdA</i>	Parede Celular
A7X659	Proteína de ligação à imunoglobulina <i>sbi</i>	Secreção
H0CIZ5	Lipase Triacilglicerol	Secreção
H0CJP3	Sphingomyelin phosphodiesterase	Região extracelular
G7ZQA4	Transglicosilase <i>sceD</i>	Região extracelular
F5WI91	Heme uptake protein	Parede Celular
D2FNS2	Proteína putative não caracterizada	Região extracelular
H7G6G2	Subunidade F da leucocidina	Região extracelular

5.4. Integração dos três proteomas

Através da utilização de uma ferramenta bioinformática de desenho de diagramas de Venn, disponível *online* (<http://bioinformatics.psb.ugent.be>) e do diagrama de Venn resultante verificou-se que quando comparados os três proteomas, existem algumas proteínas que são comuns a diferentes proteomas. Não se verificou a existência de proteínas comuns entre os três proteomas mas quando sobrepostas as identificações entre o proteoma citoplasmático e o proteoma da superfície celular exposta, 2 proteínas são comuns, a *transketolase* (F0D1W7) e a *formate-tetrahydrofolate ligase* (Q2G296). Por sua vez quando comparados o proteoma da superfície celular e o proteoma extracelular o número de identificações comuns aumenta para 37 proteínas comuns. Já uma última comparação entre o proteoma citoplasmático e o proteoma extracelular não revela qualquer proteína em comum.

Esta análise através do diagrama de Venn permite uma melhor visualização geral do conteúdo proteico das três componentes em estudo (citoplasma, superfície exposta e meio extracelular), pois disponibiliza uma forma rápida de avaliar com maior exactidão o sucesso das extracções proteicas e das contaminações de proteínas não pertencentes aos vários proteomas.

Embora os dados relativos às identificações por espectrometria de massa e consequente interrogação da base de dados *Uniprot* tenham apontado para contaminações do proteoma da superfície exposta e extracelular na ordem dos 50% e 40% respectivamente, o mesmo não se confirmou quando os nomes das proteínas foram sujeitos a uma análise estatística (diagrama de Venn). No diagrama de Venn (Figura 13), as potenciais contaminações com proteínas consideradas internas baixaram para menos de 1% no proteoma da superfície exposta e 1% para o proteoma extracelular. Neste tipo de análise a identidade da proteína fica em segundo plano pois o interesse reside no número de proteínas identificadas num determinado proteoma que não pertençam a esse mesmo proteoma. A percentagem de contaminações proteicas obtidas no presente estudo reforçam a informação na bibliografia actual, com taxas de 40 a 50% de contaminações com proteínas citoplasmáticas. Já as baixas percentagens reveladas pelo estudo, assim como os valores de 0 presentes no diagrama de Venn (Figura 13) devem-se, provavelmente, ao facto de o proteoma usado como “controlo” para as proteínas citoplasmáticas ter sido obtido pela técnica de 2-DE; a excisão de *spots* no gel

bidimensional, embora criteriosa e minuciosa, nunca permite o levantamento de todas a proteínas presentes no gel.

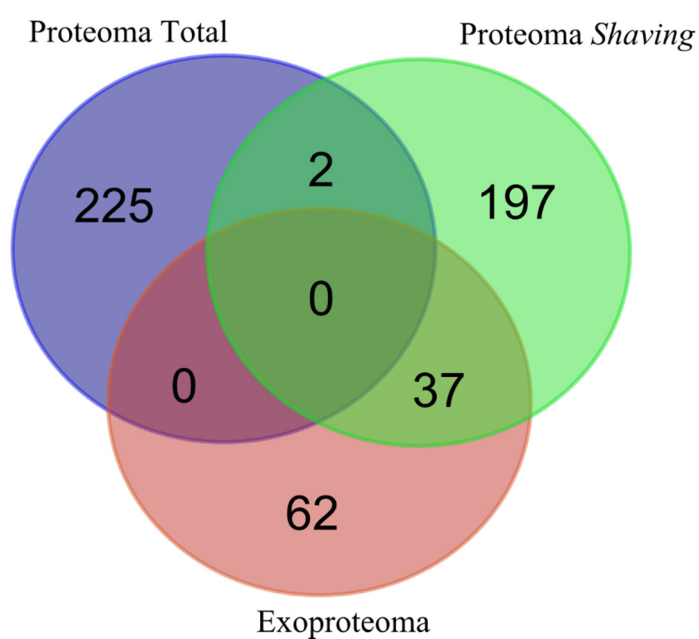


Figura 13. Diagrama de Venn integrante de todas a proteínas identificadas.

6. Conclusão e perspectivas futuras

No final desta dissertação de mestrado foi possível verificar que todos os objectivos foram atingidos com sucesso.

Ao nível técnico, estes resultados evidenciaram uma elevada taxa de sucesso na obtenção de proteínas. Foi possível extrair e solubilizar eficazmente as proteínas.

Neste trabalho, foram realizados vários ensaios de electroforese bidimensional de forma a determinar o protocolo que garantisse melhores resultados de separação proteica. Como resultado destes diferentes ensaios, foi possível definir um protocolo base de electroforese bidimensional para *S. aureus*, permitindo assim obter proteomas bem definidos com elevado número de *spots* proteicos.

O proteoma citoplasmático da estirpe em estudo foi avaliado e 85% das proteínas foram identificadas, com um score de 100, como pertencentes a *S. aureus*. Este resultado revelou uma taxa elevada de coerência dos métodos utilizados: a extracção de proteínas, 2-DE e MALDI-TOF.

O perfil proteico revelou características fenotípicas e proporcionou uma excelente aproximação da informação do genoma de um microrganismo, assim como a regulação metabólica e a fisiologia celular global em MRSA. Este resultado provou ser uma ferramenta essencial para a avaliação da condição fisiológica do patógeno durante o processo de infecção.

Os resultados deste estudo permitiram, ainda, a comparação entre o proteoma e as respectivas proteínas de MRSA ST398 com outras linhagens genéticas de *S. aureus*, a fim de identificar proteínas específicas da linhagem ST398, tanto ao nível intra e extracelular como ao nível da superfície exposta da célula bacteriana.

Com a comparação entre os três proteomas em estudo, foi possível fazer o *crosslink* entre proteínas presentes no interior e exterior da célula.

O valor de 0 proteínas comuns entre os três proteomas, embora teoricamente impossível, implica, obrigatoriamente, a presença de proteínas no proteoma citoplasmático associadas ao exterior celular. Este resultado reforça a importância deste estudo pois, as proteínas não identificadas no gel bidimensional poderão estar associadas a mecanismos de patogenicidade da bactéria e/ou a mecanismos importantes do processo de sobrevivência celular. A impossibilidade de identificar a totalidade das proteínas presentes no gel bidimensional e a consequente falta de identificação de proteínas comuns entre os três proteomas projectam este trabalho para futuros estudos proteómicos.

6. Conclusão e perspectivas futuras

Este trabalho traz assim uma nova perspectiva no estudo da patogenicidade, resistência a antibióticos e o normal funcionamento de uma célula bacteriana, possibilitando obter um tipo de informação que antes se encontrava fora do alcance dos estudos genéticos habituais.

Estudos como o presente possibilitam a correlação dos resultados proteicos com sequências obtidas de amplicões com a utilização de primers específicos, de tecnologias que permitam analisar e avaliar a expressão génica (PCR multiplex e RT-PCR). No contexto do estudo da expressão proteica, a proteómica comparativa e o estudo das vias metabólicas (*pathway analysis*) são áreas científicas de grande potencial.

A avaliação comparativa e a integração de ambos, genoma e proteoma, à escala técnica, especialmente quando quantitativa, permitirá melhorar o nosso conhecimento sobre o crescimento bacteriano, virulência e relação com o seu ambiente.

A proteómica e identificação de proteínas por 2-DE correlacionada com MALDI/TOF-TOF e bases de dados de bioinformática deverão tornar-se cada vez mais essenciais para a elucidação dos mecanismos de patogenicidade e resistência a antibióticos.

7. Referências bibliográficas

1. Kuroda, M., T. Ohta, I. Uchiyama, T. Baba, H. Yuzawa, *et al.*, *Whole genome sequencing of methicillin-resistant Staphylococcus aureus*. Lancet, 2001. **357**(9264): p. 1225-40.
2. McCarthy, A.J. and J.A. Lindsay, *Genetic variation in Staphylococcus aureus surface and immune evasion genes is lineage associated: implications for vaccine design and host-pathogen interactions*. BMC Microbiol, 2010. **10**: p. 173.
3. Lindsay, J.A., C.E. Moore, N.P. Day, S.J. Peacock, A.A. Witney, *et al.*, *Microarrays reveal that each of the ten dominant lineages of Staphylococcus aureus has a unique combination of surface-associated and regulatory genes*. J Bacteriol, 2006. **188**(2): p. 669-76.
4. Lindsay, J.A., *Genomic variation and evolution of Staphylococcus aureus*. Int J Med Microbiol, 2010. **300**(2-3): p. 98-103.
5. Enright, M.C., N.P. Day, C.E. Davies, S.J. Peacock and B.G. Spratt, *Multilocus sequence typing for characterization of methicillin-resistant and methicillin-susceptible clones of Staphylococcus aureus*. J Clin Microbiol, 2000. **38**(3): p. 1008-15.
6. Feil, E.J., J.E. Cooper, H. Grundmann, D.A. Robinson, M.C. Enright, *et al.*, *How clonal is Staphylococcus aureus?* J Bacteriol, 2003. **185**(11): p. 3307-16.
7. Novick, R.P., *Staphylococcal plasmids and their replication*. Annu Rev Microbiol, 1989. **43**: p. 537-65.
8. Malachowa, N. and F.R. DeLeo, *Mobile genetic elements of Staphylococcus aureus*. Cell Mol Life Sci, 2010. **67**(18): p. 3057-71.
9. Holmes, A., M. Ganner, S. McGuane, T.L. Pitt, B.D. Cookson and A.M. Kearns, *Staphylococcus aureus isolates carrying Panton-Valentine leucocidin genes in England and Wales: frequency, characterization, and association with clinical disease*. J Clin Microbiol, 2005. **43**(5): p. 2384-90.
10. van Duijkeren, E., M.J. Wolfhagen, A.T. Box, M.E. Heck, W.J. Wannet and A.C. Fluit, *Human-to-dog transmission of methicillin-resistant Staphylococcus aureus*. Emerg Infect Dis, 2004. **10**(12): p. 2235-7.
11. Blaine, K.P., M.J. Tuohy, D. Wilson, G.W. Procop, D.J. Tisch, N.K. Shrestha and G.S. Hall, *Progression to bacteremia in critical care patients colonized with methicillin-*

7. Referências bibliográficas

- resistant Staphylococcus aureus expressing Panton-Valentine leukocidin*. Diagn Microbiol Infect Dis, 2010. **68**(1): p. 28-33.
12. Chi, C.Y., S.M. Wang, H.C. Lin and C.C. Liu, *A clinical and microbiological comparison of Staphylococcus aureus toxic shock and scalded skin syndromes in children*. Clin Infect Dis, 2006. **42**(2): p. 181-5.
 13. Fitzgerald, J.R., D.E. Sturdevant, S.M. Mackie, S.R. Gill and J.M. Musser, *Evolutionary genomics of Staphylococcus aureus: insights into the origin of methicillin-resistant strains and the toxic shock syndrome epidemic*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(15): p. 8821-6.
 14. Lee, J.H., *Methicillin (Oxacillin)-resistant Staphylococcus aureus strains isolated from major food animals and their potential transmission to humans*. Appl Environ Microbiol, 2003. **69**(11): p. 6489-94.
 15. Duquette, R.A. and T.J. Nuttall, *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus in dogs and cats: an emerging problem?* J Small Anim Pract, 2004. **45**(12): p. 591-7.
 16. Tenover, F.C. and R.V. Goering, *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus strain USA300: origin and epidemiology*. J Antimicrob Chemother, 2009. **64**(3): p. 441-6.
 17. Van Den Broek, I.V., V.A.N.C. BA, A. Haenen, E.M. Broens, V.D.W. PJ, *et al.*, *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus in people living and working in pig farms*. Epidemiol Infect, 2009. **137**(5): p. 700-8.
 18. Aarestrup, F.M., L. Cavaco and H. Hasman, *Decreased susceptibility to zinc chloride is associated with methicillin resistant Staphylococcus aureus CC398 in Danish swine*. Vet Microbiol, 2010. **142**(3-4): p. 455-7.
 19. Catry, B., E. Van Duijkeren, M.C. Pomba, C. Greko, M.A. Moreno, *et al.*, *Reflection paper on MRSA in food-producing and companion animals: epidemiology and control options for human and animal health*. Epidemiol Infect, 2010. **138**(5): p. 626-44.
 20. Boucher, H., L.G. Miller and R.R. Razonable, *Serious infections caused by methicillin-resistant Staphylococcus aureus*. Clin Infect Dis, 2010. **51 Suppl 2**: p. S183-97.
 21. Skinner, D. and C. Keefer, *Significance of bacteremia caused by Staphylococcus aureus*. Arch Intern Med, 1941. **68:851-75**.

22. Wertheim, H.F., D.C. Melles, M.C. Vos, W. van Leeuwen, A. van Belkum, H.A. Verbrugh and J.L. Nouwen, *The role of nasal carriage in Staphylococcus aureus infections*. Lancet Infect Dis, 2005. **5**(12): p. 751-62.
23. Grundmann, H., D.M. Aanensen, C.C. van den Wijngaard, B.G. Spratt, D. Harmsen and A.W. Friedrich, *Geographic distribution of Staphylococcus aureus causing invasive infections in Europe: a molecular-epidemiological analysis*. PLoS Med, 2010. **7**(1): p. e1000215.
24. Stefani, S., D.R. Chung, J.A. Lindsay, A.W. Friedrich, A.M. Kearns, H. Westh and F.M. Mackenzie, *Meticillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA): global epidemiology and harmonisation of typing methods*. Int J Antimicrob Agents, 2012. **39**(4): p. 273-82.
25. European Center for Disease Prevention and Control. <http://www.ecdc.europa.eu/>, Consultado Junho 2013.
26. Pinho, M.G., H. de Lencastre and A. Tomasz, *An acquired and a native penicillin-binding protein cooperate in building the cell wall of drug-resistant staphylococci*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(19): p. 10886-91.
27. Chambers, H.F., *Methicillin resistance in staphylococci: molecular and biochemical basis and clinical implications*. Clin Microbiol Rev, 1997. **10**(4): p. 781-91.
28. Hiramatsu, K., *Vancomycin-resistant Staphylococcus aureus: a new model of antibiotic resistance*. Lancet Infect Dis, 2001. **1**(3): p. 147-55.
29. Eliopoulos, G.M., *Quinupristin-dalfopristin and linezolid: evidence and opinion*. Clin Infect Dis, 2003. **36**(4): p. 473-81.
30. Foster, T.J., *The Staphylococcus aureus "superbug"*. J Clin Invest, 2004. **114**(12): p. 1693-6.
31. HIV web study- Dermatologic Manifestations, <http://depts.washington.edu/hiv/ids/derm/case6/discussion.html>, Janeiro 2013.
32. Armand-Lefevre, L., R. Ruimy and A. Andremont, *Clonal comparison of Staphylococcus aureus isolates from healthy pig farmers, human controls, and pigs*. Emerg Infect Dis, 2005. **11**(5): p. 711-4.

7. Referências bibliográficas

33. Battisti, A., A. Franco, G. Merialdi, H. Hasman, M. Iurescia, *et al.*, *Heterogeneity among methicillin-resistant Staphylococcus aureus from Italian pig finishing holdings*. Vet Microbiol, 2010. **142**(3-4): p. 361-6.
34. Voss, A., F. Loeffen, J. Bakker, C. Klaassen and M. Wulf, *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus in pig farming*. Emerg Infect Dis, 2005. **11**(12): p. 1965-6.
35. Huijsdens, X.W., B.J. van Dijke, E. Spalburg, M.G. van Santen-Verheuvél, M.E. Heck, *et al.*, *Community-acquired MRSA and pig-farming*. Ann Clin Microbiol Antimicrob, 2006. **5**: p. 26.
36. Crombe, F., G. Willems, M. Dispas, M. Hallin, O. Denis, *et al.*, *Prevalence and antimicrobial susceptibility of methicillin-resistant Staphylococcus aureus among pigs in Belgium*. Microb Drug Resist, 2012. **18**(2): p. 125-31.
37. Kadlec, K. and S. Schwarz, *Identification of a novel trimethoprim resistance gene, dfrK, in a methicillin-resistant Staphylococcus aureus ST398 strain and its physical linkage to the tetracycline resistance gene tet(L)*. Antimicrob Agents Chemother, 2009. **53**(2): p. 776-8.
38. Mendes, R.E., L.M. Deshpande, M. Castanheira, J. DiPersio, M.A. Saubolle and R.N. Jones, *First report of cfr-mediated resistance to linezolid in human staphylococcal clinical isolates recovered in the United States*. Antimicrob Agents Chemother, 2008. **52**(6): p. 2244-6.
39. Zhao, B. and C.L. Poh, *Insights into environmental bioremediation by microorganisms through functional genomics and proteomics*. Proteomics, 2008. **8**(4): p. 874-81.
40. Pietrogrande, M.C., N. Marchetti, F. Dondi and P.G. Righetti, *Spot overlapping in two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis maps: relevance to proteomics*. Electrophoresis, 2003. **24**(1-2): p. 217-24.
41. O'Farrell, P.H., *High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins*. J Biol Chem, 1975. **250**(10): p. 4007-21.
42. Lodish, H., A. Berk, S. Zipursky, P. Matsudaira, D. Baltimore and J. Darnell, *Molecular Cell Biology*, 2003. **5th Edition**(W.H. Freeman & Company.).
43. Gasparic, V., B. Bjellqvist and Å. Rosengren, Swedish Patent No. 7514049-1, 1975.

44. Görg, A., A. Klaus, C. Lück, F. Weiland and W. Weiss, *Two-Dimensional Electrophoresis with Immobilized pH Gradients for Proteome Analysis: A laboratory manual*. Technische Universität München, 2007.
45. Gorg, A., O. Drews, C. Luck, F. Weiland and W. Weiss, *2-DE with IPGs*. Electrophoresis, 2009. **30 Suppl 1**: p. S122-32.
46. Lopez-Campistrous, A., P. Semchuk, L. Burke, T. Palmer-Stone, S.J. Brokx, *et al.*, *Localization, annotation, and comparison of the Escherichia coli K-12 proteome under two states of growth*. Mol Cell Proteomics, 2005. **4**(8): p. 1205-9.
47. Tonella, L., C. Hoogland, P.A. Binz, R.D. Appel, D.F. Hochstrasser and J.C. Sanchez, *New perspectives in the Escherichia coli proteome investigation*. Proteomics, 2001. **1**(3): p. 409-23.
48. Evers, S., K. Di Padova, M. Meyer, H. Langen, M. Fountoulakis, W. Keck and C.P. Gray, *Mechanism-related changes in the gene transcription and protein synthesis patterns of Haemophilus influenzae after treatment with transcriptional and translational inhibitors*. Proteomics, 2001. **1**(4): p. 522-44.
49. Champion, K.M., J.C. Nishihara, J.C. Joly and D. Arnott, *Similarity of the Escherichia coli proteome upon completion of different biopharmaceutical fermentation processes*. Proteomics, 2001. **1**(9): p. 1133-48.
50. Unlu, M., M.E. Morgan and J.S. Minden, *Difference gel electrophoresis: a single gel method for detecting changes in protein extracts*. Electrophoresis, 1997. **18**(11): p. 2071-7.
51. Washburn, M.P., D. Wolters and J.R. Yates, 3rd, *Large-scale analysis of the yeast proteome by multidimensional protein identification technology*. Nat Biotechnol, 2001. **19**(3): p. 242-7.
52. Francois, P., A. Scherl, D. Hochstrasser and J. Schrenzel, *Proteomic approaches to study Staphylococcus aureus pathogenesis*. J Proteomics, 2010. **73**(4): p. 701-8.
53. de Godoy, L.M., J.V. Olsen, J. Cox, M.L. Nielsen, N.C. Hubner, *et al.*, *Comprehensive mass-spectrometry-based proteome quantification of haploid versus diploid yeast*. Nature, 2008. **455**(7217): p. 1251-4.

7. Referências bibliográficas

54. Cargile, B.J., D.L. Talley and J.L. Stephenson, Jr., *Immobilized pH gradients as a first dimension in shotgun proteomics and analysis of the accuracy of pI predictability of peptides*. Electrophoresis, 2004. **25**(6): p. 936-45.
55. Wu, S., H. de Lencastre, A. Sali and A. Tomasz, *A phosphoglucomutase-like gene essential for the optimal expression of methicillin resistance in Staphylococcus aureus: molecular cloning and DNA sequencing*. Microb Drug Resist, 1996. **2**(2): p. 277-86.
56. Berger-Bachi, B., L. Barberis-Maino, A. Strassle and F.H. Kayser, *FemA, a host-mediated factor essential for methicillin resistance in Staphylococcus aureus: molecular cloning and characterization*. Mol Gen Genet, 1989. **219**(1-2): p. 263-9.
57. Maki, H., T. Yamaguchi and K. Murakami, *Cloning and characterization of a gene affecting the methicillin resistance level and the autolysis rate in Staphylococcus aureus*. J Bacteriol, 1994. **176**(16): p. 4993-5000.
58. Ornelas-Soares, A., H. de Lencastre, B. de Jonge, D. Gage, Y.S. Chang and A. Tomasz, *The peptidoglycan composition of a Staphylococcus aureus mutant selected for reduced methicillin resistance*. J Biol Chem, 1993. **268**(35): p. 26268-72.
59. Suginaka, H., M. Shimatani, M. Ogawa and S. Kotani, *Prevention of penicillin-induced lysis of Staphylococcus aureus by cellular lipoteichoic acid*. J Antibiot (Tokyo), 1979. **32**(1): p. 73-7.
60. Fujimoto, D.F. and K.W. Bayles, *Opposing roles of the Staphylococcus aureus virulence regulators, Agr and Sar, in Triton X-100- and penicillin-induced autolysis*. J Bacteriol, 1998. **180**(14): p. 3724-6.
61. Qoronfleh, M. W., Gustafson, J. E. & Wilkinson, B. J. (1998). Conditions that induce *Staphylococcus aureus* heat shock proteins also inhibit autolysis. FEMS Microbiol Lett 166, 103-107.
62. Hecker, M. and U. Volker, *General stress response of Bacillus subtilis and other bacteria*. Adv Microb Physiol, 2001. **44**: p. 35-91.
63. Gertz, S., S. Engelmann, R. Schmid, K. Ohlsen, J. Hacker and M. Hecker, *Regulation of sigmaB-dependent transcription of sigB and asp23 in two different Staphylococcus aureus strains*. Mol Gen Genet, 1999. **261**(3): p. 558-66.

64. Kullik, I., P. Giachino and T. Fuchs, *Deletion of the alternative sigma factor sigmaB in Staphylococcus aureus reveals its function as a global regulator of virulence genes*. J Bacteriol, 1998. **180**(18): p. 4814-20.
65. Ziebandt, A.K., H. Weber, J. Rudolph, R. Schmid, D. Hoper, S. Engelmann and M. Hecker, *Extracellular proteins of Staphylococcus aureus and the role of SarA and sigma B*. Proteomics, 2001. **1**(4): p. 480-93.
66. Heinrichs, J.H., M.G. Bayer and A.L. Cheung, *Characterization of the sar locus and its interaction with agr in Staphylococcus aureus*. J Bacteriol, 1996. **178**(2): p. 418-23.
67. Scott, J.R. and T.C. Barnett, *Surface proteins of gram-positive bacteria and how they get there*. Annu Rev Microbiol, 2006. **60**: p. 397-423.
68. Foster, T.J., *Immune evasion by staphylococci*. Nat Rev Microbiol, 2005. **3**(12): p. 948-58.
69. Schaffer, A.C. and J.C. Lee, *Vaccination and passive immunisation against Staphylococcus aureus*. Int J Antimicrob Agents, 2008. **32 Suppl 1**: p. S71-8.
70. Dreisbach, A., J.M. van Dijk and G. Buist, *The cell surface proteome of Staphylococcus aureus*. Proteomics, 2011. **11**(15): p. 3154-68.
71. Wolff, S., H. Hahne, M. Hecker and D. Becher, *Complementary analysis of the vegetative membrane proteome of the human pathogen Staphylococcus aureus*. Mol Cell Proteomics, 2008. **7**(8): p. 1460-8.
72. Sibbald, M.J., A.K. Ziebandt, S. Engelmann, M. Hecker, A. de Jong, *et al.*, *Mapping the pathways to staphylococcal pathogenesis by comparative secretomics*. Microbiol Mol Biol Rev, 2006. **70**(3): p. 755-88.
73. Schmalzer, M., N.J. Jann, F. Gotz and R. Landmann, *Staphylococcal lipoproteins and their role in bacterial survival in mice*. Int J Med Microbiol, 2010. **300**(2-3): p. 155-60.
74. Grandi, G., *Bacterial surface proteins and vaccines*. F1000 Biol Rep, 2010. **2**.
75. Bowden, M.G., W. Chen, J. Singvall, Y. Xu, S.J. Peacock, *et al.*, *Identification and preliminary characterization of cell-wall-anchored proteins of Staphylococcus epidermidis*. Microbiology, 2005. **151**(Pt 5): p. 1453-64.

7. Referências bibliográficas

76. Hartford, O., D. McDevitt and T.J. Foster, *Matrix-binding proteins of Staphylococcus aureus: functional analysis of mutant and hybrid molecules*. Microbiology, 1999. **145** (Pt 9): p. 2497-505.
77. Buist, G., A. Steen, J. Kok and O.P. Kuipers, *LysM, a widely distributed protein motif for binding to (peptido)glycans*. Mol Microbiol, 2008. **68**(4): p. 838-47.
78. Solis, N., M.R. Larsen and S.J. Cordwell, *Improved accuracy of cell surface shaving proteomics in Staphylococcus aureus using a false-positive control*. Proteomics, 2010. **10**(10): p. 2037-49.
79. Cordwell, S.J., *Technologies for bacterial surface proteomics*. Curr Opin Microbiol, 2006. **9**(3): p. 320-9.
80. Molloy, M.P., B.R. Herbert, M.B. Slade, T. Rabilloud, A.S. Nouwens, K.L. Williams and A.A. Gooley, *Proteomic analysis of the Escherichia coli outer membrane*. Eur J Biochem, 2000. **267**(10): p. 2871-81.
81. Cullen, P.A., S.J. Cordwell, D.M. Bulach, D.A. Haake and B. Adler, *Global analysis of outer membrane proteins from Leptospira interrogans serovar Lai*. Infect Immun, 2002. **70**(5): p. 2311-8.
82. Sabarth, N., S. Lamer, U. Zimny-Arndt, P.R. Jungblut, T.F. Meyer and D. Bumann, *Identification of surface proteins of Helicobacter pylori by selective biotinylation, affinity purification, and two-dimensional gel electrophoresis*. J Biol Chem, 2002. **277**(31): p. 27896-902.
83. Cullen, P.A., X. Xu, J. Matsunaga, Y. Sanchez, A.I. Ko, D.A. Haake and B. Adler, *Surfaceome of Leptospira spp*. Infect Immun, 2005. **73**(8): p. 4853-63.
84. Tjalsma, H., L. Lambooy, P.W. Hermans and D.W. Swinkels, *Shedding & shaving: disclosure of proteomic expressions on a bacterial face*. Proteomics, 2008. **8**(7): p. 1415-28.
85. Rodriguez-Ortega, M.J., N. Norais, G. Bensi, S. Liberatori, S. Capo, et al., *Characterization and identification of vaccine candidate proteins through analysis of the group A Streptococcus surface proteome*. Nat Biotechnol, 2006. **24**(2): p. 191-7.

86. Severin, A., E. Nickbarg, J. Wooters, S.A. Quazi, Y.V. Matsuka, *et al.*, *Proteomic analysis and identification of Streptococcus pyogenes surface-associated proteins*. J Bacteriol, 2007. **189**(5): p. 1514-22.
87. Armengaud, J., J.A. Christie-Oleza, G. Clair, V. Malard and C. Duport, *Exoproteomics: exploring the world around biological systems*. Expert Rev Proteomics, 2012. **9**(5): p. 561-75.
88. Driessen, A.J. and N. Nouwen, *Protein translocation across the bacterial cytoplasmic membrane*. Annu Rev Biochem, 2008. **77**: p. 643-67.
89. Haft, D.H., S.H. Payne and J.D. Selengut, *Archaeosortases and exosortases are widely distributed systems linking membrane transit with posttranslational modification*. J Bacteriol, 2012. **194**(1): p. 36-48.
90. Armengaud, J., *Proteogenomics and systems biology: quest for the ultimate missing parts*. Expert Rev Proteomics, 2010. **7**(1): p. 65-77.
91. Rabilloud, T., *The whereabouts of 2D gels in quantitative proteomics*. Methods Mol Biol, 2012. **893**: p. 25-35.
92. Walz, A., C.V. Mujer, J.P. Connolly, T. Alefantis, R. Chafin, *et al.*, *Bacillus anthracis secretome time course under host-simulated conditions and identification of immunogenic proteins*. Proteome Sci, 2007. **5**: p. 11.
93. Termine, E. and G.P. Michel, *Transcriptome and secretome analyses of the adaptive response of Pseudomonas aeruginosa to suboptimal growth temperature*. Int Microbiol, 2009. **12**(1): p. 7-12.
94. Araujo, L.S., R.M. Maciel, A. Trajman and M.H. Saad, *Assessment of the IgA immunoassay diagnostic potential of the Mycobacterium tuberculosis MT10.3-MPT64 fusion protein in tuberculous pleural fluid*. Clin Vaccine Immunol, 2010. **17**(12): p. 1963-9.
95. Hansmeier, N., T.C. Chao, J. Kalinowski, A. Puhler and A. Tauch, *Mapping and comprehensive analysis of the extracellular and cell surface proteome of the human pathogen Corynebacterium diphtheriae*. Proteomics, 2006. **6**(8): p. 2465-76.

7. Referências bibliográficas

96. Dumas, E., M. Desvaux, C. Chambon and M. Hebraud, *Insight into the core and variant exoproteomes of Listeria monocytogenes species by comparative subproteomic analysis*. Proteomics, 2009. **9**(11): p. 3136-55.
97. Ziebandt, A.K., H. Kusch, M. Degner, S. Jaglitz, M.J. Sibbald, *et al.*, *Proteomics uncovers extreme heterogeneity in the Staphylococcus aureus exoproteome due to genomic plasticity and variant gene regulation*. Proteomics, 2010. **10**(8): p. 1634-44.
98. Vogel, C. and E.M. Marcotte, *Insights into the regulation of protein abundance from proteomic and transcriptomic analyses*. Nat Rev Genet, 2012. **13**(4): p. 227-32.
99. Panisko, E.A., T.P. Conrads, M.B. Goshe and T.D. Veenstra, *The postgenomic age: characterization of proteomes*. Exp Hematol, 2002. **30**(2): p. 97-107.
100. Treitz, G., T.M. Gronewold, E. Quandt and M. Zabe-Kuhn, *Combination of a SAW-biosensor with MALDI mass spectrometric analysis*. Biosens Bioelectron, 2008. **23**(10): p. 1496-502.
101. Hortin, G.L., *The MALDI-TOF mass spectrometric view of the plasma proteome and peptidome*. Clin Chem, 2006. **52**(7): p. 1223-37.
102. Vijayendran, C., T. Polen, V.F. Wendisch, K. Friebs, K. Niehaus and E. Flaschel, *The plasticity of global proteome and genome expression analyzed in closely related W3110 and MG1655 strains of a well-studied model organism, Escherichia coli-K12*. J Biotechnol, 2007. **128**(4): p. 747-61.
103. Tan, T., C. Quek and G. Ng, *Clinical diagnosis using proteomics and complementary learning*. Int Joint Conf Neur Netw. 2865-2872, 2006.
104. Josic, D. and S. Kovac, *Application of proteomics in biotechnology--microbial proteomics*. Biotechnol J, 2008. **3**(4): p. 496-509.
105. Latterich, M., M. Abramovitz and B. Leyland-Jones, *Proteomics: new technologies and clinical applications*. Eur J Cancer, 2008. **44**(18): p. 2737-41.
106. Lozano, C., C. Aspiroz, A.I. Ezpeleta, E. Gomez-Sanz, M. Zarazaga and C. Torres, *Empyema caused by MRSA ST398 with atypical resistance profile, Spain*. Emerg Infect Dis, 2011. **17**(1): p. 138-40.

107. Monteiro, R., R. Vitorino, P. Domingues, H. Radhouani, C. Carvalho, *et al.*, *Proteome of a methicillin-resistant Staphylococcus aureus clinical strain of sequence type ST398*. J Proteomics, 2012. **75**(10): p. 2892-915.
108. Gorg, A., W. Weiss and M.J. Dunn, *Current two-dimensional electrophoresis technology for proteomics*. Proteomics, 2004. **4**(12): p. 3665-85.
109. Scientific T. NanoDrop 1000 Spectrophotometer V3.7 User's Manual; 2008.
110. Laemmli, U.K., *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4*. Nature, 1970. **227**(5259): p. 680-5.
111. Gorg, A., C. Obermaier, G. Boguth, A. Harder, B. Scheibe, R. Wildgruber and W. Weiss, *The current state of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients*. Electrophoresis, 2000. **21**(6): p. 1037-53.
112. Görg A, Klaus A, Lück C, Weiland F, Weiss W. Two-Dimensional Electrophoresis with Immobilized pH Gradients for Proteome Analysis. A laboratory manual Technische Universität München; 2007.
113. Renzone, G., C. D'Ambrosio, S. Arena, R. Rullo, L. Ledda, L. Ferrara and A. Scaloni, *Differential proteomic analysis in the study of prokaryotes stress resistance*. Ann Ist Super Sanita, 2005. **41**(4): p. 459-68.
114. Mandell, G.L., *Catalase, superoxide dismutase, and virulence of Staphylococcus aureus. In vitro and in vivo studies with emphasis on staphylococcal--leukocyte interaction*. J Clin Invest, 1975. **55**(3): p. 561-6.
115. Nakonieczna, J., E. Michta, M. Rybicka, M. Grinholc, A. Gwizdek-Wisniewska and K.P. Bielawski, *Superoxide dismutase is upregulated in Staphylococcus aureus following protoporphyrin-mediated photodynamic inactivation and does not directly influence the response to photodynamic treatment*. BMC Microbiol, 2010. **10**: p. 323.
116. Saxena, S. and C. Gombert, *Superoxide dismutase, protease and lipase expression in clinical isolates of Staphylococcus aureus: a tool for antimicrobial drug discovery*. Mol Cell Biochem, 2010. **341**(1-2): p. 217-23.
117. Pantosti, A., A. Sanchini and M. Monaco, *Mechanisms of antibiotic resistance in Staphylococcus aureus*. Future Microbiol, 2007. **2**(3): p. 323-34.

7. Referências bibliográficas

118. Pinto, L., P. Poeta, S. Vieira, C. Caleja, H. Radhouani, *et al.*, *Genomic and proteomic evaluation of antibiotic resistance in Salmonella strains*. J Proteomics, 2010. **73**(8): p. 1535-41.
119. Gilmore, J.M. and M.P. Washburn, *Advances in shotgun proteomics and the analysis of membrane proteomes*. J Proteomics, 2010. **73**(11): p. 2078-91.
120. Roncada, P., F. Deriu, A. Gaviraghi, P.A. Martino and L. Bonizzi, *Proteomic study of antibiotic resistance in Escherichia coli strains*. Vet Res Commun, 2009. **33 Suppl 1**: p. 157-60.
121. Santoni, V., M. Molloy and T. Rabilloud, *Membrane proteins and proteomics: un amour impossible?* Electrophoresis, 2000. **21**(6): p. 1054-70.
122. Macher, B.A. and T.Y. Yen, *Proteins at membrane surfaces-a review of approaches*. Mol Biosyst, 2007. **3**(10): p. 705-13.
123. Wallin, E. and G. von Heijne, *Genome-wide analysis of integral membrane proteins from eubacterial, archaean, and eukaryotic organisms*. Protein Sci, 1998. **7**(4): p. 1029-38.
124. Paradisi, F., S. Collins, A.R. Maguire and P.C. Engel, *Phenylalanine dehydrogenase mutants: efficient biocatalysts for synthesis of non-natural phenylalanine derivatives*. J Biotechnol, 2007. **128**(2): p. 408-11.
125. Yamada, A., T. Dairi, Y. Ohno, X.L. Huang and Y. Asano, *Nucleotide sequencing of phenylalanine dehydrogenase gene from Bacillus badius IAM 11059*. Biosci Biotechnol Biochem, 1995. **59**(10): p. 1994-5.
126. Laubacher, M.E. and S.E. Ades, *The Rcs phosphorelay is a cell envelope stress response activated by peptidoglycan stress and contributes to intrinsic antibiotic resistance*. J Bacteriol, 2008. **190**(6): p. 2065-74.
127. Berger-Bachi, B., A. Strassle, J.E. Gustafson and F.H. Kayser, *Mapping and characterization of multiple chromosomal factors involved in methicillin resistance in Staphylococcus aureus*. Antimicrob Agents Chemother, 1992. **36**(7): p. 1367-73.
128. Glanzmann, P., J. Gustafson, H. Komatsuzawa, K. Ohta and B. Berger-Bachi, *glmM operon and methicillin-resistant glmM suppressor mutants in Staphylococcus aureus*. Antimicrob Agents Chemother, 1999. **43**(2): p. 240-5.

129. Jolly, L., S. Wu, J. van Heijenoort, H. de Lencastre, D. Mengin-Lecreulx and A. Tomasz, *The femR315 gene from Staphylococcus aureus, the interruption of which results in reduced methicillin resistance, encodes a phosphoglucosamine mutase*. J Bacteriol, 1997. **179**(17): p. 5321-5.
130. Cordwell, S.J., M.R. Larsen, R.T. Cole and B.J. Walsh, *Comparative proteomics of Staphylococcus aureus and the response of methicillin-resistant and methicillin-sensitive strains to Triton X-100*. Microbiology, 2002. **148**(Pt 9): p. 2765-81.
131. Gertz, S., S. Engelmann, R. Schmid, A.K. Ziebandt, K. Tischer, *et al.*, *Characterization of the sigma(B) regulon in Staphylococcus aureus*. J Bacteriol, 2000. **182**(24): p. 6983-91.
132. Price, C.W., P. Fawcett, H. Ceremonie, N. Su, C.K. Murphy and P. Youngman, *Genome-wide analysis of the general stress response in Bacillus subtilis*. Mol Microbiol, 2001. **41**(4): p. 757-74.
133. Morikawa, K., A. Maruyama, Y. Inose, M. Higashide, H. Hayashi and T. Ohta, *Overexpression of sigma factor, sigma(B), urges Staphylococcus aureus to thicken the cell wall and to resist beta-lactams*. Biochem Biophys Res Commun, 2001. **288**(2): p. 385-9.
134. Howden, B.P. and M.L. Grayson, *Dumb and dumber--the potential waste of a useful antistaphylococcal agent: emerging fusidic acid resistance in Staphylococcus aureus*. Clin Infect Dis, 2006. **42**(3): p. 394-400.
135. Besier, S., A. Ludwig, V. Brade and T.A. Wichelhaus, *Molecular analysis of fusidic acid resistance in Staphylococcus aureus*. Mol Microbiol, 2003. **47**(2): p. 463-9.
136. Norstrom, T., J. Lannergard and D. Hughes, *Genetic and phenotypic identification of fusidic acid-resistant mutants with the small-colony-variant phenotype in Staphylococcus aureus*. Antimicrob Agents Chemother, 2007. **51**(12): p. 4438-46.
137. Capaldi, R.A., B. Schulenberg, J. Murray and R. Aggeler, *Cross-linking and electron microscopy studies of the structure and functioning of the Escherichia coli ATP synthase*. J Exp Biol, 2000. **203**(Pt 1): p. 29-33.
138. Copeland A, Lucas S, Lapidus A, Barry K, Detter JC, Glavina del Rio T, Hammon N, Israni S, Pitluck S, Chain P, Malfatti S, Shin M, Vergez L, Schmutz J, Larimer F, Land M, Hauser L, Kyrpides N, Kim E, Tomasz A, Richardson P. submitted for publication.

7. Referências bibliográficas

- Complete sequence of chromosome of *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* JH1. (JUN-2007) to the EMBL/GenBank/DDBJ databases. 2007.
139. Pieper, R., C.L. Gatlin-Bunai, E.F. Mongodin, P.P. Parmar, S.T. Huang, *et al.*, *Comparative proteomic analysis of Staphylococcus aureus strains with differences in resistance to the cell wall-targeting antibiotic vancomycin*. *Proteomics*, 2006. **6**(15): p. 4246-58.
 140. Drummelsmith, J., E. Winstall, M.G. Bergeron, G.G. Poirier and M. Ouellette, *Comparative proteomics analyses reveal a potential biomarker for the detection of vancomycin-intermediate Staphylococcus aureus strains*. *J Proteome Res*, 2007. **6**(12): p. 4690-702.
 141. Chhatwal, G.S., *Anchorless adhesins and invasins of Gram-positive bacteria: a new class of virulence factors*. *Trends Microbiol*, 2002. **10**(5): p. 205-8.
 142. Dreisbach, A., K. Hempel, G. Buist, M. Hecker, D. Becher and J.M. van Dijk, *Profiling the surfacome of Staphylococcus aureus*. *Proteomics*, 2010. **10**(17): p. 3082-96.
 143. Copeland, A., *Complete sequence of chromosome of Staphylococcus aureus subsp. aureus JH9*. Submitted to the EMBL/GenBank/DDBJ databases, 2007.
 144. Bernardo, K., N. Pakulat, S. Fleer, A. Schnaith, O. Utermohlen, *et al.*, *Subinhibitory concentrations of linezolid reduce Staphylococcus aureus virulence factor expression*. *Antimicrob Agents Chemother*, 2004. **48**(2): p. 546-55.
 145. Boyle-Vavra, S. and R.S. Daum, *Community-acquired methicillin-resistant Staphylococcus aureus: the role of Panton-Valentine leukocidin*. *Lab Invest*, 2007. **87**(1): p. 3-9.
 146. Boakes, E., A.M. Kearns, M. Ganner, C. Perry, R.L. Hill and M.J. Ellington, *Distinct bacteriophages encoding Panton-Valentine leukocidin (PVL) among international methicillin-resistant Staphylococcus aureus clones harboring PVL*. *J Clin Microbiol*, 2011. **49**(2): p. 684-92.
 147. Clarke, S.R., G. Andre, E.J. Walsh, Y.F. Dufrene, T.J. Foster and S.J. Foster, *Iron-regulated surface determinant protein A mediates adhesion of Staphylococcus aureus to human corneocyte envelope proteins*. *Infect Immun*, 2009. **77**(6): p. 2408-16.

Publicações

Com base no trabalho efectuado no âmbito deste trabalho de dissertação, realizaram-se as seguintes publicações:

- **Comunicações em painel ("poster"):**

Monteiro R., H. Radhouani, P. Poeta, C. Torres, R. Vitorino, P. Domingues, G. Igrejas. Proteomic approach to investigate clinical human Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. In Book of Abstracts of the XXXVI Jornadas Portuguesas de Genética. Coimbra, 30 Maio a 1 de Junho, USB drive.

- **Artigos em revistas de circulação internacional com arbitragem científica:**

Monteiro R., Vitorino R, Domingues P, Radhouani H, Carvalho C, Poeta P, Torres C, Igrejas G. 2012. Proteome of a methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical strain of sequence type ST398. *J Proteomics*;5:5. IF 4.906

Anexo

Tabela A1. Proteínas identificadas nos 105 *spots* excisados do gel 2-DE. A Tabela A1 encontra-se publicada na revista de circulação internacional com arbitragem científica *Journal of Proteomics*, no artigo intitulado “Proteome of a methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical strain of sequence type ST398.” Podendo ser consultada online em (<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1874391911007172>).

Tabela A3. Proteínas identificadas no Exoproteoma.

Accession	Description	Species	Protein Name	Σ # Peptides	Score 1EXO 2EXO 3EXO	MW [kDa]	calc. pI	Function	Localization	Biological Process	Ref.
D2N627	Bifunctional autolysin	<i>Staphylococcus aureus</i> (strain MRSA ST398 / isolate S0385)		32	811,96 827,23 2814,30	136,6	9,60			Glycosidase	[1]
H7G701	Uncharacterized protein	<i>Staphylococcus aureus subsp. aureus</i> DR10		26	2075,56 9006,84 6741,00	24,2	6,40		Extracellular region		
A7WYX6	Elongation factor Tu	<i>Staphylococcus aureus</i> (strain Mu3 / ATCC 700698)	<i>tuf</i>	15	3920,64 2666,18 2308,01	43,1	4,86	Promotes the GTP-dependent binding of aminoacyl-tRNA to the A-site of ribosomes during protein biosynthesis	Cytoplasm	Protein biosynthesis	[2]
D2UJV3	Elongation factor G	<i>Staphylococcus aureus subsp. aureus</i> H19	<i>fusA</i>	11	1323,83 1320,71 591,84	65,3	4,81	Catalyzes the GTP-dependent ribosomal translocation step during translation elongation. Catalyzes the coordinated movement of the two tRNA molecules, the mRNA and conformational changes in the ribosome	Cytoplasm	Protein biosynthesis	[3]
H7G3A4	IsdA	<i>Staphylococcus aureus subsp. aureus</i> DR10	IsdA	11	464,24 578,41 1066,22	39,0	9,64		Cell wall		[4]
Q2FH36	Cold shock protein CspA	<i>Staphylococcus aureus</i> (strain USA300)	<i>cspA</i>	8	663,20 1379,16 1103,51	7,3	4,56	Involved in cold stress response	Cytoplasm	Regulation of transcription	[5]
F9L2X6	N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase	<i>Staphylococcus aureus subsp. aureus</i> 21269		8	286,96 297,93 300,27	66,6	6,37			Peptidoglycan catabolic process	[6]
A7X659	Immunoglobulin-binding protein sbi	<i>Staphylococcus aureus</i> (strain Mu3 / ATCC 700698)	<i>sbi</i>	7	278,95 --- 720,69	48,9	9,38	Interacts with components of both the adaptive and innate host immune system, thereby protecting the cell against the host immune response	Secreted	Virulence	[2]
B0FZE8	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase 1	<i>Staphylococcus aureus subsp. aureus</i>	<i>gapC</i>	7	1666,31 804,34 115,55	36,3	5,05			Glucose metabolic process	[7]

Accession	Description	Species	Protein Name	Σ # Peptides	Score 1EXO 2EXO 3EXO	MW [kDa]	calc. pI	Function	Localization	Biological Process	Ref.
H4FZN8	Phosphopyruvate hydratase (Fragment)	<i>Staphylococcus aureus subsp. aureus</i> IS-157	eno	7	1083,40 304,95 ---	46,0	4,61			Glycolysis	[8]
H4CIR4	Putative exported protein	<i>Staphylococcus aureus subsp. aureus</i> CIGC345D		7	137,99 --- 683,78	16,6	9,03				[9]
H0CIZ5	Triacylglycerol lipase	<i>Staphylococcus aureus subsp. aureus</i> 21331		7	--- 229,28 671,77	76,5	8,92		Secreted	Hydrolase	[6]
C5N3P6	Thermonuclease	<i>Staphylococcus aureus subsp. aureus</i> USA300_TCH959	nuc	7	288,90 --- 653,90	23,9	9,42			Hydrolase	[10]
H0CJP3	Sphingomyelin phosphodiesterase (Fragment)	<i>Staphylococcus aureus subsp. aureus</i> 21334	sph	6	390,98 --- 723,30	31,1	7,93		Extracellular region		[6]
A6QEJ2	50S ribosomal protein	<i>Staphylococcus aureus</i> (strain Newman)	rpL	5	1219,44 818,42 ---	12,7	4,65	Seems to be the binding site for several of the factors involved in protein synthesis and appears to be essential for accurate translation	Ribosome	Translation	[11]
H4BSS0	50S ribosomal protein L13	<i>Staphylococcus aureus subsp. aureus</i> CIGC341D	rpLM	5	735,85 --- ---	15,7	9,11	This protein is one of the early assembly proteins of the 50S ribosomal subunit, although it is not seen to bind rRNA by itself. It is important during the early stages of 50S assembly	Ribosome	Translation	[9]
C8MXT8	Elongation factor Ts (Fragment)]	<i>Staphylococcus aureus</i> A9763		5	1003,48 864,18 ---	27,0	4,92	Associates with the EF-Tu.GDP complex and induces the exchange of GDP to GTP. It remains bound to the aminoacyl-tRNA.EF-Tu.GTP complex up to the GTP hydrolysis stage on the ribosome	Cytoplasm	Protein biosynthesis	[12]
H6LRJ8	Chaperone protein DnaK	<i>Staphylococcus aureus subsp. aureus</i> VC40	HSP70	5	1011,82 559,00 ---	53,9	4,88			Stress response	[13]

Accession	Description	Species	Protein Name	Σ # Peptides	Score 1EXO 2EXO 3EXO	MW [kDa]	calc. pI	Function	Localization	Biological Process	Ref.
H3XSS6	Triosephosphate isomerase	<i>Staphylococcus aureus subsp. aureus</i> IS-88		5	550,64 743,19 344,52	13,9	4,56			Glycolysis	[8]
D8HBY4	Trigger factor	<i>Staphylococcus aureus subsp. aureus</i> (strain ED133)	<i>tig</i>	5	887,91 701,97 310,79	48,6	4,42	Involved in protein export. Acts as a chaperone by maintaining the newly synthesized protein in an open conformation. Functions as a peptidyl-prolyl cis-trans isomerase	Cytoplasm	Cell division	[14]
H4CY90	Secretory antigen ssaA2	<i>Staphylococcus aureus subsp. aureus</i> CIG547		5	--- 452,91 323,57	29,3	8,94				[9]
G7ZQA4	Probable transglycosylase sceD	<i>Staphylococcus aureus subsp. aureus</i> MSHR1132		5	--- 112,21 260,39	23,9	5,88		Extracellular region		[15]
A7WXP7	L-lactate dehydrogenase 1	<i>Staphylococcus aureus</i> (strain Mu3 / ATCC 700698)	<i>ldh1</i>	4	552,04 179,40 ---	34,5	5,07	Appears to be the primary factor that allows <i>S.aureus</i> growth during nitrosative stress in both aerobically and anaerobically cultured cells	Cytoplasm	Glycolysis	[2]
Q8VTM6	60 kDa chaperonin 2	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>groL</i>	4	394,98 621,15 556,92	56,2	4,68	Prevents misfolding and promotes the refolding and proper assembly of unfolded polypeptides generated under stress conditions	Cytoplasm	Protein refolding	[16]
H4BWW3	Pyruvate dehydrogenase E1 component subunit beta	<i>Staphylococcus aureus subsp. aureus</i> CIGC341D	<i>pdhB</i>	4	305,07 --- ---	34,7	4,73			Oxidoreductase	[9]
H4BST4	30S ribosomal protein S8	<i>Staphylococcus aureus subsp. aureus</i> CIGC341D	<i>rpsH</i>	4	1431,96 927,94 288,34	14,6	9,33	One of the primary rRNA binding proteins, it binds directly to 16S rRNA central domain where it helps coordinate assembly of the platform of the 30S subunit	Ribosome	Translation	[9]
F9K9Y2	Alkaline shock protein 23	<i>Staphylococcus aureus subsp. aureus</i> 21235	<i>asp</i>	4	2024,49 --- ---	19,2	5,20				[6]

Accession	Description	Species	Protein Name	Σ # Peptides	Score 1EXO 2EXO 3EXO	MW [kDa]	calc. pI	Function	Localization	Biological Process	Ref.
F0D4Y9	Staphopain cysteine proteinase	<i>Staphylococcus aureus</i> O11		4	--- --- 396,69	43,1	9,66			Proteolysis	[17]
F5WI91	Heme uptake protein	<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i> 21318	<i>isdC</i>	4	123,65 --- 140,18	24,2	8,44		Cell wall	Heme transport	[6]
D2FNS2	Putative uncharacterized protein	<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i> D139		4	--- --- 286,42	40,4	9,29		Extracellular region	Cytolysis in other organism	[3]
A7WZS6	Phosphoglycerate kinase	<i>Staphylococcus aureus</i> (strain Mu3 / ATCC 700698)	<i>pgk</i>	3	462,19 --- ---	42,6	5,33		Cytoplasm	Glycolysis	[2]
Q5HH02	Phosphocarrier protein HPr	<i>Staphylococcus aureus</i> (strain COL)	<i>ptsH</i>	3	289,62 --- ---	9,5	4,67	General (non sugar-specific) component of the phosphoenolpyruvate-dependent sugar phosphotransferase system (sugar PTS). This major carbohydrate active-transport system catalyzes the phosphorylation of incoming sugar substrates concomitantly with their translocation across the cell membrane. The phosphoryl group from phosphoenolpyruvate (PEP) is transferred to the phosphoryl carrier protein HPr by enzyme I. Phospho-HPr then transfers it to the permease (enzymes II/III). P-Ser-HPr interacts with the catabolite control protein A (CcpA), forming a complex that binds to DNA at the catabolite response elements cre, operator sites preceding a large number of catabolite-regulated genes. Thus, P-Ser-HPr is a corepressor in carbon catabolite repression (CCR), a mechanism that allows bacteria to coordinate and	Cytoplasm	Phosphotransferase system; Sugar transport; Transcription; Transcription regulation; Transport	[18]

Accession	Description	Species	Protein Name	Σ # Peptides	Score 1EXO 2EXO 3EXO	MW [kDa]	calc. pI	Function	Localization	Biological Process	Ref.
								optimize the utilization of available carbon sources.			
A7X5F4	50S ribosomal protein L16	<i>Staphylococcus aureus</i> (strain Mu3 / ATCC 700698)	<i>rplP</i>	3	235,46 --- ---	16,2	10,64	Binds 23S rRNA and is also seen to make contacts with the A and possibly P site tRNAs	Ribosome	Translation	[2]
A7X5G2	50S ribosomal protein L4	<i>Staphylococcus aureus</i> (strain Mu3 / ATCC 700698)	<i>rplD</i>	3	1901,97 3261,51 ---	22,5	9,91	One of the primary rRNA binding proteins, this protein initially binds near the 5'-end of the 23S rRNA. It is important during the early stages of 50S assembly. It makes multiple contacts with different domains of the 23S rRNA in the assembled 50S subunit and ribosome	Ribosome	Translation	[2]
Q6GFY8	30S ribosomal protein S4	<i>Staphylococcus aureus</i> (strain MRSA252)	<i>rpsD</i>	3	627,88 --- ---	23,0	10,02	One of the primary rRNA binding proteins, it binds directly to 16S rRNA where it nucleates assembly of the body of the 30S subunit	Small ribosomal subunit	Translation	[19]
H7G2N7	Pyruvate kinase	<i>Staphylococcus aureus subsp. aureus</i> DR10		3	257,97 --- ---	63,1	5,30			Glycolysis	[4]
H4GY77	Ribosomal protein L1	<i>Staphylococcus aureus subsp. aureus</i> CIG1500	<i>rplA</i>	3	886,09 618,20 331,30	24,5	8,43	Binds directly to 23S rRNA. The L1 stalk is quite mobile in the ribosome, and is involved in E site tRNA release. Protein L1 is also a translational repressor protein, it controls the translation of the L11 operon by binding to its mRNA	Large ribosomal subunit	Translation	[9]
B3VKN3	50S ribosome protein	<i>Staphylococcus aureus</i> GN	<i>rap</i>	3	306,59 575,37 ---	30,0	10,76	One of the primary rRNA binding proteins. Required for association of the 30S and 50S subunits to form the 70S ribosome, for tRNA binding and peptide bond formation. It has been suggested to have peptidyltransferase activity; this is somewhat controversial. Makes several contacts with the 16S rRNA in the 70S ribosome.	Large ribosomal subunit	Translation	[7]

Accession	Description	Species	Protein Name	Σ # Peptides	Score 1EXO 2EXO 3EXO	MW [kDa]	calc. pI	Function	Localization	Biological Process	Ref.
D6HHK6	50S ribosomal protein	<i>Staphylococcus aureus subsp. aureus</i> 58-424		3	308,54 --- 276,56	8,5	5,86	This protein binds to 23S rRNA in the presence of protein L20	Ribosome	Translation	[3]
H1SS25	DAK2 domain fusion protein	<i>Staphylococcus aureus subsp. aureus</i> 21262 YloV		3	219,40 244,27 ---	60,5	4,74			Glycerol metabolic process	[6]
F3SQT3	GMP synthase [glutamine-hydrolyzing]	<i>Staphylococcus warneri</i> VCU121	<i>guaA</i>	3	151,30 537,32 ---	58,0	5,00	Catalyzes the synthesis of GMP from XMP	Cytoplasm	GMP biosynthetic; Glutamine metabolic process; tRNA processing	[20]
C5QPP7	DNA-directed RNA polymerase subunit beta'	<i>Staphylococcus epidermidis</i> M23864:W1	<i>rpoC</i>	3	277,02 --- ---	134,1	6,11	DNA-dependent RNA polymerase catalyzes the transcription of DNA into RNA using the four ribonucleoside triphosphates as substrates		Transcription	[10]
D9RGJ6	Translation initiation factor IF-2	<i>Staphylococcus aureus</i> (strain JKD6159)	<i>infB</i>	3	223,61 --- ---	77,5	5,17	One of the essential components for the initiation of protein synthesis. Protects formylmethionyl-tRNA from spontaneous hydrolysis and promotes its binding to the 30S ribosomal subunits. Also involved in the hydrolysis of GTP during the formation of the 70S ribosomal complex	Cytoplasm	Protein biosynthesis	[21]
A5IQ66	Cysteine synthase	<i>Staphylococcus aureus</i> (strain JH9)		3	127,38 --- 107,88	33,0	5,25			Cysteine biosynthetic process from serine	[22]
Q5TKS1	Beta-ketoacyl-ACP synthase III (Fragment)	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>fabH</i>	3	433,39 --- 240,21	32,7	4,89		Cytoplasm	Fatty acid biosynthetic process	[23]
C8A845	Alkyl hydroperoxide	<i>Staphylococcus aureus subsp. aureus</i> 68-397		3	--- --- 496,62	21,0	5,05			Response to oxidative stress	[3]

Accession	Description	Species	Protein Name	Σ # Peptides	Score 1EXO 2EXO 3EXO	MW [kDa]	calc. pI	Function	Localization	Biological Process	Ref.
	reductase subunit C										
E7MVE5	50S ribosomal protein L5	<i>Staphylococcus aureus subsp. aureus</i> MRSA131	<i>rplE</i>	3	917,57 --- ---	18,3	9,38	This is 1 of the proteins that binds and probably mediates the attachment of the 5S RNA into the large ribosomal subunit, where it forms part of the central protuberance. In the 70S ribosome it contacts protein S13 of the 30S subunit (bridge B1b), connecting the 2 subunits; this bridge is implicated in subunit movement. Contacts the P site tRNA; the 5S rRNA and some of its associated proteins might help stabilize positioning of ribosome-bound tRNAs		Translation	[24]
F3TH19	Threonine--tRNA ligase	<i>Staphylococcus aureus subsp. aureus</i> 21193	<i>thrS</i>	3	219,33 --- ---	74,2	5,31		Cytoplasm	Protein biosynthesis	[20]
H4HM14	Lipoteichoic acid synthase	<i>Staphylococcus aureus subsp. aureus</i> CIG290	<i>ltaS</i>	3	--- --- 169,27	69,0	8,87				[9]
A6U106	Cell division protein ftsZ	<i>Staphylococcus aureus</i> (strain JH1)	<i>ftsZ</i>	3	418,53 720,86 ---	41,1	4,98	Essential cell division protein that forms a contractile ring structure (Z ring) at the future cell division site. The regulation of the ring assembly controls the timing and the location of cell division. One of the functions of the FtsZ ring is to recruit other cell division proteins to the septum to produce a new cell wall between the dividing cells. Binds GTP and shows GTPase activity	Cytoplasm	Cell cycle; Cell division; Septation	[22]
H7G6G2	Leukocidin F subunit	<i>Staphylococcus aureus subsp. aureus</i> DR10		3	--- --- 142,14	38,6	8,24		Extracellular region	Pathogenesis	[4]
F3TMS3	MAP domain protein	<i>Staphylococcus aureus subsp. aureus</i> 21193		3	--- 139,87 162,62	11,3	9,09				[20]

Accession	Description	Species	Protein Name	Σ # Peptides	Score 1EXO 2EXO 3EXO	MW [kDa]	calc. pI	Function	Localization	Biological Process	Ref.
D2UHD2	SsaA	<i>Staphylococcus aureus subsp. aureus</i> H19		3	--- 628,58 611,13	16,9	6,24				[3]
A7X6Y6	Fructose-bisphosphate aldolase class 1	<i>Staphylococcus aureus</i> (strain Mu3 / ATCC 700698)	fda	2	150,16 --- ---	33,0	4,98			Glycolysis	[2]
A7X319	Transcription elongation factor GreA	<i>Staphylococcus aureus</i> (strain Mu3 / ATCC 700698)	greA	2	107,73 --- ---	17,7	4,59	Necessary for efficient RNA polymerase transcription elongation past template-encoded arresting sites. The arresting sites in DNA have the property of trapping a certain fraction of elongating RNA polymerases that pass through, resulting in locked ternary complexes. Cleavage of the nascent transcript by cleavage factors such as GreA or GreB allows the resumption of elongation from the new 3'terminus. GreA releases sequences of 2 to 3 nucleotides		Transcription	[2]
A7X451	Probable manganese-dependent inorganic pyrophosphatase	<i>Staphylococcus aureus</i> (strain Mu3 / ATCC 700698)	ppaC	2	329,42 --- ---	34,0	4,86		Cytoplasm		[2]
A7WYW0	50S ribosomal protein L11	<i>Staphylococcus aureus</i> (strain Mu3 / ATCC 700698)	rplK	2	221,55 --- 253,63	14,9	8,98		Ribosome	Translation	[2]
A7X5D4	50S ribosomal protein L15	<i>Staphylococcus aureus</i> (strain Mu3 / ATCC 700698)	rplO	2	522,99 --- ---	15,6	10,29	Binds to the 23S rRNA	Large ribosomal subunit	Translation	[2]
A7X3A1	50S ribosomal protein L20	<i>Staphylococcus aureus</i> (strain Mu3 / ATCC 700698)	rplT	2	--- --- 149,48	13,7	11,25	Binds directly to 23S ribosomal RNA and is necessary for the in vitro assembly process of the 50S ribosomal subunit.	Ribosome	Translation	[2]

Accession	Description	Species	Protein Name	Σ # Peptides	Score 1EXO 2EXO 3EXO	MW [kDa]	calc. pI	Function	Localization	Biological Process	Ref.
A7X5E1	50S ribosomal protein L6	<i>Staphylococcus aureus</i> (strain Mu3 / ATCC 700698)	<i>rplF</i>	2	151,09 --- ---	19,8	9,54	This protein binds to the 23S rRNA, and is important in its secondary structure. It is located near the subunit interface in the base of the L7/L12 stalk, and near the tRNA binding site of the peptidyltransferase center	Ribosome	Translation	[2]
D6SDD0	Inosine-5'-monophosphate dehydrogenase	<i>Staphylococcus aureus subsp. aureus</i> MN8	<i>guaB</i>	2	228,86 --- ---	52,8	5,78	Catalyzes the conversion of inosine 5'-phosphate (IMP) to xanthosine 5'-phosphate (XMP), the first committed and rate-limiting step in the de novo synthesis of guanine nucleotides, and therefore plays an important role in the regulation of cell growth		GMP biosynthetic process	[25]
H3YMA2	DNA-directed RNA polymerase, beta subunit (Fragment)	<i>Staphylococcus aureus subsp. aureus</i> IS-111	<i>rpoB_1</i>	2	249,59 --- ---	108,9	4,98	DNA-dependent RNA polymerase catalyzes the transcription of DNA into RNA using the four ribonucleoside triphosphates as substrates		Transcription	[8]
D2FQA8	Hydroxymethylglutaryl-CoA synthase	<i>Staphylococcus aureus subsp. aureus</i> D139		2	286,29 --- ---	43,2	5,06			Isoprenoid biosynthetic process	[3]
D2GEM7	FeS assembly ATPase SufC	<i>Staphylococcus aureus subsp. aureus</i> Btn1260		2	170,69 --- ---	28,3	4,97			ATP catabolic process	[3]
H3YW95	Alanine--tRNA ligase (Fragment)	<i>Staphylococcus aureus subsp. aureus</i> IS-122	<i>alaS</i>	2	261,19 --- ---	94,4	5,05		Cytoplasm	Protein biosynthesis	[8]
G5JGX4	Endopeptidase	<i>Staphylococcus simiae</i> CCM 7213		2	99,59 --- ---	91,1	5,57			Protein metabolic process	[26]
H3ZWH2	Ribosomal protein S3, N-terminal domain protein	<i>Staphylococcus aureus subsp. aureus</i> IS-125		2	180,03 --- ---	12,2	9,57		Small ribosomal subunit	Translation	[8]
D2GAR6	Asparaginyl-tRNA synthetase (Fragment)	<i>Staphylococcus aureus subsp. aureus</i> WW2703/97		2	114,12 --- ---	29,7	4,93		Cytoplasm	Protein biosynthesis	[3]

Accession	Description	Species	Protein Name	Σ # Peptides	Score 1EXO 2EXO 3EXO	MW [kDa]	calc. pI	Function	Localization	Biological Process	Ref.
H3XYU4	Glutamine synthetase	<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i> IS-91	<i>glnA</i>	2	176,28 --- ---	40,8	5,11		Cytoplasm	Glutamine biosynthetic process	[8]
D2GH82	tRNA-binding domain-containing protein	<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i> Btn1260		2	321,11 --- ---	23,2	4,67				[3]
F9L508	50S ribosomal protein L4	<i>Staphylococcus capitis</i> VCU116	<i>rplD</i>	2	1837,08 2764,08 ---	22,5	9,95		Ribosome	Translation	[20]
D0K9M2	3-hexulose-6-phosphate synthase	<i>Staphylococcus aureus</i> (strain ED98)	<i>hxlA</i>	2	234,51 --- ---	22,4	4,75			'de novo' pyrimidine nucleobase biosynthetic process	[27]
D8HG43	Probable malate:quinone oxidoreductase 2	<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i> (strain ED133)	<i>mqr</i>	2	262,35 --- ---	56,0	6,81			Tricarboxylic acid cycle	[14]
D2FKW8	Dihydrolipoyllysine-residue acetyltransferase component	<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i> D139		2	287,38 192,89 ---	45,6	5,03				[3]
H4BZU1	Acetate kinase	<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i> CIGC341D	<i>ackA</i>	2	195,22 --- ---	41,8	5,68		Cytoplasm	Acetyl-CoA biosynthetic process	[9]
H7G3Q1	3-oxoacyl-[acyl-carrier-protein] synthase 2	<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i> DR10		2	--- 391,97 ---	43,7	5,25			Fatty acid biosynthesis; Fatty acid metabolism	[4]
C5N1R8	NADH dehydrogenase	<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i> USA300_TCH959	<i>ahpF</i>	2	345,53 789,28 ---	54,7	4,79			Cell redox homeostasis	[10]

Accession	Description	Species	Protein Name	Σ # Peptides	Score 1EXO 2EXO 3EXO	MW [kDa]	calc. pI	Function	Localization	Biological Process	Ref.
H4CDT1	Pyridoxal biosynthesis lyase PdxS	<i>Staphylococcus aureus subsp. aureus</i> CIG1770	pdxS	2	231,64 --- ---	30,2	5,02	Involved in the production of pyridoxal phosphate, probably by incorporating ammonia into the pyridine ring		Pyridoxal phosphate biosynthetic process	[9]
C7ZWE1	Isoleucyl-tRNA synthetase	<i>Staphylococcus aureus subsp. aureus</i> 55/2053		2	87,88 --- ---	85,1	5,22		Cytoplasm	Protein biosynthesis	[3]
D2G9F6	Transketolase (Fragment)	<i>Staphylococcus aureus subsp. aureus</i> WW2703/97		2	210,88 --- ---	58,4	5,03				[3]
F0P5K0	DNA-binding protein HU	<i>Staphylococcus pseudintermedius</i> (strain ED99)	hup	2	--- --- 155,00	9,6	9,52			DNA condensation	[28]
H4G4R3	Putative uncharacterized protein (Fragment)	<i>Staphylococcus aureus subsp. aureus</i> IS-160		2	91,54 --- ---	23,0	4,83				[8]
D2GGI7	Transcriptional repressor	<i>Staphylococcus aureus subsp. aureus</i> Btn1260		2	196,39 --- ---	22,9	8,16			Sequence-specific DNA binding	[3]
H4G2K3	GMP synthase (Glutamine-hydrolyzing), C-terminal domain protein (Fragment)	<i>Staphylococcus aureus subsp. aureus</i> IS-160		2	--- --- 278,26	52,9	5,15		Cytoplasm	GMP biosynthetic process	[8]
Q5TKS2	Beta-ketoacyl-ACP reductase (Fragment)	<i>Staphylococcus aureus</i>	fabG	2	153,52 --- ---	24,6	5,30			Fatty acid biosynthetic process	[23]
H4GB84	Ribose-phosphate diphosphokinase	<i>Staphylococcus aureus subsp. aureus</i> IS-189	prs	2	102,13 --- ---	33,5	6,06		Cytoplasm	Nucleotide biosynthesis	[8]
D1Q9K5	CoeA disulfide reductase (Fragment)	<i>Staphylococcus aureus</i> A9765		2	152,31 --- ---	31,5	5,92		Cytoplasm	Cell redox homeostasis	[12]

Accession	Description	Species	Protein Name	Σ # Peptides	Score 1EXO 2EXO 3EXO	MW [kDa]	calc. pI	Function	Localization	Biological Process	Ref.
F9KF96	Putative glutamine--fructose-6-phosphate transaminase (Isomerizing)	<i>Staphylococcus aureus subsp. aureus</i> 21235		2	306,60 --- ---	29,1	5,35			Carbohydrate metabolic process	[8]
E5R9H7	Cold shock protein cspC	<i>Staphylococcus aureus</i> (strain ECT-R 2)		2	293,81 --- ---	7,4	4,54		Cytoplasm	Regulation of transcription, DNA-dependent	[29]
I0JDV4	Cell shape-determining protein MreC	<i>Staphylococcus aureus subsp. aureus</i> HO 5096 0412		2	--- --- 125,42	31,0	9,01	Involved in formation and maintenance of cell shape		Cell shape	[30]
F5WPE1	Translation elongation factor P	<i>Staphylococcus aureus subsp. aureus</i> 21318		2	100,98 --- ---	14,8	5,17			Protein biosynthesis	[20]
H3YUY4	Putative uncharacterized protein (Fragment)	<i>Staphylococcus aureus subsp. aureus</i> IS-111		2	246,54 --- ---	19,8	5,44				[8]
C4WBU2	Purine nucleoside phosphorylase DeoD-type	<i>Staphylococcus warneri</i> L37603	deoD	2	98,89 --- ---	25,9	4,91			Purine nucleoside metabolic process	[31]
D2GDH7	1-phosphatidylinositol phosphodiesterase (Fragment)	<i>Staphylococcus aureus subsp. aureus</i> WW2703/97		2	--- --- 284,51	30,7	7,02			Lipid metabolic process	[3]
H4BPR3	Hemolytic family protein	<i>Staphylococcus aureus subsp. aureus</i> CIG1057		2	195,08 --- ---	4,5	4,91			Pathogenesis	[9]
D2GE09	Manganese - binding protein]	<i>Staphylococcus aureus subsp. aureus</i> Btn1260		2	151,96 --- ---	34,7	8,66			Cell adhesion	[3]

Accession	Description	Species	Protein Name	Σ # Peptides	Score 1EXO 2EXO 3EXO	MW [kDa]	calc. pI	Function	Localization	Biological Process	Ref.
H3YGV0	CHAP domain protein (Fragment)	<i>Staphylococcus aureus subsp. aureus</i> IS-105		2	--- --- 396,06	19,7	6,35			Cell wall macromolecule catabolic process	[8]
F9KZ14	Antibacterial protein 1	<i>Staphylococcus aureus subsp. aureus</i> 21269		2	--- --- 102,78	4,5	5,72			Pathogenesis	[20]
H0CAY6	N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase Sle1	<i>Staphylococcus aureus subsp. aureus</i> 21194	<i>sle_2</i>	2	--- --- 306,11	32,5	9,63			Cell wall macromolecule catabolic process	[6]

Bibliografia referente à tabela 3

1. Schijffelen, M.J., et al., *Whole genome analysis of a livestock-associated methicillin-resistant Staphylococcus aureus ST398 isolate from a case of human endocarditis*. BMC Genomics, 2010. **11**: p. 376.
2. Neoh, H.M., et al., *Mutated response regulator graR is responsible for phenotypic conversion of Staphylococcus aureus from heterogeneous vancomycin-intermediate resistance to vancomycin-intermediate resistance*. Antimicrob Agents Chemother, 2008. **52**(1): p. 45-53.
3. Feldgarden, M., et al., *The Genome Sequence of Staphylococcus aureus strain H19*. Submitted to the EMBL/GenBank/DDBJ databases, 2009.
4. Uhlemann, A.C., et al., *Identification of a highly transmissible animal-independent Staphylococcus aureus ST398 clone with distinct genomic and cell adhesion properties*. MBio, 2012. **3**(2).
5. Diep, B.A., et al., *Complete genome sequence of USA300, an epidemic clone of community-acquired methicillin-resistant Staphylococcus aureus*. Lancet, 2006. **367**(9512): p. 731-9.
6. Jones, M., et al., Submitted to the EMBL/GenBank/DDBJ databases, 2011.
7. Li, R., et al., Submitted to the EMBL/GenBank/DDBJ databases, 2008.
8. Jones, M., et al., Submitted to the EMBL/GenBank/DDBJ databases, 2012.
9. Gill, S., et al., Submitted to the EMBL/GenBank/DDBJ databases, 2012.
10. Qin, X., et al., *Submitted to the EMBL/GenBank/DDBJ databases*. 2009.
11. Baba, T., et al., *Genome sequence of Staphylococcus aureus strain Newman and comparative analysis of staphylococcal genomes: polymorphism and evolution of two major pathogenicity islands*. J Bacteriol, 2008. **190**(1): p. 300-10.
12. Ward, D., et al., Submitted to the EMBL/GenBank/DDBJ databases, 2009.
13. Sass, P., et al., *Genome sequence of Staphylococcus aureus VC40, a vancomycin- and daptomycin-resistant strain, to study the genetics of development of resistance to currently applied last-resort antibiotics*. J Bacteriol, 2012. **194**(8): p. 2107-8.

14. Guinane, C.M., et al., *Evolutionary genomics of Staphylococcus aureus reveals insights into the origin and molecular basis of ruminant host adaptation*. Genome Biol Evol, 2010. **2**: p. 454-66.
15. Holt, D.C., et al., *A very early-branching Staphylococcus aureus lineage lacking the carotenoid pigment staphyloxanthin*. Genome Biol Evol, 2011. **3**: p. 881-95.
16. Dugourd, D.F., A. Young, and J.A. Wright, *Molecular chaperones/chaperonin-encoding stress genes groEL and groES and their use as antimicrobial targets*. Submitted to the EMBL/GenBank/DDBJ databases, 2000.
17. Le Marechal, C., et al., *Genome sequences of two Staphylococcus aureus ovine strains that induce severe (strain O11) and mild (strain O46) mastitis*. J Bacteriol, 2011. **193**(9): p. 2353-4.
18. Gill, S.R., et al., *Insights on evolution of virulence and resistance from the complete genome analysis of an early methicillin-resistant Staphylococcus aureus strain and a biofilm-producing methicillin-resistant Staphylococcus epidermidis strain*. J Bacteriol, 2005. **187**(7): p. 2426-38.
19. Holden, M.T., et al., *Complete genomes of two clinical Staphylococcus aureus strains: evidence for the rapid evolution of virulence and drug resistance*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(26): p. 9786-91.
20. Jones, M., et al., Submitted to the EMBL/GenBank/DDBJ databases, 2011.
21. Chua, K., et al., *Complete genome sequence of Staphylococcus aureus strain JKD6159, a unique Australian clone of ST93-IV community methicillin-resistant Staphylococcus aureus*. J Bacteriol, 2010. **192**(20): p. 5556-7.
22. Copeland, A., et al., *Complete sequence of chromosome of Staphylococcus aureus subsp. aureus JH9*. Submitted to the EMBL/GenBank/DDBJ databases, 2007.
23. Morita, Y., S. Ikeno, and K.S. Tsuchiya, *Cloning and expression of Staphylococcus aureus Smith fab genes*. Submitted to the EMBL/GenBank/DDBJ databases, 2004.
24. Weinstock, G., et al., Submitted to the EMBL/GenBank/DDBJ databases, 2010.
25. Muzny, D., et al., Submitted to the EMBL/GenBank/DDBJ databases, 2010.

26. Suzuki, H., et al., *Comparative genomic analysis of the genus Staphylococcus including Staphylococcus aureus and its newly described sister species Staphylococcus simiae*. BMC Genomics, 2012. **13**: p. 38.
27. Lowder, B.V., et al., *Recent human-to-poultry host jump, adaptation, and pandemic spread of Staphylococcus aureus*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. **106**(46): p. 19545-50.
28. Ben Zakour, N.L., et al., *Complete genome sequence of the canine pathogen Staphylococcus pseudintermedius*. J Bacteriol, 2011. **193**(9): p. 2363-4.
29. Lindqvist, M., et al., *Detection and characterisation of SCCmec remnants in MR-MSSA causing a clonal outbreak in a Swedish county*. Submitted to the EMBL/GenBank/DDBJ databases, 2010.
30. Aslett, M., Submitted to the EMBL/GenBank/DDBJ databases, 2012.
31. Sebastian, Y., et al., Submitted to the EMBL/GenBank/DDBJ databases, 2009.

Tabela A2. Proteínas identificadas pelo método de *Shaving* celular.

Accession	Description	Species	Protein Name	Σ # Peptides	Score Rep.1 Rep.2 Rep.3	MW [kDa]	calc. pI	Function	Localization	Biological process	Ref.
H1SMA0	Translation elongation factor Tu	<i>Staphylococcus aureus subsp. aureus 21252</i>	<i>tuf</i>	31	7347,45 5832,15 6109,92	43,1	4,89	This protein promotes the GTP-dependent binding of aminoacyl-tRNA to the A-site of ribosomes during protein biosynthesis	Cytoplasm	GTP catabolic process	[1]
A6QEJ9	Elongation factor G	<i>Staphylococcus aureus (strain Newman)</i>	<i>fusA</i>	24	4171,01 3763,47 4291,27	76,6	4,91	Catalyzes the GTP-dependent ribosomal translocation step during translation elongation. During this step, the ribosome changes from the pre-translocational (PRE) to the post-translocational (POST) state as the newly formed A-site-bound peptidyl-tRNA and P-site-bound deacylated tRNA move to the P and E sites, respectively. Catalyzes the coordinated movement of the two tRNA molecules, the mRNA and conformational changes in the ribosome	Cytoplasm	GTP catabolic process	[2]
B0FZE8	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase 1	<i>Staphylococcus aureus subsp. aureus</i>	<i>gapC</i>	23	6131,22 7392,26 6286,94	36,3	5,05			Glucose metabolic process	[3]
A7X2Y1	Chaperone protein DnaK	<i>Staphylococcus aureus (strain Mu3 / ATCC 700698)</i>	<i>dnaK</i>	18	3213,89 2697,04 2231,19	66,3	4,78	Acts as a chaperone		Stress response	[4]
C5N2W8	DNA-directed RNA polymerase subunit beta'	<i>Staphylococcus aureus subsp. aureus USA300_TCH959</i>	<i>rpoC</i>	15	695,75 789,79 872,79	134,2	7,02	DNA-dependent RNA polymerase catalyzes the transcription of DNA into RNA using the four ribonucleoside triphosphates as substrates		Transcription	[5]
H7G2N7	Pyruvate kinase	<i>Staphylococcus aureus subsp. aureus DR10</i>		14	1754,29 1337,70 1364,86	63,1	5,30			Glycolysis	[6]
Q2YUD8	60 kDa chaperonin	<i>Staphylococcus aureus (strain bovine RF122 / ET3-1)</i>	<i>groL</i>	12	803,65 --- 828,26	57,5	4,64	Prevents misfolding and promotes the refolding and proper assembly of unfolded polypeptides generated under stress conditions	Cytoplasm	Protein refolding	[7]

Accession	Description	Species	Protein Name	Σ # Peptides	Score Rep.1 Rep.2 Rep.3	MW [kDa]	calc. pI	Function	Localization	Biological process	Ref.
A6QGF7	Elongation factor Ts	<i>Staphylococcus aureus</i> (strain Newman)	<i>tsf</i>	12	1825,62 1967,80 1277,88	32,4	5,17	Associates with the EF-Tu.GDP complex and induces the exchange of GDP to GTP. It remains bound to the aminoacyl-tRNA.EF-Tu.GTP complex up to the GTP hydrolysis stage on the ribosome	Cytoplasm	Protein biosynthesis	[2]
Q8VTM6	60 kDa chaperonin 2	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>groL</i>	12	--- 971,79 ---	56,2	4,68	Prevents misfolding and promotes the refolding and proper assembly of unfolded polypeptides generated under stress conditions	Cytoplasm	Protein refolding	[8]
D4U980	DNA-directed RNA polymerase subunit beta	<i>Staphylococcus aureus</i> A9754	<i>rpoB</i>	12	352,30 650,67 423,25	133,1	5,03	DNA-dependent RNA polymerase catalyzes the transcription of DNA into RNA using the four ribonucleoside triphosphates as substrates		Transcription	[9]
H4FZN8	Phosphopyruvate hydratase (Fragment)	<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i> IS-157	<i>eno</i>	12	3433,86 3379,18 3117,15	46,0	4,61			Glycolysis	[10]
D9RFF6	Triose-phosphate isomerase	<i>Staphylococcus aureus</i> (strain JKD6159)	<i>tpi</i>	11	895,51 1198,04 671,30	27,2	4,92		Cytoplasm	Gluconeogenesis	[11]
A7X5B4	50S ribosomal protein L13	<i>Staphylococcus aureus</i> (strain Mu3 / ATCC 700698)	<i>rplM</i>	10	509,14 690,19 726,86	16,3	9,31	This protein is one of the early assembly proteins of the 50S ribosomal subunit, although it is not seen to bind rRNA by itself. It is important during the early stages of 50S assembly	Ribosome	Translation	[4]
A7WYW7	DNA-directed RNA polymerase subunit beta	<i>Staphylococcus aureus</i> (strain Mu3 / ATCC 700698)	<i>rpoB</i>	10	352,30 650,67 ---	133,1	5,02	DNA-dependent RNA polymerase catalyzes the transcription of DNA into RNA using the four ribonucleoside triphosphates as substrates		Transcription	[4]
C8A5K6	Transketolase domain-containing protein	<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i> 65-1322		9	212,90 311,58 565,36	35,2	4,73				[12]
D9RMR1	Aspartyl/glutamyl-tRNA amidotransferase subunit B	<i>Staphylococcus aureus</i> (strain JKD6008)	<i>gatB</i>	9	593,29 848,79 572,13	51,3	5,11	Allows the formation of correctly charged Asn-tRNA(Asn) or Gln-tRNA(Gln) through the transamidation of misacylated Asp-tRNA(Asn) or Glut-tRNA(Gln)		Protein biosynthesis	[13]

Accession	Description	Species	Protein Name	Σ # Peptides	Score Rep.1 Rep.2 Rep.3	MW [kDa]	calc. pI	Function	Localization	Biological process	Ref.
D8HBY4	Trigger factor	<i>Staphylococcus aureus subsp. aureus (strain ED133)</i>	<i>tig</i>	9	932,83 768,22 913,22	48,6	4,42	Involved in protein export. Acts as a chaperone by maintaining the newly synthesized protein in an open conformation. Functions as a peptidyl-prolyl cis-trans isomerase	Cytoplasm	Cell division	[14]
H7G3Q1	3-oxoacyl-[acyl-carrier-protein] synthase 2	<i>Staphylococcus aureus subsp. aureus DR10</i>		9	542,22 486,27 293,10	43,7	5,25	Catalyzes the condensation reaction of fatty acid synthesis by the addition to an acyl acceptor of two carbons from malonyl-ACP		Fatty acid biosynthesis	[6]
A7X1Q8	Polyribonucleotide nucleotidyltransferase	<i>Staphylococcus aureus (strain Mu3 / ATCC 700698)</i>	<i>pnp</i>	8	263,64 384,72 436,56	77,3	4,97	Involved in mRNA degradation. Hydrolyzes single-stranded polyribonucleotides processively in the 3'- to 5'-direction	Cytoplasm	RNA processing	[4]
A6QEJ2	50S ribosomal protein L7/L12	<i>Staphylococcus aureus (strain Newman)</i>	<i>rpL</i>	8	4642,20 4715,09 3583,04	12,7	4,65	Seems to be the binding site for several of the factors involved in protein synthesis and appears to be essential for accurate translation	Ribosome	Translation	[2]
A7X328	Alanine--tRNA ligase	<i>Staphylococcus aureus (strain Mu3 / ATCC 700698)</i>	<i>alaS</i>	8	630,56 484,21 503,25	98,5	5,12	Catalyzes the attachment of alanine to tRNA(Ala) in a two-step reaction: alanine is first activated by ATP to form Ala-AMP and then transferred to the acceptor end of tRNA(Ala). Also edits incorrectly charged Ser-tRNA(Ala) and Gly-tRNA(Ala) via its editing domain	Cytoplasm	Protein biosynthesis	[4]
D6SDD0	Inosine-5'-monophosphate dehydrogenase	<i>Staphylococcus aureus subsp. aureus MN8</i>	<i>guaB</i>	8	296,63 163,39 335,02	52,8	5,78	Catalyzes the conversion of inosine 5'-phosphate (IMP) to xanthosine 5'-phosphate (XMP), the first committed and rate-limiting step in the de novo synthesis of guanine nucleotides, and therefore plays an important role in the regulation of cell growth		GMP biosynthetic process	[15]
H4GQ47	Carbamoyl-phosphate synthase large chain	<i>Staphylococcus aureus subsp. aureus CIG1242</i>	<i>carB</i>	8	445,86 428,50 210,03	116,9	4,96			Amino-acid biosynthesis	[16]

Accession	Description	Species	Protein Name	Σ # Peptides	Score Rep.1 Rep.2 Rep.3	MW [kDa]	calc. pI	Function	Localization	Biological process	Ref.
C8AH41	Endopeptidase	<i>Staphylococcus aureus subsp. aureus E1410</i>		8	--- 436,88 297,13	91,0	5,73			Protein metabolic process	[12]
H0C5I3	Translation initiation factor IF-2 (Fragment)	<i>Staphylococcus aureus subsp. aureus 21194</i>	<i>infB</i>	8	471,34 442,36 664,22	54,5	5,01			Protein biosynthesis	[1]
D2FKW8	Dihydrolipoyllysine-residue acetyltransferase component	<i>Staphylococcus aureus subsp. aureus D139</i>		8	508,40 599,10 420,30	45,6	5,03				[12]
D4UDU2	Pyruvate dehydrogenase E1 component	<i>Staphylococcus aureus A8819</i>		8	612,95 661,89 888,80	41,4	5,05			Glycolysis	[9]
F0D1W7	Transketolase	<i>Staphylococcus aureus O11</i>		8	357,95 349,41 378,80	71,6	5,01				[17]
G0LTV3	Putative transketolase	<i>Staphylococcus aureus subsp. aureus LGA251</i>		8	--- 349,41 378,80	72,2	5,03				[18]
A7X0K2	3-oxoacyl-[acyl-carrier-protein] synthase 3	<i>Staphylococcus aureus (strain Mu3 / ATCC 700698)</i>	<i>fabH</i>	7	576,18 530,22 611,73	33,9	5,06	Catalyzes the condensation reaction of fatty acid synthesis by the addition to an acyl acceptor of two carbons from malonyl-ACP.	Cytoplasm	Fatty acid biosynthesis	[4]
A7X5E5	50S ribosomal protein L5	<i>Staphylococcus aureus (strain Mu3 / ATCC 700698)</i>	<i>rplE</i>	7	916,75 884,05 894,18	20,3	9,32	This is 1 of the proteins that binds and probably mediates the attachment of the 5S RNA into the large ribosomal subunit, where it forms part of the central protuberance. In the 70S ribosome it contacts protein S13 of the 30S subunit (bridge B1b), connecting the 2 subunits; this bridge is implicated in subunit movement. Contacts the P site tRNA; the 5S rRNA and some of its associated proteins might help stabilize positioning of ribosome-bound tRNAs	Ribosome	Translation	[4]

Accession	Description	Species	Protein Name	Σ # Peptides	Score Rep.1 Rep.2 Rep.3	MW [kDa]	calc. pI	Function	Localization	Biological process	Ref.
D6HBS0	Adenylate kinase	<i>Staphylococcus aureus subsp. aureus 58-424</i>	<i>adk</i>	7	173,73 211,06 260,47	18,7	5,69	Catalyzes the reversible transfer of the terminal phosphate group between ATP and AMP. This small ubiquitous enzyme involved in the energy metabolism and nucleotide synthesis, is essential for maintenance and cell growth	Cytoplasm	AMP salvage	[12]
D2UMD7	6-phosphogluconate dehydrogenase, decarboxylating	<i>Staphylococcus aureus subsp. aureus H19</i>		7	187,32 213,09 258,02	51,7	5,17	Catalyzes the oxidative decarboxylation of 6-phosphogluconate to ribulose 5-phosphate and CO ₂ , with concomitant reduction of NADP to NADPH		Gluconate utilization	[12]
D8HG43	Probable malate:quinone oxidoreductase 2	<i>Staphylococcus aureus subsp. aureus (strain ED133)</i>	<i>mgo</i>	7	291,33 503,13 401,25	56,0	6,81			Tricarboxylic acid cycle	[14]
F9KVJ1	Glucosamine--fructose-6-phosphate aminotransferase [isomerizing]	<i>Staphylococcus aureus subsp. aureus 21269</i>	<i>glmS</i>	7	516,22 546,99 472,28	65,8	5,06	Catalyzes the first step in hexosamine metabolism, converting fructose-6P into glucosamine-6P using glutamine as a nitrogen source	Cytoplasm	Carbohydrate biosynthetic process	[1]
A6U106	Cell division protein ftsZ	<i>Staphylococcus aureus (strain JH1)</i>	<i>ftsZ</i>	7	638,06 584,50 539,32	41,1	4,98	Essential cell division protein that forms a contractile ring structure (Z ring) at the future cell division site. The regulation of the ring assembly controls the timing and the location of cell division. One of the functions of the FtsZ ring is to recruit other cell division proteins to the septum to produce a new cell wall between the dividing cells. Binds GTP and shows GTPase activity	Cytoplasm	Cell division	[19]
Q5HFV0	DNA-binding protein HU	<i>Staphylococcus aureus (strain COL)</i>	<i>hup</i>	6	1116,62 1193,33 1026,91	9,6	9,52	Histone-like DNA-binding protein which is capable of wrapping DNA to stabilize it, and thus to prevent its denaturation under extreme environmental conditions		DNA condensation	[20]
A7X5F6	50S ribosomal protein L22	<i>Staphylococcus aureus Mu3 / ATCC 700698)</i>	<i>rpIV</i>	6	442,06 243,32 99,68	12,8	9,92	Binds specifically to 23S rRNA; its binding is stimulated by other ribosomal proteins		Translation	[4]

Accession	Description	Species	Protein Name	Σ # Peptides	Score Rep.1 Rep.2 Rep.3	MW [kDa]	calc. pI	Function	Localization	Biological process	Ref.
A7X5F5	30S ribosomal protein S3	<i>Staphylococcus aureus</i> (strain Mu3 / ATCC 700698)	<i>rpsC</i>	6	611,71 340,49 302,11	24,1	9,76	Binds the lower part of the 30S subunit head. Binds mRNA in the 70S ribosome, positioning it for translation	Small ribosomal subunit	Translation	[4]
A7X5E2	30S ribosomal protein S8	<i>Staphylococcus aureus</i> (strain Mu3 / ATCC 700698)	<i>rpsH</i>	6	3497,81 2739,30 3113,12	14,8	9,33	One of the primary rRNA binding proteins, it binds directly to 16S rRNA central domain where it helps coordinate assembly of the platform of the 30S subunit	Ribosome	Translation	[4]
A7X2W2	Glycine--tRNA ligase	<i>Staphylococcus aureus</i> (strain Mu3 / ATCC 700698)	<i>glyQS</i>	6	184,57 200,98 256,51	53,6	5,12	Catalyzes the attachment of glycine to tRNA(Gly)	Cytoplasm	Protein biosynthesis	[4]
A7WWP0	Serine--tRNA ligase	<i>Staphylococcus aureus</i> (strain Mu3 / ATCC 700698)	<i>serS</i>	6	171,04 137,90 308,94	48,6	5,11	Catalyzes the attachment of serine to tRNA(Ser). Is also able to aminoacylate tRNA(Sec) with serine, to form the misacylated tRNA L-seryl-tRNA(Sec), which will be further converted into selenocysteinyl-tRNA(Sec)	Cytoplasm	Protein biosynthesis	[4]
H4GY77	Ribosomal protein L1	<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i> CIG1500	<i>rplA</i>	6	1602,50 1274,69 1337,89	24,5	8,43	Binds directly to 23S rRNA. The L1 stalk is quite mobile in the ribosome, and is involved in E site tRNA release	Large ribosomal subunit	Translation	[16]
B3VKN3	50S ribosome protein L2	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>rap</i>	6	1516,89 1271,88 1080,92	30,0	10,76	One of the primary rRNA binding proteins. Required for association of the 30S and 50S subunits to form the 70S ribosome, for tRNA binding and peptide bond formation. It has been suggested to have peptidyltransferase activity; this is somewhat controversial. Makes several contacts with the 16S rRNA in the 70S ribosome	Large ribosomal subunit	Translation	[21]
H4GGS7	Isoleucine--tRNA ligase	<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i> IS-189	<i>ileS</i>	6	137,48 --- 168,16	97,4	5,45	Catalyzes the attachment of isoleucine to tRNA(Ile).	Cytoplasm	Protein biosynthesis	[10]

Accession	Description	Species	Protein Name	Σ # Peptides	Score Rep.1 Rep.2 Rep.3	MW [kDa]	calc. pI	Function	Localization	Biological process	Ref.
H4BZU1	Acetate kinase	<i>Staphylococcus aureus subsp. aureus CIGC341D</i>	<i>ackA</i>	6	269,87 297,29 232,52	41,8	5,68		Cytoplasm	Acetyl-CoA biosynthetic process	[16]
H4BY92	Carbamoyl-phosphate synthase small chain	<i>Staphylococcus aureus subsp. aureus CIGC341D</i>	<i>carA</i>	6	370,98 271,07 308,46	36,4	6,47			Amino-acid biosynthesis	[16]
K0M036	Glutamine synthetase	<i>Staphylococcus aureus subsp. aureus ST228</i>	<i>glnA</i>	6	--- 223,89 384,72	46,2	5,10		Cytoplasm	Glutamine biosynthetic process	[22]
A7X6Y6	Fructose-bisphosphate aldolase class 1	<i>Staphylococcus aureus (strain Mu3 / ATCC 700698)</i>	<i>fda</i>	5	410,80 370,70 269,28	33,0	4,98			Glycolysis	[4]
Q2FH36	Cold shock protein CspA	<i>Staphylococcus aureus (strain USA300)</i>	<i>cspA</i>	5	364,66 246,25 352,05	7,3	4,56		Cytoplasm		[23]
A6U305	Glutamyl-tRNA(Gln) amidotransferase subunit A	<i>Staphylococcus aureus (strain JH1)</i>	<i>gatA</i>	5	115,32 175,89 137,89	52,8	5,20	Allows the formation of correctly charged Gln-tRNA(Gln) through the transamidation of misacylated Glu-tRNA(Gln) in organisms which lack glutaminyl-tRNA synthetase. The reaction takes place in the presence of glutamine and ATP through an activated gamma-phospho-Glu-tRNA(Gln)		Protein biosynthesis	[19]
A7WZS6	Phosphoglycerate kinase	<i>Staphylococcus aureus (strain Mu3 / ATCC 700698)</i>	<i>pgk</i>	5	--- 711,68 587,03	42,6	5,33		Cytoplasm	Glycolysis	[4]
A7X5D9	50S ribosomal protein L18	<i>Staphylococcus aureus (strain Mu3 / ATCC 700698)</i>	<i>rplR</i>	5	283,13 335,12 156,24	13,1	9,95		Ribosome	Translation	[4]

Accession	Description	Species	Protein Name	Σ # Peptides	Score Rep.1 Rep.2 Rep.3	MW [kDa]	calc. pI	Function	Localization	Biological process	Ref.
Q6GFY8	30S ribosomal protein	<i>Staphylococcus aureus</i> (strain MRSA252)	rpsD	5	822,65 686,78 562,61	23,0	10,02	One of the primary rRNA binding proteins, it binds directly to 16S rRNA where it nucleates assembly of the body of the 30S subunit	Small ribosomal subunit	Translation	[13]
A7WY58	30S ribosomal protein S6	<i>Staphylococcus aureus</i> (strain Mu3 / ATCC 700698)	rpsF	5	549,05 304,64 425,21	11,6	5,19	Binds together with S18 to 16S ribosomal RNA	Ribosome	Translation	[4]
A7X3J9	Leucine--tRNA ligase	<i>Staphylococcus aureus</i> (strain Mu3 / ATCC 700698)	leuS	5	390,16 --- 533,34	91,6	5,16		Cytoplasm	Protein biosynthesis	[4]
E5TEU4	50S ribosomal protein L25	<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i> CGS00	ctc	5	568,56 254,64 612,82	23,3	4,46	This is one of the proteins that binds to the 5S RNA in the ribosome where it forms part of the central protuberance	Ribosome	Translation	[24]
D2FM12	30S ribosomal protein	<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i> D139	SATG	5	363,13 --- 186,85	43,2	4,60	This is one of the proteins that binds to the 5S RNA in the ribosome where it forms part of the central protuberance	Ribosome	Translation	[12]
F5WIC9	Putative phosphoenolpyruvate-protein phosphotransferase	<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i> 21318	SA21318_0810	5	151,91 156,78 347,20	47,1	4,86		Cytoplasm	Phosphoenolpyruvate-dependent sugar phosphotransferase system	[1]
G7ZLX6	Phosphoglycerate kinase	<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i> MSHR1132	pgk	5	637,36 --- ---	42,6	5,17		Cytoplasm	Glycolysis	[25]
D2GEM7	FeS assembly ATPase SufC	<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i> Btn1260		5	425,80 414,18 710,63	28,3	4,97			ATP catabolic process	[12]
D2GJI4	30S ribosomal protein	<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i> Btn1260		5	625,93 825,65 547,34	13,5	10,14		Ribosome	Translation	[12]

Accession	Description	Species	Protein Name	Σ # Peptides	Score Rep.1 Rep.2 Rep.3	MW [kDa]	calc. pI	Function	Localization	Biological process	Ref.
F0D6Q9	Alkyl hydroperoxide reductase subunit F	<i>Staphylococcus aureus O11</i>	<i>ahpF</i>	5	364,72 249,79 172,90	54,7	4,79			Cell redox homeostasis	[17]
C5N0S8	DNA gyrase subunit	<i>Staphylococcus aureus subsp. aureus USA300_TCH95</i>	<i>gyrA</i>	5	254,89 217,91 356,18	98,9	5,17	DNA gyrase negatively supercoils closed circular double-stranded DNA in an ATP-dependent manner and also catalyzes the interconversion of other topological isomers of double-stranded DNA rings, including catenanes and knotted rings	Cytoplasm	DNA topological change	[5]
Q2FZ09	Protein RecA	<i>Staphylococcus aureus (strain NCTC 8325)</i>	<i>recA</i>	5	178,73 298,33 251,52	34,9	5,11	Can catalyze the hydrolysis of ATP in the presence of single-stranded DNA, the ATP-dependent uptake of single-stranded DNA by duplex DNA, and the ATP-dependent hybridization of homologous single-stranded DNAs. It interacts with LexA causing its activation and leading to its autocatalytic cleavage	Cytoplasm	DNA damage	[26]
H4GG37	Aconitate hydratase 1	<i>Staphylococcus aureus subsp. aureus IS-189</i>	<i>acnA</i>	5	181,69 322,82 273,45	91,5	5,05			Metabolic process	[10]
D2GGI7	Transcriptional repressor	<i>Staphylococcus aureus subsp. aureus Btn1260</i>		5	240,19 285,09 636,91	22,9	8,16				[12]
H4G2K3	GMP synthase (Glutamine-hydrolyzing), C-terminal domain protein	<i>Staphylococcus aureus subsp. aureus IS-160</i>		5	472,30 409,43 ---	52,9	5,15		Cytoplasm	GMP biosynthetic process	[10]
Q5TKS2	Beta-ketoacyl-ACP reductase (Fragment)	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>fabG</i>	5	347,39 578,72 408,32	24,6	5,30			Fatty acid biosynthetic process	[27]
H4GB84	Ribose-phosphate diphosphokinase	<i>Staphylococcus aureus subsp. aureus IS-189</i>	<i>prs</i>	5	275,18 538,94 183,92	33,5	6,06		Cytoplasm	Nucleotide biosynthesis	[10]

Accession	Description	Species	Protein Name	Σ # Peptides	Score Rep.1 Rep.2 Rep.3	MW [kDa]	calc. pI	Function	Localization	Biological process	Ref.
D2FNZ4	DEAD-box ATP-dependent RNA helicase	<i>Staphylococcus aureus subsp. aureus D139</i>		5	150,63 177,67 482,43	57,0	9,52				[12]
H0ATE5	Phosphate acetyltransferase OS= GN=pta PE=4 SV=1 - [H0ATE5_STAAU]	<i>Staphylococcus aureus subsp. aureus 21202</i>	pta	5	537,64 452,98 590,91	34,9	4,93				[1]
A7X5D0	Translation initiation factor IF-1	<i>Staphylococcus aureus (strain Mu3 / ATCC 700698)</i>	infA	4	514,34 474,92 573,14	8,3	7,42	No specific function has so far been attributed to this initiation factor; however, it seems to stimulate more or less all the activities of the other two initiation factors, IF-2 and IF-3	Cytoplasm	Protein biosynthesis	[4]
A7WXP7	L-lactate dehydrogenase 1	<i>Staphylococcus aureus (strain Mu3 / ATCC 700698)</i>	ldh1	4	--- 292,94 463,99	34,5	5,07	Appears to be the primary factor that allows S.aureus growth during nitrosative stress in both aerobically and anaerobically cultured cells	Cytoplasm	Stress response	[4]
Q5HH02	Phosphocarrier protein HPr	<i>Staphylococcus aureus (strain COL)</i>	ptsH	4	108,97 292,61 184,43	9,5	4,67	General (non sugar-specific) component of the phosphoenolpyruvate-dependent sugar phosphotransferase system (sugar PTS). This major carbohydrate active-transport system catalyzes the phosphorylation of incoming sugar substrates concomitantly with their translocation across the cell membrane. The phosphoryl group from phosphoenolpyruvate (PEP) is transferred to the phosphoryl carrier protein HPr by enzyme I. Phospho-HPr then transfers it to the permease (enzymes II/III)	Cytoplasm	Phosphotransferase system	[20]
A7WYW2	50S ribosomal protein L10	<i>Staphylococcus aureus (strain Mu3 / ATCC 700698)</i>	rplJ	4	861,04 496,04 739,15	17,7	4,83		Ribosome	Ribosome biogenesis	[4]

Accession	Description	Species	Protein Name	Σ # Peptides	Score Rep.1 Rep.2 Rep.3	MW [kDa]	calc. pI	Function	Localization	Biological process	Ref.
A7X5D4	50S ribosomal protein L15	<i>Staphylococcus aureus</i> (strain Mu3 / ATCC 700698)	rplO	4	932,06 1091,45 862,38	15,6	10,29	Binds to the 23S rRNA	Large ribosomal subunit	Translation	[4]
A7X5E1	50S ribosomal protein L6	<i>Staphylococcus aureus</i> (strain Mu3 / ATCC 700698)	rplF	4	224,86 337,93 296,34	19,8	9,54	This protein binds to the 23S rRNA, and is important in its secondary structure. It is located near the subunit interface in the base of the L7/L12 stalk, and near the tRNA binding site of the peptidyltransferase center	Ribosome	Translation	[4]
A7X344	Aspartate--tRNA ligase	<i>Staphylococcus aureus</i> (strain Mu3 / ATCC 700698)	aspS	4	--- --- 213,38	66,6	5,07		Cytoplasm	Protein biosynthesis	[4]
I7IJ52	DNA-directed RNA polymerase alpha chain	<i>Staphylococcus equorum</i> subsp. <i>equorum</i> Mu2	rpoA	4	184,09 366,00 ---	34,9	4,79	DNA-dependent RNA polymerase catalyzes the transcription of DNA into RNA using the four ribonucleoside triphosphates as substrates		Transcription	[28]
F9KK63	Tyrosine--tRNA ligase	<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i> 21259	tyrS	4	--- 398,01 337,51	39,6	5,48	Catalyzes the attachment of tyrosine to tRNA(Tyr) in a two-step reaction: tyrosine is first activated by ATP to form Tyr-AMP and then transferred to the acceptor end of tRNA(Tyr)	Cytoplasm	Protein biosynthesis	[29]
H0C8S8	ATP-dependent zinc metalloprotease FtsH	<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i> 21194	hflB	4	433,60 242,72 ---	57,4	8,22	Acts as a processive, ATP-dependent zinc metalloprotease for both cytoplasmic and membrane proteins. Plays a role in the quality control of integral membrane proteins		ATP catabolic process	[1]
D2GBK7	UDP-N-acetylglucosamine 1-carboxyvinyltransferase 1	<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i> WW2703/97	murA	4	250,21 111,37 238,93	45,0	5,94	Cell wall formation. Adds enolpyruvyl to UDP-N-acetylglucosamine	Cytoplasm	Cell division	[12]
F0DD79	Extracellular AA binding ABC transporter	<i>Staphylococcus aureus</i> O46		4	--- 317,18 ---	27,3	9,01				[17]

Accession	Description	Species	Protein Name	Σ # Peptides	Score Rep.1 Rep.2 Rep.3	MW [kDa]	calc. pI	Function	Localization	Biological process	Ref.
D2GF73	GTP-binding protein TypA/BipA	<i>Staphylococcus aureus subsp. aureus Btn1260</i>		4	318,75 210,95 309,46	69,1	5,01		Intracellular	GTP catabolic process	[12]
G0LU67	Asparagine--tRNA	<i>Staphylococcus aureus subsp. aureus LGA251</i>	<i>asnS</i>	4	105,72 167,61 104,20	49,1	5,48		Cytoplasm	Protein biosynthesis	[18]
C5N2X9	Branched-chain-amino-acid aminotransferase	<i>Staphylococcus aureus subsp. aureus USA300_TCH959</i>	<i>ilvE</i>	4	224,08 405,71 276,46	40,0	4,98			Pisoleucine biosynthetic process	[5]
H3TQ22	50S ribosomal protein L3	<i>Staphylococcus aureus subsp. aureus 21342</i>	<i>rplC</i>	4	288,10 469,43 374,90	23,6	9,80	One of the primary rRNA binding proteins, it binds directly near the 3'-end of the 23S rRNA, where it nucleates assembly of the 50S subunit	Ribosome	Translation	[1]
J0UNH6	Leucyl-tRNA synthetase	<i>Staphylococcus aureus subsp. aureus str. Newbould 305</i>	<i>leuS</i>	4	390,16 431,41 --	91,7	5,19		Cytoplasm	Protein biosynthesis	[30]
C8KSI5	Putative uncharacterized protein	<i>Staphylococcus aureus D30</i>		4	326,57 --- ---	52,8	4,72				[31]
C8KSN6	6-phosphofructokinase	<i>Staphylococcus aureus D30</i>	<i>pfkA</i>	4	363,61 --- ---	33,4	5,73		Cytoplasm	Glycolysis	[31]
H0CE91	Protein GrpE	<i>Staphylococcus aureus subsp. aureus 21331</i>	<i>grpE</i>	4	185,17 179,33 141,53	24,0	4,56	Participates actively in the response to hyperosmotic and heat shock by preventing the aggregation of stress-denatured proteins, in association with DnaK and GrpE.	Cytoplasm	Stress response	[1]
H7G2S8	Putative exported	<i>Staphylococcus aureus subsp. aureus DR10</i>		4	230,45 166,12 ---	49,5	9,45				[6]
D2N6B2	Phenylalanine--tRNA ligase beta subunit	<i>S aureus (strain MRSA ST398 / isolate S0385)</i>	<i>pheT</i>	4	120,42 234,31 ---	88,9	4,84		Cytoplasm	Protein biosynthesis	[32]

Accession	Description	Species	Protein Name	Σ # Peptides	Score Rep.1 Rep.2 Rep.3	MW [kDa]	calc. pI	Function	Localization	Biological process	Ref.
A5IQ66	Cysteine synthase	<i>Staphylococcus aureus</i> (strain JH9)		4	--- 186,61 487,53	33,0	5,25			Amino-acid biosynthesis	[19]
F9L1N0	S-adenosylmethionine synthase	<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i> 21269		4	245,43 245,19 171,58	43,6	5,01	Catalyzes the formation of S-adenosylmethionine from methionine and ATP	Cytoplasm	One-carbon metabolism	[1]
F0DEY0	Lysyl-tRNA synthetase (Fragment)	<i>Staphylococcus aureus</i> O46		4	189,12 179,10 ---	53,2	5,19		Cytoplasm	Protein biosynthesis	[17]
G7ZP60	Threonine--tRNA ligase	<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i> MSHR1132	thrS	4	242,72 250,16 ---	74,4	5,39		Cytoplasm	Protein biosynthesis	[25]
G8V062	Putative uncharacterized protein	<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i> 11819-97		4	234,03 216,27 166,73	35,2	4,73				[33]
H3YH83	Fructose-bisphosphate aldolase	<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i> IS-105	fba	4	298,27 471,55 179,60	24,7	5,49			Carbohydrate metabolic process	[10]
H0CK32	FeS assembly protein SufB (Fragment)	<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i> 21334	sufB	4	147,13 166,47 322,05	51,6	5,25				[1]
D2GJ33	GTP-binding protein YchF	<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i> Btn1260		4	--- 420,24 217,88	40,6	4,72				[12]
K9ALG1	GMP synthase	<i>Staphylococcus massiliensis</i>	guaA	4	--- --- 456,40	57,7	4,94	Catalyzes the synthesis of GMP from XMP	Cytoplasm	GMP biosynthesis	[34]
A7X2Q9	Elongation factor P	<i>Staphylococcus aureus</i> (strain Mu3 / ATCC 700698)	efp	3	109,67 138,81 202,34	20,5	4,82	Involved in peptide bond synthesis. Stimulates efficient translation and peptide-bond synthesis on native or reconstituted 70S ribosomes in vitro. Probably functions indirectly by altering the affinity of the ribosome for aminoacyl-tRNA, thus increasing their	Cytoplasm	Protein biosynthesis	[4]

Accession	Description	Species	Protein Name	Σ # Peptides	Score Rep.1 Rep.2 Rep.3	MW [kDa]	calc. pI	Function	Localization	Biological process	Ref.
								reactivity as acceptors for peptidyl transferase			
A7X524	Phosphoglucosamine mutase	<i>Staphylococcus aureus</i> (strain Mu3 / ATCC 700698)	glmM	3	--- 168,97 ---	49,3	4,77	Catalyzes the conversion of glucosamine-6-phosphate to glucosamine-1-phosphate		Carbohydrate metabolic process	[4]
A7X656	2,3-bisphosphoglycerate-dependent phosphoglycerate mutase	<i>Staphylococcus aureus</i> (strain Mu3 / ATCC 700698)	gpmA	3	327,15 210,66 ---	26,7	5,39	Catalyzes the interconversion of 2-phosphoglycerate and 3-phosphoglycerate		Glycolysis	[4]
A6U172	ATP-dependent protease ATPase subunit HslU	<i>Staphylococcus aureus</i> (strain JH1)	hslU	3	236,89 181,42 ---	52,3	5,31	ATPase subunit of a proteasome-like degradation complex; this subunit has chaperone activity. The binding of ATP and its subsequent hydrolysis by HslU are essential for unfolding of protein substrates subsequently hydrolyzed by HslV. HslU recognizes the N-terminal part of its protein substrates and unfolds these before they are guided to HslV for hydrolysis	Cytoplasm	Stress response	[19]
A7X451	Probable manganese-dependent inorganic pyrophosphatase	<i>Staphylococcus aureus</i> (strain Mu3 / ATCC 700698)	ppaC	3	673,03 692,71 504,56	34,0	4,86		Cytoplasm		[4]
A7X5C3	50S ribosomal protein L17	<i>Staphylococcus aureus</i> (strain Mu3 / ATCC 700698)	rplQ	3	318,88 322,38 205,36	13,7	9,85		Ribosome	Translation	[4]
A7X3A1	50S ribosomal protein L20	<i>Staphylococcus aureus</i> (strain Mu3 / ATCC 700698)	rplT	3	224,61 --- 360,46	13,7	11,25	Binds directly to 23S ribosomal RNA and is necessary for the in vitro assembly process of the 50S ribosomal subunit. It is not involved in the protein synthesizing functions of that subunit	Ribosome	Translation	[4]

Accession	Description	Species	Protein Name	Σ # Peptides	Score Rep.1 Rep.2 Rep.3	MW [kDa]	calc. pI	Function	Localization	Biological process	Ref.
A7X5G2	50S ribosomal protein L4	<i>Staphylococcus aureus</i> (strain Mu3 / ATCC 700698)	<i>rplD</i>	3	1159,52 1102,93 1049,37	22,5	9,91	One of the primary rRNA binding proteins, this protein initially binds near the 5'-end of the 23S rRNA. MF_01328 Forms part of the polypeptide exit tunnel			[4]
A6QE10	Glutamate--tRNA ligase	<i>Staphylococcus aureus</i> (strain Newman)	<i>gltX</i>	3	--- 314,07 525,88	56,3	5,31	Catalyzes the attachment of glutamate to tRNA(Glu) in a two-step reaction	Cytoplasm	Protein biosynthesis	[2]
A7WWQ5	Transcriptional regulatory protein WalR	<i>Staphylococcus aureus</i> (strain Mu3 / ATCC 700698)	<i>walR</i>	3	--- 256,09 ---	27,2	5,19	Member of the two-component regulatory system WalK/WalR that regulates genes involved in autolysis, biofilm formation and cell wall metabolism	Cytoplasm	Transcription	[4]
C8M2K3	Orotate phosphoribosyltransferase	<i>Staphylococcus aureus</i> A8115	<i>pyrE</i>	3	155,04 --- ---	22,0	5,15	Catalyzes the transfer of a ribosyl phosphate group from 5-phosphoribose 1-diphosphate to orotate, leading to the formation of orotidine monophosphate (OMP)		Pyrimidine biosynthesis	[9]
H4BY75	Cell division protein FtsA	<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i> CIGC341D	<i>ftsA</i>	3	343,07 --- ---	49,4	4,56			Cell division	[16]
H7G2V6	6,7-dimethyl-8-ribityllumazine synthase	<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i> DR10	<i>ribH</i>	3	--- 205,95 99,52	16,2	5,57	Catalyzes the formation of 6,7-dimethyl-8-ribityllumazine by condensation of 5-amino-6-(D-ribitylamino)uracil with 3,4-dihydroxy-2-butanone 4-phosphate. This is the penultimate step in the biosynthesis of riboflavin		Riboflavin biosynthesis	[6]
I0XH14	Ribosomal protein S2	<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i> CO-23	<i>rpsB</i>	3	177,46 324,84 315,42	22,4	4,88		Small ribosomal subunit	Translation	[10]
C8M6R5	Alcohol dehydrogenase GroES domain-containing protein	<i>Staphylococcus aureus</i> A9299		3	--- 207,71 276,42	36,0	5,52				[9]

Accession	Description	Species	Protein Name	Σ # Peptides	Score Rep.1 Rep.2 Rep.3	MW [kDa]	calc. pI	Function	Localization	Biological process	Ref.
D6HHK6	50S ribosomal protein L21	<i>Staphylococcus aureus subsp. aureus 58-424</i>		3	525,78 545,15 427,34	8,5	5,86	This protein binds to 23S rRNA in the presence of protein L20	Ribosome	Translation	[12]
C8LK21	ABC transporter ATP-binding protein	<i>Staphylococcus aureus A6224</i>		3	203,86 187,82 116,51	60,2	4,96				[9]
H0CEK9	Probable thiol peroxidase	<i>Staphylococcus aureus subsp. aureus 21331</i>	<i>tpx</i>	3	147,53 209,22 ---	18,0	4,75	Has antioxidant activity. Could remove peroxides or H2O2		Cell redox homeostasis	[1]
F5WI94	Pyruvate carboxylase	<i>Staphylococcus aureus subsp. aureus 21318</i>		3	--- --- 244,68	92,0	5,27			Gluconeogenesis	[1]
G7ZQT2	Alkaline shock protein 23	<i>Staphylococcus aureus subsp. aureus MSHR1132</i>		3	--- 1875,00 ---	19,2	5,20				[25]
F9KWP0	FAH family protein	<i>Staphylococcus aureus subsp. aureus 21269</i>		3	--- --- 157,58	33,1	5,06				[1]
C5N089	Pyruvate oxidase	<i>Staphylococcus aureus subsp. aureus USA300_TCH959</i>		3	--- 216,48 248,52	63,6	7,62				[5]
H4HJY2	3-methyl-2-oxobutanoate hydroxymethyltransferase	<i>Staphylococcus aureus subsp. aureus CIG290</i>	<i>panB</i>	3	--- 183,74 117,61	28,2	6,15	Catalyzes the reversible reaction in which hydroxymethyl group from 5,10-methylenetetrahydrofolate is transferred onto alpha-ketoisovalerate to form ketopantoate		Pantothenate biosynthesis	[16]
Q9KX07	Thioredoxin reductase (Fragment)	<i>Staphylococcus aureus</i>		3	251,26 --- 151,06	31,6	5,76		Cytoplasm	Removal of superoxide radicals	[35]
G7ZP92	6-phosphofructokinase	<i>Staphylococcus aureus subsp. aureus MSHR1132</i>	<i>pfkA</i>	3	--- --- 208,16	34,8	5,60		Cytoplasm	Glycolysis	[25]

Accession	Description	Species	Protein Name	Σ # Peptides	Score Rep.1 Rep.2 Rep.3	MW [kDa]	calc. pI	Function	Localization	Biological process	Ref.
H3YWE9	Translation initiation factor IF-3 (Fragment)	<i>Staphylococcus aureus subsp. aureus IS-122</i>	<i>infC</i>	3	251,74 --- ---	19,5	9,66	IF-3 binds to the 30S ribosomal subunit and shifts the equilibrium between 70S ribosomes and their 50S and 30S subunits in favor of the free subunits, thus enhancing the availability of 30S subunits on which protein synthesis initiation begins	Cytoplasm	Protein biosynthesis	[10]
D0K2Y1	tRNA uridine 5-carboxymethylaminomethyl modification enzyme MnmG	<i>Staphylococcus aureus (strain ED98)</i>	<i>gidA</i>	3	333,87 298,35 348,87	67,0	5,41	NAD-binding protein involved in the addition of a carboxymethylaminomethyl (cmnm) group at the wobble position (U34) of certain tRNAs, forming tRNA-cmnm5s2U34	Cytoplasm	tRNA processing	[36]
D0K9M2	3-hexulose-6-phosphate synthase	<i>Staphylococcus aureus (strain ED98)</i>	<i>hxlA</i>	3	191,50 260,76 236,61	22,4	4,75			Carbohydrate metabolic process	[36]
C8ACW8	FtsK/SpoIIIE family protein	<i>Staphylococcus aureus subsp. aureus 68-397</i>		3	129,14 110,75 ---	136,9	5,19		Integral to membrane	Cell division	[12]
I0TRI3	30S ribosomal protein S5	<i>Staphylococcus aureus subsp. aureus IS-M</i>	<i>rpsE</i>	3	--- --- 250,24	10,8	9,63		Ribosome	Translation	[1]
F9JTS2	Arginine--tRNA ligase (Fragment)	<i>Staphylococcus aureus subsp. aureus 21200</i>	<i>argS</i>	3	340,04 315,32 144,85	45,9	5,06		Cytoplasm	Protein biosynthesis	[1]
H1SKC6	Probable glycine dehydrogenase [decarboxylating] subunit 1	<i>Staphylococcus aureus subsp. aureus 21252</i>	<i>gcvPA</i>	3	--- 144,39 144,90	49,7	5,20	The glycine cleavage system catalyzes the degradation of glycine. The P protein binds the alpha-amino group of glycine through its pyridoxal phosphate cofactor; CO ₂ is released and the remaining methylamine moiety is then transferred to the lipoamide cofactor of the H protein		Nucleoside metabolic process	[1]
H3XPT4	DNA topoisomerase IV subunit A	<i>Staphylococcus aureus subsp. aureus IS-55</i>	<i>parC</i>	3	137,66 --- 183,28	61,4	6,46			DNA topological change	[10]

Accession	Description	Species	Protein Name	Σ # Peptides	Score Rep.1 Rep.2 Rep.3	MW [kDa]	calc. pI	Function	Localization	Biological process	Ref.
H4HA20	Deoxyribose-phosphate aldolase (Fragment)	<i>Staphylococcus aureus subsp. aureus CIG1835</i>		3	235,95 --- 103,24	16,8	4,59	Catalyzes a reversible aldol reaction between acetaldehyde and D-glyceraldehyde 3-phosphate to generate 2-deoxy-D-ribose 5-phosphate	Cytoplasm	Deoxyribonucleotide catabolic process	[16]
C5N5L3	Penicillin-binding protein 2 (Fragment)	<i>Staphylococcus aureus subsp. aureus USA300_TCH959</i>	<i>pbp2</i>	3	--- --- 249,40	53,6	9,07			Peptidoglycan biosynthetic process	[5]
H4AA54	Alkyl hydroperoxide reductase subunit C	<i>Staphylococcus aureus subsp. aureus CIG1165</i>		3	698,39 835,60 525,81	9,8	5,14			Response to oxidative stress	[16]
F9K418	DivIVA domain protein	<i>Staphylococcus aureus subsp. aureus 21201</i>		3	209,40 211,22 ---	17,2	7,20		Cytoplasm	Cell division	[1]
D9RLJ5	Putative uncharacterized protein	<i>Staphylococcus aureus (strain JKD6008)</i>		3	180,54 --- 169,66	14,0	9,38				[37]
D1GM42	Formate acetyltransferase	<i>Staphylococcus aureus (strain TW20 / 0582)</i>		3	--- 236,70 341,16	84,8	5,48		Cytoplasm	Carbohydrate metabolic process	[13]
H4HLJ7	Ribosomal protein S7	<i>Staphylococcus aureus subsp. aureus CIG290</i>	<i>rpsG</i>	3	291,55 --- 140,69	14,4	9,57	One of the primary rRNA binding proteins, it binds directly to 16S rRNA where it nucleates assembly of the head domain of the 30S subunit. Is located at the subunit interface close to the decoding center, probably blocks exit of the E-site tRNA	Small ribosomal subunit	Translation	[16]
F9KB66	Transcription antitermination protein nusG	<i>Staphylococcus aureus subsp. aureus 21235</i>	<i>nusG</i>	3	239,21 223,68 192,23	11,9	4,64	Influences transcription termination and antitermination. Acts as a component of the transcription complex, and interacts with the termination factor rho and RNA polymerase		Transcription	[1]
C8AH26	Predicted protein	<i>Staphylococcus aureus subsp. aureus E1410</i>		3	323,31 389,10 402,85	17,3	5,41		Cytoplasm	Purine ribonucleoside salvage	[12]

Accession	Description	Species	Protein Name	Σ # Peptides	Score Rep.1 Rep.2 Rep.3	MW [kDa]	calc. pI	Function	Localization	Biological process	Ref.
D6LXT7	Cell cycle protein gpsB	<i>Staphylococcus aureus subsp. aureus EMRSA16</i>		3	336,00 167,30 237,53	12,6	7,25	Divisome component that associates with the complex late in its assembly, after the Z-ring is formed, and is dependent on DivIC and PBP2B for its recruitment to the divisome. Together with EzrA, is a key component of the system that regulates PBP1 localization during cell cycle progression	Cytoplasm	Cell division	[12]
G5JHJ5	Lysine--tRNA ligase	<i>Staphylococcus simiae CCM 7213</i>	lysS	3	--- --- 245,11	57,0	5,33		Cytoplasm	Protein biosynthesis	[38]
H0AU98	Putative uncharacterized protein	<i>Staphylococcus aureus subsp. aureus 21202</i>		3	335,08 --- ---	15,0	4,83				[1]
F9K0P2	Malonyl CoA-acyl carrier protein transacylase	<i>Staphylococcus aureus subsp. aureus 21201</i>	fabD	3	--- 204,09 ---	31,0	5,03				[1]
H4G487	2-C-methyl-D-erythritol 4-phosphate cytidyltransferase (Fragment)	<i>Staphylococcus aureus subsp. aureus IS-160</i>		3	--- 168,21 170,78	25,5	5,88	Catalyzes the formation of 4-diphosphocytidyl-2-C-methyl-D-erythritol from CTP and 2-C-methyl-D-erythritol 4-phosphate (MEP)		Isoprene biosynthesis	[10]
H3VN39	Alkaline shock protein 23	<i>Staphylococcus hominis VCU122</i>	asp	3	--- --- 1760,45	20,7	5,20				[1]
K0TS63	Triosephosphate isomerase	<i>Staphylococcus arlettae CVD059</i>	tpiA	3	388,79 --- ---	27,3	4,77		Cytoplasm	Gluconeogenesis	[39]
J9URX8	Uncharacterized protein	<i>Staphylococcus aureus 08BA02176</i>		3	231,03 377,64 346,57	48,4	5,44				[40]
A7X4J3	10 kDa chaperonin	<i>Staphylococcus aureus (strain Mu3 / ATCC 700698)</i>	groS	2	--- 144,43 139,06	10,4	4,92	Binds to Cpn60 in the presence of Mg-ATP and suppresses the ATPase activity of the latter	Cytoplasm	Protein folding	[4]

Accession	Description	Species	Protein Name	Σ # Peptides	Score Rep.1 Rep.2 Rep.3	MW [kDa]	calc. pI	Function	Localization	Biological process	Ref.
A7WZR9	ATP-dependent Clp protease proteolytic subunit	<i>Staphylococcus aureus</i> (strain Mu3 / ATCC 700698)	clpP	2	162,91 --- ---	21,5	5,26	Cleaves peptides in various proteins in a process that requires ATP hydrolysis. Has a chymotrypsin-like activity. Plays a major role in the degradation of misfolded proteins	Cytoplasm	Proteolysis	[4]
A7X2R9	Probable glycine dehydrogenase	<i>Staphylococcus aureus</i>	gcvPB	2	117,48 --- ---	54,7	5,74	The glycine cleavage system catalyzes the degradation of glycine		Glycine decarboxylation system	[4]
A7X319	Transcription elongation factor GreA	<i>Staphylococcus aureus</i> (strain Mu3 / ATCC 700698)	greA	2	172,61 --- ---	17,7	4,59	Necessary for efficient RNA polymerase transcription elongation past template-encoded arresting sites. The arresting sites in DNA have the property of trapping a certain fraction of elongating RNA polymerases that pass through, resulting in locked ternary complexes. Cleavage of the nascent transcript by cleavage factors such as GreA or GreB allows the resumption of elongation from the new 3'terminus. GreA releases sequences of 2 to 3 nucleotides		Transcription	[4]
A7X2A9	Peptide methionine sulfoxide reductase MsrB	<i>Staphylococcus aureus</i> (strain Mu3 / ATCC 700698)	msrB	2	--- 199,88 ---	16,3	4,86				[4]
A7WYT2	Glutamine amidotransferase subunit PdxT	<i>Staphylococcus aureus</i> (strain Mu3 / ATCC 700698)	pdxT	2	95,10 --- ---	20,6	6,04	Involved in the hydrolysis of glutamine to glutamate and ammonia. Channels an ammonia molecule to PdxS		Glutamine catabolic process	[4]
A7X1F5	Orotidine 5'-phosphate decarboxylase	<i>Staphylococcus aureus</i> (strain Mu3 / ATCC 700698)	pyrF	2	152,37 --- ---	25,6	6,28	Catalyzes the decarboxylation of orotidine 5'-monophosphate (OMP) to uridine 5'-monophosphate (UMP)		Pyrimidine biosynthesis	[4]
A7X4W4	Peptide chain release factor 1	<i>Staphylococcus aureus</i> (strain Mu3 / ATCC 700698)	prfA	2	181,45 159,01 ---	40,3	4,91	Peptide chain release factor 1 directs the termination of translation in response to the peptide chain termination codons UAG and UAA	Cytoplasm	Protein biosynthesis	[4]

Accession	Description	Species	Protein Name	Σ # Peptides	Score Rep.1 Rep.2 Rep.3	MW [kDa]	calc. pI	Function	Localization	Biological process	Ref.
A7WYW0	50S ribosomal protein L11	<i>Staphylococcus aureus</i> (strain Mu3 / ATCC 700698)	<i>rplK</i>	2	--- 244,14 412,82	14,9	8,98	This protein binds directly to 23S ribosomal RNA	Ribosome	Translation	[4]
A7X5F4	50S ribosomal protein L16	<i>Staphylococcus aureus</i> (strain Mu3 / ATCC 700698)	<i>rplP</i>	2	--- --- 403,66	16,2	10,64	Binds 23S rRNA and is also seen to make contacts with the A and possibly P site tRNAs	Ribosome	Translation	[4]
A7X5F2	50S ribosomal protein L29	<i>Staphylococcus aureus</i> (strain Mu3 / ATCC 700698)	<i>rpmC</i>	2	130,76 145,08 ---	8,1	9,60		Ribosome	Translation	[4]
A7X5D6	50S ribosomal protein L30	<i>Staphylococcus aureus</i> (strain Mu3 / ATCC 700698)	<i>rpmD</i>	2	--- 312,90 383,19	6,5	10,11		Large ribosomal subunit	Translation	[4]
A7X4W8	50S ribosomal protein L31 type B	<i>Staphylococcus aureus</i> (strain Mu3 / ATCC 700698)	<i>rpmE2</i>	2	--- 219,28 158,17	9,7	8,44		Ribosome	Translation	[4]
A7X5C7	30S ribosomal protein S13	<i>Staphylococcus aureus</i> (strain Mu3 / ATCC 700698)	<i>rpsM</i>	2	526,83 --- 487,27	13,7	10,42	Located at the top of the head of the 30S subunit, it contacts several helices of the 16S rRNA. In the 70S ribosome it contacts the 23S rRNA (bridge B1a) and protein L5 of the 50S subunit (bridge B1b), connecting the 2 subunits; these bridges are implicated in subunit movement. Contacts the tRNAs in the A and P-sites	Ribosome	Translation	[4]
A7X1Q7	30S ribosomal protein S15	<i>Staphylococcus aureus</i> (strain Mu3 / ATCC 700698)	<i>rpsO</i>	2	--- 265,75 ---	10,6	10,51	One of the primary rRNA binding proteins, it binds directly to 16S rRNA where it helps nucleate assembly of the platform of the 30S subunit by binding and bridging several RNA helices of the 16S rRNA By similarity. HAMAP-Rule MF_01343	Ribosome	Translation	[4]

Accession	Description	Species	Protein Name	Σ # Peptides	Score Rep.1 Rep.2 Rep.3	MW [kDa]	calc. pI	Function	Localization	Biological process	Ref.
								Forms an intersubunit bridge (bridge B4) with the 23S rRNA of the 50S subunit in the ribosome			
A7X1K6	30S ribosomal protein S16	<i>Staphylococcus aureus</i> (strain Mu3 / ATCC 700698)	<i>rpsP</i>	2	332,25 --- ---	10,2	9,92		Ribosome	Translation	[4]
A7X4V6	Uracil phosphoribosyltransferase	<i>Staphylococcus aureus</i> (strain Mu3 / ATCC 700698)	<i>upp</i>	2	--- 448,88 ---	23,0	6,55	Catalyzes the conversion of uracil and 5-phospho-alpha-D-ribose 1-diphosphate (PRPP) to UMP and diphosphate		UMP salvage	[4]
A7X0P2	UPF0477 protein SAHV_1009	<i>Staphylococcus aureus</i> (strain Mu3 / ATCC 700698)		2	217,43 --- ---	19,3	5,01		Intracellular	RNA metabolic process	[4]
C5QWK7	50S ribosomal protein L19 (Fragment)	<i>Staphylococcus epidermidis</i> W23144	<i>rplS</i>	2	96,09 --- 154,57	12,8	11,53	This protein is located at the 30S-50S ribosomal subunit interface and may play a role in the structure and function of the aminoacyl-tRNA binding site	Ribosome	Translation	[5]
G7ZN48	Aerobic glycerol-3-phosphate dehydrogenase	<i>Staphylococcus aureus subsp. aureus</i> MSHR1132		2	--- --- 177,71	62,4	7,28			Glycerol-3-phosphate metabolic process	[25]
D6H2K2	DNA polymerase III, beta subunit (Fragment)	<i>Staphylococcus aureus subsp. aureus</i> M1015		2	158,32 --- ---	32,2	4,84	DNA polymerase III is a complex, multichain enzyme responsible for most of the replicative synthesis in bacteria. This DNA polymerase also exhibits 3' to 5' exonuclease activity. The beta chain is required for initiation of replication once it is clamped onto DNA, it slides freely (bidirectional and ATP-independent) along duplex DNA	Cytoplasm	DNA replication	[12]
H3XMP3	Ribosomal protein L23	<i>Staphylococcus aureus subsp. aureus</i> IS-55	<i>rplW</i>	2	--- --- 92,87	9,2	9,44		Ribosome	Translation	[10]

Accession	Description	Species	Protein Name	Σ # Peptides	Score Rep.1 Rep.2 Rep.3	MW [kDa]	calc. pI	Function	Localization	Biological process	Ref.
H0ASJ2	Thioredoxin	<i>Staphylococcus aureus subsp. aureus 21202</i>	<i>trxA</i>	2	--- 481,28 410,85	11,5	4,55			Cell redox homeostasis	[1]
H4ENN1	Proline--tRNA ligase	<i>Staphylococcus aureus subsp. aureus CIG1750</i>	<i>proS</i>	2	--- --- 204,28	62,7	5,14	Catalyzes the attachment of proline to tRNA(Pro) in a two-step reaction	Cytoplasm	Protein biosynthesis	[16]
F0DCP4	3-hydroxy-3-methylglutaryl CoA synthase	<i>Staphylococcus aureus O46</i>	<i>mvaS</i>	2	272,04 --- ---	41,0	5,08			Isoprenoid biosynthetic process	[17]
D9RNC9	Pyridine nucleotide-disulfide oxidoreductase	<i>Staphylococcus aureus (strain JKD6008)</i>		2	--- 174,38 ---	44,2	5,58				[37]
H4BSC3	Peptidase C26 family protein	<i>Staphylococcus aureus subsp. aureus CIG1057</i>		2	239,35 --- ---	31,5	4,92	Catalyzes the ATP-dependent amination of UTP to CTP with either L-glutamine or ammonia as the source of nitrogen		Pyrimidine biosynthesis	[16]
H0DF98	Formate--tetrahydrofolate ligase	<i>Staphylococcus pettenkoferi VCU012</i>	<i>fhs</i>	2	248,01 143,09 ---	42,8	6,09			Folic acid-containing compound biosynthetic process	[1]
E6M8N2	Fumarylacetoacetate hydrolase	<i>Staphylococcus lugdunensis M23590</i>	<i>fahA</i>	2	--- 128,39 ---	33,0	4,84				[15]
H4D1A2	ATP-dependent protease ATPase subunit HslU	<i>Staphylococcus aureus subsp. aureus CIG547</i>	<i>hslU</i>	2	--- --- 231,79	52,3	5,25	ATPase subunit of a proteasome-like degradation complex; this subunit has chaperone activity. The binding of ATP and its subsequent hydrolysis by HslU are essential for unfolding of protein substrates subsequently hydrolyzed by HslV. HslU recognizes the N-terminal part of its protein substrates and unfolds these before they are guided to HslV for hydrolysis	Cytoplasm	ATP catabolic process	[16]

Accession	Description	Species	Protein Name	Σ # Peptides	Score Rep.1 Rep.2 Rep.3	MW [kDa]	calc. pI	Function	Localization	Biological process	Ref.
D2FMS1	Putative uncharacterized protein	<i>Staphylococcus aureus subsp. aureus D139</i>		2	--- 114,57 ---	21,7	4,75				[12]
F9L508	50S ribosomal protein L4	<i>Staphylococcus capitis VCU116</i>	<i>rplD</i>	2	895,19 --- ---	22,5	9,95	Forms part of the polypeptide exit tunnel	Ribosome	Translation	[10]
C2LXP4	Transcription termination factor NusA	<i>Staphylococcus hominis SK119</i>	<i>nusA</i>	2	--- --- 102,40	45,8	4,55				[41]
D2GEL6	Arsenate reductase	<i>Staphylococcus aureus subsp. aureus Btn1260</i>		2	98,96 --- ---	13,6	7,27				[12]
D6UB43	Cell division protein FtsY	<i>Staphylococcus aureus subsp. aureus ATCC 51811</i>	<i>ftsY</i>	2	108,58 --- ---	46,6	4,77	Involved in targeting and insertion of nascent membrane proteins into the cytoplasmic membrane. Acts as a receptor for the complex formed by the signal recognition particle (SRP) and the ribosome-nascent chain (RNC)	Cytoplasm	Cell division	[15]
F5WMI2	Putative uncharacterized protein	<i>Staphylococcus aureus subsp. aureus 21318</i>		2	--- --- 128,48	49,6	6,48				[10]
H7G3N4	Oligoendopeptidase F	<i>Staphylococcus aureus subsp. aureus DR10</i>		2	--- 124,67 216,52	69,8	5,26			Proteolysis	[6]
F3TKS7	Quinone oxidoreductase, YhdH/YhfP family	<i>Staphylococcus aureus subsp. aureus 21193</i>		2	--- 156,84 ---	38,1	6,38				[1]
Q2FEC6	Putative zinc-binding dehydrogenase	<i>Staphylococcus aureus (strain USA300)</i>		2	--- --- 110,99	32,8	6,00				[23]
H3XAB0	Protein translocase subunit SecA	<i>Staphylococcus aureus subsp. aureus IS-24</i>		2	--- --- 170,31	64,6	5,29		Plasma membrane	Protein transport	[10]
I0JDQ6	5'-methylthioadenosine	<i>Staphylococcus aureus subsp.</i>	<i>pfs</i>	2	--- ---	24,5	4,92	Catalyzes the irreversible cleavage of the glycosidic bond in both 5'-		Amino-acid biosynthesis	[42]

Accession	Description	Species	Protein Name	Σ # Peptides	Score Rep.1 Rep.2 Rep.3	MW [kDa]	calc. pI	Function	Localization	Biological process	Ref.
	ne/S-adenosylhomocysteine nucleosidase	<i>aureus HO 5096 0412</i>			96,02			methylthioadenosine (MTA) and S-adenosylhomocysteine (SAH/AdoHcy) to adenine and the corresponding thioribose, 5'-methylthioribose and S-ribosylhomocysteine, respectively			
G5JLS2	GTP-binding protein LepA]	<i>Staphylococcus simiae CCM 7213</i>	<i>lepA</i>	2	--- 103,08 ---	35,1	4,91	Required for accurate and efficient protein synthesis under certain stress conditions. May act as a fidelity factor of the translation reaction, by catalyzing a one-codon backward translocation of tRNAs on improperly translocated ribosomes. Back-translocation proceeds from a post-translocation (POST) complex to a pre-translocation (PRE) complex, thus giving elongation factor G a second chance to translocate the tRNAs correctly. Binds to ribosomes in a GTP-dependent manner	Plasma membrane	Protein biosynthesis	[38]
G7ZPN2	UPF0342 protein SAMSHR1132_1 6910	<i>Staphylococcus aureus subsp. aureus MSHR1132</i>		2	--- --- 119,96	13,3	4,37				[25]
I3FQ06	Cell division protein sepF	<i>Staphylococcus aureus subsp. aureus VRS4</i>	<i>sepF</i>	2	215,31 --- ---	13,0	5,22	Cell division protein that is part of the divisome complex and is recruited early to the Z-ring. Probably stimulates Z-ring formation, perhaps through the cross-linking of FtsZ protofilaments. Its function overlaps with FtsA	Cytoplasm	Cell division	[43]
D2FK47	Ribonucleoside-diphosphate reductase	<i>Staphylococcus aureus subsp. aureus D139</i>		2	--- --- 130,05	55,7	5,83	Provides the precursors necessary for DNA synthesis. Catalyzes the biosynthesis of deoxyribonucleotides from the corresponding ribonucleotides		DNA replication	[12]
H0CCL5	Putative CoA-disulfide reductase (Fragment)	<i>Staphylococcus aureus subsp. aureus 21194</i>		2	248,15 --- ---	39,8	5,27				[1]

Accession	Description	Species	Protein Name	Σ # Peptides	Score Rep.1 Rep.2 Rep.3	MW [kDa]	calc. pI	Function	Localization	Biological process	Ref.
D2G8F0	Tryptophanyl-tRNA synthetase	<i>Staphylococcus aureus subsp. aureus</i> WW2703/97	trpS	2	--- --- 87,21	36,6	6,60		Cytoplasm	Protein biosynthesis	[12]
A7X2X6	Putative uncharacterized protein	<i>Staphylococcus aureus</i> (strain Mu3 / ATCC 700698)		2	211,96 233,53 263,27	51,0	5,78			RNA modification	[4]
H4EMH7	UDP-N-acetylmuramoyl-L-alanyl-D-glutamate--L-lysine ligase	<i>Staphylococcus aureus subsp. aureus</i> CIG1750	murE	2	--- --- 119,26	53,7	5,72	Catalyzes the addition of L-lysine to the nucleotide precursor UDP-N-acetylmuramoyl-L-alanyl-D-glutamate (UMAG) in the biosynthesis of bacterial cell-wall peptidoglycan	Cytoplasm	Cell wall biogenesis/degradation	[16]
H3WVV4	Acyl carrier protein	<i>Staphylococcus lugdunensis</i> VCU139	acpP	2	--- --- 155,64	7,5	4,09	Carrier of the growing fatty acid chain in fatty acid biosynthesis	Cytoplasm	Fatty acid biosynthesis	[10]
F3TM70	Tex-like protein N-terminal domain protein	<i>Staphylococcus aureus subsp. aureus</i> 21193		2	--- --- 127,61	21,1	8,62				[1]
F5WK87	Chaperone protein DnaJ	<i>Staphylococcus aureus subsp. aureus</i> 21318	dnaJ	2	106,04 --- ---	36,5	6,44	Participates actively in the response to hyperosmotic and heat shock by preventing the aggregation of stress-denatured proteins and by disaggregating proteins, also in an autonomous, DnaK-independent fashion. Unfolded proteins bind initially to DnaJ; upon interaction with the DnaJ-bound protein, DnaK hydrolyzes its bound ATP, resulting in the formation of a stable complex. GrpE releases ADP from DnaK; ATP binding to DnaK triggers the release of the substrate protein, thus completing the reaction cycle. Several rounds of ATP-dependent interactions between DnaJ, DnaK and GrpE are required for fully efficient folding. Also involved, together	Cytoplasm	Stress response	[1]

Accession	Description	Species	Protein Name	Σ# Peptides	Score Rep.1 Rep.2 Rep.3	MW [kDa]	calc. pI	Function	Localization	Biological process	Ref.
								with DnaK and GrpE, in the DNA replication of plasmids through activation of initiation proteins			
H4G856	Virulence factor B family protein	<i>Staphylococcus aureus subsp. aureus IS-160</i>		2	--- 157,61 ---	20,0	4,79				[1]
H3ZYA8	Catalase	<i>Staphylococcus aureus subsp. aureus IS-125</i>		2	--- 139,18 ---	53,7	5,45			Hydrogen peroxide	[10]
H3YD86	Siderophore biosynthesis protein, IucA/IucC family	<i>Staphylococcus aureus subsp. aureus IS-99</i>		2	115,31 --- 103,45	48,8	6,07			Siderophore biosynthetic process	[10]
F3STZ2	Valine--tRNA ligase (Fragment)	<i>Staphylococcus warneri VCU121</i>	valS	2	356,60 323,11 ---	76,1	4,92	Catalyzes the attachment of valine to tRNA(Val). As ValRS can inadvertently accommodate and process structurally similar amino acids such as threonine, to avoid such errors, it has a "posttransfer" editing activity that hydrolyzes mischarged Thr-tRNA(Val) in a tRNA-dependent manner	Cytoplasm	Protein biosynthesis	[10]
C5QM16	Putative uncharacterized protein	<i>Staphylococcus epidermidis M23864:W1</i>		2	187,02 138,13 136,02	6,3	4,54				[5]-
H3Z131	Adenylosuccinate lyase C-terminal domain protein (Fragment)	<i>Staphylococcus aureus subsp. aureus IS-122</i>		2	--- --- 107,03	19,5	5,41			Purine ribonucleotide biosynthetic process	[10]
H3XKU2	Methionine--tRNA ligase	<i>Staphylococcus aureus subsp. aureus IS-55</i>	metG	2	--- --- 155,47	66,4	5,11	Is required not only for elongation of protein synthesis but also for the initiation of all mRNA translation through initiator tRNA(fMet) aminoacylation	Cytoplasm	Protein biosynthesis	[10]
D2FDZ9	DNA polymerase	<i>Staphylococcus aureus subsp. aureus C427</i>		2	173,01 --- ---	99,1	5,17		Intracellular	DNA replication	[12]

Accession	Description	Species	Protein Name	Σ # Peptides	Score Rep.1 Rep.2 Rep.3	MW [kDa]	calc. pI	Function	Localization	Biological process	Ref.
F3SQJ3	GMP reductase	<i>Staphylococcus warneri</i> VCU121	<i>guaC</i>	2	--- --- 117,91	36,2	7,01	Catalyzes the irreversible NADPH-dependent deamination of GMP to IMP.		Purine nucleotide metabolic process	[1]
H7FK83	Putative transcriptional regulator	<i>Staphylococcus saprophyticus</i> subsp. <i>saprophyticus</i> KACC 16562		2	--- --- 102,13	15,3	7,18		Intracellular	Transcription	[44]
D2N4L6	Cystathionine gamma-lyase (Gamma-cystathionase)(Probasin-related antigen) (PRB-RA)	<i>Staphylococcus aureus</i> (strain MRSA ST398 / isolate S0385)		2	--- --- 93,43	41,3	5,62			Metabolic process	[32]
H7G584	1-phosphofructokinase	<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i> DR10		2	--- 111,31 ---	32,5	4,75				[6]
H1SQK9	Glycine cleavage system H protein	<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i> 21252	<i>gcvH</i>	2	417,35 477,89 ---	14,0	4,03	The glycine cleavage system catalyzes the degradation of glycine. The H protein shuttles the methylamine group of glycine from the P protein to the T protein		Glycine decarboxylation via glycine cleavage system	[1]
H3XP65	Putative dihydroorotase	<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i> IS-55	<i>pyrC</i>	2	--- 212,80 ---	35,4	5,97			Pyrimidine biosynthesis	[10]
H7G4W1	Acetyl-CoA acetyltransferase	<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i> DR10		2	--- --- 130,80	41,7	5,38				[6]
F9KIB2	Ribosome recycling factor	<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i> 21259	<i>frr</i>	2	--- 324,64 ---	16,4	9,61			Translation	[1]
H4C091	Helix-turn-helix family protein	<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i> CIGC341D		2	--- 254,38 ---	15,9	6,76				[16]

Accession	Description	Species	Protein Name	Σ # Peptides	Score Rep.1 Rep.2 Rep.3	MW [kDa]	calc. pI	Function	Localization	Biological process	Ref.
D2FYY2	Azoreductase	<i>Staphylococcus aureus</i> WBG10049		2	--- 307,04 ---	20,9	6,14				[12]
D2UN28	D-alanine aminotransferase	<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i> H19		2	213,81 --- ---	27,7	5,26	Acts on the D-isomers of alanine, leucine, aspartate, glutamate, aminobutyrate, norvaline and asparagine. The enzyme transfers an amino group from a substrate D-amino acid to the pyridoxal phosphate cofactor to form pyridoxamine and an alpha-keto acid in the first half-reaction		D-amino acid metabolic process	[12]
H0APJ6	4-phosphoerythronate dehydrogenase	<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i> 21202	pdxB_2	2	103,01 --- ---	34,7	5,38				[1]
E2FYX8	Putative uncharacterized protein	<i>Staphylococcus aureus</i>		2	175,55 --- ---	35,7	5,47				[45]
C5Q1G8	Adenylosuccinate synthetase	<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i> TCH130	purA	2	--- --- 151,97	46,8	6,47	Plays an important role in the de novo pathway of purine nucleotide biosynthesis. Catalyzes the first committed step in the biosynthesis of AMP from IMP	Cytoplasm	Purine biosynthesis	[5]
H0CGQ7	NAD/NADP octopine/nopaline dehydrogenase, alpha-helical domain protein	<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i> 21331		2	--- --- 192,45	40,7	4,97		Cytoplasm	Glycerol-3-phosphate catabolic process	[1]
G5JK44	DAK2 domain-containing protein	<i>Staphylococcus simiae</i> CCM 7213		2	--- --- 140,74	60,5	4,64			Glycerol metabolic process	[38]
H0C6K5	Putative uncharacterized protein	<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i> 21194		2	320,07 375,38 354,43	20,9	4,34				[1]
D2FQ44	Putative uncharacterized protein	<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i> D139		2	145,39 --- ---	24,6	5,43			Oxidation-reduction process	[12]

Accession	Description	Species	Protein Name	Σ # Peptides	Score Rep.1 Rep.2 Rep.3	MW [kDa]	calc. pI	Function	Localization	Biological process	Ref.
E5R756	NAD-dependent malic enzyme (NAD-ME)	<i>Staphylococcus aureus</i> (strain ECT-R 2)		2	--- --- 180,87	34,7	5,07			Malate metabolic proces	[46]
H0CEF1	GTPase obg	<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. aureus 21331	<i>cgtA</i>	2	--- 201,18 ---	47,2	5,17	An essential GTPase which binds GTP, GDP and possibly (p)ppGpp with moderate affinity, with high nucleotide exchange rates and a fairly low GTP hydrolysis rate By similarity. It may play a role in control of the cell cycle, stress response, ribosome biogenesis and in those bacteria that undergo differentiation, in morphogenesis control	Cytoplasm	GTP catabolic process	[1]
K0U847	GTPase Der	<i>Staphylococcus arlettae</i>	<i>der</i>	2	166,31 --- ---	49,1	5,53	GTPase that plays an essential role in the late steps of ribosome biogenesis		Ribosome biogenesis	[39]
H3UQQ3	DNA gyrase, B subunit	<i>Staphylococcus epidermidis</i> VCU057	<i>gyrB</i>	2	--- 139,78 ---	49,2	5,73			DNA topological change	[1]
C5MYP9	Possible 6-phosphogluconolactonase	<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. aureus USA300_TCH959		2	--- 191,87 131,11	38,5	5,19				[5]

Bibliografia referente à tabela 2

1. Jones, M., et al., Submitted to the EMBL/GenBank/DDBJ databases, 2011.
2. Baba, T., et al., *Genome sequence of Staphylococcus aureus strain Newman and comparative analysis of staphylococcal genomes: polymorphism and evolution of two major pathogenicity islands*. J Bacteriol, 2008. **190**(1): p. 300-10.
3. Li, R., et al., Submitted to the EMBL/GenBank/DDBJ databases, 2008.
4. Neoh, H.M., et al., *Mutated response regulator graR is responsible for phenotypic conversion of Staphylococcus aureus from heterogeneous vancomycin-intermediate resistance to vancomycin-intermediate resistance*. Antimicrob Agents Chemother, 2008. **52**(1): p. 45-53.
5. Qin, X., et al., Submitted to the EMBL/GenBank/DDBJ databases. 2009.
6. Uhlemann, A.C., et al., *Identification of a highly transmissible animal-independent Staphylococcus aureus ST398 clone with distinct genomic and cell adhesion properties*. MBio, 2012. **3**(2).
7. Herron-Olson, L., et al., *Molecular correlates of host specialization in Staphylococcus aureus*. PLoS One, 2007. **2**(10): p. e1120.
8. Dugourd, D.F., A. Young, and J.A. Wright, *Molecular chaperones/chaperonin-encoding stress genes groEL and groES and their use as antimicrobial targets*. Submitted to the EMBL/GenBank/DDBJ databases, 2000.
9. Ward, D., et al., Submitted to the EMBL/GenBank/DDBJ databases, 2009.
10. Jones, M., et al., Submitted to the EMBL/GenBank/DDBJ databases, 2012.
11. Chua, K., et al., *Complete genome sequence of Staphylococcus aureus strain JKD6159, a unique Australian clone of ST93-IV community methicillin-resistant Staphylococcus aureus*. J Bacteriol, 2010. **192**(20): p. 5556-7.
12. Feldgarden, M., et al., *The Genome Sequence of Staphylococcus aureus strain H19*. Submitted to the EMBL/GenBank/DDBJ databases, 2009.
13. Holden, M.T., et al., *Complete genomes of two clinical Staphylococcus aureus strains: evidence for the rapid evolution of virulence and drug resistance*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(26): p. 9786-91.
14. Guinane, C.M., et al., *Evolutionary genomics of Staphylococcus aureus reveals insights into the origin and molecular basis of ruminant host adaptation*. Genome Biol Evol, 2010. **2**: p. 454-66.
15. Muzny, D., et al., Submitted to the EMBL/GenBank/DDBJ databases, 2010.
16. Gill, S., et al., Submitted to the EMBL/GenBank/DDBJ databases, 2012.
17. Le Marechal, C., et al., *Genome sequences of two Staphylococcus aureus ovine strains that induce severe (strain O11) and mild (strain O46) mastitis*. J Bacteriol, 2011. **193**(9): p. 2353-4.

18. Garcia-Alvarez, L., et al., *Meticillin-resistant Staphylococcus aureus with a novel mecA homologue in human and bovine populations in the UK and Denmark: a descriptive study*. Lancet Infect Dis, 2011. **11**(8): p. 595-603.
19. Copeland, A., et al., *Complete sequence of chromosome of Staphylococcus aureus subsp. aureus JH9*. Submitted to the EMBL/GenBank/DDBJ databases, 2007.
20. Gill, S.R., et al., *Insights on evolution of virulence and resistance from the complete genome analysis of an early methicillin-resistant Staphylococcus aureus strain and a biofilm-producing methicillin-resistant Staphylococcus epidermidis strain*. J Bacteriol, 2005. **187**(7): p. 2426-38.
21. Li, R., Y. Cui, and C. Yu, Submitted to the EMBL/GenBank/DDBJ databases, 2008.
22. Vogel, V., et al., *Short term evolution of a highly transmissible Staphylococcus aureus clone (ST228)*. Submitted to the EMBL/GenBank/DDBJ databases, 2011.
23. Diep, B.A., et al., *Complete genome sequence of USA300, an epidemic clone of community-acquired methicillin-resistant Staphylococcus aureus*. Lancet, 2006. **367**(9512): p. 731-9.
24. Ehrlich, G.D., Submitted to the EMBL/GenBank/DDBJ databases, 2008.
25. Holt, D.C., et al., *A very early-branching Staphylococcus aureus lineage lacking the carotenoid pigment staphyloxanthin*. Genome Biol Evol, 2011. **3**: p. 881-95.
26. Gillasp, A.F., et al., *The Staphylococcus aureus NCTC8325 genome*. Submitted to the EMBL/GenBank/DDBJ databases, 2006.
27. Morita, Y., S. Ikeno, and K.S. Tsuchiya, *Cloning and expression of Staphylococcus aureus Smith fab genes*. Submitted to the EMBL/GenBank/DDBJ databases, 2004.
28. Irlinger, F., et al., *Genome sequence of Staphylococcus equorum subsp. equorum Mu2, isolated from a French smear-ripened cheese*. J Bacteriol, 2012. **194**(18): p. 5141-2.
29. Jones, M., et al., Submitted to the EMBL/GenBank/DDBJ databases, 2011.
30. Bouchard, D., et al., *Genome sequence of Staphylococcus aureus Newbould 305, a strain associated with mild bovine mastitis*. J Bacteriol, 2012. **194**(22): p. 6292-3.
31. Sivaraman, K., et al., *Genome sequencing and analysis reveals possible determinants of Staphylococcus aureus nasal carriage*. BMC Genomics, 2008. **9**: p. 433.
32. Schijffelen, M.J., et al., *Whole genome analysis of a livestock-associated methicillin-resistant Staphylococcus aureus ST398 isolate from a case of human endocarditis*. BMC Genomics, 2010. **11**: p. 376.
33. Stegger, M., et al., *Genome sequence of Staphylococcus aureus strain 11819-97, an ST80-IV European community-acquired methicillin-resistant isolate*. J Bacteriol, 2012. **194**(6): p. 1625-6.
34. Sharma, R., A. Singh, and P.K. Jangir, *Genome Sequence of Staphylococcus massiliensis S46*. Submitted to the EMBL/GenBank/DDBJ databases, 2012.
35. de Lencastre, H., et al., *Antibiotic resistance as a stress response: complete sequencing of a large number of chromosomal loci in Staphylococcus aureus strain COL that impact on the expression of resistance to methicillin*. Microb. Drug Resist, 1999. **5**.

36. Lowder, B.V., et al., *Recent human-to-poultry host jump, adaptation, and pandemic spread of Staphylococcus aureus*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. **106**(46): p. 19545-50.
37. Howden, B.P., et al., *Complete genome sequence of Staphylococcus aureus strain JKD6008, an ST239 clone of methicillin-resistant Staphylococcus aureus with intermediate-level vancomycin resistance*. J Bacteriol, 2010. **192**(21): p. 5848-9.
38. Suzuki, H., et al., *Comparative genomic analysis of the genus Staphylococcus including Staphylococcus aureus and its newly described sister species Staphylococcus simiae*. BMC Genomics, 2012. **13**: p. 38.
39. Dinakaran, V., et al., *Genome sequence of Staphylococcus arlettae strain CVD059, isolated from the blood of a cardiovascular disease patient*. J Bacteriol, 2012. **194**(23): p. 6615-6.
40. Golding, G.R., et al., *whole-genome sequence of livestock-associated st398 methicillin-resistant staphylococcus aureus Isolated from Humans in Canada*. J Bacteriol, 2012. **194**(23): p. 6627-8.
41. Sebastian, Y., et al., Submitted to the EMBL/GenBank/DDBJ databases, 2009.
42. Aslett, M., Submitted to the EMBL/GenBank/DDBJ databases, 2012.
43. Kos, V.N., et al., *Comparative genomics of vancomycin-resistant Staphylococcus aureus strains and their positions within the clade most commonly associated with Methicillin-resistant S. aureus hospital-acquired infection in the United States*. MBio, 2012. **3**(3).
44. Kim, B.S., et al., *Draft genome sequence of Staphylococcus saprophyticus subsp. saprophyticus M1-1, isolated from the gills of a Korean rockfish, Sebastes schlegeli Hilgendorf, after high hydrostatic pressure processing*. J Bacteriol, 2012. **194**(16): p. 4441-2.
45. Viana, D., et al., *Adaptation of Staphylococcus aureus to ruminant and equine hosts involves SaPI-carried variants of von Willebrand factor-binding protein*. Mol Microbiol, 2010. **77**(6): p. 1583-94.
46. Lindqvist, M., et al., *Detection and characterisation of SCCmec remnants in MR-MSSA causing a clonal outbreak in a Swedish county*. Submitted to the EMBL/GenBank/DDBJ databases, 2010.