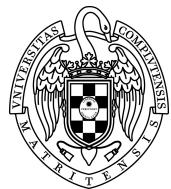

**Desarrollo de herramientas
bioinformáticas para estudios de
proteómica a gran escala de
*Candida albicans***



TESIS DOCTORAL

Vital Vialás Fernández

Departamento de Microbiología II
Facultad de Farmacia
Universidad Complutense de Madrid

2015

Desarrollo de herramientas bioinformáticas para estudios de proteómica a gran escala de *Candida albicans*

Memoria que presenta para optar al título de Doctor
Vital Vialás Fernández

Dirigida por la Doctora
Concha Gil García

Departamento de Microbiología II
Facultad de Farmacia
Universidad Complutense de Madrid

2015

*A mis padres
por el apoyo y amor incondicional*

Agradecimientos

En este espacio toca dar las gracias a toda la gente que ha contribuido directa o indirectamente, incluso inconscientemente, a que yo finalmente, han pasado unos cuantos años ya, pueda haber escrito esta tesis. Estos agradecimientos son una especie da carta abierta para que la lea quien quiera y que cada cual que se sienta aludido o aludida en su turno. También habrá quién esté aquí mencionado pero no lea esto. Aquí queda escrito para esos casos.

En primer lugar, Ana, gracias por compartir tu vida conmigo, y tu manera de verla, tan optimista y alegre, sin tí no habría podido. Tú sabes preocuparte de las cosas importantes y no de detalles como la portada o de si llevo o no traje.

Alberto Pascual, gracias por animarme y empujarme en mis primeros pasos en la bioinformática en mi primera etapa en el CNB, gracias a tí encontré mi sitio en Farmacia donde he hecho todo este trabajo.

Concha, por supuesto, ¡que gran jefa!, exigente pero comprensiva, gracias a tí he podido aprender un montón de cosas, muchas de Proteómica, pero también de la vida en general. A Lucía y Gloria, gracias también. También podríais haber sido mis directoras. Me habéis aportado muchas ideas de genuinas científicas. Os respeto y admiro.

Juan Pablo Albar, a su memoria también dedico una parte de esta tesis. Él me permitió una segunda etapa en el CNB donde aprendí y disfruté y conocí mucha buena gente.

Mis compis de la Unidad 1. Por aquí ha desfilado un montón de gente. Todos me habéis ayudado en cosas de trabajo, pero también, y esto es lo más importante, a hacer que todo el tiempo que he pasado aquí (que no es poco) sea mucho más agradable. Jose, Aida, Virginia, Claudia, Elvira, Ahinara, Catarina, Perce. Gracias a todos, somos una pequeña familia.

Por la unidad de proteómica también ha pasado mucha gente, pero quiero

agradecer a María Luisa, Lola y Felipe por la ayuda que me han prestado en innumerables ocasiones.

Al resto de compañeros y profes/jefes del Depar, gracias también por contribuir a crear un gran ambiente de trabajo. Sinceramente no creo que sea fácil encontrar un ambiente tan bueno en otros sitios. No sé donde continuaré mi trayectoria laboral, pero nunca olvidaré estos años aquí.

En 2011 pasé unos meses en el ISB, Seattle, de donde guardo un gran recuerdo y quiero aprovechar para mostrar mi reconocimiento por lo bien que me trajeron y lo mucho que he aprendido gracias a esto desde entonces. Rob, Eric, Luis, Zhi, Ulrike, thank you all.

También he pasado por otros sitios. En un periodo entre UCM y CNB están Rubén Nogales y Dani Tabas, jedis de la informática, me habéis ayudado mucho en partes de esta tesis y os lo agradezco.

Quiero agradecer también a los amigos de Madrid con los que he salido tantas veces por ahí. Carmilio, Jacobo, Fernando, Arancha, Rocío, Adolfo, Roberto, Fermín, David, Xavi. Long Live QGT!

A los amigos de Badajoz porque cada vez que voy siento como si nunca me hubiera marchado, gracias también.

También me siento en deuda para con la comunidad informática que trabaja y ayuda desinteresadamente. Esto es lo bonito de la informática. Linux, Ubuntu, StackOverflow, LaTex, TeXis, github, y otros muchos proyectos y software que he usado. Gracias amigos frikis desconocidos.

Y finalmente a mi familia, a mis hermanos y mis padres, a quienes dedico esta tesis por su amor y su apoyo incondicional.

Resumen

Introducción

El concepto de Proteómica, acuñado en analogía al de Genómica, fue usado por primera vez por Marc Wilkins a mediados de los años 90 para describir al *conjunto total de proteínas que se expresan por los genes de una célula, tejido u organismo*. Anteriormente, a finales de los 80, el desarrollo de las técnicas de ionización suave, como la *Ionización por Electrospray*, ESI (*Electrospray Ionization*) o la *Desorción Suave por Láser*, SLD (*Soft Laser Desorption*), permitieron ionizar grandes biomoléculas como las proteínas manteniéndolas relativamente intactas. Esto sentó las bases de la espectrometría de masas aplicada a la proteómica.

En la proteómica *shotgun* (el término inglés está muy asentado), el primer paso del experimento normalmente consiste en la digestión de las proteínas de la muestra en péptidos por acción de una enzima proteolítica como la tripsina. Esto incrementa notablemente el rendimiento en términos de número de proteínas que pueden ser identificadas en un solo experimento comparado con los experimentos basados en gel. Sin embargo, tiene el coste asociado de provocar una gran complejidad de la mezcla de péptidos y el problema añadido de la inferencia de las proteínas originarias.

Los péptidos son separados por cromatografía líquida (LC), e ionizados para entrar a continuación en el espectrómetro de masas donde son separados en función de la proporción entre su masa y su carga (m/z) y los valores obtenidos son registrados en un espectro MS¹. En la espectrometría de masas en tandem (MS/MS), los péptidos con mayor intensidad son seleccionados para ser fragmentados de modo que se generan espectros MS/MS, colecciones de valores m/z y de intensidad para cada precursor y sus fragmentos.

Una vez adquiridos los espectros empíricos comienza el análisis computacional. El método de identificación de péptidos más efectivo se basa en bus-

RESUMEN

car o enfrentar los espectros adquiridos contra una base de datos de secuencias de proteínas. Esto es lo que hacen los llamados motores de búsqueda. En esencia, a cada par espectro-péptido (PSM), se le otorga una puntuación que mide el grado de similitud entre el espectro empírico adquirido y espectros teóricos generados (correspondientes a secuencias conocidas).

Para evaluar la seguridad en la identificación de los péptidos, se pueden proporcionar parámetros estadísticos como los p-valores y e-valores para cada PSM. Pero en el contexto de un experimento en el que se generan miles de espectros MS/MS, se pueden aplicar procedimientos estadísticos adicionales.

La estimación de la *Tasa de Falsos Descubrimientos*, FDR (*False Discovery Rate*) es un método sencillo pero efectivo. Comparando los espectros adquiridos con espectros teóricos derivados de secuencias generadas artificialmente, llamadas señuelos, se puede construir una población errónea de referencia. La tasa FDR se calcula asumiendo que esa población es equivalente a la de asignaciones PSMs a secuencias reales pero erróneas.

Otros métodos de post-procesamiento para evaluar la calidad de las asignaciones PSM son los modelos mixtos de probabilidad, implementados en herramientas como PeptideProphet. En primer lugar se crea una puntuación discriminante, independiente del motor de búsqueda, y se genera la distribución de los mejores péptidos candidatos (aquellos con mejor puntuación) para todos los espectros del experimento. El modelo mixto de probabilidad asume que esta distribución es una mezcla de la población de PSMs correcta y la población de PSMs incorrecta. Entonces, usando un algoritmo de Esperanza-Maximización, se obtiene y se ajusta la curva que define ambas poblaciones. Finalmente, usando probabilidad bayesiana, se obtiene la probabilidad de ser correcto para cada PSM.

En cuanto al problema de la inferencia de las proteínas hay dos aspectos fundamentales. Por una parte está el agrupamiento no-aleatorio de péptidos en proteínas provoca que el error de asignaciones incorrectas se propague afectando las tasas FDR. Pero además, también contribuye al problema el hecho de que existan secuencias de péptidos comunes, conservados, en diferentes proteínas. Las distintas herramientas informáticas tratan estos asuntos con diferentes aproximaciones. ProteinProphet, usado para una gran parte de los resultados de esta tesis, recalcula las probabilidades de cada PSM premiando aquellos que corresponden a péptidos que tienen *hermanos* (péptidos identifi-

cados pertenecientes a una misma proteína) y viceversa. Además se hace una ponderación usando un factor de corrección para tener en cuenta si el péptido es único o presente en varias proteínas. Finalmente se obtiene una lista mínima de las proteínas que pueden explicar todos los péptidos identificados y un valor correspondiente de probabilidad para cada una.

Otro aspecto fundamental en la Proteómica moderna es la diseminación de los resultados experimentales. Repositorios públicos *online* como PRIDE (*Protein Identifications Database*) o PeptideAtlas juegan un papel esencial en esto. A diferencia de PRIDE, PeptideAtlas reprocesa todos los espectros mediante su conjunto de herramientas informáticas Trans Proteomics Pipeline para asegurar uniformidad y calidad en los datos que almacena. Además la *Iniciativa de Estandarización en Proteómica*, PSI (*Proteomics Standards Initiative*) ha desarrollado formatos estándar para promocionar el intercambio y reanálisis de datos. Particularmente MzIdentML, el estándar para almacenar identificaciones de péptidos y proteínas, es usado como formato de entrada en Proteopathogen, una herramienta descrita en esta tesis.

Objetivos

La presencia de resultados de experimentos de Proteómica en repositorios públicos para el hongo patógeno oportunista *C. albicans* eran hasta hace poco muy escasos, originados en instrumentos de baja resolución y por tanto, en ocasiones, no muy fiables. Así, el desarrollo de bases de datos y adopción de formatos estándar en Proteómica juegan un papel esencial para analizar, comparar y presentar resultados. Las herramientas informáticas descritas en esta tesis contribuyen a esos objetivos.

Resultados

La base de datos y herramienta web Proteopathogen es la primera aplicación *online* descrita que combinaba resultados de experimentos de Proteómica con información específica relevante para el estudio de proteínas de *C. albicans* como términos de la *Ontología Génica*, GO (*Gene Ontology*) o las rutas de la *Enciclopedia de Genes y Genomas de Kyoto*, KEGG (*Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*) en las que estan implicadas. El formato de identificaciones de péptidos y proteínas MzIdentML promovido por la iniciativa PSI aún no había sido creado de modo que Proteopathogen recopilaba los resulta-

RESUMEN

dos en formatos de texto separado por tabulador dependientes del programa utilizado para generar los resultados.

Tras una primera versión (Vialás *et al.*, 2009), la aplicación ha sido totalmente remodelada para adaptarse al formato estándar de identificaciones mzIdentML (Vialas and Gil, 2015) como fuente de información independiente del procesamiento experimental y computacional con el que los resultados son generados.

Proteopathogen es una útil herramienta *online* que facilita la visualización y análisis de los resultados de experimentos de Proteómica tanto por los usuarios del laboratorio como por parte de los revisores de las revistas donde los estudios son publicados.

Con el desarrollo del PeptideAtlas de *C. albicans*, por primera vez se incluyó un modelo de hongo patógeno en el proyecto global PeptideAtlas. En su primera versión (Vialas *et al.*, 2013), este PeptideAtlas proporcionó resultados de identificación para más de 2500 proteínas para un FDR de 1.2 %, lo que representa una cobertura del 41 % del proteoma predicho. Posteriormente, dos experimentos, consistentes en un fraccionamiento subcelular exahustivo y en un fraccionamiento *off-gel* a nivel de péptido procedente de distintas condiciones de crecimiento, fueron diseñados *ad hoc* para incrementar la cobertura del proteoma. Éstos, junto con resultados de dos experimentos sobre el proteoma de la superficie y el proteoma secretado, fueron reprocesados junto con los experimentos de la versión original, para obtener un nuevo PeptideAtlas. Este reprocesamiento, además, incluye resultados de tres motores de búsqueda diferentes y por primera vez en un proyecto a gran escala de *C. albicans*, una base de datos con secuencias específicas de alelo.

El resultado es la caracterización más completa del proteoma de *C. albicans* existente hasta la fecha actual. Describe más de 71000 péptidos asignados a 4174 proteínas, lo que representa el 66 % del proteoma predicho.

Además, a través de su interfaz web, el PeptideAtlas proporciona una herramienta para ayudar en la selección de péptidos proteotípicos candidatos para ser monitorizados, el primer paso, esencial, en el diseño de ensayos de proteómica dirigida.

Por último, y para favorecer la comunicación e interconexión entre los recursos CGD y PeptideAtlas, se ha contactado con los desarrolladores e impulsores de CGD proporcionándoles un formato de enlace para que, a través de

la información en la pestaña *proteína* en CGD, se pueda acceder a los datos de evidencia de identificación en PeptideAtlas para las proteínas para las que exista esta información.

Conclusiones

La base de datos y aplicación web desarrollada, denominada Proteopathogen, es una herramienta pública *online* de gran utilidad para la visualización y análisis de resultados de proteómica en estudios que usan *C. albicans* como organismo modelo de hongos patógenos.

Con la adopción del estándar mzIdentML como formato de origen para incorporar nuevos datos en Proteopathogen se asegura la estabilidad y futuro de este proyecto ya que es posible obtener archivos con resultados de identificaciones en este formato independientemente del procesamiento experimental y computacional.

Se ha creado un PeptideAtlas de *C. albicans* estableciendo por primera vez una caracterización a gran escala del proteoma de un modelo de hongo patógeno en el proyecto global PeptideAtlas.

Este PeptideAtlas de *C. albicans* describe 71310 péptidos y 4174 proteínas (para un FDR de 0,10 % a nivel de PSM), supone la caracterización más exahustiva del proteoma de este organismo (66 %) y es el recurso más completo y fiable disponible públicamente.

En el PeptideAtlas de *C. albicans* se describen 2860 proteínas para las que sus correspondientes ORFs se denominan *uncharacterized* por carecer de un producto génico conocido, lo que supone un 63 % de éstos.

Summary

Introduction

The concept of Proteomics, a term coined in analogy to Genomics, was first used by Marc Wilkins in the mid 90s to describe the total set of proteins being expressed by the genes of a cell, tissue or organism. Earlier, in the late 80s, the development of soft ionizations techniques, such as Electrospray Ionization (ESI) and Soft Laser Desorption (SLD) enabled the ability to ionize large biomolecules such as proteins while keeping them relatively intact. This settled the foundation upon which mass spectrometry was applied to what would later become modern proteomics.

In *shotgun* proteomics, the first step of the experiment usually consists of a digestion of the sample proteins into peptides by means of a proteolytic enzyme such as trypsin. This greatly increases performance in terms of the number of proteins that can be detected in a single LC-MS/MS run compared to gel-based approaches, but comes at the cost of a great complexity at the peptide level and the protein inference problem.

Peptides are then separated by liquid chromatography (LC), then ionized and eventually enter the mass spectrometer where they are separated as a function of their mass-to-charge (m/z) ratio, recorded in the MS¹ spectrum. In tandem mass spectrometry (MS/MS) peptides with higher intensities are selected to be fragmented so MS/MS spectra, a collection of m/z values and intensities of the precursor and product ions, are produced.

Once the empirical spectra are acquired, the computational analysis starts. The most efficient peptide identification method is based on searching the acquired spectra against protein sequence databases. This is what search engines do. Basically, a score measuring the degree of similarity between the empirical spectrum and a theoretically derived spectrum (corresponding to a known sequence) is given to pairs of spectrum - peptide sequence named PSMs (Pep-

SUMMARY

tide to Spectrum Match)

To assess confidence in peptide identification, statistic measures such as p-values and e-values are given to PSMs. But in the context of a large experiment generating thousands of MS/MS spectra, further filtering or additional statistical procedures may be applied.

The estimation of the False Discovery Rate is a simple yet effective procedure. By comparing the spectra to artificially generated sequences, called decoys, a reference population of incorrect matches is created and is assumed to be equivalent to the population of incorrect matches to real sequences (false positives).

Other post-processing method to evaluate confidence in identifications of MS/MS spectra is probability mixture modelling, implemented in tools such as PeptideProphet. It first creates a discriminant, search engine-independent score and then generates the distribution of all best matches to the total amount of MS/MS in the experiment. This distribution is assumed to be a mixture of the correctly assigned and incorrectly assigned PSMs. Then, using curve-fitting and the Expectation-Maximization algorithm, the correct and incorrect distributions can be inferred. And finally, using bayesian statistics a probability of being correct is computed for each PSM.

Then there is the protein inference problem which has two main aspects. On the one hand there is the non-random grouping of peptides into proteins, which propagates error affecting FDR levels. And on the other hand there is peptide degeneracy, that is, conserved sequences in different proteins. Different software tools deal with these issues in different approaches. ProteinProphet, used for a large part of the results in this thesis, recomputes PSM probabilities rewarding those corresponding to *sibling* peptides, and giving weights depending on sequence uniqueness/degeneracy. In this way, a minimal list of proteins that explains all observed peptides is provided along with the corresponding protein-level probability values.

Fundamental to modern proteomics is also data sharing and dissemination. Public on-line repositories, like PRIDE and PeptideAtlas play a key role in this sense. Unlike PRIDE, PeptideAtlas, reprocesses all MS/MS spectra through its specific Trans Proteomic Pipeline to ensure data uniformity and quality. In addition, the Proteomics Standard Initiative has developed standard data formats to promote sharing and re-analysis of experimental data. In particular,

MzIdentML, the standard for peptide and protein identification, is used as input data format for Proteopathogen, developed in this thesis.

Objectives

The presence of proteomic data related to the fungal opportunistic pathogen *C. albicans* in online public repositories was until recently very sparse, sometimes originated from low resolution instruments and therefore seldom reliable. In this context, the development of databases and the adoption of standard formats in proteomics have an essential role in the analysis, sharing and dissemination of results. The software tools presented here contribute to these objectives.

Results

The database and web tool Proteopathogen was, in its original version (Vialás *et al.*, 2009), the first described software tool that combined proteomics experiments results with specific information relevant to the study of *C.albicans* proteins such as GO (Gene Ontology) terms and KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) pathways annotations, all available through a rich web interface. The Proteomics Standard Initiative promoted format for peptide and protein identifications MzIdentML had not been released yet, so Proteopathogen collected results in tab separated text formats dependant on the software that was used to generate them.

Following the first version, the software was adapted to make use of mzlidentML, as its source of data (Vialas and Gil, 2015) and the database was populated with quality data from PeptideAtlas.

Proteopathogen has become a versatile online tool to allow visualization and analysis of proteomics experiments results by the wet-lab users but also enabling revision by reviewers of the journals of the field.

With the development of a *C. albicans* PeptideAtlas, for the first time a fungal pathogen has been included in the global PeptideAtlas project. In its original build (Vialas *et al.*, 2013), the *C. albicans* PeptideAtlas provides identification results for over 2500 proteins at 1.2 %FDR, which represent a coverage of 41 % of the predicted proteome. Then two experiments, consisting of an extensive subcellular fractionation and an off-gel peptide-level fractionation from different growing conditions, were specifically designed to increase proteome coverage.

SUMMARY

These, together with two additional datasets on the surface, and the vesicles and secreted proteomes were reprocessed along with the datasets in the previous build to generate a new version of the PeptideAtlas. In addition, for the first time in a large-scale *C.albicans* project a database with allele-specific sequences was used.

This reprocessing, combining results from three different search engines, effectively means the most exhaustive *C. albicans* proteome characterization up to the current date. It describes over 71000 detected peptides assigned to 4174 proteins, which represent 66 % of the predicted proteome.

Moreover, through its web interface, this PeptideAtlas enables a valuable resource to aid in the selection of candidate proteotypic peptides, the first, essential step in targeted proteomics assays.

Lastly, and in order to favor intercommunication between resources CGD and PeptideAtlas, we have contacted the CGD developers and promoters providing them with links so, through the *protein* tab in CGD, users may access the corresponding identification data in PeptideAtlas.

Conclusions

The developed database and web application called Proteopathogen has been proven to be a valuable, greatly useful tool to view and analyze proteomics experiments results using *C. albicans* as a model for the study of fungal pathogens.

With the adoption of the mzIdentML standard as input data format for new experiments in Proteopathogen, a solid foundation is established to ensure continuity and easing the incorporation of new results using this format which is independent of the experimental and computational procedures that may have generated the results

The created *C. albicans* PeptideAtlas has established for the first time a large-scale characterization of the proteome for a model of fungal pathogen in the PeptideAtlas global project.

SUMMARY

This *C. albicans* PeptideAtlas describes 71310 peptides and 4174 proteins (for a 0.10 % FDR at PSM level), means the most exhaustive proteome characterization for this organism (66 %) and it currently is the most complete and reliable resource available.

Furthermore, the *C. albicans* PeptideAtlas describes 2860 proteins for which their corresponding ORFs are termed *uncharacterized* because they lack a known protein product, that is 63 % of them.

Índice

Agradecimientos	VII
Resumen	IX
Summary	xv
I INTRODUCCIÓN	1
1. Introducción	3
1.1. Proteómica. Conceptos generales	3
1.2. Espectrometría de masas	4
1.2.1. Consideraciones sobre unidades empleadas en espectrometría de masas	5
1.2.2. Espectrómetro de masas	6
1.2.3. Espectrometría de masas en tandem. MS/MS	12
1.3. Digestión de proteínas en péptidos	15
1.4. Proteómica en gel	16
1.4.1. Huella de masas peptídicas	17
1.5. Proteómica <i>shotgun</i>	17
1.5.1. Separación de péptidos y proteínas sin gel	18
1.6. Asignación péptido-espectro	20
1.6.1. Búsqueda en bases de datos de secuencias	21
1.6.2. Otras estrategias de asignación péptido-espectro	26
1.7. Evaluación estadística de resultados de identificaciones de péptidos y proteínas	27
1.7.1. Conceptos estadísticos básicos	27

1.7.2. Puntuaciones basadas en distribuciones de espectro individual y promedio	29
1.7.3. Bases de datos señuelo y Tasa de Falsos Descubrimientos (FDR)	31
1.7.4. Modelos mixtos de probabilidad. Probabilidad posterior . .	35
1.8. Inferencia de proteínas a partir de péptidos	38
1.9. Herramientas adicionales de post-procesamiento y validación a nivel de péptido y proteína	41
1.10. Proteómica dirigida. SRM	43
1.11. Repositorios públicos de proteómica <i>online</i>	44
1.11.1. PRIDE	45
1.11.2. PeptideAtlas	45
1.12. Formatos de archivos usados en espectrometría de masas y proteómica	45
1.13. <i>Candida albicans</i> como organismo modelo	49
 OBJETIVOS	 51
 Objetivos	 53
 II DESARROLLO DE UNA APLICACIÓN WEB PARA RECOGER, VISUALIZAR Y ANALIZAR RESULTADOS DE ESTUDIOS DE PROTEÓMICA DE <i>Candida albicans</i>	 55
 Proteopathogen, a protein database for studying <i>Candida albicans</i> - host interaction	 57
 Proteopathogen2: A database and web tool to store and display proteomics identification results in the mzIdentML standard	 69
Introduction	72
Materials and methods	73
Results and discussion	75
Conclusions	78

ÍNDICE	ÍNDICE
III CREACIÓN DE UN PEPTIDEATLAS DE <i>Candida albicans</i>	83
A <i>Candida albicans</i> PeptideAtlas	85
Introduction	88
Materials and methods	89
Results and discussion	92
Conclusions	97
A comprehensive <i>Candida albicans</i> PeptideAtlas build enables deep proteome coverage	103
Introduction	106
Materials and methods	107
Results and discussion	113
Conclusions	121
IV DISCUSIÓN	129
Discusión	131
Desarrollo de una aplicación web para recoger, visualizar y analizar resultados de estudios de proteómica de <i>C. albicans</i>	132
Creación de un PeptideAtlas de <i>C. albicans</i>	135
V CONCLUSIONES	141
Conclusiones	143
Bibliografía	145
Lista de acrónimos	162

Índice de figuras

Introducción	3
1.1. Aumento de complejidad desde el genoma hacia el proteoma	4
1.2. Esquema de un espectrómetro de masas	6
1.3. Ionización MALDI y ESI	8
1.4. Analizadores de masas	10
1.5. Espectrometría de masas en tandem. MS/MS	12
1.6. Nomenclatura de Roepstorff para los fragmentos en MS/MS	14
1.7. Etapas en un experimento de proteómica <i>shotgun</i>	18
1.8. Interpretación automática de espectros MS/MS	21
1.9. Estrategia básica de identificación	24
1.10. Tabla de contingencia. Contraste de hipótesis	29
1.11. Estimación del e-valor	30
1.12. Distribuciones de espectro individual y promedio	32
1.13. Construcción de una base de datos señuelo	33
1.14. Modelo mixto de probabilidad. PeptideProphet	37
1.15. Agrupamiento no aleatorio de péptidos en proteínas	39
1.16. Adquisición y reconstrucción de la señal en un experimento SRM	44
1.17. Formatos de archivos en proteómica	46
1.18. Equilibrio entre <i>Candida albicans</i> y células del sistema inmune .	50
Proteopathogen, a protein database for studying <i>Candida albicans</i> - host interaction	57
Figure 1	62

Proteopathogen2: A database and web tool to store and display proteomics identification results in the mzIdentML standard	69
Figure 1	75
Figure 2	77
A <i>Candida albicans</i> PeptideAtlas	85
Figure 1	92
Figure 2	94
Figure 3	96
A comprehensive <i>Candida albicans</i> PeptideAtlas build enables deep proteome coverage	103
Figure 1	107
Figure 2	114
Figure 3	115
Figure 4	118
Figure 5	121
Discusión	131
2.1. Página de inicio de Proteopathogen2	134
2.2. Información básica para Mp65p y péptidos observados en PeptideAtlas	138

Índice de Tablas

Proteopathogen, a protein database for studying <i>Candida albicans</i> - host interaction	57
Table 1	61
Proteopathogen2: A database and web tool to store and display proteomics identification results in the mzIdentML standard	69
Table 1	73
A <i>Candida albicans</i> PeptideAtlas	85
Table 1	90
A comprehensive <i>Candida albicans</i> PeptideAtlas build enables deep proteome coverage	103
Table 1	107
Table 2	118

INTRODUCCIÓN

Introducción

1.1. Proteómica. Conceptos generales

El concepto de proteoma fue acuñado originalmente por Marc Wilkins en los años 90 en analogía al concepto de Genoma (Wasinger *et al.*, 1995). Si el genoma es la dotación génica de una célula u organismo, el proteoma es entendido como *el conjunto total de proteínas expresadas por los genes de una célula, tejido u organismo*. Sin embargo, mientras que el Genoma es el mismo en todas las células del organismo, el proteoma es un concepto más variable. Los genes se expresan en función de las condiciones en que se encuentra la célula, según el orgánulo, el tejido, y estadío del desarrollo entre otros factores. Además existen niveles de complejidad adicional en el curso de información desde el gen a la proteína como el procesamiento alternativo de intrones y las modificaciones post-traduccionales PTM (*Post-Translational Modification*, Modificación Post-Tradicional). Por eso el término *proteoma* puede diversificarse, para ajustarse a definiciones mas específicas. Así, podemos hablar del proteoma (o fosfo-proteoma, por ejemplo) de un orgánulo celular, como la mitocondria, en un tejido concreto, en unas condiciones ambientales definidas por los nutrientes disponibles, posiblemente sometida a condiciones de estrés, etc.

Proteómica es, por tanto, el estudio del proteoma, independientemente del conjunto o subconjunto de proteínas objeto de estudio. Pero además, el término *proteómica* se refiere a las tecnologías utilizadas para ello.

El establecimiento de la espectrometría de masas aplicada a moléculas biológicas a finales de los años 80 y el desarrollo de técnicas de separación de proteínas y péptidos como la electroforesis PAGE (*Polyacrylamide Gel Electrophoresis*, Electroforesis en Gel de Poliacrilamida) y la cromatografía HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*, Cromatografía Líquida de

INTRODUCCIÓN

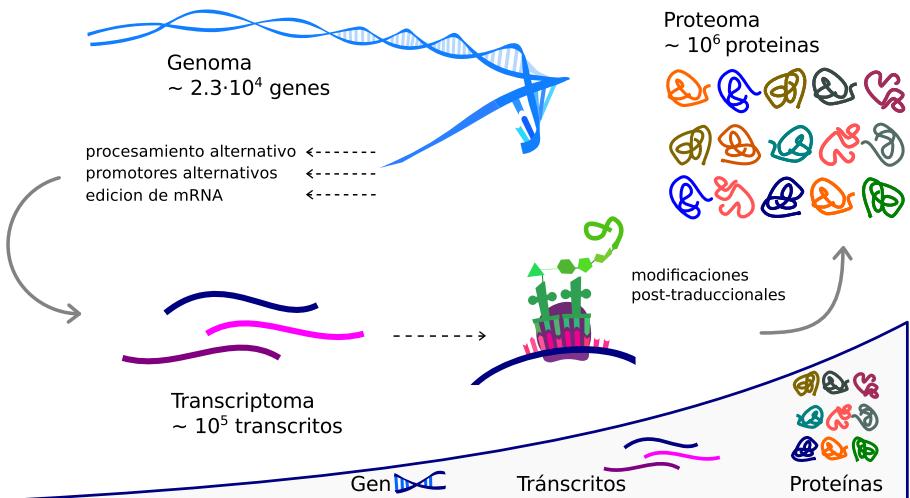


Figura 1.1: Aumento de complejidad desde el genoma hacia el proteoma

Alta Eficacia) permitieron que la proteómica se consolidara y extendiera como disciplina científica.

La figura 1.1 ilustra como el grado de complejidad biológica desde la unidad de información, es decir, el gen, hasta la unidad funcional, la proteína, aumenta exponencialmente.

1.2. Espectrometría de masas

El desarrollo, a finales de los años 70 del siglo pasado, de las técnicas de ionización suave como la desorción FD (*Field Desorption*, Desorción por Campo Eléctrico), la desorción PD (*Plasma Desorption*, Desorción por Plasma) y la ionización FAB (*Fast Atom Bombardment*, Bombardeo con Átomos Rápidos) permitió por primera vez que las grandes y lábiles moléculas biológicas como péptidos y proteínas pudieran ser ionizadas y volatilizadas relativamente intactas para ser a continuación introducidas en los espectrómetros de masas. Posteriormente, a finales de los 80, el desarrollo de la ionización ESI (*Electrospray Ionization*, Ionización por Electrospray) (Fenn *et al.*, 1989) y SLD (*Soft Laser Desorption*, Desorción Suave por Láser) (Tanaka *et al.*, 1988), además de valer el premio Nobel a los químicos John Fenn y Koichi Tanaka, permitió sentar definitivamente las bases de la espectrometría de masas aplicada a la proteómica.

Como ocurre en muchas otras ocasiones en la ciencia, de forma paralela e

independientemente habían surgido en distintas partes del mundo ideas muy similares. Así, el desarrollo de SLD que valió el Nobel a K. Tanaka, tuvo un precedente unos años antes. Franz Hillenkamp y Michael Karas en Frankfurt, Alemania (éstos discutiblemente no galardonados) habían ideado una técnica similar que, en este caso, denominaron MALDI (*Matrix Assisted Laser Desorption Ionization*, Ionización mediante Desorción por Láser Asistida por Matriz) (Karas and Hillenkamp, 1988). Aunque la ionización MALDI no fue aplicada a proteínas hasta la publicación del trabajo de Tanaka, actualmente éste es el acrónimo que se ha impuesto para referirse a la técnica y es, de hecho, una técnica muy extendida en laboratorios de espectrometría de masas.

1.2.1. Consideraciones sobre unidades empleadas en espectrometría de masas

La unidad fundamental de masa usada en física y química, empleada en la medida de masas atómicas y moleculares, es la llamada *Unidad de Masa Atómica*, **u**, o **uma** también denominada *Dalton*, **Da**. La escala de unidades de masa atómica es una escala relativa donde la referencia es el átomo de carbono. El valor de una *u* o un *Dalton* se define como la doceava parte de la masa de un átomo neutro de ^{12}C , el isótopo más frecuente de carbono. Así, la masa de un átomo de ^{12}C es de 12 *u*. Y una *u* es aproximadamente equivalente a la masa de un átomo de hidrógeno o la masa de un protón.

$$1\text{Da} = 1\text{u} = 1/12 \cdot \left(\frac{12\text{g } ^{12}\text{C}}{\text{mol } ^{12}\text{C}} \right)$$

$$1\text{Da} = 1\text{u} = 1/12 \cdot \left(\frac{6,0221 \times 10^{23} \text{átomos } ^{12}\text{C}}{\text{mol } ^{12}\text{C}} \right)$$

$$1\text{Da} = 1\text{u} = 1,66054 \times 10^{-24} \text{g/átomo } ^{12}\text{C} = 1,66054 \times 10^{-27} \text{kg/átomo } ^{12}\text{C}$$

(1.1)

Sin embargo los analizadores de masas no miden la masa de los analitos ionizados sino la relación entre masa y carga m/z , donde m es la masa molecular del analito y z un múltiplo entero del número de cargas del ion. La unidad empleada para medir esta relación es el *Thomson*, **Th**. Un thomson equivale a 1 Da / e, donde e es la carga elemental. En general, para iones monocargados

INTRODUCCIÓN

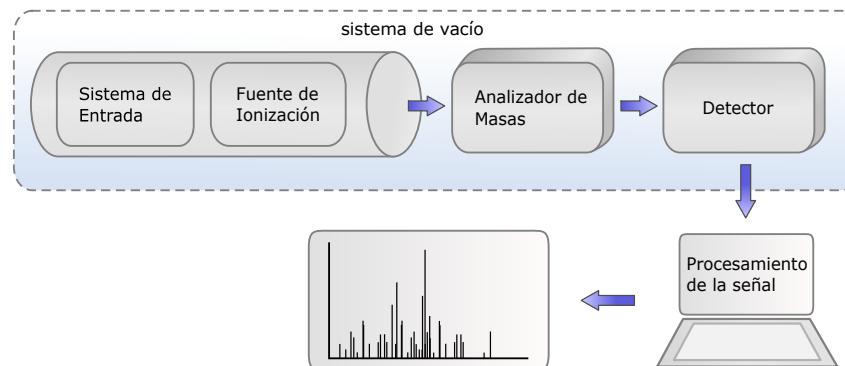


Figura 1.2: Esquema de un espectrómetro de masas. En ocasiones el caso de ESI, el sistema de entrada y la fuente de ionización forman parte de un único componente. Todos los componentes se encuentran en el interior de un sistema de vacío

y solo en ese caso, la masa en Da es equivalente a su valor en thomsons.

Además, en espectrometría de masas es interesante medir la masa exacta de los isótopos de los elementos que componen las moléculas. En este sentido es importante diferenciar entre las masas mono-isotópica y masa promedio.

La *masa promedio* es equivalente a una media de las masas atómicas de todos los átomos de los elementos que componen el ion ponderados por abundancia isotópica. Mientras que la *masa mono-isotópica* es aquella en la que se considera que todos los átomos de C se encuentran en su forma ¹²C.

1.2.2. Espectrómetro de masas

Un espectrómetro de masas es, en esencia, una balanza de precisión molecular capaz de medir, hasta un determinado límite de sensibilidad, la masa (en relación a la carga) de moléculas (ionizadas). Consta básicamente de cuatro partes o secciones:

1. **Sistema de entrada.** Generalmente los espectrómetros de masas se encuentran acoplados con sistemas cromatográficos de alta resolución que permiten que los analitos de una muestra inicialmente muy compleja sean separados e introducidos gradualmente. Este acoplamiento requiere una interfaz, una conexión física y funcional entre el sistema de cromatografía y el espectrómetro, que consiste generalmente en una co-

lumna capilar de caudal controlado. En ocasiones, como es en el caso de ESI, el sistema de entrada y la fuente de iones forman parte de un único componente.

2. Fuente de iones. Las macromoléculas biológicas, como proteínas y péptidos, no son fácilmente volatilizadas. El desarrollo de las técnicas de ionización suave permitió que péptidos y proteínas ionizados y relativamente intactos pudieran ser introducidos, en fase gaseosa, en un sistema de vacío en los espectrómetros de masas para ser analizados. La ionización ESI y MALDI son las más comunes en proteómica aunque existen también otros métodos un poco menos utilizados.

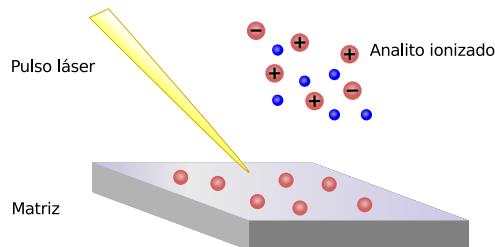
- **MALDI** (Figura 1.3 a) consiste en embeber la muestra en una matriz líquida, que posteriormente se seca, con alta capacidad de absorber luz UV sobre la que inciden pulsos de luz láser UV. Al absorber la energía del láser las moléculas que conforman la matriz son ionizadas por adición de protones que son luego transferidos al analito.
- En **ESI** (Figura 1.3 b) el analito se encuentra en fase líquida en un solvente orgánico volátil como metanol o acetonitrilo. Esta solución es conducida a través de un capilar sometido a un campo eléctrico de forma que las micro-gotas en el ápice del capilar, una vez que la carga supera un límite, forman un aerosol. Las micro-gotas del aerosol disminuyen su tamaño por evaporación del solvente, reagrupándose en gotas más estables y pequeñas en un proceso reiterativo, hasta el punto en que las moléculas de analito se repelen con la fuerza suficiente para superar la tensión superficial y liberarse (explosión de Coulomb) quedando en suspensión y siendo así introducidos en un sistema vacío hacia el espectrómetro.

Otros tipos de ionización menos empleados en proteómica son los conocidos por los acrónimos FAB, FD y PD.

3. Analizador de masas. El analizador de masas es la parte del instrumento en la que los iones se separan en base su relación entre la masa y carga (m/z). Es el elemento que se usa generalmente para definir el tipo de instrumento. Existen varios tipos, y además pueden combinarse en los llamados espectrómetros híbridos. Así, un analizador de tipo

INTRODUCCIÓN

a) MALDI



b) ESI

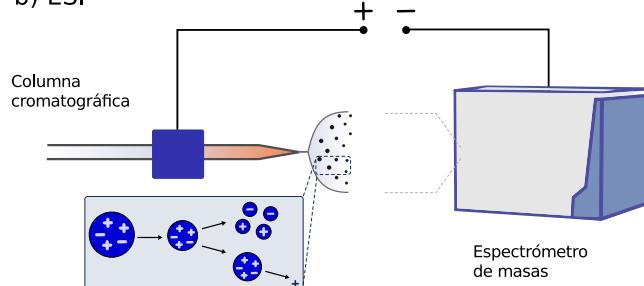


Figura 1.3: Ionización MALDI y ESI

cuadrupolo puede encontrarse acoplado con un analizador de tiempo de vuelo o una trampa iónica para formar un QTOF (*Quadrupole-Time Of Flight*, Cuadrupolo-Tiempo de Vuelo) o QTrap (*Quadrupole-Ion Trap*, Cuadrupolo-Trampa Iónica) respectivamente. Algunos de los analizadores de masas más empleados en proteómica son los siguientes:

- **Analizadores de tipo TOF** (*Time Of Flight*, Tiempo de Vuelo). Estos analizadores usan un campo eléctrico para acelerar los iones de analito. La separación se produce por la diferencia en el tiempo que éstos invierten en recorrer una distancia en el vacío en el interior del analizador, el llamado *Tiempo de Vuelo*. La aceleración y por tanto el Tiempo de Vuelo es una función de la relación m/z de los iones que impactan en el detector a diferentes tiempos. Los analizadores TOF separan todo el paquete de iones ionizados en una escala dependiente del tiempo y por tanto se usan generalmente en combinación con ionización MALDI, que introduce iones en el analizador en pulsos de láser en un régimen discontinuo controlado.
- **Cuadrupolos.** Los analizadores de tipo cuadrupolo (Figura 1.4 a) reciben su nombre porque constan de cuatro varillas metálicas de

sección hiperbólica en su cara interna enfrentadas en pares llamados polos con cargas opuestas. Sobre estos pares, además del potencial eléctrico de corriente continua, se aplica también una corriente alterna de radiofrecuencia. Esta conformación permite crear un campo eléctrico oscilante controlado que desvía selectivamente los iones que pasan a través y de esta forma solo los iones en un estrecho margen de valores m/z podrán llegar a impactar en el detector mientras que el resto son desviados y filtrados.

- Las **trampas iónicas** funcionan bajo el mismo principio físico que los cuadrupolos, pero la conformación en forma de cámara de las trampas iónicas permite confinar y acumular los iones que luego son liberados selectivamente.

Las trampa iónica QIT (*Quadrupole Ion Trap*, Trampa Iónica Cuadrupolar), descrita por el Nobel Wolfgang Paul en 1960, (Figura 1.4 c) consta de dos electrodos metálicos de sección hiperbólica enfrentados y un electrodo toroidal que conforman una cámara donde se acumulan los iones de analito. En el interior los iones orbitan en el vacío. El ajuste de la radiofrecuencia permite filtrar selectivamente los iones, estabilizando aquellos con determinados valores m/z y desestabilizando el resto, que colisionan con el electrodo y no llegan al detector (Louris *et al.*, 1987).

Las trampas iónicas LTQ (*Linear Trap Quadrupole*, Cuadrupolo de confinamiento lineal) o LIT (*Linear Ion Trap*, Trampa Iónica Lineal) consisten en un sistema de cuadrupolo, que sitúa los iones en un eje radial, y dos electrodos terminales, uno en cada extremo, que confina los iones longitudinalmente. Con respecto a las trampas iónicas tipo QIT, las trampas iónicas LTQ tienen una mayor capacidad de acumulación de iones y de barrido. Además pueden funcionar como un cuadrupolo convencional.

Orbitrap (Figura 1.4 b) es un tipo de trampa iónica, relativamente reciente, desarrollado a finales de los años 90 del s.XX (Makarov, 2000). Consiste en un electrodo en un eje interno rodeado por un electrodo externo cilíndrico. Los iones son introducidos tangencialmente desde la fuente de ionización y, al ajustar la diferencia de potencial, son atrapados en órbitas elípticas longitudinales, en las

INTRODUCCIÓN

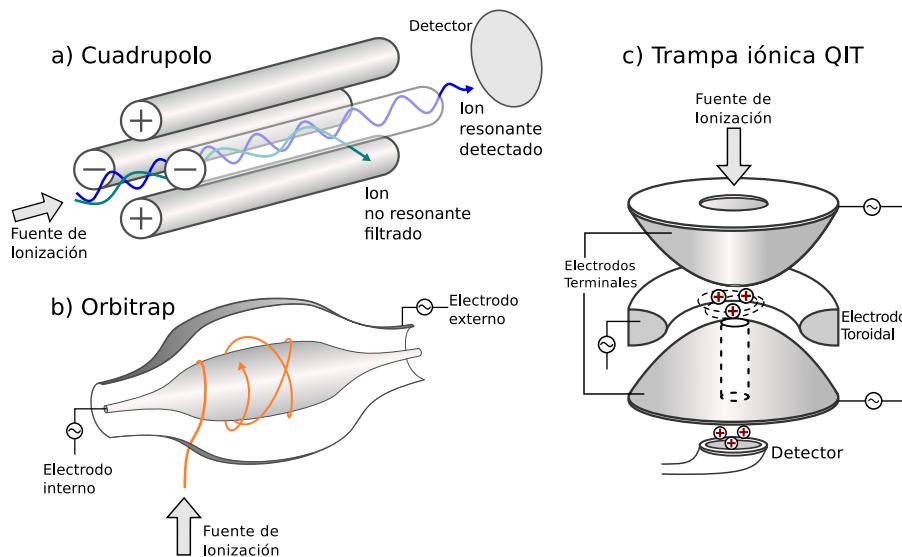


Figura 1.4: Algunos de los analizadores de masas más comunes son los de tipo cuadrupolo (a), Orbitrap (b) y trampa iónica cuadrupolar (c)

que la atracción hacia el eje interno es compensada por la fuerza centrífuga. La relación m/z se determina a partir de la frecuencia angular de la oscilación de los iones en torno al electrodo longitudinal interno.

Los analizadores de tipo FTICR (*Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance*, Resonancia Iónica Ciclotrónica - Transformada de Fourier) se basan en confinar los iones en una celda ICR donde un campo magnético homogéneo somete los iones a seguir una trayectoria circular con una frecuencia de rotación característica de cada relación m/z y del valor del campo. Al aplicar un campo eléctrico de igual frecuencia a la frecuencia de rotación, la partícula es excitada para seguir una trayectoria más larga aumentando el radio de giro provocando que los iones alcancen las placas de detección. La señal formada por la mezcla de las frecuencias de todos los iones es entonces deconvolucionada mediante la transformada de Fourier que permite la detección simultánea de todas las frecuencias.

4. **Detector** El detector es elemento final de un espectrómetro de masas. Registra la corriente producida por el haz de iones que incide sobre él convirtiéndola en una señal eléctrica medible. Los detectores más utiliza-

dos en espectrometría de masas son los *multiplicadores de electrones*. Este tipo de detector utiliza la energía cinética de los iones que inciden sobre una placa sobre la que se provoca una segunda descarga de electrones que inciden en otra placa y así sucesivamente de forma que se produce una reacción en cadena para conseguir la amplificación de la señal.

La *sensibilidad, resolución, precisión y exactitud* son parámetros importantes en espectrometría de masas ya que determinan notablemente la cantidad y calidad de información del espectro generado, lo que a su vez, es esencial para identificar el péptido que origina el espectro.

La *sensibilidad* de un espectrómetro de masas es la capacidad para detectar masas muy pequeñas. Puede llegar a ser de hasta unas pocas partes por millón (ppm) en el caso de instrumentos de alta precisión como el LTQ-Orbitrap, pero requiere un ajuste óptimo de múltiples parámetros como la calibración del instrumento o la temperatura entre otros.

La *resolución* es la capacidad para discernir señales que realmente corresponden a diferentes iones dentro de una ventana o margen de valores m/z . Esto es esencial para evitar la co-fragmentación, es decir, obtener fragmentos de iones precursores diferentes con valores m/z similares, o cuando se requiere conocer la distribución isotópica de un ion. La resolución, R, se define como la diferencia entre las masas de dos picos adyacentes que están resueltos

$$R = \frac{M}{\Delta M} \quad (1.2)$$

donde M es el valor entero más próximo de masa del primer pico y ΔM es el incremento de m/z a una determinada altura del pico. Frecuentemente se usa un 50 % de altura del pico, en ese caso el parámetro es el denominado FWHM (*Full Width at Half Mass*, Ancho de Pico a Media Altura).

La *exactitud* de la medida de la masa molecular es la diferencia entre el valor m/z obtenido para un ion y su valor real. Se expresa generalmente en partes por millón (ppm) y representa el error del valor m/z obtenido con respecto al valor verdadero.

La *precisión* es una medida de la dispersión de una serie de mediciones obtenidas para un analito determinado (en condiciones experimentales equiparables) con respecto a un valor promedio de referencia. El parámetro que se emplea generalmente como medida de precisión es la desviación estándar σ ,

INTRODUCCIÓN

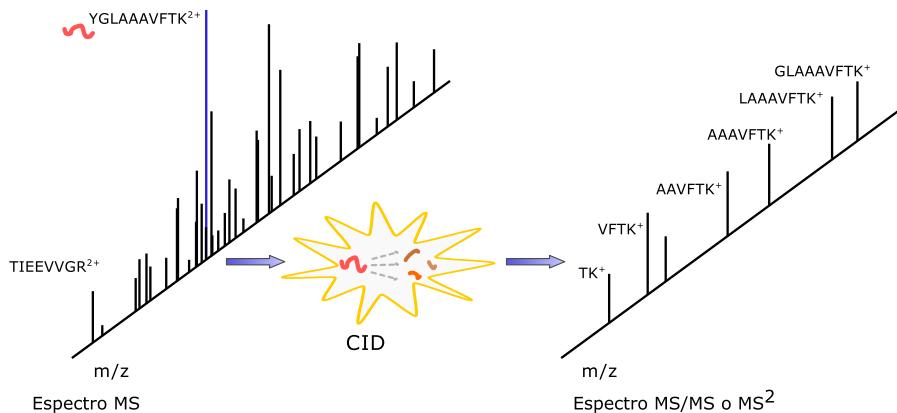


Figura 1.5: En la espectrometría de masas en tandem se seleccionan péptidos precursores, generalmente los de mayor intensidad en el espectro MS¹, para ser fragmentados y generar el espectro MS/MS o MS²

equivalente a la raíz cuadrada de la varianza.

1.2.3. Espectrometría de masas en tandem. MS/MS

Los péptidos, separados en el especlómetro de masas en base a su relación m/z , generan señales cuyas intensidades son registradas en el detector e interpretadas como un espectro. El objetivo básico en proteómica consiste en la elección del mejor péptido de una lista de posibles candidatos que ha generado el espectro, y por extensión la inferencia de la proteína originaria. Tras la adquisición de los espectros, el análisis informático consiste, en esencia, en estimar el grado de similitud entre el espectro empírico obtenido y espectros teóricos derivados de secuencias en una base de datos de referencia.

En ocasiones, cuando la proteína original se encuentra relativamente aislada, el espectro que generan los péptidos que se detectan en el instrumento es suficientemente informativo y específico de la proteína original y ésta puede ser identificada. Este es el principio de la técnica conocida como huella de masas peptídicas, descrita en la sección 1.4.1. Sin embargo, esta técnica requiere que la proteína se encuentre aislada y el rendimiento que ofrece es, por tanto, limitado.

En la espectrometría de masas MS/MS (*Tandem Mass Spectrometry*, Espectrometría de masas en tandem) o MS², los péptidos, una vez ionizados y en el interior del analizador, son sometidos a una fragmentación adicional.

(Figura 1.5). Los péptidos se fragmentan, generando iones más pequeños lo que hace que el patrón de fragmentación sea más específico de la secuencia original. Esto aumenta el poder de resolución del análisis, ya que permite distinguir péptidos que, intactos, tienen masas muy similares, pero cuyos patrones de fragmentación MS/MS son diferentes. Esto posibilita, además, partir de muestras con mezclas de proteínas más complejas incrementando así el rendimiento del experimento.

El proceso que conduce a la adquisición de espectros conlleva varias etapas. En primer lugar el instrumento escanea todos los péptidos ionizados introducidos en el espectrómetro y registra los llamados espectros MS¹, valores *m/z* y sus correspondientes intensidades para cada ion. A continuación, en función de la intensidad registrada en MS¹, se seleccionan y aislan algunos de estos iones, *precursores*, para ser fragmentados en péptidos más pequeños, *fragmentos*, en el interior del analizador. El espectro MS² adquirido o espectro de fragmentación, registra los valores *m/z* e intensidades de los fragmentos de cada uno de los péptidos precursores aislados y fragmentados. El patrón de fragmentación codificado en los espectros MS² contiene la información necesaria para deducir la secuencia aminoacídica del péptido que lo origina.

En algunos análisis puede ser necesario realizar fragmentaciones adicionales que permitan un poder de resolución mayor aún. Estos análisis se conocen como MSⁿ, donde *n* es el número de fragmentaciones y etapas de análisis de masas consiguientes.

A este método de adquisición de espectros de fragmentación, en el que los péptidos precursores son seleccionados para ser fragmentados en base las intensidades en el espectro MS¹ se le denomina también mediante el acrónimo DDA (*Data Dependent Acquisition*, Adquisición Dependiente de Datos)

Los fragmentos originados a partir del péptido, según la nomenclatura de Roepstorff (Roepstorff and Fohlman, 1984), se clasifican, en función del punto donde se produce la ruptura, en las denominadas series *x*, *y* y *z* si la carga del ion permanece en el extremo carboxilo-terminal y las series *a*, *b* y *c* si la carga permanece en el extremo amino-terminal. Además se añade un sub-índice que indica el número de residuos en el fragmento (Figura 1.6). Generalmente, los iones más abundantes e informativos son los *b*- e *y*-, generados por la fragmentación en el enlace peptídico entre aminoácidos, el punto de menor energía de la estructura. En analizadores tipo cuadrupolo o QTOF predominan

INTRODUCCIÓN

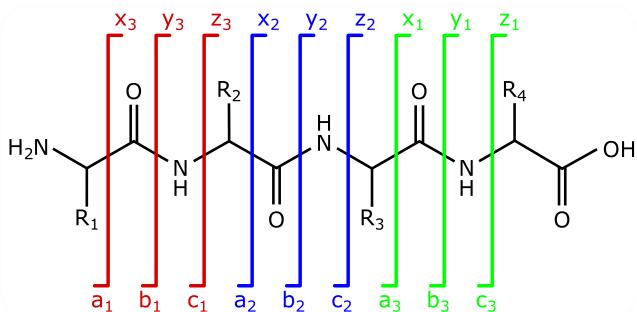


Figura 1.6: Nomenclatura de Roepstorff para los fragmentos en MS/MS

los iones y -, mientras que en las trampas iónicas se generan igualmente b - e y - (Steen and Mann, 2004).

Técnicas de fragmentación

La fragmentación CID (*Collision Induced Dissociation*, Disociación Inducida por Colisión) es uno de los métodos de fragmentación más frecuentemente utilizados en espectrometría de masas para proteómica. Consiste en hacer colisionar a las moléculas de analito con átomos o moléculas de gases nobles, químicamente inertes. Argón o Xenón son generalmente usados en triples cuadropolos y Helio en las trampas iónicas (Burlingame *et al.*, 1996). La colisión provoca que parte de la energía cinética del ion sea transformada en energía vibracional lo que provoca la ruptura del esqueleto peptídico. La fragmentación tipo CID genera una elevada proporción de iones de las series b - e y -.

Otros tipos de fragmentación son ETD (*Electron Transfer Dissociation*, Disociación por Transferencia de Electrones) (Syka *et al.*, 2004) en la que los iones de analito con carga positiva interaccionan con aniones que les transfieren un electrón produciendo una fragmentación con presencia de iones c - y z -; la disociación ECD (*Electron Capture Dissociation*, Disociación por Captura de Electrones) (Zubarev *et al.*, 1998), consistente la interacción del analito con electrones suministrados directamente; y, por último, la disociación HCD (*Higher Energy Collision Dissociation*, Disociación por Colisión de Alta Energía) usada en analizadores tipo Orbitrap (Olsen *et al.*, 2007), y que al igual que CID genera iones b - e y -, si bien, debido a la mayor energía de activación, los iones b - sufren fragmentaciones adicionales generando iones a - y otras especies de menor tamaño.

1.3. Digestión de proteínas en péptidos

Tras la obtención de una muestra de proteínas, ya sea una mezcla compleja o una proteína más o menos aislada y purificada, el primer paso en un experimento de proteómica consiste en someter a las proteínas a la acción de una enzima proteolítica que corta en puntos específicos de la secuencia y que las digiere en un conjunto de péptidos. Sin embargo, sabiendo que ciertos espectrómetros de masas tienen la capacidad de medir masas de proteínas intactas, podemos preguntarnos:

¿por qué hacer una digestión que aumenta el grado de complejidad de la muestra y que supone el problema añadido de la inferencia de la proteína originaria a partir de sus péptidos constituyentes? o dicho de otra manera ¿es necesario el paso intermedio de digestión en péptidos para luego inferir las proteínas originales?

La respuesta a estas preguntas, revisada en (Steen and Mann, 2004), tiene que ver, sobre todo, con limitaciones técnicas. El principal motivo es que la sensibilidad de los espectrómetros es menor para proteínas intactas que para péptidos. Pero además, las proteínas intactas pueden ser difíciles de manipular, algunas, como las proteínas de membrana son insolubles en condiciones en que otras sí lo son. Muchos detergentes comúnmente usados interfieren en MS ya que son fácilmente ionizables y se encuentran en gran cantidad en proporción a las proteínas (Hatt *et al.*, 1997).

La digestión consiste en la rotura de proteínas en péptidos por acción de una enzima proteolítica. Tradicionalmente se ha utilizado para esto *tripsina*, que rompe la secuencia aminoacídica a continuación, en el lado carboxilo-, de Arginina (R) o Lisina (K) a menos que exista una Prolina (P) adyacente. Los péptidos generados por acción de la tripsina, llamados péptidos *trípticos*, tienen un tamaño adecuado, dada la frecuencia media de R y K, para el análisis por espectrometría de masas lo que explica la popularidad de esta proteasa.

También es posible la utilización de otras proteasas siempre que se conozca su patrón de corte. Es de hecho una aproximación inevitable para aquellos casos en que la tripsina no sea útil, por ejemplo, debido a una baja frecuencia de R y K que no generen péptidos del tamaño adecuado.

1.4. Proteómica en gel

La separación de proteínas por electroforesis PAGE es una técnica, o serie de técnicas con variantes, que consiste en separar proteínas presentes en una muestra inicial en base a propiedades fisico-químicas diferenciadoras como su carga, tamaño y/o su punto isoeléctrico. En función del número de estas propiedades que se aprovechan para separar, en mayor o menor grado, las proteínas de una muestra se distinguen básicamente dos tipos de PAGE:

En la electroforesis 1D-PAGE (*Monodimensional PoliAcrylamide Gel Electrophoresis*, Electroforesis en Gel de Poliacrilamida Monodimensional), las proteínas se separan en función de su peso molecular, las más pequeñas avanzan más en el gel. En la electroforesis 2D-PAGE (*Bidimensional PoliAcrylamide Gel Electrophoresis*, Electroforesis en Gel de Poliacrilamida Bidimensional), (Klose, 1975; O'Farrell, 1975), las proteínas se separan en una primera dimensión (sobre una tira con un gradiente de pH inmovilizado) en función de su punto isoeléctrico para posteriormente, aplicar la segunda dimensión, equivalente a 1DPAGE.

Otra clasificación posible de las técnicas PAGE puede establecerse en función de si se usan condiciones desnaturalizantes o no. Entre las técnicas que usan geles desnaturalizantes probablemente la más empleada sea la electroforesis SDS-PAGE (*Sodium Dodecyl Sulfate PoliAcrylamide Gel Electrophoresis*, Electroforesis en Gel de Poliacrilamida con Dodecilsulfato Sódico). Y entre las que usan condiciones nativas o no desnaturalizantes, la llamada Blue Native, empleada para estudiar proteínas agrupadas en complejos.

La proteómica en gel ha sido (y continúa siendo) una técnica muy empleada en laboratorios de todo el mundo. Tiene algunas limitaciones, como el hecho de que proteínas de bajo peso molecular o muy hidrofóbicas no son fácilmente observables (Gygi *et al.*, 2000), o una limitación en el número de proteínas identificables a partir de un gel que difícilmente puede superar el millar (Klose and Kobalz, 1995).

Sin embargo, este tipo de estudios sigue teniendo un nicho en la proteómica actual (Rogowska-Wrzesinska *et al.*, 2013). Una ventaja notable es que permite la visualización, identificación y cuantificación de proteínas intactas. La particular capacidad de la proteómica en gel para separar proteínas con pequeños cambios en sus puntos isoeléctricos, *pI*, permite discernir entre iso-

formas de proteínas, o versiones de la misma proteína con PTM, lo es difícil de conseguir con otro tipo de aproximaciones.

1.4.1. Huella de masas peptídicas

La huella de masas peptídicas de una proteína se refiere al hecho de que el patrón de fragmentación de una proteína en los péptidos que la constituyen utilizando una enzima proteolítica determinada, es muy específico de la proteína originaria (siempre y cuando se conozca el patrón de corte de la enzima, como es el caso de la tripsina) de forma que el espectro que generan puede de ser utilizado para identificarla. Sin embargo, a pesar de esta especificidad, la enorme variedad de proteínas implica una mayor aún variedad de posibles péptidos generados a partir de ellas que pueden tener masas muy similares. Por ese motivo, para obtener una huella peptídica se requiere que la proteína se encuentre previamente aislada, generalmente a partir de una *mancha* o *spot* proteico de 2D-PAGE

La técnica de la huella peptídica, PMF (*Peptide Mass Fingerprint*, Huella de Masas Peptídicas), desarrollada a principios de los años 90 por varios grupos independientemente (Pappin *et al.*, 1993; Henzel *et al.*, 1993; Mann *et al.*, 1993) se lleva a cabo generalmente por espectrometría de masas MALDI-TOF(ToF). Esto significa que, una vez obtenidos los péptidos correspondientes a la proteína del *spot*, éstos se sitúan en una matriz MALDI, donde son ionizados e introducidos en un analizador TOF. Una vez obtenido el espectro patrón de masas peptídicas, el proceso de análisis consiguiente es similar al que se hace en la proteómica *shotgun*. Como se describe en las secciones siguientes, la identificación del péptido responsable del espectro se realiza utilizando un motor de búsqueda, que compara los valores de m/z del espectro obtenidos empíricamente con los valores de m/z calculados a partir de las secuencias de péptidos trípticos teóricos.

1.5. Proteómica *shotgun*

La proteómica *shotgun* (el término inglés se encuentra muy establecido) es la técnica de elección para la mayoría de estudios proteómicos enfocados a obtener un alto rendimiento. El nombre *shotgun* proviene de una analogía con las técnicas clásicas de secuenciación genómica donde el ADN es fragmentado en puntos no focalizados, indiscriminadamente, en secuencias más

INTRODUCCIÓN

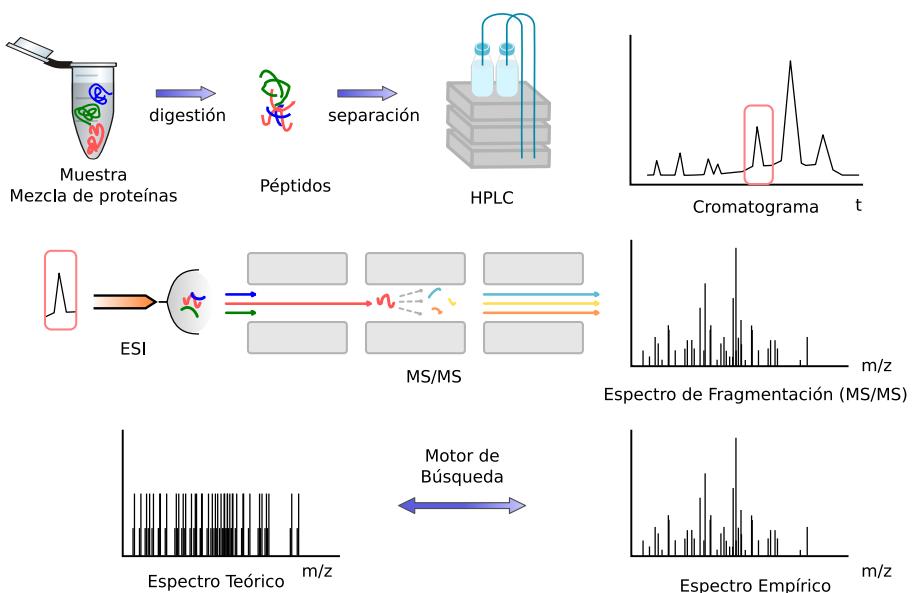


Figura 1.7: Etapas en un experimento de proteómica *shotgun*. En primer lugar la muestra de proteínas es digerida en péptidos. A continuación éstos son separados mediante algún tipo cromatografía, frecuentemente HPLC. A medida que eluyen, los péptidos separados, son introducidos en el espectrómetro de masas que genera un espectro de fragmentación MS/MS. Por último el motor de búsqueda compara los espectros empíricos con espectros teóricos asignando una puntuación.

pequeñas que posteriormente son ensambladas. En la proteómica *shotgun* las proteínas son fragmentadas en péptidos a partir de los cuales se infiere finalmente la proteína original. Implica varios pasos descritos en las siguientes secciones.

1.5.1. Separación de péptidos y proteínas sin gel

A diferencia de la técnica de la Huella Peptídica donde cada proteína se encuentra relativamente aislada, en la proteómica de alto rendimiento o *shotgun*, puesto que el objetivo es identificar el máximo número de proteínas en un solo experimento, se parte de una muestra más compleja. Esto es importante porque, sabiendo que a partir de cada proteína se generan múltiples péptidos (trípticos), el grado de complejidad de la muestra aumenta enormemente tras la digestión. Por este motivo, para evitar que la mezcla de péptidos sea demasiado compleja para la resolución en el análisis MS, previamente a la introducción de los péptidos en el espectrómetro, se realiza una cromatografía

que permite separar los péptidos para que sean ionizados y lleguen al analizador de masas gradualmente.

Opcionalmente esta separación puede comenzar a nivel de proteína por electroforesis en un gel 1D-PAGE , o incluso a un nivel estructural superior, por ejemplo, por fraccionamientos sub-celulares correspondientes a distintos orgánulos.

Cromatografía Líquida de Alto Rendimiento. HPLC

Pero el fraccionamiento más importante se hace a nivel de péptido, tras la digestión de las proteínas, por HPLC. El funcionamiento básico general en HPLC consiste en hacer pasar la muestra a través de una fase estacionaria en el interior de una columna mediante el bombeo a alta presión de una fase móvil. De esta forma los componentes de la muestra se retrasan diferencialmente en función de sus interacciones químicas con la fase estacionaria a medida que atraviesan la columna. La fase móvil suele ser una combinación, en proporciones variables, de un componente acuoso al que se añade un ácido (trifluoroacético o fórmico) y un solvente orgánico (comúnmente acetonitrilo o metanol). Esta proporción en la composición de la fase móvil puede ser constante (cromatografía isocrática) o variable, en gradiente de elución. En un gradiente típico, al aumentar la proporción del solvente orgánico, los analitos de la muestra irán progresivamente teniendo mayor afinidad por la fase móvil y se separan de la fase estacionaria. El *Tiempo de Retención* o *Tiempo de Elución* es el tiempo que necesita un analito para atravesar la columna. Siempre que las condiciones cromatográficas permanezcan invariables el tiempo de retención de un analito es una característica identificativa.

El tipo más común de cromatografía usada en experimentos de proteómica es la que se conoce como RP-HPLC (*Reverse Phase High Performance Liquid Chromatography*, Cromatografía Líquida de Alta Eficacia en Fase Reversa). En ella los analitos de la muestra se separan en base a su carácter hidrofóbico. La fase estacionaria, apolar, está compuesta por unas micro-esferas de sílice cubiertas de cadenas alquilo con 18 átomos de C (C18). Un gradiente en que el solvente orgánico aumente gradualmente y en proporción inversa al componente acuoso, provoca que los analitos más polares eluyan primero integrados en la fracción acuosa cuando hay una mayor proporción de ésta, mientras que los más hidrofóbicos son retenidos durante más tiempo. Además, la cromato-

grafía, usando una terminología similar a la usada para la separación de proteínas en gel, también puede ser multi-dimensional. La tecnología denominada MudPIT (*Multidimensional Protein Identification Technology*, Tecnología Multi-dimensional de Identificación de Proteínas) (Wolters *et al.*, 2001) integra una primera dimensión de separación usando una columna SCX (*Strong Cation Exchange*, Intercambio Catiónico Fuerte) y una segunda dimensión consistente en una cromatografía en fase reversa.

A continuación, una vez producida la separación cromatográfica, los péptidos son ionizados e introducidos en el espectrómetro de masas. En ocasiones, como el caso de la ionización ESI, el sistema de entrada y la fuente de iones forman parte de un único componente que se encuentra acoplado (*on-line*) al espectrómetro de masas.

Tras la adquisición experimental de los espectros, el paso siguiente en un experimento de proteómica *shotgun* implica el análisis computacional de esos espectros cuyo objetivo final es la obtención de una lista de proteínas que presumiblemente se encuentran en la muestra. Este análisis computacional, a su vez, consta de varios procesos secuenciales, principalmente la asignación de secuencias peptídicas a cada espectro (sección 1.6), la inferencia de las proteínas a partir de esos péptidos (sección 1.8) y una evaluación estadística que aporta medidas de fiabilidad a la identificación (sección 1.7).

1.6. Asignación péptido-espectro

En un experimento típico de proteómica *shotgun* pueden generarse miles de espectros por hora. La interpretación manual, por lo tanto no es una opción práctica. Diversas aproximaciones computacionales y herramientas de *software* se han desarrollado para facilitar esta tarea de asignación de secuencias peptídicas a los espectros MS/MS. A cada una de estas parejas péptido-espectro se les denomina generalmente PSM (*Peptide-Spectrum Match*, Asignación Péptido-Espectro).

Las estrategias utilizadas para la obtención de una lista de PSM básicamente pueden clasificarse en tres tipos. La más extendida es la búsqueda utilizando bases de datos de secuencias, consistente en establecer una correlación entre el espectro MS/MS obtenido empíricamente y espectros teóricos predichos a partir de secuencias. Otra estrategia, usada en casos en que el genoma del organismo objeto de estudio no está (o sólo parcialmente) secuen-

Interpretación automática usando espectros teóricos. Principios básicos

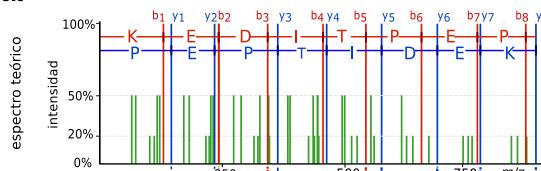
1 - Dado el conocimiento previo sobre:
 · Secuencias en BBDD de proteínas
 · Probabilidad de que cada tipo de ión se encuentre en un espectro MS/MS:

Iones b : 100%	Iones b , y + 2H : 50%
Iones a : 20%	Iones b , y -NH ₃ : 20%
Iones y : 100%	Iones b , y -H ₂ O : 20%

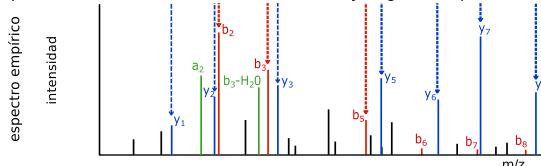
2 - Se puede crear un espectro teórico para una lista de péptidos candidatos elaborada conociendo:
 · Enzima proteolítica utilizada
 · Rango de tolerancia de masas
 · etc

Para cada espectro empírico:
 $\{c \in P : |M_{\text{teórica}} - M_{\text{empírica}}| < \text{Tol}\}$

c: péptido candidato **P**: péptidos (trípticos) en BD
Tol: tolerancia



3 - Y para cada uno de los espectros teóricos obtenidos comparar con el espectro empírico, obtener todos los iones coincidentes y asignar una puntuación



4 - Por último, en base a la puntuación, se puede obtener una lista de los mejores péptidos candidatos que posiblemente han originado el espectro

Figura 1.8: Interpretación automática de espectros MS/MS. Gracias a la información disponible sobre la presencia de los diferentes tipos de iones se puede elaborar una lista de péptidos candidatos que han generado el espectro empírico y para cada uno de ellos comparar y evaluar su similitud.

ciado, es la secuenciación *de novo* en la que la secuencia se infiere directamente del espectro sin ayuda de una base de datos de referencia. El tercer tipo de aproximación, la búsqueda basada en bibliotecas de espectros, requiere una recopilación, lo más extensa posible, de espectros MS/MS adquiridos previamente y ya asignados a péptidos, que son comparados directamente con los espectros empíricos adquiridos.

1.6.1. Búsqueda en bases de datos de secuencias

La búsqueda utilizando bases de datos de secuencias es el principal y más extendido método de asignación de una secuencia peptídica a un espectro MS/MS (figura 1.8). Existen una gran variedad de herramientas computacionales llamadas motores de búsqueda diseñadas para realizar esta tarea.

Los motores de búsqueda son un tipo de programas informáticos a los que se les suministra como entrada datos correspondientes a una lista de espectros MS/MS empíricos y una serie de parámetros que tener en cuenta para

INTRODUCCIÓN

restringir la búsqueda. El programa compara estos espectros reales registrados con espectros teóricos que es posible obtener gracias a diversas fuentes de información disponible como el patrón de corte de la enzima proteolítica utilizada, los valores m/z de los fragmentos que se producirían a partir de los péptidos, la frecuencia estimada de cada tipo de fragmento y las secuencias de las proteínas en una base de datos de referencia. En el proceso, el espacio de búsqueda se acota mediante la selección de una lista de péptidos posibles, (candidatos que cumplen unos criterios determinados), que posiblemente han generado el espectro MS/MS y a continuación se ordenan utilizando una puntuación función del grado de similitud entre el espectro empírico y el teórico.

Elaboración de una lista de péptidos candidatos

Para reducir el espacio de búsqueda entre todos los posibles péptidos candidatos que explican el espectro MS/MS y así reducir el coste computacional, el motor de búsqueda requiere, como estrategia heurística, una serie de parámetros proporcionados por el usuario. Éstos, básicamente, reflejan conocimiento previo sobre el experimento y pueden ser entendidos como información auxiliar para facilitar la distinción entre identificaciones auténticas o reales e identificaciones falsas. Los más importantes de estos parámetros son la enzima utilizada y el rango de masas en el que debe encontrarse el ion precursor.

- La selección de la enzima proteolítica utilizada limita la digestión predicha computacionalmente a aquellos péptidos que cumplan el patrón de corte conocido, filtrando el resto de posibles péptidos. Con esto se reduce enormemente el número de comparaciones que el motor de búsqueda debe realizar y, por tanto, el tiempo empleado para ello. Sin embargo, al restringir el tipo de enzima, se imposibilita la identificación de péptidos con rupturas inespecíficas (por ejemplo el procesamiento post-traduccional que provoca la liberación del péptido señal o por proteasas contaminantes presentes en la muestra)
- El establecimiento de un rango o ventana de tolerancia de masas, tanto a nivel de péptido precursor como a nivel de fragmentos, permite excluir aquellos péptidos y fragmentos que se encuentren fuera de dicho rango. Sólo los espectros teóricos de aquellos péptidos que cumplen este requisito son comparados con el espectro empírico y puntuados en base a su similitud. La elección de esta tolerancia depende del tipo de espectróme-

tro utilizado, así, para equipos de alta resolución tipo Orbitrap o FTICR se puede ajustar a valores inferiores a 1 Da.

Otros parámetros que se proporcionan al *software* y que afectan notablemente a la creación de la lista de candidatos y por tanto también al coste computacional son, la selección de masa mono-isotópica o masa promedio (es decir, considerar que todos los átomos de C se encuentran en su forma ^{12}C o bien que exista una proporción variable de isótopos ^{13}C); el número de puntos de corte no efectuados permitidos dentro de la secuencia del precursor; la existencia de modificaciones post-traduccionales y otras modificaciones permitidas (variables o fijas) que ocurren en el proceso experimental; y la selección del tipo de iones fragmento a buscar.

El establecimiento de estos valores tiene consecuencias muy notables en los resultados de identificación de péptidos y en consecuencia de proteínas. Por ejemplo, restringir a un rango de tolerancia muy pequeño el valor posible de masa del precursor, aunque puede ser útil para obtener espectros de gran calidad en instrumentos muy sensibles, puede dejar fuera secuencias válidas.

Una aproximación sensata puede consistir en (disponiendo de recursos computacionales suficientes) realizar una búsqueda muy abierta y posteriormente refinarla. En ocasiones se puede hacer una búsqueda con una ventana de tolerancia amplia para la masa del precursor y posteriormente emplear ese parámetro en el post-procesamiento (PeptideProphet, sección 1.7.4) de forma que se puede obtener un mayor rendimiento (en términos de identificaciones para una cierta tasa de error) comparado con una búsqueda para el mismo conjunto de espectros con una ventana más restrictiva (Ding *et al.*, 2008; Nesvizhskii, 2010).

Motores de búsqueda. Funciones de puntuación

Los motores de búsqueda se encargan de asignar a cada espectro empírico obtenido un péptido, el mejor candidato de una lista de los posibles péptidos que han generado ese espectro, con una cierta medida de puntuación función del grado de similitud entre espectro empírico y teórico. La estrategia general consiste en realizar una digestión teórica de las secuencias de proteínas de referencia, teniendo en cuenta los parámetros especificados. Así, para cada espectro observado, el motor de búsqueda recorre las secuencias en una base de datos (un archivo FASTA) seleccionando aquellos péptidos con valores

INTRODUCCIÓN



Figura 1.9: Estrategia básica de identificación. Para el conjunto seleccionado de péptidos candidatos se establece una correlación entre el espectro MS/MS empírico y el espectro generado teóricamente por cada uno de los candidatos.

m/z similares al del ion precursor en el espectro empírico y que se encuentran dentro del rango de tolerancia permitido obteniendo un espectro teórico para cada uno. A continuación se establece el grado de similitud de cada espectro adquirido con los espectros teóricos de cada uno de los péptidos candidatos, es decir, se evalúa la calidad de cada PSM.

Los motores de búsqueda realizan esta comparación de diferentes maneras, usando distintas funciones de puntuación. Algunos incluso calculan más de un tipo de puntuación. Existen una gran variedad de estrategias de puntuación descritas profusamente en la bibliografía, basadas en funciones de correlación entre espectros, basadas en contar el número de fragmentos compartidos, en alineamiento de espectros o en el uso de reglas derivadas más complejas.

SEQUEST (Eng *et al.*, 1994) fue la primera herramienta descrita para correlacionar espectros MS/MS con secuencias de aminoácidos y actualmente sigue siendo uno de los programas más utilizados. Para cada espectro adquirido, SEQUEST calcula de manera independiente la puntuación de correlación (*cross-correlation Score, Xcorr*) para todos los candidatos con los que es comparado. En primer lugar se crea un espectro empírico procesado (espectro X) en el que los picos de baja intensidad son eliminados y el resto de valores *m/z* son redondeados al valor entero más próximo. Para cada candidato se crea un espectro teórico (espectro Y) usando unas reglas de fragmentación

simplificadas. Entonces el valor $Xcorr$ es calculado usando la función de correlación $Corr(t)$ (el producto entre los vectores X e Y, con Y desplazado t unidades de masa respecto a X a lo largo del eje m/z) (a)

$$a) Corr(t) = \sum_i x_i y_{i+t} \quad (1.3)$$

$$b) Xcorr = Corr(0) - \langle Corr(t) \rangle_t$$

donde x_i e y_i representan los picos del espectro procesado y el espectro teórico respectivamente. Básicamente, $Xcorr$ contabiliza el número de fragmentos coincidentes entre el espectro empírico (procesado) y el espectro teórico permitiendo pequeños desplazamientos. Además la puntuación se corrige sustrayendo el valor medio de $Corr(t)$ en torno a $t = 0$, que representa una estimación de las coincidencias aleatorias entre picos (b). SEQUEST también proporciona un valor de puntuación adicional, ΔCn , que indica la diferencia entre el valor $Xcorr$ del mejor candidato y el del segundo mejor candidato. Ambos valores son por tanto indicativos de la calidad de cada PSM que será mejor cuanto más altas sean ambas puntuaciones.

Una adaptación no comercial, de código abierto, del algoritmo original de SEQUEST es el motor de búsqueda Comet (Eng *et al.*, 2013), que introduce la novedad de permitir paralelizar el proceso de búsqueda para poder ser ejecutado en procesadores multi-núcleo.

Otro motor de búsqueda frecuentemente utilizado es *X!Tandem* (Fenyö and Beavis, 2003), que calcula una puntuación llamada *hyperscore*. Ésta también se basa en contar el número de picos compartidos entre los espectros teórico y empírico, pero en este caso, en la versión original del software, se tiene en cuenta si los iones coincidentes pertenecen a las series *b*- e *y*-.

$$by - Score = \sum \text{Intensidad picos coincidentes } b \text{ e } y - \quad (1.4)$$

$$hyperscore = (by - Score) \cdot N_y! \cdot N_b!$$

Opcionalmente, *X! Tandem* puede ser modificado con la puntuación-k (McLean *et al.*, 2006), un producto escalar similar al implementado en Comet con una manipulación previa de las intensidades de los iones de los espectros teóricos candidatos.

El motor de búsqueda OMSSA (*Open Mass Spectrometry Search Algorithm*, Algoritmo Abierto de Búsqueda de Espectrometría de Masas) (Geer

INTRODUCCIÓN

et al., 2004), al igual que X!Tandem, es de código abierto. En OMSSA, la puntuación es un reflejo del número de coincidencias entre iones del espectro experimental y el teórico sin tener en cuenta si los iones son de tipo *b*- o *y*-.

Tanto X!Tandem como OMSSA proporcionan una medida adicional además de su propio método de puntuación, el *e*-*valor*, que da idea de la calidad de la asignación ya que puede interpretarse como el número esperado de péptidos con puntuación igual o superior a la del mejor péptido candidato.

Por último, *Mascot* es quizás el más popular de los motores de búsqueda a pesar de ser comercial y de que el algoritmo de correlación que usa nunca fue publicado. El programa calcula una puntuación expresada en términos probabilísticos llamada *ion score* que indica la probabilidad de que un número de coincidencias de picos hayan ocurrido aleatoriamente dado el número total de picos en el espectro y dada una distribución calculada de los valores *m/z* predichos para los candidatos

1.6.2. Otras estrategias de asignación péptido-espectro

Búsqueda basada en bibliotecas de espectros

Una alternativa posible a la búsqueda de espectros MS/MS usando espectros teóricos predichos computacionalmente a partir de bases de datos de secuencias consiste en buscar mediante comparación directa con otros espectros ya almacenados en una biblioteca de espectros. Estas bibliotecas se crean mediante la recopilación de espectros MS/MS observados e identificados en experimentos previos. Un nuevo espectro adquirido puede ser comparado directamente con los espectros de la biblioteca (que se encuentren dentro de un rango de tolerancia de masa permitida) y determinar así cual es la mejor coincidencia.

Al igual que en el caso de los motores de búsqueda basados en secuencia, existe un tipo específico de *software* que permite crear bibliotecas de espectros y realizar búsquedas usándolas como SpectraST (Lam *et al.*, 2007).

Este tipo de aproximación supera a la búsqueda basada en secuencia en términos de velocidad, tasa de error y sensibilidad en la identificación de péptidos (Lam *et al.*, 2007). Además, a los resultados obtenidos también se les puede aplicar los modelos de validación estadística desarrollados para las búsquedas basadas en secuencia.

Sin embargo, en contrapartida, sólo es posible detectar aquellos péptidos

que hayan sido previamente identificados y que se encuentren en la biblioteca de espectros.

Identificación por secuenciación *de novo*

La secuenciación *de novo* a diferencia de las otras aproximaciones para interpretar espectros MS/MS, no requiere información adicional como las secuencias de las proteínas o espectros recopilados en experimentos previos. Por este motivo, la interpretación de espectros *de novo* es útil para detectar proteínas de organismos no secuenciados o procedentes de muestras de origen desconocido.

Existe también para este tipo de aproximación *software* que automatiza el proceso. Sin embargo su uso no se encuentra muy extendido ya que, para la gran cantidad de espectros obtenidos en un experimento típico de *shotgun*, el proceso es computacionalmente muy exhaustivo y requiere espectros MS/MS de gran calidad.

1.7. Evaluación estadística de resultados de identificaciones de péptidos y proteínas

Frecuentemente en un solo experimento de proteómica *shotgun* se generan decenas de miles de espectros MS/MS. El procesamiento bioinformático automatizado de estos datos es por tanto un aspecto fundamental para la interpretación de los resultados. Por otra parte, no a todos los espectros MS/MS generados se les asigna un péptido, y a su vez, de todo el conjunto de PSM sólo una fracción son correctos, es decir el espectro corresponde realmente a la secuencia asignada. De hecho, en algunos experimentos realizados en instrumentos de baja resolución, los PSM incorrectos pueden llegar a suponer la mayoría (Nesvizhskii, 2007). Por eso, el desarrollo de métodos de evaluación de la calidad, en términos de confianza estadística, es una tarea crucial para filtrar los resultados generados.

1.7.1. Conceptos estadísticos básicos

El planteamiento general en el tratamiento estadístico en experimentos de proteómica consiste en enfrentar dos hipótesis. La hipótesis nula (H_0) indica que el péptido (o proteína) está incorrectamente identificado. La hipótesis alternativa (H_1) indica lo contrario, que la asignación es correcta. Los tests

INTRODUCCIÓN

estadísticos que se aplican enfrentan ambas hipótesis para aportar una medida de probabilidad estadística, generalmente la probabilidad de rechazar la hipótesis nula, es decir, de que la asignación sea correcta. (Figura 1.10). La población que se estudia puede ser la puntuación de todos los candidatos enfrentados a un espectro, o en términos globales, para todo un experimento, las puntuaciones de todos los PSM.

En la tabla de contingencia de la figura 1.10, U, V, T, y S corresponden a los Verdaderos Negativos, Falsos Positivos, Falsos Negativos y Verdaderos Positivos respectivamente. Con estos valores se pueden definir los conceptos de

- *sensibilidad* o tasa TPR (*True Positive Rate*, Tasa de Verdaderos Positivos). Es la proporción de asignaciones consideradas correctas (por encima del umbral) entre el total de asignaciones correctas.

$$TPR = \frac{S}{T + S} \quad (1.5)$$

- *especificidad*. Es la proporción de asignaciones consideradas incorrectas entre el total de asignaciones incorrectas.

$$especificidad = \frac{U}{U + V} \quad (1.6)$$

- Tasa FNR (*False Negative Rate*, Tasa de Falsos Negativos). Es la proporción de asignaciones consideradas incorrectas entre el total de asignaciones correctas.

$$FNR = 1 - sensibilidad = \frac{T}{T + S} \quad (1.7)$$

- Tasa FPR (*False Positive Rate*, Tasa de Falsos Positivos). Es la proporción de asignaciones consideradas correctas entre el total de asignaciones incorrectas.

$$FPR = 1 - especificidad = \frac{V}{U + V} \quad (1.8)$$

- Tasa FDR (*False Discovery Rate*, Tasa de Falsos Descubrimientos). Es la proporción de asignaciones consideradas incorrectas entre el total de asignaciones consideradas (por encima del umbral).

$$FDR = \frac{V}{S + V} \quad (1.9)$$

1.7. Evaluación estadística de resultados de identificaciones de péptidos y proteínas

INTRODUCCIÓN

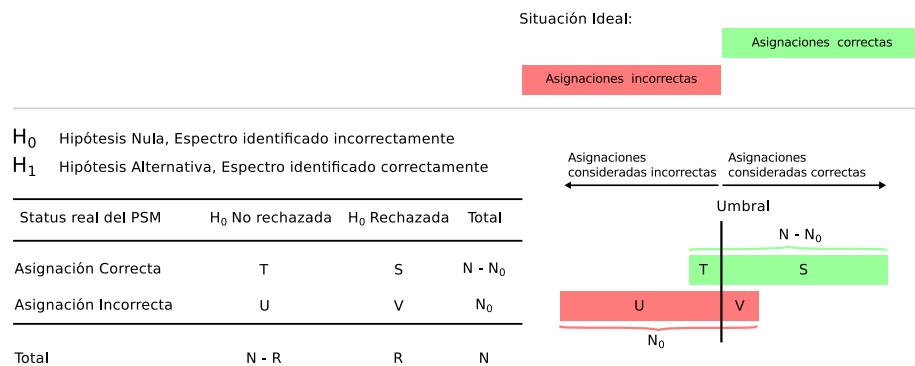


Figura 1.10: Tabla de contingencia. Contraste de hipótesis. La estrategia general consiste en realizar tests que permitan rechazar la hipótesis nula y por tanto tener un criterio estadístico para aceptar la hipótesis alternativa, es decir, afirmar que la asignación es correcta.

1.7.2. Puntuaciones basadas en distribuciones de espectro individual y promedio

Distribución de espectro individual

Generalmente los motores de búsqueda aportan varios tipos de puntuación para cada PSM. Un tipo de puntuaciones se refiere a la calidad de cada asignación en particular, evalúa el grado de similitud entre el espectro empírico y el péptido asignado, el mejor de la lista de candidatos. (*Xcorr* en SEQUEST, *hyperscore* en X!Tandem o *ionScore* en Mascot). Pero además, a veces, aportan una puntuación indicativa de la calidad del PSM en relación a otros, al segundo mejor candidato (ΔCn de SEQUEST); o con respecto a una población del resto de candidatos que obtuvieron puntuaciones inferiores utilizando los parámetros estadísticos *e*-valor y *p*-valor.

Para ello, en primer lugar se selecciona el mejor péptido asignado a un espectro, es decir aquel candidato con la mejor puntuación, y a continuación se construye una distribución de las puntuaciones del resto de péptidos comparados con el espectro. Esta distribución representa la hipótesis nula, la población de asignaciones PSM incorrectas.

El *p*-valor se calcula entonces relacionando la puntuación del mejor péptido con respecto a esta distribución (aleatoria) del resto de puntuaciones. Cuanto más alejada se sitúa la mejor puntuación del centro de la distribución mayor es la significatividad estadística del PSM. El *p*-valor, es por tanto, una medida de la probabilidad de que el mejor péptido candidato seleccionado sea asignado in-

INTRODUCCIÓN

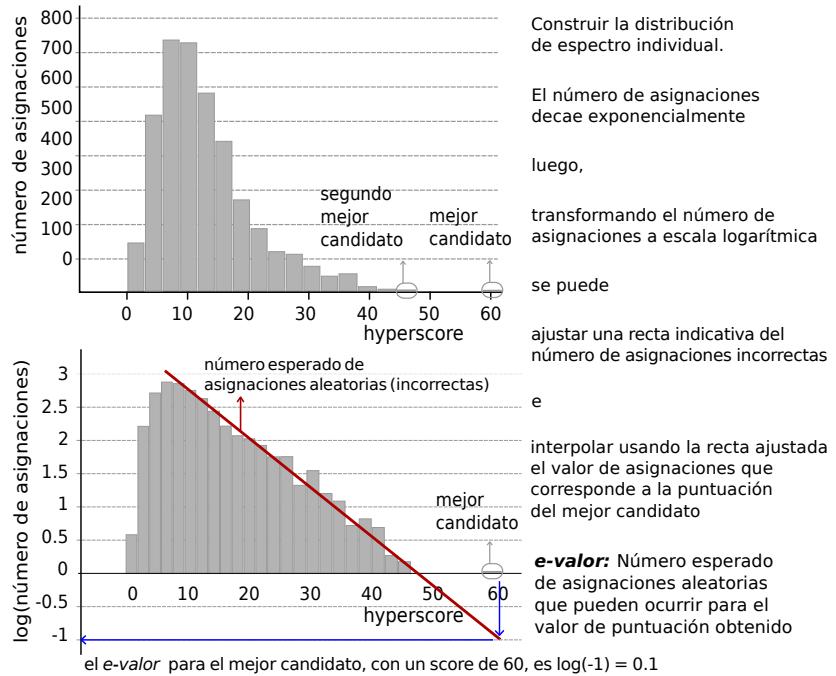


Figura 1.11: Para estimar el e-valor, X!Tandem convierte a escala logarítmica la distribución de espectro individual utilizando su puntuación (*hyperscore*) y a continuación, interpola, en la recta ajustada, (que representa el número de asignaciones aleatorias esperadas) el valor que correspondería a la mejor puntuación obtenida.

correctamente al espectro. Así, un *p-valor* bajo indicará una baja probabilidad de que el PSM haya sido asignado de forma incorrecta, es decir, es probablemente correcto.

El *e-valor* también se usa frecuentemente como medida de calidad en aproximaciones de espectro individual. Esá relacionado con el *p-valor* pero se interpreta como el número esperado de péptidos con puntuación igual o superior a la del mejor péptido candidato. X!Tandem calcula un *e-valor* obtenido empíricamente a partir de la distribución de espectro individual para cada PSM (Figura 1.11)

Ambos parámetros estadísticos, el *p-valor* y el *e-valor*, a diferencia del valor de puntuación original calculado por el motor de búsqueda, son independientes de la función de puntuación utilizada y por tanto suponen una medida más general de la calidad de cada PSM y son comparables en ensayos que usan distintos instrumentos, diferentes motores de búsqueda y parámetros (Nes-

vizhskii, 2010).

Algunos motores de búsqueda, además de su función de puntuación propia, como *hyperscore* en el caso de *X!Tandem* o *ion score* en el caso de *Mascot* también hacen uso de una distribución de espectro individual para calcular y proporcionar un *e-valor* para cada PSM.

Distribución promedio

En los experimentos *shotgun* generalmente se obtienen miles de espectros MS/MS. Las medidas estadísticas de las distribuciones de espectro individual por tanto, no son suficientes. Incluso en el caso de que se requiera un *p-valor* muy bajo, (lo que implicaría una confianza estadística muy alta para un PSM en concreto) si se evalúan miles de espectros MS/MS podrían ocurrir PSM con *p-valores* igualmente bajos sólo por azar. Por este motivo se utilizan estrategias de *corrección de test múltiple (multiple test correction)* que re-ajustan los *p-valores*. Una aproximación muy utilizada, aunque produce resultados conservadores, es la corrección de Bonferroni (Abdi, 2007), que simplemente divide el *p-valor* por el número de veces que se repite el test. Así para un PSM con *p-valor* = 0,05 en un experimento en el que hay otros 10.000 PSM, el *p-valor* original habría de reajustarse a $0,05/10.000 = 5 \cdot 10^{-6}$.

Las distribuciones promedio, como muestra la Figura 1.12, son distribuciones de las mejores puntuaciones de todos los PSM de un experimento y permiten por tanto estimar otros parámetros estadísticos adicionales a nivel global, como la Tasa de Falsos Descubrimientos, FDR y la probabilidad de un PSM en particular en el contexto global del experimento.

Es importante destacar que las aproximaciones que usan distribuciones de espectro individual son compatibles con las que usan distribuciones promedio, es decir, se puede realizar un análisis FDR global para un conjunto de PSM que han sido ordenados por *p-valores* o *e-valores* obtenidos individualmente.

1.7.3. Bases de datos señuelo y Tasa de Falsos Descubrimientos (FDR)

El tipo de evaluación estadística más ampliamente utilizada en experimentos de proteómica *shotgun* es un tipo de corrección de test múltiples, la *Tasa de Falsos Descubrimientos (FDR, False Discovery Rate)* (Benjamini and Hochberg, 1995). Básicamente, el concepto de tasa FDR se refiere a la proporción

INTRODUCCIÓN

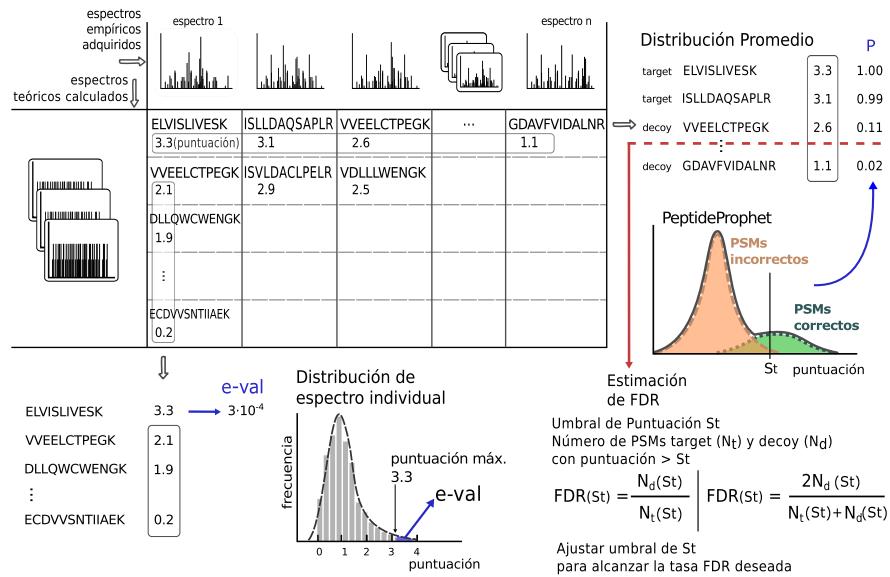


Figura 1.12: La distribución de espectro individual es la distribución de las puntuaciones de todos los péptidos candidatos comparados con el espectro empírico. La distribución promedio, es la distribución de las puntuaciones de los mejores candidatos para el total de todos los espectros empíricos. Ésta se puede de considerar una población mixta compuesta por una mezcla de subpoblación de asignaciones incorrectas y otra subpoblación de asignaciones correctas.

de PSM incorrectos que se aceptan en todo el conjunto de PSM de un experimento para un umbral de puntuación (o de parámetro estadístico como el *p*-valor) fijado.

Para la estimación de la tasa FDR (Figura 1.12), la estrategia utilizada consiste esencialmente en utilizar una base de datos llamada *señuelo* o *decoy* (Figura 1.13) (Elias and Gygi, 2007). Es una aproximación sencilla pero efectiva que requiere que los espectros MS/MS sean comparados con espectros teóricos derivados de secuencias *señuelo*, que pueden ser generadas de varias formas pero que, en cualquier caso, son secuencias que no existen, no corresponden a ninguna proteína. La asignación de espectros MS/MS a estas secuencias *señuelo* permite recrear una hipótesis nula. Se puede tener la certeza de que los resultados de identificaciones correspondientes a secuencias *señuelo*, claramente etiquetadas en el fichero fasta, son identificaciones incorrectas. A continuación, para hacer las búsquedas, se puede añadir a la base de datos de secuencias *reales* (secuencias *target*) un número equivalente de secuencias *señuelo* y hacer que el motor de búsqueda use esta base

1.7. Evaluación estadística de resultados de identificaciones de péptidos y proteínas

INTRODUCCIÓN

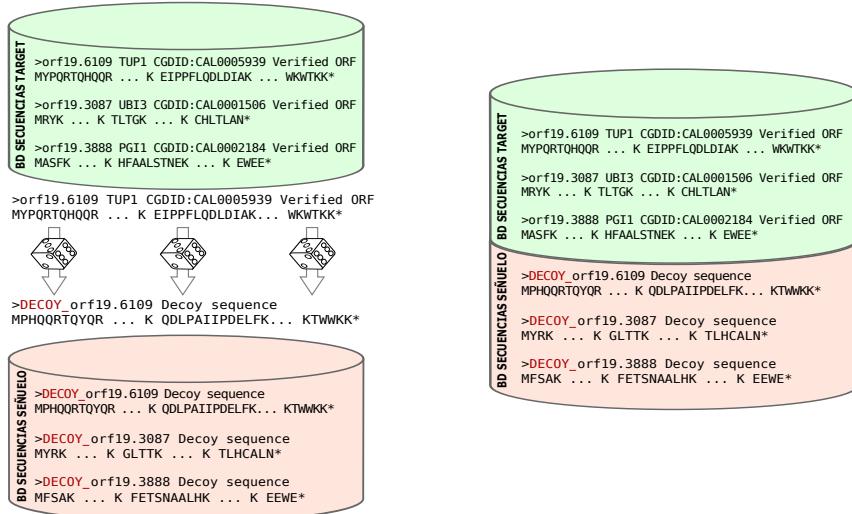


Figura 1.13: Una estrategia comúnmente empleada en la construcción de bases de datos señuelo consiste en barajar la secuencia aminoacídica, péptido a péptido (para así conservar el tamaño medio de los péptidos), de cada una de las proteínas en la base de datos original, para obtener así una base de datos señuelo, y a continuación concatenarlas.

de datos concatenada (*secuencias reales - secuencias señuelo*) del doble de tamaño que la original. O bien se pueden realizar dos búsquedas consecutivas, una utilizando la base de datos de secuencias *reales* y otra a continuación utilizando la de secuencias *señuelo*.

Las secuencias *señuelo* pueden obtenerse mediante varios métodos (Elias and Gygi, 2007; Käll *et al.*, 2008) La inversión de la secuencia de la proteína es un método sencillo que conserva la frecuencia media de cada aminoácido y permite generar siempre las mismas secuencias *señuelo* para sucesivas búsquedas. A cambio, el hecho de que no sea un orden aleatorio puede implicar que la población *señuelo* no refleje exactamente una hipótesis nula. También se pueden generar las secuencias de cada proteína de forma aleatoria. Esto también conserva las frecuencias de los aminoácidos, pero por otra parte, se elimina toda redundancia y se generarán por tanto un mayor número de péptidos *señuelo*. Otra opción es, en lugar de generar nuevas secuencias para cada proteína, crear péptidos *señuelo* de cada proteína dado el patrón de corte conocido de la enzima proteolítica utilizada. Esta opción tiene la ventaja de que los péptidos creados serán el mismo número y tendrán exactamente las mismas masas que las secuencias *reales*.

INTRODUCCIÓN

Una vez establecida esta hipótesis nula, la estrategia asume una idea básica central: la frecuencia con que los espectros MS/MS son asignados a secuencias *señuelo* sigue la misma distribución que la frecuencia con que los espectros son asignados incorrectamente a secuencias *reales*.

Así, de forma general y dado que las bases de datos de secuencias *reales* y *señuelo* tienen el mismo tamaño, el número de PSM incorrectos o Falsos Positivos (N_{inc} , aquellos espectros a los que se ha asignado incorrectamente una secuencia *real*) puede ser considerado equivalente al número de PSM *señuelo* (N_d , espectros a los que se ha asignado una secuencia *señuelo*). Con esto se puede estimar la tasa FDR como N_d/N_t , esto es, la proporción de PSM *señuelo*, N_d como sustituto conocido de N_{inc} , entre el total de secuencias *reales* con puntuaciones superiores al umbral fijado, N_t . En ocasiones, cuando las búsquedas se hacen sobre la base de datos concatenada, para tener en cuenta que el tamaño es el doble que la original, la tasa FDR también puede calcularse como $2N_d/(N_t+N_d)$

Esta estimación general puede tener variantes. En el caso de que se realicen dos búsquedas independientes, una sobre la base de datos *target* y a continuación sobre la equivalente *señuelo*, la estimación de FDR como N_d/N_t resulta conservadora ya que N_d puede considerarse una sobre-estimación de N_{inc} . Esto se debe a que toda la población de espectros se compara con las secuencias *señuelo* a pesar de que algunos de los espectros podrían asignarse correctamente a una secuencia *target*. Además, la mayoría de las funciones de puntuación tienden a otorgar puntuaciones más altas a PSM *señuelo* que a PSM *target* incorrectos por lo que la distribución de puntuaciones *señuelo* no es un reflejo preciso de la distribución de puntuaciones de los PSM incorrectos. Una forma de corregir este efecto consiste en estimar una aproximación previa de la fracción N_{inc} dentro de N_t considerando que la mayoría de los PSM con puntuaciones bajas son probablemente incorrectos (Käll *et al.*, 2008) Así se puede incluir en la tasa FDR un factor de corrección definido por el porcentaje estimado de PSM *target* incorrectos (PIT): Si en N_t el 80 % de los PSM son incorrectos, la tasa FDR calculada como N_d/N_t se multiplica por 0.8 para obtener un valor FDR más preciso (Por cada 100 PSM *señuelo* en el conjunto de PSM aceptado se estiman 80 PSM *target* incorrectos)

Las búsquedas utilizando una base de datos concatenada *target-decoy* son menos sensibles al efecto de sobre-estimación de N_d , sin embargo también

producen un resultado FDR conservador. En este caso ya no se compara todo el conjunto de espectros con las secuencias *target* y *señuelo* por separado sino simultáneamente lo que produce un efecto de competición. Se puede considerar que las secuencias *target* y *señuelo* compiten por el espectro. Pero esto implica que a algunos espectros se les puede asignar una secuencia *señuelo* con una puntuación mayor a la que se obtiene al asignarles la secuencia *target* correcta. En tal caso se produce un aumento de N_d y una consiguiente reducción del número de PSM correcto y por tanto un incremento de FDR.

Otra forma de mejorar la estimación de FDR es un algoritmo refinado (Navarro and Vázquez, 2009) que consiste en una búsqueda en bases de datos separadas teniendo en cuenta en conjunto las distribuciones de poblaciones de PSM *target* y PSM *decoy* y corrige el efecto de competición de las búsquedas en bases de datos concatenadas.

1.7.4. Modelos mixtos de probabilidad. Probabilidad posterior

La estrategia de las bases de datos *señuelo* permite una estimación global de la tasa FDR pero no proporciona un valor de confianza estadística para cada PSM individual.

PeptideProphet (Keller *et al.*, 2002) es un algoritmo de post-procesamiento (empleado después de que el motor de búsqueda haya establecido una lista de PSM), el primero en implementar este tipo de análisis, que permite estimar la confianza en los péptidos identificados aportando un valor de probabilidad posterior.

Resumidamente, PeptideProphet recalcula las puntuaciones y emplea un método de Bayes empírico -un procedimiento de inferencia estadística en que la distribución *a priori* se estima a partir de los datos- para establecer un modelo mixto de probabilidad que integra las subpoblaciones de espectros correctamente asignados e incorrectamente asignados.

Primero, PeptideProphet recalcula las puntuaciones. Mediante análisis discriminante, las distintas puntuaciones aportadas por un motor de búsqueda son combinadas en un solo valor que maximiza la separación de asignaciones correctas e incorrectas. La puntuación discriminante *S* resulta de una función combinación ponderada de las puntuaciones x_1, x_2, \dots, x_s expresada de forma

INTRODUCCIÓN

general:

$$S = F(x_1, x_2, \dots, x_S) = c_0 + \sum_{i=1}^S c_i x_i \quad (1.10)$$

donde la constante c_0 y el peso de las variables c_i son derivadas de forma que la proporción de la variación entre clases (asignaciones correctas e incorrectas) se maximiza con respecto a la variación dentro de cada clase.

Y como ejemplo específico para el caso de SEQUEST:

$$S = F_{SEQUEST}(Xcorr, \Delta C_n, SpRank) = c_0 + c_1 Xcorr + c_2 \Delta C_n + c_3 SpRank \quad (1.11)$$

Aunque en su versión original, el *software* requería una población de asignaciones correctas de referencia para estimar estas variables, posteriormente el algoritmo fue extendido para poder estimar los coeficientes de forma dinámica a partir de los datos en cada experimento (Ding *et al.*, 2008; Ma *et al.*, 2012).

PeptideProphet asume que la distribución de las puntuaciones recalculadas S puede explicarse como una combinación, una distribución mixta, en la que las asignaciones realmente correctas siguen una distribución $Normal(\mu, \sigma)$, y las asignaciones incorrectas, una distribución $Gamma(\alpha, \beta, \gamma)$. (Figura 1.14).

Pero además de la puntuación discriminante hay otros parámetros que contribuyen a la separación de las poblaciones de PSM incorrectos y PSM correctos. Concretamente los parámetros NTT (*Number of Tryptic Termini*, Número de Extremos Trípticos), NMC (*Number of Missed Cleavages*, Número de puntos de corte no efectuados) y el error en la masa del precursor, ΔM , tienen individualmente distribuciones diferentes para las asignaciones correctas e incorrectas (Choi and Nesvizhskii, 2008) lo que aporta una mejor definición de las distribuciones cuando son incorporados en un modelo mixto común.

A continuación, PeptideProphet usa un algoritmo EM (*Expectation-Maximization*, Esperanza-Maximización) y el teorema de Bayes para estimar las distribuciones *Normal*, de PSM correctos, y *Gamma*, de PSM incorrectos; y calcular una probabilidad para cada asignación individual.

Para iniciar, el algoritmo requiere los parámetros π_0 (la proporción de asignaciones incorrectas en toda la población); μ , σ , parámetros que definen la *Normal*; y α , β , γ , que definen la *Gamma*.

1.7. Evaluación estadística de resultados de identificaciones de péptidos y proteínas

INTRODUCCIÓN

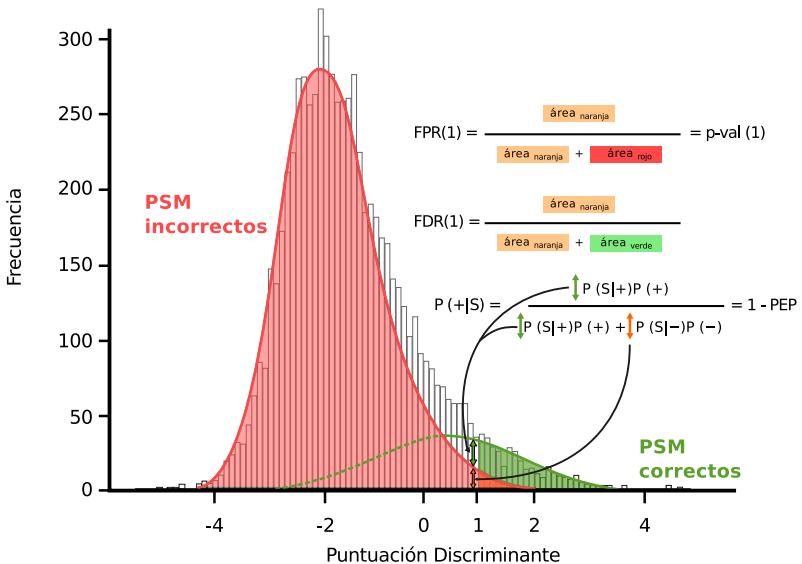


Figura 1.14: PeptideProphet considera la distribución promedio de PSMs como una mezcla de una subpoblación de PSM correctos (distribución Normal, en verde) y otra de PSM incorrectos (distribución Gamma, en rojo). Una vez inferidas estas distribuciones mediante el algoritmo *EM*, la probabilidad de un PSM en particular puede calcularse mediante el teorema de Bayes como la probabilidad de tener una puntuación siendo correcto con respecto a la probabilidad de tener esa puntuación.

En el primer paso *-E-* se usa el teorema de Bayes para estimar la probabilidad condicionada de cada puntuación de ser correcta:

$$P(+|S) = \frac{P(S|+)P(+)}{P(S|+)P(+) + P(S|-)P(-)} \quad (1.12)$$

donde $P(+|S)$ es la probabilidad de que el PSM con puntuación S sea correcta, $P(S|+)$ y $P(S|-)$ son las probabilidades condicionadas de una puntuación S entre las distribuciones correctas e incorrectas; y $P(+)$ y $P(-)$ son las probabilidades *a priori* de asignaciones correctas e incorrectas (Figura 1.14). Esta probabilidad puede entenderse como la probabilidad de que, teniendo una puntuación S , una asignación sea correcta con respecto a la probabilidad de tener esa puntuación. De la misma manera se puede calcular la probabilidad de ser incorrecta. En ese caso, el valor es la Probabilidad de Error Posterior, *PEP* que coincide con la *FDR local*.

Y en el siguiente paso *-M-*, una vez calculadas las probabilidades de cada

PSM se recalcularán los valores de los parámetros que describen las distribuciones.

Los pasos E y M se suceden iterativamente hasta la convergencia, el momento en que los parámetros estimados no difieren en valor absoluto de un error predefinido suministrado, ϵ .

Además de proporcionar probabilidades para cada PSM, PeptideProphet también calcula la FDR global. Para un umbral de puntuación t :

$$FDR(t) = \frac{P(-)P(S > t | -)}{P(S > t | -)P(-) + P(S > t | +)P(+)} \quad (1.13)$$

y otros parámetros como *p*-valor y la tasa de falsos positivos FPR. (Figura 1.14).

En un principio, cuando fue implementado (Keller *et al.*, 2002), este modelo mixto para el cálculo de probabilidades no hacía uso de búsquedas realizadas usando la estrategia de las secuencias *señuelo* pues no se había generalizado aún. Cuando comenzaron a emplearse este tipo de búsquedas PeptideProphet incorporó esta información haciendo que las puntuaciones correspondientes a péptidos *señuelo* sólamente puedan contribuir a la estimación de los parámetros que describen la distribución *Gamma* de PSM incorrectos. Esto permitió redefinir una versión semisupervisada del algoritmo (Choi and Nesvizhskii, 2008) en el sentido de que la clase (PSM correctos o incorrectos) pasa a ser un parámetro conocido para algunas pero no todas las asignaciones.

1.8. Inferencia de proteínas a partir de péptidos

En un experimento de proteómica *shotgun*, desde el momento de la digestión de las proteínas, todo el análisis subsiguiente se realiza a nivel de péptidos. Esto, que permite que la estrategia *shotgun* pueda obtener un alto rendimiento en la identificación de péptidos, sin embargo provoca una dificultad adicional para ensamblar una lista de proteínas que presumiblemente se encuentran en la muestra analizada.

Uno de los principales motivos que complican la inferencia de las proteínas se refiere a la pérdida de la correspondencia péptido-proteína como consecuencia fundamentalmente de la detección de péptidos compartidos o *degenerados* cuyas secuencias están en diferentes proteínas. Esta dificultad, descrita como parte del *problema de la inferencia de proteínas* en (Nesvizhskii

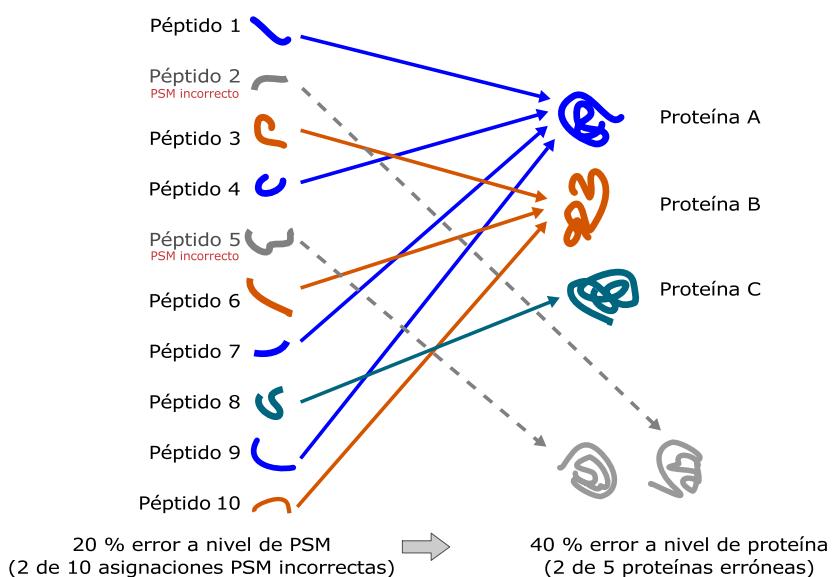


Figura 1.15: Agrupamiento no aleatorio de péptidos en proteínas. Los péptidos correctamente asignados generalmente se agrupan formando parte de una proteína, sin embargo esto no ocurre para las asignaciones incorrectas, cada PSM incorrecto corresponde a una proteína diferente y se traduce por tanto en una identificación de proteína errónea. (1 PSM incorrecto, 1 proteína incorrecta).

and Aebersold, 2005), a su vez se deriva de varios posibles escenarios. En algunos casos el procesamiento alternativo de intrones provoca la existencia de isoformas de una proteína en la muestra. De éstas, sólo algunas tienen en su secuencia péptidos trípticos exclusivos que permitan, en caso de ser detectados, concluir la presencia de la proteína fehacientemente. En otros casos, proteínas diferentes procedentes de una familia de genes (parálogos) poseen una alta homología de secuencia. Frecuentemente, a pesar de detectar un cierto número de péptidos, no se puede asumir la presencia de ninguna de las proteínas de la familia en particular.

En función de la presencia de estos péptidos compartidos y de péptidos exclusivos de cada proteína se han descrito métodos y nomenclaturas adecuadas para definir como *identificada* una proteína o lista de proteínas (Nesvizhskii and Aebersold, 2005; Prieto *et al.*, 2012)

Un principio básico que ha sido muy utilizado es el de la llamada navaja de Occam (Nesvizhskii *et al.*, 2003) consiste en presentar el menor número posible de proteínas que pueda explicar todos los péptidos observados y, en

INTRODUCCIÓN

el caso de que varias proteínas estén representadas por varios péptidos compartidos (ninguno de ellos exclusivo de una proteína), presentar las proteínas en un grupo como una sola entrada de la lista.

Otra de las dificultades en la inferencia de proteínas es el fenómeno consistente en el agrupamiento dirigido de péptidos en sus correspondientes proteínas, lo que provoca una amplificación de las tasas de error. Como se observa en la figura 1.15, mientras que las identificaciones de péptidos correctas tienden a agruparse en un número pequeño de proteínas, los péptidos incorrectos, puesto que proceden de asignaciones aleatorias a entradas en la base de datos, suponen una proteína errónea por cada péptido.

Para combinar los péptidos en las proteínas originarias se pueden realizar varias aproximaciones. La más sencilla consiste en seleccionar de todos sus PSM el de mejor puntuación o probabilidad y usarlo como puntuación de la proteína. Sobre este método básico se puede añadir además reglas como que al menos dos péptidos que superen un cierto umbral de puntuación deben contribuir a la inferencia de la proteína. A menudo se emplean variaciones de este método, fijando distintos umbrales y criterios, sin embargo una aproximación estadística puede ser más interesante, utilizando las probabilidades a nivel de PSM para combinarlas y obtener una probabilidad a nivel de proteína. La herramienta ProteinProphet (Nevzinhskii *et al.*, 2003) implementa este tipo de análisis.

De forma general se podría calcular la probabilidad de una proteína P como 1 menos las probabilidades de ser incorrectos de cada uno (p_i) de sus péptidos:

$$P(\text{prot}) = 1 - \prod_i (1 - p_i) \quad (1.14)$$

Pero ProteinProphet refina las probabilidades de cada PSM previamente a combinarlas para tener en cuenta el problema del agrupamiento dirigido de péptidos en proteínas descrito, especialmente importante en proteínas representadas por un solo péptido. Este reajuste inicial consiste en tener en cuenta el parámetro NSP (*Number of Sibling Peptides*, Número de Péptidos Hermanos), de forma que se penalizan las probabilidades de péptidos cuando sólo uno aporta evidencia para una proteína mientras que las probabilidades se reajustan aumentándose en casos en que muchos péptidos hermanos aporten evidencia a la presencia de la proteína.

1.9. Herramientas adicionales de post-procesamiento y validación a nivel de péptido y proteína

INTRODUCCIÓN

El reajuste teniendo en cuenta el NSP se realiza con una aproximación de Bayes empírica análoga a los modelos de PeptideProphet que estima las distribuciones de NSP entre las poblaciones de péptidos correcta e incorrecta:

$$NSP_i = \sum_{j \neq i} p_j$$
$$p'_i = \frac{p_i f_1(NSP_i)}{p_i f_1(NSP_i) + (1 - p_i) f_0(NSP_i)} \quad (1.15)$$

$$P(prot) = 1 - \prod_i (1 - w_i^n p'_i)$$

donde $f_0(NSP)$ y $f_1(NSP)$ son las distribuciones NSP entre los péptidos incorrectos y correctos, p'_i es la probabilidad ajustada para el péptido i , y w_i^n el peso del péptido i en la proteína n .

Pero además de reajustar las probabilidades de los PSM teniendo en cuenta el agrupamiento no aleatorio de péptidos en proteínas, ProteinProphet también considera la existencia de péptidos presentes en más de una proteína. Para ello otorga pesos de forma que la contribución de un péptido cuya secuencia está presente en varias proteínas

1.9. Herramientas adicionales de post-procesamiento y validación a nivel de péptido y proteína

Algunas herramientas bioinformáticas de post-procesamiento de resultados de identificaciones como PeptideProphet y ProteinProphet han demostrado ser de gran utilidad proporcionando un medio de calcular probabilidades y tasas de error de forma muy precisa. Sin embargo, la modelización que emplean a veces no resulta muy eficiente, especialmente en casos de listas de espectros e identificaciones muy grandes (Reiter *et al.*, 2009).

Por otra parte, frecuentemente interesa desde el punto de vista experimental, alcanzar una cobertura lo más amplia posible del proteoma objeto de estudio utilizando para ello una aproximación combinada con varios motores de búsqueda.

La herramienta de software iProphet (Shteynberg *et al.*, 2011) fue desarrollada para resolver este tipo de necesidades, implementando un modelo más completa de todas las fuentes de información en un experimento de proteó-

INTRODUCCIÓN

mica *shotgun*. Si PeptideProphet aporta probabilidades a nivel de PSM, esta extensión refina las probabilidades aportándolas a nivel de secuencia peptídica única, es decir combina todas las probabilidades de los PSM que se refieren a la misma secuencia. Para ello, el programa reajusta (mejorando o penalizando) los valores de salida de PeptideProphet (de forma análoga a como ProteinProphet lo hace con el parámetro NSP) usando cinco fuentes adicionales de información proporcionadas por los parámetros NSS (*Number of Sibling Searches*, Número de Búsquedas Hermanas), que aumenta las probabilidades de una secuencia peptídica si es identificada por múltiples motores de búsqueda; NRS (*Number of Replicate Spectra*, Número de Espectros Réplica), que tiene en cuenta si hay muchos espectros que son asignados a la misma secuencia con alta probabilidad; NSE (*Number of Sibling Experiments*, Número de Experimentos Hermanos), que aumenta las probabilidades de péptidos que son repetidamente identificados a partir de espectros obtenidos en distintos experimentos (asumiendo que son réplicas o protocolos similares); NSI (*Number of Sibling Ions*, Número de Iones Hermanos), que aumenta la probabilidad de un péptido si es encontrado en distintos estados de carga; y por último, NSM (*Number of Sibling Modifications*, Numero de Modificaciones Hermanas), que actúa de forma similar a NSI, aumenta la probabilidad si se encuentra una instancia modificada y sin modificar de un péptido.

Por otra parte, las herramientas hasta ahora descritas para el control de la tasa de errores, ya sea mediante la estrategia de búsqueda en bases de datos señuelo o bien con el control estadístico que aportan los modelos mixtos de probabilidad (PeptideProphet), permiten controlar la tasa FDR a nivel de PSM. Sin embargo obtener los valores de FDR a nivel de proteína implica un nivel adicional de complejidad. Dado que una proteína se considera identificada cuando contiene un conjunto de PSM que a su vez pueden ser correctos o no, el error, como muestra la figura 1.15, se propaga de forma especialmente acusada en experimentos que generan grandes conjuntos de datos (decenas de miles de espectros) (Reiter *et al.*, 2009). Por eso la estimación de FDR a nivel de proteína ha de tener en cuenta que los PSM falsos positivos y los PSM verdaderos positivos tienen distribuciones diferentes. Mientras que los primeros apuntarán aleatoriamente a entradas de toda la base de datos, los segundos solo corresponden al subconjunto de proteínas presentes en la muestra. Esto hace que en la práctica las tasas de error para proteínas sean mayores que

para PSM.

1.10. Proteómica dirigida. SRM

La proteómica *shotgun*, cuyo objetivo es detectar la mayor cantidad posible de proteínas en una muestra, se denomina en ocasiones por ello, proteómica *de descubrimiento*. En esto, esencialmente, la *proteómica dirigida* se distingue de las técnicas de *shotgun*, en el objetivo. Esta metodología no pretende identificar una gran cantidad de proteínas diferentes en la muestra, sino que intenta identificar y, opcionalmente también cuantificar, una proteína o un grupo de proteínas de interés seleccionadas *a priori*. De ahí el nombre proteómica *dirigida*. A diferencia de las técnicas *shotgun* donde los *n* precursores más abundantes son seleccionados para ser fragmentados en una adquisición dependiente de datos (DDA), en la proteómica dirigida la adquisición es denominada DIA (*Data Independent Acquisition*, Adquisición Independiente de Datos)

La técnica que se utiliza para llevar a cabo experimentos de proteómica dirigida se denomina SRM (*Selected Reaction Monitoring*, Monitorización de Reacción Seleccionada) o también, frecuentemente utilizado como sinónimo, MRM (*Multiple Reaction Monitoring*, Monitorización de Reacción Múltiple).

La proteómica dirigida, basada en técnicas SRM, desde hace unos años está emergiendo y popularizándose como un complemento ideal de las técnicas de *shotgun*. Las técnicas SRM proporcionan unas propiedades muy interesantes en experimentos en que se requiere que un grupo de proteínas, por ejemplo biomarcadores o proteínas constituyentes de una red o ruta particular, sean detectadas y cuantificadas de una forma precisa y reproducible en diferentes muestras que se quiere comparar.

Originalmente desarrollada para detectar y cuantificar pequeñas moléculas como metabolitos o fármacos, las primeras aplicaciones de SRM al campo de la proteómica comenzaron en 2003 (Gerber *et al.*, 2003), 2004 (Kuhn *et al.*, 2004).

El principio fundamental en el que se basa la técnica SRM consiste en aprovechar la capacidad de espectrómetros de masas de tipo triple cuadrupolo para actuar como filtros de masas de analitos a dos niveles consecutivos, el de un péptido precursor, y el de los fragmentos que se generan tras ser éste fragmentado. Los péptidos son monitorizados usando *transiciones*, conjuntos

INTRODUCCIÓN

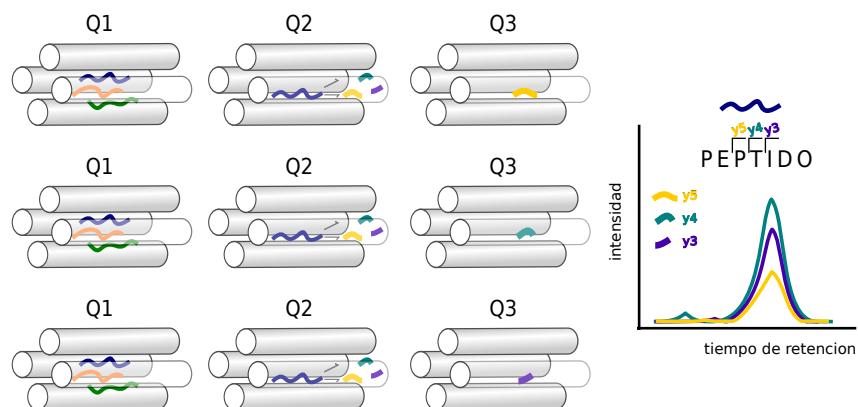


Figura 1.16: Adquisición y reconstrucción de la señal en un experimento SRM

de valores m/z de un precursor y valores m/z de productos correspondientes. Este doble filtro es, idealmente, muy específico del péptido, y por extensión, de la proteína originaria. Por eso es esencial utilizar péptidos *proteotípicos*, aquellos cuya secuencia del péptido es única y específica de la proteína a la que pertenece.

La señal que se genera en el instrumento al medir la cantidad de estos fragmentos, junto con la información del tiempo de retención cromatográfica permite reconstruir un pico de elución en el que se puede observar que los fragmentos co-eluyen en el tiempo de retención del péptido monitorizado. (Figura 1.16)

Sin embargo, en ocasiones a pesar de usar péptidos proteotípicos y comprobar que los fragmentos coeluyen, puede ocurrir que las señales correspondan a otro péptido distinto al que se está monitorizando. Para aumentar la confianza en la identificación se puede disparar un espectro MS/MS a partir del péptido monitorizado y confirmar su identidad (MIDAS, *MRM Initiated Detection And Sequencing*) También se pueden añadir a la muestra versiones sintéticas de los péptidos que se monitorizan, con un marcaje isotópico que permitan ubicar el tiempo de retención exacto.

1.11. Repositorios públicos de proteómica *online*

Los resultados generados en experimentos de proteómica han de ser convenientemente mostrados y compartidos con la comunidad científica. Algunos

1.12. Formatos de archivos usados en espectrometría de masas y proteómica

de los repositorios más populares que almacenan y permiten visualizar resultados de experimentos de proteómica son PRIDE y PeptideAtlas.

1.11.1. PRIDE

La base de datos PRIDE (*Protein Identifications Database*), creada en el Instituto Bioinformático Europeo en Inglaterra (Martens *et al.*, 2005) es el repositorio más extenso de datos de espectrometría de masas. Almacena los resultados originales enviados por los investigadores usando para ello su propio formato PRIDE XML. Además se han desarrollado herramientas que facilitan la creación y el envío de los resultados en este formato.

1.11.2. PeptideAtlas

El proyecto PeptideAtlas surgió en 2005 en el Instituto de Biología de Sistemas, Seattle, Washington. (Desiere *et al.*, 2006). A diferencia de PRIDE, donde los resultados enviados no son reanalizados de ninguna forma sino que se mantienen como los usuarios los enviaron, PeptideAtlas sí cuenta con un flujo de validación de los resultados. Este análisis, denominado TPP (*Trans Proteomics Pipeline*) (Deutsch *et al.*, 2010) emplea secuencialmente los programas descritos PeptideProphet, ProteinProphet y iProphet principalmente, para asegurar la calidad y robustez de los datos de identificaciones mostrados. Inicialmente contaba con datos de proteínas humanas y posteriormente un gran número de especies se han incorporado. El trabajo titulado *A Candida albicans PeptideAtlas* (Vialas *et al.*, 2013) forma parte del proyecto desde 2012.

1.12. Formatos de archivos usados en espectrometría de masas y proteómica

En el proceso de análisis de datos que sigue a la adquisición experimental de espectros se requiere un uso intensivo de *software*, desde la asignación de secuencias peptídicas a los espectros hasta la elaboración de listas de proteínas identificadas y evaluación estadística de los resultados. Existe una gran variedad de este tipo de programas, que sirven de apoyo a cada uno de estos pasos en el proceso de análisis

En términos muy generales se puede distinguir *software* abierto, que la comunidad bioinformática ha desarrollado en respuesta a las necesidades de

INTRODUCCIÓN

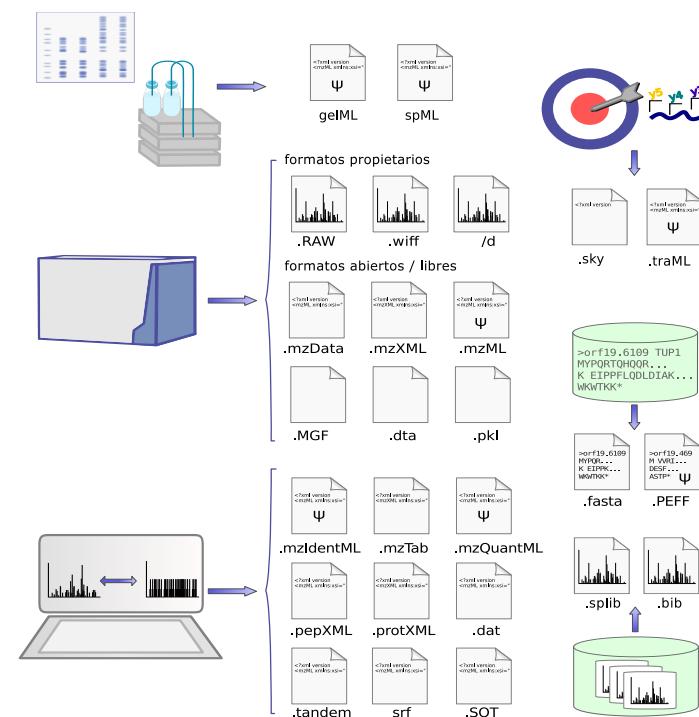


Figura 1.17: Visión general de formatos comúnmente usados en cada etapa de un experimento de proteómica. Los formatos adoptados como estándar por HUPO-PSI contienen el símbolo Ψ

compartir, inspeccionar y generar ficheros sin las restricciones que imponen las licencias; y *software* privativo desarrollado *ad hoc* por las compañías fabricantes de espectrómetros de masas para sus instrumentos. En este sentido la iniciativa HUPO-PSI ha adquirido un papel muy importante en la elaboración y difusión de formatos abiertos que puedan servir de estándar para toda la comunidad.

En una clasificación más precisa, estos formatos pueden clasificarse en función de la etapa del análisis al que sirven de ayuda.

- *Formatos que recogen la salida de los espectrómetros de masas*

Este es un tipo de formatos muy diverso. Depende básicamente, de la forma en que se detectan y recogen los espectros. Cuando la frecuencia en que se escanea cada fragmento es superior a la resolución del instrumento la señal se registra como picos con una forma y anchura precisas. Este tipo de adquisición es el *modo continuo o perfil*. Los instrumentos registran los espectros en modo continuo de forma predeterminada, pero

1.12. Formatos de archivos usados en espectrometría de masas y proteómica

frecuentemente son sometidos a un procesamiento por un algoritmo que extrae los picos detectados como parejas de valores m/z e intensidad. Esto se denomina adquisición de *datos centroide*.

Entre los formatos desarrollados por los fabricantes podemos encontrar aquellos para los que toda la información de los espectros se encuentra en un solo archivo, aquellos para los que la información se divide en un par de archivos y aquellos con múltiples archivos para cada adquisición de espectros. Así, para los instrumentos *Thermo Scientific* el formato es del primer tipo, toda la información es codificada en archivos con extensión .RAW (datos perfil o centroide a elección). Los instrumentos AB-Sciex en su mayoría (excepto los TOF-TOF) pueden generar archivos del segundo tipo, en pares donde un archivo con extensión .wiff contiene los metadatos y un archivo .wiff.scan contiene los espectros. Por último, para algunos instrumentos de Waters y Agilent, se obtienen múltiples archivos agrupados en carpetas con extensión .d o .raw.

Sin embargo, el hecho de que estos formatos sean codificados en binario junto con la disponibilidad de las librerías de lectura proporcionadas por los fabricantes restringida únicamente al sistema operativo MS Windows frenó el desarrollo de nuevas herramientas de lectura y manipulación de este tipo de archivos. En ese contexto, aparecieron los primeros formatos de texto (XML) para codificar toda la información de salida de MS, mzXML (Pedrioli *et al.*, 2004) y mzData que posteriormente fueron unificados en el estándar HUPO-PSI mzML (Deutsch, 2010).

Por último, una solución intermedia, ideada previamente a la aparición de los formatos basados en XML descritos, es la creación de ficheros de texto simples con una simple lista de los picos obtenidos para cada ión precursor y sus fragmentos. Los formatos de archivo con extensión .pkl .dta o .ms2 contienen espectros independientes en cada fichero, los .MGF pueden contener múltiples espectros en un solo fichero.

■ *Formatos que recogen el resultado de las búsquedas*

Este tipo de formatos se encuentra generalmente muy ligado al *software* empleado para generar los resultados, es decir el motor de búsqueda. SEQUEST, comenzó usando los formatos .out y .SQT pero posteriormente ha desarrollado los .SRF y .MSF. X!Tandem y OMSSA generan

archivos basados en XML *.tandem* y *.omx* respectivamente.

Para independizar el motor de búsqueda usado del formato obtenido se creó el formato *.pepXML* que además permite el análisis por las herramientas de TPP. *pepXML*, cuya unidad de información básica es el PSM, es el formato que lee y escribe PeptideProphet, para ProteinProphet, se creó *.protXML*, que contiene la lista de proteínas y sus péptidos asignados.

Sin embargo, de nuevo *pepXML* y *protXML*, aunque muy populares, también estaban ligados al flujo de análisis de TPP. Y de nuevo, HUPO-PSI ideó un nuevo formato estándar para recoger toda información derivada del resultado de búsquedas y análisis independientemente de su origen, el mzIdentML (Jones *et al.*, 2012). Además, HUPO-PSI también ha desarrollado mzTab, una versión alternativa simplificada que no se basa en XML sino en texto separado por tabulador.

- *Formatos que almacenan bibliotecas de espectros*

Los motores de búsqueda que usan bibliotecas de espectros, como SpectraST (parte de TPP) (Lam *et al.*, 2007) requieren generalmente un formato que contenga espectros consenso, una combinación de los espectros y el péptido que se les ha asignado, así como otras anotaciones y metadatos. El NIST (*National Institute for Standards and Technology*, Instituto Nacional Americano de Estándares y Tecnología) distribuye bibliotecas de espectros en formato *.msp*. SpectraST produce el formato *.splib*; y X!Hunter y Bibiospec *ASL* y *.blib* respectivamente.

- *Formatos que almacenan secuencias*

Los motores de búsqueda basados en secuencia requieren que se les suministren secuencias de cada proteína (y también, para cada una de ellas su correspondiente secuencia señalero). Para ello el tipo de formato más usado es el celebérrimo FASTA. Sin embargo no es el único, HUPO-PSI ha creado el formato PEFF, que mejora a FASTA añadiendo reglas sobre cómo ha de expresarse la cabecera de cada secuencia. Esta sintaxis definida facilita la tarea al *software* que lee los ficheros.

- *Formatos específicos para proteómica dirigida*

En proteómica dirigida, podemos encontrar dos tipos de formatos. Entre los que se usan como fuente de entrada de información, para indicar al

espectrómetro las listas de transiciones, es decir, que precursores y fragmentos ha de monitorizar, los más empleados son .sky, empleado por el programa Skyline; y el estándar HUPO-PSI *TraML* (Deutsch *et al.*, 2012). Para los resultados de análisis por SRM, el programa Skyline usa su propio formato, .skyd, basado en XML y otros programas como mProphet (Reiter *et al.*, 2011) usan sus propios formatos de texto separado por tabulador.

1.13. *Candida albicans* como organismo modelo

C. albicans es un hongo patógeno oportunista que se encuentra comúnmente como residente comensal, inocuo, en las mucosas gastrointestinal y urogenital en un alto porcentaje de la población (Calderone, 2012). Sin embargo, su cualidad de patógeno oportunista implica que, en ocasiones, propiciadas generalmente por un sistema inmune debilitado en el hospedador, puede proliferar y diseminarse provocando infecciones, candidiasis, de gravedad variable, desde afecciones mucocutáneas leves hasta infecciones sistémicas severas que pueden incluso llegar a ser letales. En Estados Unidos especies del género *Candida* suponen la cuarta causa más común de infecciones nosocomiales con tasas de mortalidad de hasta el 50 % en el caso de infecciones sistémicas (Pfaller and Diekema, 2010). Los principales factores de virulencia con los que cuenta *C. albicans* para proliferar y diseminarse causando infecciones son su polimorfismo, su capacidad de producir adhesinas e invasinas, y la formación de biopelículas (Mayer *et al.*, 2013).

El polimorfismo consiste en la capacidad de transformar su morfología. Las morfologías más comunes (además de otras como las pseudohifas y las cladosporas) son la clásica forma ovalada levaduriforme, adecuada para la diseminación a través de los vasos sanguíneos, y los filamentos o hifas que permiten penetrar e invadir tejidos (Berman and Sudbery, 2002; Jacobsen *et al.*, 2012).

La producción de adhesinas, proteínas especializadas en la adhesión a la superficies abiotícas o de otras células es otro importante factor de virulencia. Las aglutininas de la familia ALS que incluyen proteínas con anclaje GPI como Als3 (Phan *et al.*, 2007; de Groot *et al.*, 2013) y otras como la también anclada mediante GPI y asociada a hifas Hwp1 (Sundstrom *et al.*, 2002) son algunas de las adhesinas más estudiadas.

INTRODUCCIÓN

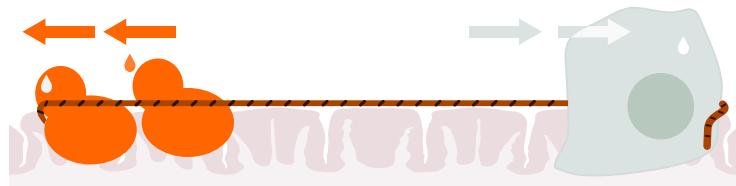


Figura 1.18: La población comensal de células de *C. albicans* y células del sistema inmune como macrófagos, presentes en las mucosas de los tractos gastrointestinal y genito-urinario se encuentran en un *status* de equilibrio en condiciones normales.

La formación de biopelículas sobre sustratos abióticos como catéteres o prótesis dentales o sobre la superficie celular en mucosas también supone un factor de virulencia crítico. Se ha descrito que biopelículas maduras adquieren una mayor resistencia a antifúngicos y a la acción del sistema inmune del hospedador en comparación con células planctónicas (Fanning and Mitchell, 2012).

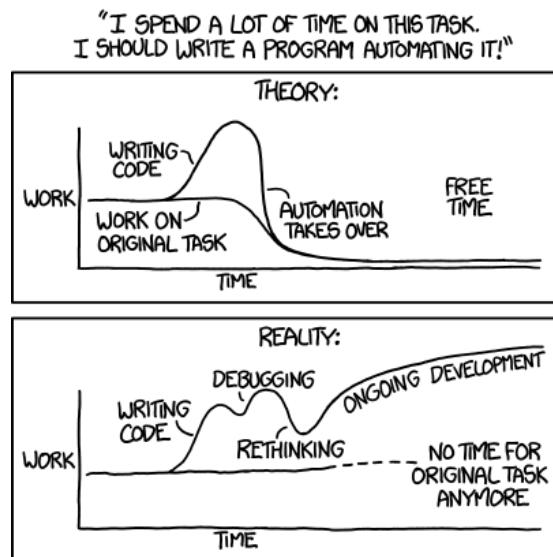
Desde el punto de vista de la proteómica, se han realizado muy diversos estudios usando el modelo de *C. albicans*. En este sentido los ensayos proteómicos se han enfocado principalmente en el estudio de los rasgos patógenos. Existen trabajos enfocados al estudio del proteoma de la pared celular (Castillo *et al.*, 2008), estudios de proteómica de los factores de virulencia (Pitarch *et al.*, 2006a), de la respuesta serológica (Pitarch *et al.*, 2009) y también estudios sobre la resistencia a antifúngicos (Hoehamer *et al.*, 2010).

OBJETIVOS

Objetivos

- Desarrollo de una aplicación web, denominada Proteopathogen, apoyada en una base de datos para recoger, almacenar y analizar resultados de identificación de péptidos y proteínas procedentes de estudios proteómicos relacionados con la interacción hospedador-patógeno usando *C. albicans* como modelo de hongo patógeno.
- Adopción del formato estándar de identificaciones de péptidos y proteínas mzIdentML como fuente única de información para la base de datos y aplicación web Proteopathogen para que la inserción de los datos sea independiente del procesamiento experimental y computacional empleado.
- Creación de un atlas peptídico o PeptideAtlas para *C. albicans*
 - Recopilación de resultados de espectrometría de masas y creación de una primera versión de PeptideAtlas empleando el flujo de trabajo proporcionado por las herramientas que conforman TPP (*Trans Proteomic Pipeline*) que incluye conversión de los espectros a un formato estándar, identificación de péptidos, inferencia de proteínas y validación estadística de los resultados.
 - Desarrollo de nuevos experimentos diseñados *ad hoc* para incrementar la cobertura del proteoma. Implementación de nuevas rutinas de análisis incorporando al flujo de trabajo TPP una nueva base datos con secuencias específicas de alelo y un procesamiento multi-algoritmo.

DESARROLLO DE UNA APLICACIÓN WEB PARA RECOGER, VISUALIZAR Y ANALIZAR RESULTADOS DE ESTUDIOS DE PROTEÓMICA DE *Candida albicans*



xkcd, Randall Munroe

Proteopathogen, a protein database for studying Candida albicans - host interaction

Vital Vialás, Rubén Nogales-Cadenas, César Nombela, Alberto Pascual-Montano, Concha Gil

Proteomics 2009, 9, 4664-4668

PROTEO PATHOGEN

proteopathogen.dacya.ucm.es

Description			Author			Species		Reference	
Integrated proteomics and genomics strategies bring new insight into Candida albicans response upon macrophage interaction			Fernandez-Arenas E, Cabezon V, Bermejo C, Arroyo J, Nombela C, Diez-Orejas R, Gil C			Candida albicans		PubMed	
Q5AIA2, HOM6	Search database	Search type	Search Analysis Software	Enzyme	Fixed Modifications	Variable Modifications	Precursor Mass Tolerance	Fragment Mass Tolerance	
	CandidaDB	MALDI-TOF/TOF	MASCOT	Trypsin	Carbamidomethyl(C)	Oxidation(M)	150	0,35	
Matching / Non matching peptides			Coverage	Total ion CI %	Protein MW	Protein PI	Best Ion Score		
13			56	-	43	4,84	-		
Observed Mass	Expected mr	Calculated mr	Delta da	start	end	miss	Peptide sequence	Ion score	Modification
1123.57	1122.56	1122.59	-0.03	188	197	1	SDVKFSDVVK	-	-
1176.58	1175.57	1175.58	-0.01	262	271	0	LPNYDADIQK	-	-
1210.63	1209.62	1209.60	0.02	115	124	1	AFSSDLKEWK	-	-
...

Abstract

There exist, at present, public web repositories for management and storage of proteomic data and also fungi-specific databases. None of them, however, is focused to the specific research area of fungal pathogens and their interactions with the host, and contains proteomics experimental data. In this context, we present Proteopathogen, a database intended to compile proteomics experimental data and to facilitate storage and access to a range of data which spans proteomics workflows from description of the experimental approaches leading to sample preparation to MS settings and peptides supporting protein identification. Proteopathogen is currently focused on *Candida albicans* and its interaction with macrophages; however, data from experiments concerning different pathogenic fungi species and other mammalian cells may also be found suitable for inclusion into the database.

Proteopathogen is publicly available at <http://proteopathogen.dacya.ucm.es>

Candida albicans is an opportunistic pathogenic fungus, which can be found as a component of the usual flora in human mucoses. Although it does not normally cause disease in immunocompetent colonized hosts, in the case of immunosuppressed patients *Candida* cells can overproliferate and become pathogenic. Cells in yeast form (oval cells) may produce hyphae, penetrate tissues and eventually cause invasive candidiasis. At present, the frequency of this fatal opportunistic mycosis continues to be distressing and, unfortunately, solution is hindered by the reduced effectiveness and serious side effects of the few available drugs, the appearance of antifungal-drug resistance, and the lack of accurate and prompt diagnostic procedures (Calderone, 2012).

Addressing proteomic studies involving the way *Candida* interacts with immune cells is thus essential in order to improve our comprehension of the process of infection and represents the primary step of investigation that could lead to future development of diagnosis methods, vaccines and antifungal drugs (Fernández-Arenas *et al.*, 2007; Martínez-Solano *et al.*, 2006; Pitarch *et al.*, 2006a,b).

Experimental techniques in proteomics have quickly evolved in such a way that nowadays we have to deal with vast amounts of complex data originated by the combination of multi-dimensional separation techniques and MS analysis together with the bioinformatics software reports (Monteoliva and Albar, 2004). Existing public repositories for management and storage of proteomic data such as World 2-D PAGE (Hoogland *et al.*, 2008), the Proteome Database System for Microbial Research 2-D PAGE (Pleissner *et al.*, 2004), or PRIDE (Martens *et al.*, 2005); and fungi-specific databases such as BioBase Myco-PathPD (Csank *et al.*, 2002), Candida Genome Database (CGD) (Arnaud *et al.*, 2005) or Candida DB (Rossignol *et al.*, 2008) are very popular and useful tools. However, none of them deals with proteomic experimental data related to the specific research area of fungal pathogens and their interaction with the host. In this context, we present Proteopathogen, a protein database, currently focused on the *C. albicans* - macrophage interaction model - which enables a framework for the access and submission of proteomic workflow data, from description of the experimental approaches leading to sample preparation to MS settings and identification - supporting peptides. Through its interface web site, the database can easily be queried to allow an efficient browsing through all the stored data, improving the quality of eventual analysis of MS results.

PROTEOPATHOGEN DATABASE TO STUDY *C. albicans* - HOST INTERACTION

Table 1. Overview of the stored data in Proteopathogen as well as their published evidences.

References	Description of experimental approach	Species	#Protein identifications
(Fernández-Arenas <i>et al.</i> , 2007)	<i>C. albicans</i> differentially expressed proteins after 3 h interaction with RAW 264.7 murine macrophages. 2-D silver-stained gel. MS/MS (MALDI/TOF-TOF)	<i>C. albicans</i>	66
(Martínez-Solano <i>et al.</i> , 2006)	Proteins identified from cytoplasmic extracts of RAW 264.7 cells after 45 min interaction with <i>C. albicans</i>	<i>Mus musculus</i>	38
(Cabezón <i>et al.</i> , 2009)	Identification of Glycosyl phosphatidil inositol (GPI)-anchored membrane proteins Identification of membrane proteins	<i>C. albicans</i>	292 1273

Regarding the compilation of information used to populate the database, data from three different studies were considered suitable to be present in Proteopathogen. The first two correspond to publish works relating to proteomics of the *Candida* - macrophage interaction (Fernández-Arenas *et al.*, 2007; Martínez-Solano *et al.*, 2006), where the former reports 66 different *C. albicans* identified proteins and the latter, 38 murine macrophage proteins. The third study represents an analysis of the *C. albicans* plasma membrane proteome (Cabezón *et al.*, 2009). It compiles a set of experiments aimed at extraction and identification of membrane proteins and a set of experiments intended to obtain enrichment in glycosylphosphatidylinositol-anchored surface proteins, which have been reported to be involved in cell wall biogenesis, cell-cell adhesion and interaction with the host (Plaine *et al.*, 2008).

In all cases, protein identifications lists are collected together with the pertinent experimental context specified by descriptions of the experimental approaches, MS settings and peptides supporting identification for each of the proteins (Table 1).

Along with the experimental information, and in order to provide a deeper view of the data, complementary information is retrieved from public web repositories. In the case of *C. albicans* proteins, identifiers, synonyms, aminoacid sequence of the translated open reading frame, *Saccharomyces cerevisiae*

PROTEOPATHOGEN DATABASE TO STUDY *C. albicans* - HOST INTERACTION

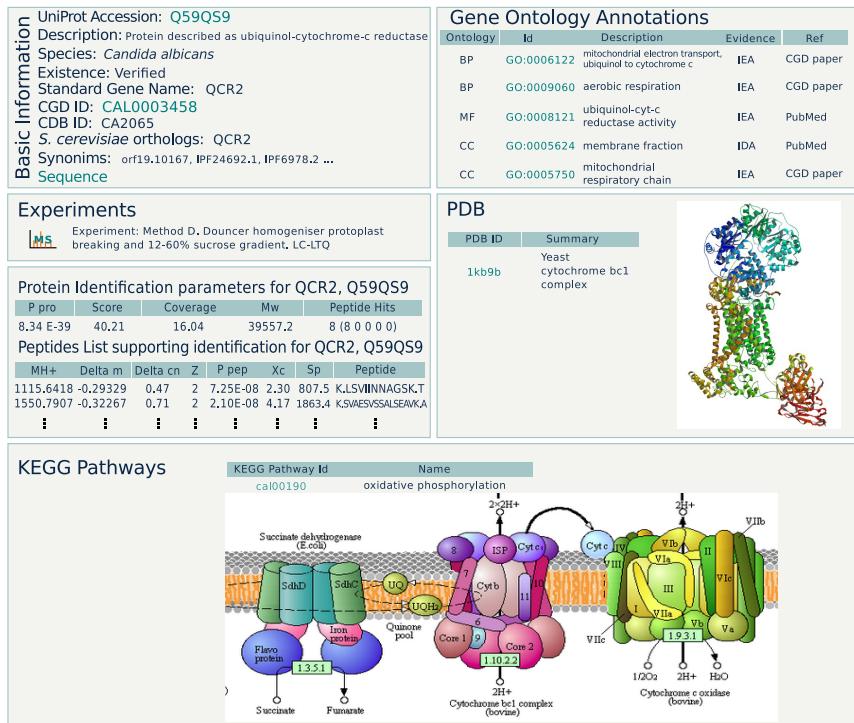


Figure 1. Use case: Search for *C. albicans* ubiquinol-cytochrome-c reductase QCR2. The different sections in the result comprise information on protein description and identifiers, experiments in which it has been identified, GO annotation, KEGG and CGD pathway annotation and structural information from PDB.

orthologs, Gene Ontology (GO) annotation, pathway annotations and scientific literature references were obtained from CGD (Arnaud *et al.*, 2005), whereas in the case of murine macrophage proteins, the equivalent information was obtained from UniProt KnowledgeBase (The Uniprot Consortium, 2008) and the Mouse Genome Database (Bult *et al.*, 2008). Additionally, pathways annotations were retrieved from Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) Pathway Database (Kanehisa *et al.*, 2007) and structure information from the Protein Data Bank (PDB) (Berman *et al.*, 2000).

Concerning the architecture of the software, the back-end layer consists of a MySQL database managed by the web application development framework Ruby on Rails that sets up structure and relations of data, handles queries to the database and displays the user web-based interface.

The experimental context is addressed in Proteopathogen in a hierarchical

manner, where a main general approach, which may correspond to a published article, is characterized by a description or title, authors, target species and Pubmed identifier when available; and experiments within it, are in turn, characterized by the description of the particular experiment, the date when it was performed and number of identified proteins.

Information on one particular protein is split into several sections in Proteopathogen. Protein Basic Information displays the UniProt accession number, description, species, evidence for the existence, standard gene name, organism- specific database identifiers, yeast orthologs for *Candida* proteins and human orthologs for mouse proteins and sequence. The Section 2 lists experiments in which the particular protein has been identified. Where available, one or more of the following sections will be displayed as well: the table entitled GO showing GO annotations along with the pertinent scientific references, the KEGG Pathways and CGD Pathways tables rendering annotations from KEGG and CGD respectively, and PDB, a table specifying structural information. Where no PDB identifiers are found for *C. albicans* proteins, *S. cerevisiae* orthologs are used instead, and similarly, when a PDB identifier cannot be found for mouse proteins, the human ortholog is used.

In all cases, proteins are unambiguously related to their corresponding experiment, thus enabling a relation to the data concerning experimental parameters of identification and identification-supporting peptides. This data comprise, on the one hand, common MS settings for all proteins identified in the particular experiment, including search database, MS type, analysis software, digestion enzyme, fixed aminoacid modifications, variable modifications and maximum allowed number of miscleavages; and on the other hand, particular parameters and peptides list for each protein, including number of matched peptides, score, observed peptide mass, calculated peptide mass, start and end coordinates, number of missed cleavages and the sequence of the peptide.

The web interface to Proteopathogen offers multiple ways to query the database. Through the Browse Experiments search option, a list containing all sets of experimental approaches is displayed. In its turn, one particular experiment can be browsed through all the proteins identified in it.

The Search form may be used in different manners. Queries for one particular protein can be performed by supplying one of the multiple supported identifiers, namely standard gene names, *Candida* feature name, Candida DB

identifiers, CGD identifiers, MGI identifiers and UniProt accession numbers. Free text queries can be performed as well, which will retrieve a list of proteins showing coincidences in the description field of the Proteopathogen protein entry. As an additional feature, peptide sequences can also be searched for retrieving in this case, proteins in any experiment having the searched sequence in any of the identification-supporting peptides. Wild characters (*) and boolean operators are supported for free text queries and for peptide sequence queries.

In order to enhance interactivity and collaboration with users, a submission form is included in the web interface to allow the upload of more proteomic experimental approaches as long as they concern the topics addressed in Proteopathogen. Sequential steps request from the user the following information: a description of the experimental context, a related protein list, MS parameters and identification-supporting peptides lists. These data are subject to revision prior to eventual insertion into Proteo-pathogen by the database curators. Besides, the whole relational database and the MS data reports are available for download at the web site.

All the information that is retrievable from Proteo-pathogen when queried for one particular protein is shown in Fig. 1 for the specific case of ubiquinol-cytochrome-c reductase QCR2 of *C. albicans* which has been reported to show antigenic properties in human (Pitarch *et al.*, 2004).

The Protein Basic Information section displays the Uniprot accession number, a brief description of the protein as stated at CGD, evidence for its existence, standard gene name, feature name, CGD and Candida Database identifiers, yeast ortholog gene name, synonyms and sequence.

The Section 2 lists all the experiments in which QCR2 has been identified. All of them belong to the same general approach aimed at purification of membrane proteins. In every case, the corresponding links to the MS identification parameters and supporting peptides are displayed as well. This experimental data are shown in Fig. 1 for identification of QCR2 in the experiment described as "Method D. Douncer homogenizer protoplast breaking and 12-60sucrose gradient. LC-LTQ".

The section entitled GO annotations shows terms related to the electron transport chain, but more interestingly, it also shows an inferred from direct assay (IDA) annotation to the term membrane fraction (Insenser *et al.*, 2006), which fits to the fact that the protein is identified in five of the methods aimed

at purification of membrane proteins.

KEGG Pathways table provides a link to the KEGG Pathway entry for Oxidative phosphorylation, and provides the feature to show in place the image corresponding to the map from KEGG. CGD Pathways displays an analogous link to the pathway entry at CGD that, in this case, is named aerobic respiration (cyanide sensitive)- electron donors.

Finally, in the PDB section, there are four structure images available along with links to the PDB entries, corresponding to a cytochrome bc1 complex from *S. cerevisiae*. Orthologs were used since no structure could be found for the *Candida* protein.

In conclusion, Proteopathogen represents, up to date, the first public web-based repository for proteomics data related to studies involving *C. albicans* pathogenicity and its interaction with immune system cells in the host. Moreover, it enables a framework for public access and submission of this type of data and it is intended to be more actively populated in the near future, including data from different pathogenic fungi and mammalian cells, becoming a reference database in its field. Unlike other protein identification databases, Proteopathogen is focused to a specific topic but, at the same time, includes a wide range of data including descriptions of the experimental contexts, information on proteins such as GO and pathway annotations, structural information and detailed MS parameters. Therefore, Proteopathogen will contribute to save time and facilitate analysis of proteomic workflow reports for researchers interested in this area.

References

- Arnaud, M. B., Costanzo, M. C., Skrzypek, M. S., Binkley, G., Lane, C., Miyasato, S. R., and Sherlock, G. (2005), The Candida Genome Database (CGD), a community resource for *Candida albicans* gene and protein information., Nucleic acids research, 33(Database issue), D358-63.
- Berman, H. M., Westbrook, J., Feng, Z., Gilliland, G., Bhat, T. N., Weissig, H., Shindyalov, I. N., and Bourne, P. E. (2000), The Protein Data Bank., Nucleic acids research, 28(1), 235-42.
- Bult, C. J., Eppig, J. T., Kadin, J. A., Richardson, J. E., and Blake, J. A. (2008), The Mouse Genome Database (MGD): mouse biology and model

systems., Nucleic acids research, 36(Database issue), D724-8.

Cabezón, V., Llama-Palacios, A., Nombela, C., Monteoliva, L., and Gil, C. (2009), Analysis of *Candida albicans* plasma membrane proteome., Proteomics, 9(20), 4770-86.

Calderone, R. (2012), Candida and candidiasis. ASM Press, Washington DC.

Csank, C., Costanzo, M. C., Hirschman, J., Hodges, P., Kranz, J. E., Mangan, M., O'Neill, K., Robertson, L. S., Skrzypek, M. S., Brooks, J., and Garrels, J. I. (2002), Three yeast proteome databases: YPD, PombePD, and CalPD (MycoPathPD)., Methods in enzymology, 350, 347-73.

Fernández-Arenas, E., Cabezón, V., Bermejo, C., Arroyo, J., Nombela, C., Diez-Orejas, R., and Gil, C. (2007), Integrated proteomics and genomics strategies bring new insight into *Candida albicans* response upon macrophage interaction, Molecular & cellular proteomics : MCP, 6(3), 460-478.

Hoogland, C., Mostaguir, K., Appel, R. D., and Lisacek, F. (2008), The World-2DPAGE Constellation to promote and publish gel-based proteomics data through the ExPASy server., Journal of proteomics, 71(2), 245-8.

Insenser, M., Nombela, C., Molero, G., and Gil, C. (2006), Proteomic analysis of detergent - resistant membranes from *Candida albicans*., Proteomics, 6 Suppl 1, S74-81.

Kanehisa, M., Araki, M., Goto, S., Hattori, M., Hirakawa, M., Itoh, M., Katayama, T., Kawashima, S., Okuda, S., Tokimatsu, T., and Yamanishi, Y. (2007), KEGG for linking genomes to life and the environment, Nucleic Acids Research, 36(Database), D480-D484.

Martens, L., Hermjakob, H., Jones, P., Adamski, M., Taylor, C., States, D., Gevaert, K., Van- dekerckhove, J., and Apweiler, R. (2005), PRIDE: the proteomics identifications database., Proteomics, 5(13), 3537-45.

Martínez-Solano, L., Nombela, C., Molero, G., and Gil, C. (2006), Differential protein expression of murine macrophages upon interaction with *Candida albicans*, Proteomics, 6 Suppl 1, S133-S144.

Monteoliva, L. and Albar, J. P. (2004), Differential proteomics: an overview of gel and non-gel based approaches., *Briefings in functional genomics & proteomics*, 3(3), 220-39.

Pitarch, A., Abian, J., Carrascal, M., Sánchez, M., Nombela, C., and Gil, C. (2004), Proteomics-based identification of novel *Candida albicans* antigens for diagnosis of systemic candidiasis in patients with underlying hematological malignancies., *Proteomics*, 4(10), 3084-106.

Pitarch, A., Nombela, C., and Gil, C. (2006a), *Candida albicans* biology and pathogenicity: insights from proteomics., *Methods of biochemical analysis*, 49, 285-330.

Pitarch, A., Nombela, C., and Gil, C. (2006b), Contributions of proteomics to diagnosis, treatment, and prevention of candidiasis., *Methods of biochemical analysis*, 49, 331-61.

Plaine, A., Walker, L., Da Costa, G., Mora-Montes, H. M., McKinnon, A., Gow, N. A. R., Gaillardin, C., Munro, C. A., and Richard, M. L. (2008), Functional analysis of *Candida albicans* GPI-anchored proteins: roles in cell wall integrity and caspofungin sensitivity., *Fungal genetics and biology : FG & B*, 45(10), 1404-14.

Pleissner, K.-P., Eifert, T., Buettner, S., Schmidt, F., Boehme, M., Meyer, T. F., Kaufmann, S. H. E., and Jungblut, P. R. (2004), Web-accessible proteome databases for microbial research., *Proteomics*, 4(5), 1305-13.

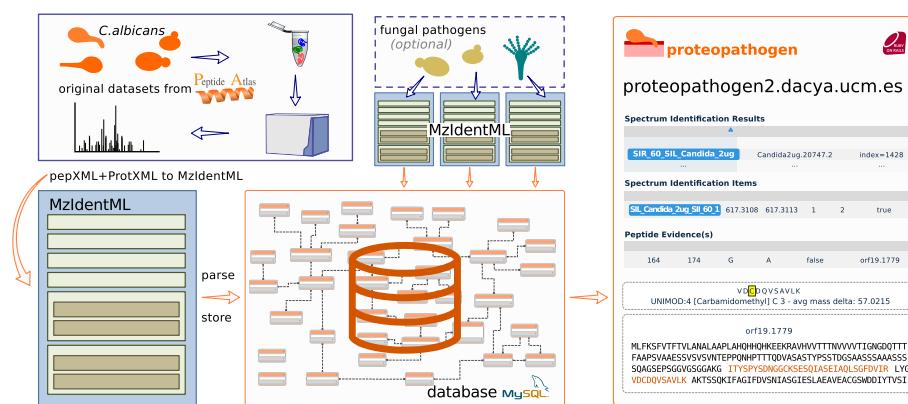
Rossignol, T., Lechat, P., Cuomo, C., Zeng, Q., Moszer, I., and DÉnfert, C. (2008), CandidaDB: a multi-genome database for *Candida* species and related Saccharomycotina., *Nucleic acids research*, 36(Database issue), D557-61.

The Uniprot Consortium (2008), The universal protein resource (UniProt)., *Nucleic acids research*, 36(Database issue), D190-5.

Proteopathogen2: A database and web tool to store and display proteomics identification results in the mzIdentML standard

Vital Vialas, Concha Gil

EuPA Open Proteomics 2015, 8, 22-27



Abstract

The Proteopathogen database was the first proteomics online resource focused on experiments related to *Candida albicans* and other fungal pathogens and their interaction with the host. Since then, the HUPO-PSI standards were implemented and settled, and the first large scale *C. albicans* proteomics resource appeared as a *C. albicans* PeptideAltas. This has enabled the remodeling of Proteopathogen to take advantage and benefit from the use of the HUPO-PSI adopted format for peptide and protein identification mzIdentML and continue offering a centralized resource for *C. albicans*, other fungal pathogens and different cell lines proteomics data.

Introduction

The opportunist pathogenic fungus *Candida albicans*, under usual circumstances, is a harmless resident commensal in human mucous membranes of a large percentage of the population. However, taking advantage of weakened host immune defenses, for instance in immunocompromised cancer or AIDS patients, it may switch to its pathogenic status, over-proliferating and becoming thus the main etiological agent of candidiasis, one of the most prevalent and costly types of fungal infections in global terms.

Proteomics studies have been addressed to study this commensal to pathogenic transition by approaching the dimorphic, yeast form to hyphal form switch (Monteoliva *et al.*, 2011; Gow and van de Veerdonk, 2011), by specifically aiming at the study of some other clinically relevant biological processes such as apoptosis (Madeo *et al.*, 2004; Fernández-Arenas *et al.*, 2007; Ramsdale, 2008) or biofilm formation (Vialás *et al.*, 2012); or targeting sets of proteins that interact first with the host like surface exposed and secreted proteins (Vialás *et al.*, 2012; Gil-Bona *et al.*, 2014).

However, until recently, the resulting proteomics identification datasets were sparse and disseminated. The Proteopathogen database (Vialás *et al.*, 2009) was the first public online proteomics data repository specifically focused on experiments aimed at the study of *C. albicans* and other fungal species pathogenic traits. Since no standard format for peptide and protein identification results was available, Proteopathogen was developed to compile and display identification lists in different tabulated text formats depending on the software used to generate and process the results.

At that time, the HUPO - Proteomics Standards Initiative (PSI) already had a trajectory striving to highlight the importance of standardization and providing formats that would comply with MIAPE (Minimum Information About a Proteomics Experiment) guidelines as reviewed in ref (Martínez-Bartolomé *et al.*, 2014). Some *de facto* standard formats existed like mzXML and pepXML (Deutsch, 2012), but the advent, years later, of the HUPO-PSI approved formats for mass spectrometry output data (Martens *et al.*, 2011) and for identification results (Jones *et al.*, 2012) among others, surfaced the efforts and claims by the community to finally adopt formats to facilitate data comparison, exchange and verification. This also inspired and boosted the development of an assortment of format conversion tools and libraries (Chambers *et al.*, 2012; Griss *et al.*,

2012) and stand-alone software for visualization of the content of the files in standard formats (Ghali *et al.*, 2013) but, most importantly for the purpose of this work, enabled the possibility for Proteopathogen to benefit from the mzIdentML adopted standard for identification results, incorporating it as the input data format and using it as inspiration for information display.

More recently, the most comprehensive, up to the current date, online *C. albicans* proteomics data repository was developed and integrated in PeptideAtlas (Vialas *et al.*, 2013). These publicly available *C. albicans* results have been used to establish a new version of Proteopathogen with a solid foundation.

In this background, we present here a revisited Proteopathogen database and web based tool adapted to read and display peptide and protein identification data based upon the mzIdentML format. It is the first online database specifically developed to map and store the contents of files in mzIdentML, it has been initially populated with the *C. albicans* PeptideAtlas identification results and it is publicly accessible at <http://proteopathogen2.dacya.ucm.es>

Materials and methods

The original identification result files were obtained from PeptideAtlas repository datasets PAe001976, PAe001977, PAe001978, PAe001979, PAe001980, PAe001981, PAe001982, PAe001983, PAe001984, PAe001985, PAe001986, PAe001987, PAe001988, PAe001989, PAe002110, and PAe002111.

As described in Ref. (Vialas *et al.*, 2013) the data sets come from a range of experiments including yeast to hypha transition assays, membrane protein extractions and a set of phosphoprotein enrichment approaches. In all cases, cells from the clinical isolates SC5314 were grown in YPD medium. For obtaining cells in hyphal form, either heat-inactivated fetal bovine serum or Lee medium pH 6.7 was used. As for the mass spectrometry, spectra were acquired in different set ups and platforms in a data-dependent manner. A summary of the experiments set ups and conditions is shown in Table 1.

Consistently with the PeptideAtlas project principles, the MS output files were processed through the Trans Proteomic Pipeline. The steps involved, first, sequence database searching using X! Tandem with k-score (MacLean *et al.*, 2006) and a custom sequence database obtained from Candida Genome Database (Costanzo *et al.*, 2006) with appended decoy counterparts and com-

Table 1. Summary of experiments, MS output files, instrument and PeptideAtlas datasets.

Type of dataset	Number of MS output files	Instrument	PeptideAtlas datasets
<i>Candida albicans</i> culture with SILAC labelling, digested protein extracts enriched in phosphopeptides IMAC/TiO2	57	Orbitrap XL, Orbitrap Velos	PAe001976, PAe001977, PAe001978, PAe001979, PAe001980, PAe001984, PAe001985, PAe001986, PAe001987, PAe001988, PAe001989
<i>Candida albicans</i> total protein extract, 2 Triple-TOF runs, 2ug and 4ug	2	Triple-TOF	PAe001983
Hyphal form and yeast form total protein extracts	8	Orbitrap Velos	PAe002110, PAe002111
LTQ membrane proteins (Cabezón <i>et al.</i> , 2009)	3	LTQ	PAe001981
LTQ proteins from acidic subproteome (Monteliva <i>et al.</i> , 2011)	8	LTQ	PAe001982

mon contaminants for peptide-to-spectrum matching and FDR assessment. Then the post-processing validation tools PeptideProphet (Choi and Nesvizhskii, 2008), ProteinProphet (Nesvizhskii *et al.*, 2003) and iProphet (Shteynberg *et al.*, 2011) provided filtered lists of peptides and proteins with high probabilities. And finally FDR was computed for different probability thresholds.

Each of the PeptideAtlas repository datasets consists on the MS output spectra files and a set of pepXML and protXML files with lists of high confidence peptide and proteins respectively. These were combined, independently for each dataset, by means of a custom script written in the Ruby scripting language (available in supplemental data) to create mzIdentML files (mzIdentML version 1.1.0) with the merged information. In order to check the files were generated correctly and ensure data quality they were all validated (semantic and MIAPE-compliant validation) with mzidValidator (Ghali *et al.*, 2013).

A completely new MySQL relational database was implemented *ad hoc* to map elements in the mzIdentML files as depicted in Fig. 1 (schema availa-

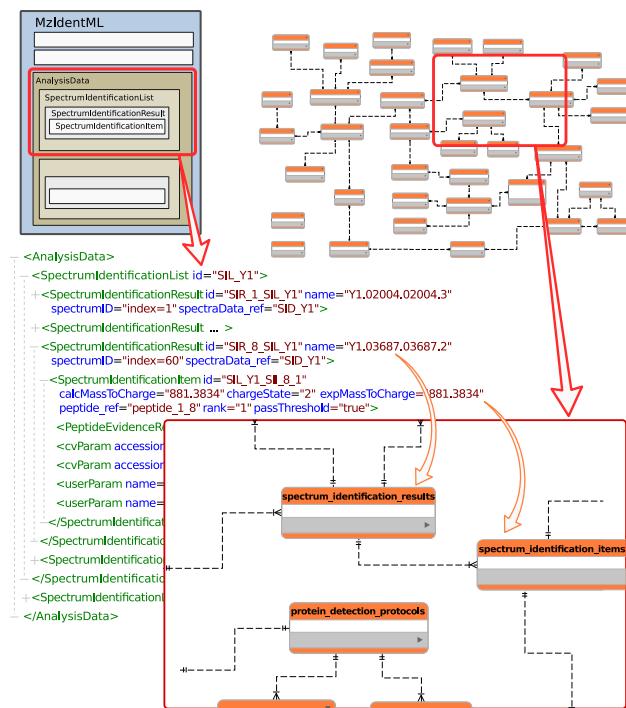


Figure 1. mzIdentML to database mapping. The MySQL schema was specifically designed to accommodate elements from the mzIdentML format. Figure shows the one-to-many relationship between the `<SpectrumIdentificationResult>` and `<SpectrumIdentificationItem>` elements.

ble in supplemental data). Then, using the Ruby scripting language (version 2.0.0) and the Rails web application development framework (version 4.0.0) a script was created to parse the data in the mzIdentML files, store the relevant elements in the corresponding tables (available in supplemental data) and eventually create the web application to display the data.

Results and discussion

A total number of sixteen mzIdentML files, corresponding to each of the PeptideAtlas repository datasets, grouped into five different experiments were compiled and used to initially populate the Proteopathogen database. These account for approximately 22,000 distinct peptides and 2600 different proteins that can be queried and viewed through the web interface.

Precisely, a stringent FDR cut-off at the PSM level set at 0.005, yields 21,883 peptides with 0.0024 FDR (peptide level) and 2577 proteins with 0.0170

FDR (protein level) as computed with Mayu, a software specifically designed to estimate accurate protein level error rates in large datasets (Reiter *et al.*, 2009) (see supplemental Table 1).

The mzIdentML contents can be browsed for each file in Proteopathogen in a means inspired by the structure in the format, particularly that under the <AnalysisData>element containing the datasets generated by the analyses. That is, for each mzIdentML file, shown in its experimental context, a user can select either the spectrum identification information (corresponding to the <SpectrumIdentification>element) and view its related information, the search protocol, search database and the list of every peptide to spectrum assignment; or the protein detection (corresponding to the <ProteinDetection>element) showing the list of peptides grouped into the inferred original proteins (Fig. 2).

Notably, the information Proteopathogen displays will depend on how complete the original mzIdentML files are. For instance, for files including the optional <Fragmentation>element under <SpectrumIdentificationItem>, Proteopathogen will display an annotated and interactive MS/MS spectrum. In addition, the optional <ccvParam>and <userParam>elements, that describe and annotate with controlled vocabularies and user-defined information respectively different elements throughout the file, might be more or less profuse depending on the software that created them.

PROTEOPATHOGEN2, ADAPTED TO MZIDENTML

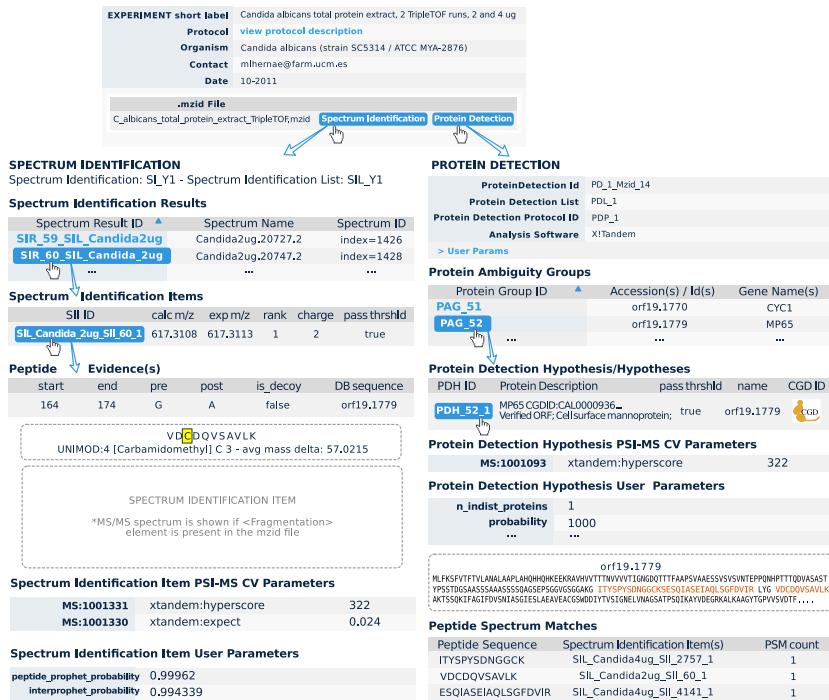


Figure 2. Information displayed in the web interface. Proteopathogen displays two main sets of information for the selected mzIdentML file. The spectrum identification section shows how for each spectrum there is a list of possible identification results, each having its peptide evidence, *i.e.* a sequence at a particular position in a protein sequence. The particular selected peptide is shown in its protein context in the protein detection section, which displays the complete list of the inferred proteins for the selected mzIdentML file with links to Candida Genome Database (CGD)

In addition to browsing through the contents of the stored mzIdentML files, Proteopathogen implements a query system yielding global results. That is, for a specific queried protein name, as found in the <ProteinDetectionHypothesis>name attribute, the search results display all the distinct peptide sequences found mapped into the protein sequence, regardless of the experiment in which they were identified, and the supporting spectra for each peptide sequence, while keeping track of the original <SpectrumIdentification> and mzIdentML file. A peptide sequence may also be searched, obtaining, when found, the corresponding protein, or group of proteins, and the set of supporting spectra, again in global scope.

The use of the Ruby scripting language, unlike other compiled languages (Java, C/C++) that are commonly used in other software used to visualize pro-

teomics file formats, enables a quick, easy to implement, flexible manner of parsing complex XML files, and creation and manipulation of objects that have to be stored in a very precise order in a database. In addition, the argument of speed in computationally intensive tasks in favor of compiled languages is getting blurry nowadays with the array of xml parsing libraries that are continuously developed and improved for scripting languages. The type of solution implemented in Proteopathogen is a DOM (Document Object Model) parser, that creates an in-memory tree representation of the whole XML hierarchy. Arguably, a parser of the type SAX (Simple API for XML parsing) would perform better in terms of speed for large files but as trade-off, leaping back and forth in search of cross-referenced elements, as is the case in mzIdentML, would be difficult or even impossible to implement. Nevertheless, future work in the direction of a SAX implementation of the parser and a comparison in performance with respect to the current one, would be of great interest.

Proteopathogen will greatly benefit from the adoption of mzIdentML as input data format. Any proteomics experiment on *C. albicans*, or any fungal pathogen-host interaction, as long as they are provided in valid (semantically valid and MIAPE- compliant) mzIdentML (version 1.1.0), will be welcome to be integrated in the database. To that purpose, users provided with login credentials may submit their files either through a simple upload form in the web application or transfer them using a specifically set up FTP server. Finally, the Rails framework for web application development will take care of any scalability issues with ease and allow for any kind of visualization improvements.

Conclusions

The Proteopathogen web application and database has been completely rebuilt to accommodate and display *C. albicans*, or any fungal pathogen for that matter, proteomics identification results in the HUPO-PSI adopted format for peptide and protein identification mzIdentML. This makes it the first public online database specifically designed to store the information contained in these types of files and display its contents following an analogous structure.

References

- Cabezón, V., Llama-Palacios, A., Nombela, C., Monteoliva, L., and Gil, C. (2009), Analysis of *Candida albicans* plasma membrane proteome., Proteomics, 9(20), 4770-86.
- Chambers, M. C., Maclean, B., Burke, R., Amodei, D., Ruderman, D. L., Neumann, S., Gatto, L., Fischer, B., Pratt, B., Egertson, J., Hoff, K., Kessner, D., Tasman, N., Shulman, N., Frewen, B., Baker, T. A., Brusniak, M.-Y., Paulse, C., Creasy, D., Flashner, L., Kani, K., Moulding, C., Seymour, S. L., Nuwaysir, L. M., Lefebvre, B., Kuhlmann, F., Roark, J., Rainer, P., Detlev, S., Hemenway, T., Huhmer, A., Langridge, J., Connolly, B., Chadic, T., Holly, K., Eckels, J., Deutsch, E. W., Moritz, R. L., Katz, J. E., Agus, D. B., MacCoss, M., Tabb, D. L., and Mallick, P. (2012), A cross-platform toolkit for mass spectrometry and proteomics., Nature biotechnology, 30(10), 918-20
- Choi, H. and Nesvizhskii, A. I. (2008), Semisupervised model-based validation of peptide identifications in mass spectrometry-based proteomics., Journal of proteome research, 7(1), 254-65.
- Costanzo, M. C., Arnaud, M. B., Skrzypek, M. S., Binkley, G., Lane, C., Miyasato, S. R., and Sherlock, G. (2006), The Candida Genome Database: facilitating research on *Candida albicans* molecular biology., FEMS yeast research, 6(5), 671-84.
- Deutsch, E. (2012), File formats commonly used in mass spectrometry proteomics, Molecular & Cellular Proteomics, 11(12), 1612-1621.
- Fernández-Arenas, E., Cabezón, V., Bermejo, C., Arroyo, J., Nombela, C., Diez-Orejas, R., and Gil, C. (2007), Integrated proteomics and genomics strategies bring new insight into *Candida albicans* response upon macrophage interaction., Molecular & cellular proteomics : MCP, 6(3), 460-478.
- Ghali, F., Krishna, R., Lukasse, P., Martínez-Bartolomé, S., Reisinger, F., Hermjakob, H., Vizcaíno, J. A., and Jones, A. R. (2013), Tools (Viewer, Library and Validator) that facilitate use of the peptide and protein identification standard format, termed mzIdentML., Molecular & cellular proteomics : MCP, 12(11), 3026-35.

Gil-Bona, A., Llama-Palacios, A., Parra, C. M., Vivanco, F., Nombela, C., Monteoliva, L., and Gil, C. (2014), Proteomics unravels extracellular vesicles as carriers of classical cytoplasmic proteins in *Candida albicans*., Journal of proteome research, 14(1), 142-53.

Gow, N. and van de Veerdonk, F. (2011), *Candida albicans* morphogenesis and host defence: discriminating invasion from colonization, Nature Reviews, 10(2), 112-122.

Griss, J., Reisinger, F., Hermjakob, H., and Vizcaíno, J. A. (2012), jmz-Reader: A Java parser library to process and visualize multiple text and XML-based mass spectrometry data formats., Proteomics, 12(6), 795-8.

Jones, A. R., Eisenacher, M., Mayer, G., Kohlbacher, O., Siepen, J., Hubbard, S. J., Selley, J. N., Searle, B. C., Shofstahl, J., Seymour, S. L., Julian, R., Binz, P.-A., Deutsch, E. W., Hermjakob, H., Reisinger, F., Griss, J., Vizcaíno, J. A., Chambers, M., Pizarro, A., and Creasy, D. (2012), The mzIdentML data standard for mass spectrometry-based proteomics results., Molecular & cellular proteomics : MCP, 11(7), M111.014381.

Madeo, F., Herker, E., and Wissing, S. (2004), Apoptosis in yeast, Current opinion in microbiology, 7(6), 655-660

MacLean, B., Eng, J., Beavis, R., and McIntosh, M. (2006), General framework for developing and evaluating database scoring algorithms using the TANDEM search engine, Bioinformatics, 22(22), 2830-2832.

Martens, L., Chambers, M., Sturm, M., Kessner, D., Levander, F., Shofstahl, J., Tang, W. H., Römpf, A., Neumann, S., Pizarro, A. D., Montecchi-Palazzi, L., Tasman, N., Coleman, M., Reisinger, F., Souda, P., Hermjakob, H., Binz, P.-A., and Deutsch, E. W. (2011), mzML-a community standard for mass spectrometry data., Molecular & cellular proteomics : MCP, 10(1), R110.000133.

Martínez-Bartolomé, S., Binz, P.-A., and Albar, J. P. (2014), The Minimal Information about a Proteomics Experiment (MIAPE) from the Proteomics Standards Initiative., Methods in molecular biology (Clifton, N.J.), 1072, 765-80.

- Monteoliva, L., Martinez-Lopez, R., Pitarch, A., Hernaez, M. L., Serna, A., Nombela, C., Albar, J. P., and Gil, C. (2011), Quantitative proteome and acidic subproteome profiling of *Candida albicans* yeast-to-hypha transition, *Journal of Proteome Research*, 10(2), 502-517.
- Nesvizhskii, A. I., Keller, A., Kolker, E., and Aebersold, R. (2003), A statistical model for identifying proteins by tandem mass spectrometry., *Analytical chemistry*, 75(17), 4646-58.
- Ramsdale, M. (2008), Programmed cell death in pathogenic fungi, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, 1783(7), 1369-1380.
- Reiter, L., Claassen, M., Schrimpf, S. S. P., Jovanovic, M., Schmidt, A., Buhmann, J. M., Hengartner, M. O., and Aebersold, R. (2009), Protein identification false discovery rates for very large proteomics data sets generated by tandem mass spectrometry, *Molecular & Cellular Proteomics*, 8(11), 2405-2417.
- Shteynberg, D., Deutsch, E. W., Lam, H., Eng, J. K., Sun, Z., Tasman, N., Mendoza, L., Moritz, R. L., Aebersold, R., and Nesvizhskii, a. I. (2011), iProphet: Multi-level Integrative Analysis of Shotgun Proteomic Data Improves Peptide and Protein Identification Rates and Error Estimates, *Molecular & Cellular Proteomics*, 10(12), M111.007690-M111.007690.
- Vialás, V., Nogales-Cadenas, R., Nombela, C., Pascual-Montano, A., and Gil, C. (2009), Proteopathogen, a protein database for studying *Candida albicans*-host interaction., *Proteomics*, 9(20), 4664-8.
- Vialás, V., Perumal, P., Gutierrez, D., Ximénez-Embún, P., Nombela, C., Gil, C., and Chaffin, W. L. (2012), Cell surface shaving of *Candida albicans* biofilms, hyphae and yeast form cells., *Proteomics*, 12(14), 2331-2339.
- Vialas, V., Sun, Z., Loureiro Y Penha, C. V., Carrascal, M., Abián, J., Monteoliva, L., Deutsch, E. W., Aebersold, R., Moritz, R. L., and Gil, C. (2013), A *Candida albicans* PeptideAtlas., *Journal of proteomics*, 97, 62-8.

CREACIÓN DE UN PEPTIDEATLAS DE *Candida albicans*

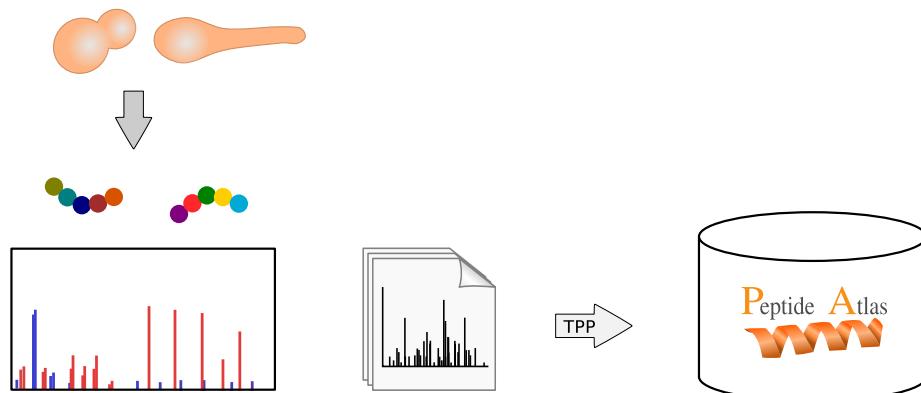
*What evidence should satisfy you?
Evidence that is publicly recorded and
properly analysed*

Richard Dawkins
Unweaving the rainbow

A Candida albicans PeptideAtlas

Vital Vialas, Zhi Sun, Carla Verónica Loureiro y Penha, Montserrat Carrascal, Joaquín Abián, Lucía Monteoliva, Eric W. Deutsch, Ruedi Aebersold, Robert L. Moritz, Concha Gil

Journal of Proteomics 2014, 97, 62-68



Abstract

Candida albicans public proteomic datasets, though growing steadily in the last few years, still have a very limited presence in online repositories. We report here the creation of a *C. albicans* PeptideAtlas comprising near 22,000 distinct peptides at a 0.24 % False Discovery Rate (FDR) that account for over 2500 canonical proteins at a 1.2% FDR. Based on data from 16 experiments, we attained coverage of 41 % of the *C. albicans* open reading frame sequences (ORFs) in the database used for the searches. This PeptideAtlas provides several useful features, including comprehensive protein and peptide-centered search capabilities and visualization tools that establish a solid basis for the study of basic biological mechanisms key to virulence and pathogenesis such as dimorphism, adherence, and apoptosis. Further, it is a valuable resource for the selection of candidate proteotypic peptides for targeted proteomic experiments via Selected Reaction Monitoring (SRM) or SWATH-MS.

Biological Significance

This *C. albicans* PeptideAtlas resolves the previous absence of fungal pathogens in the PeptideAtlas project. It represents the most extensive characterization of the proteome of this fungus that exists up to the current date, including evidence for uncharacterized ORFs. Through its web interface, PeptideAtlas supports the study of interesting proteins related to basic biological mechanisms key to virulence such as apoptosis, dimorphism and adherence. It also provides a valuable resource to select candidate proteotypic peptides for future (SRM) targeted proteomic experiments. This article is part of a Special Issue entitled: Trends in Microbial Proteomics.

Introduction

Candida albicans is a fungus of great clinical importance. In addition to asymptotically colonizing mucous membranes as a commensal in a large percentage of the population, it may cause severe opportunistic infections in specific cases such as patients with weakened immune defenses, a common circumstance in cancer and AIDS patients. *C. albicans* infections are also a threat to patients in post-surgical situations and intensive care unit stays. In this respect, invasive candidiasis remains nowadays one of the major types of nosocomial infections and a challenge in terms of economical and health costs (Wisplinghoff *et al.*, 2004; Moran *et al.*, 2010; Tong *et al.*, 2008). From the perspective of proteomics, recent studies have provided new insights into the *C. albicans* biology and suggested new clinical biomarker candidates for diagnosis and prognosis of invasive candidiasis (Pitarch *et al.*, 2006a,b; Fernández-Arenas *et al.*, 2007; Pitarch *et al.*, 2011).

However, the clinical relevance of this organism is not reflected in the number of large-scale publicly available proteomics resources. Up to the current date, the PRIDE (Vizcaíno *et al.*, 2013) database includes only 15 experiments accounting for 1786 identified proteins. The more *C. albicans*-focused Proteopathogen database (Vialás *et al.*, 2009) comprises several hundred protein identifications including data from gel based proteomics, and other major proteomic online resources such as the Global Proteome Machine Database (GPMDB (Craig and Beavis, 2004)) or Tranche (Smith *et al.*, 2011) contain no *C. albicans* data whatsoever.

As for the genomic data, according to Candida Genome Database (CGD), currently the most comprehensively annotated *C. albicans* sequence repository (Costanzo *et al.*, 2006), the *C. albicans* genome contains 6215 ORFs (as of May 28, 2013), out of which 1497 are annotated as verified, i.e. representing genes for which there is empirical evidence that the ORF actually encodes a functionally characterized protein. In contrast, 4566 ORFs are termed uncharacterized, indicating that there exists no conclusive evidence for the existence of a protein product. This data implies that most part of the predicted proteome, over 70 % of the ORFs, is still unknown or has not been properly annotated yet. An extensive characterization of the *C. albicans* proteome will therefore be of great value to increase our knowledge in proteins involved in mechanisms of virulence and infection and, thus serves as a basis to design strategies for

diagnosis, vaccination and treatment of invasive candidiasis.

Since its inception, the PeptideAtlas project (Desiere *et al.*, 2006) has encouraged mass spectrometry data submission by the community and has thus grown to a large compilation of atlases of different species including human tissue and body fluid specific builds (brain, plasma (Farrah *et al.*, 2011) and urine), microbial builds (*Halobacterium* (Van *et al.*, 2008), *Mycobacterium tuberculosis* (Schubert *et al.*, 2013), *Streptococcus* (Lange *et al.*, 2008), *Leptospira*, *Plasmodium* (Lindner *et al.*, 2013), *Saccharomyces* (King *et al.*, 2006) and *Schizosaccharomyces* (Gunaratne *et al.*, 2013)); invertebrate builds (*Caenorhabditis elegans*, *Drosophila* (Loevenich *et al.*, 2009) and *Apis mellifera* (Chan *et al.*, 2011)); and a pig and a bovine milk (Bislev *et al.*, 2012) builds. The PeptideAtlas project, as a multi-species compendium of proteomes, is continuously increasing its biological diversity. The recent *Schizosaccharomyces pombe* atlas (Gunaratne *et al.*, 2013) attains a large coverage of its proteome by ad hoc extensive fractionation and high-resolution LC-MS/MS, and contributes in the sense that some of the fission yeast biological processes have a high degree of conservation with the corresponding pathways in mammalian cells. The incorporation of *C. albicans* resolves the previous absence of fungal pathogens in the PeptideAtlas and their under representation in any public proteomic data repository.

Furthermore, the proven utility of PeptideAtlas as a resource for selecting proteotypic peptides for Selected Reaction Monitoring (SRM) (Deutsch *et al.*, 2008a) or SWATH-MS (Gillet *et al.*, 2012) will enable a starting point for future targeted proteomics workflows in *C. albicans*.

Materials and methods

Empirical data compilation

Large amounts of mass spectrometry data corresponding to many and diverse measurements of the *C. albicans* proteome initially intended for different purposes were assembled in order to build the PeptideAtlas. A range of proteomic methods, protocols and different biological conditions were used to generate the data as shown in Table 1. These include membrane protein extractions (Cabezón *et al.*, 2009), morphological yeast to hypha transition experiments (Monteoliva *et al.*, 2011) and phosphoprotein enrichment treatments.

A *Candida albicans* PEPTIDEATLAS

Table 1. List of experiments collected to construct the *C. albicans* PeptideAtlas.

#Exp	Sample (as named in the web interface)	Labeling/treatment	Instrument type	#raw files
1	Calb_acidic_subproteome	-	LTQ	3
2	Calb_memb	-	LTQ	8
3	SILAC_phos_OrbitrapVelos_1	SILAC. IMAC+TiO2	OrbitrapVelos	3
4	SILAC_phos_OrbitrapVelos_2	SILAC. IMAC+TiO2	OrbitrapVelos	3
5	SILAC_phos_OrbitrapVelos_3	SILAC. IMAC+TiO2	OrbitrapVelos	3
6	SILAC_phos_OrbitrapVelos_4	SILAC. IMAC+TiO2	OrbitrapVelos	3
7	SILAC_phos_OrbitrapXL_1A	SILAC. IMAC	OrbitrapXL	11
8	SILAC_phos_OrbitrapXL_1A_TiO2	SILAC. IMAC+TiO2	OrbitrapXL	5
9	SILAC_phos_OrbitrapXL_1B	SILAC. IMAC	OrbitrapXL	6
10	SILAC_phos_OrbitrapXL_1B_TiO2	SILAC. IMAC+TiO2	OrbitrapXL	6
11	SILAC_phos_OrbitrapXL_2	SILAC. IMAC	OrbitrapXL	6
12	SILAC_phos_OrbitrapXL_3	SILAC. IMAC	OrbitrapXL	6
13	SILAC_phos_OrbitrapXL_4	SILAC. IMAC	OrbitrapXL	5
14	Calb_extract_3TOF	-	Triple TOF	2
15	Hyphal_extract_OrbitrapVelos	-	Orbitrap Velos	4
16	Yeast_extract_OrbitrapVelos	-	Orbitrap Velos	4

The combination of these diverse datasets resulted in an unprecedented overall coverage of the *C. albicans* proteome. Protein samples were obtained as previously described in (Monteoliva *et al.*, 2011). Briefly, cells of the clinical isolate SC5314 were grown in YPD medium for standard growth, whereas hyphal form growth was induced using either Lee medium pH 6.7 or heat-inactivated fetal bovine serum. Protein extracts were then obtained by mechanical cell disruption using either glass beads in the MSK cell homogenizer or the Fast-Prep cell breaker. Protein digests were obtained by trypsinization and separated via HPLC. All spectra acquisition runs were performed by LC-MS/MS in a data-dependent manner in different instruments and setups. Table 1 provides an overview of the experiments along with the instruments used for the mass spectrometry and the corresponding number of raw spectra data files that were acquired.

In addition, raw MS data from unpublished, SILAC labeled and phosphoprotein enriched samples generated from studies focused on *Candida* interaction

with host immune cells and from experiments studying the hyphal and yeast-form proteomes, were added to the collection.

Peptide and protein identification

PeptideAtlas ensures consistency and quality of the stored data by processing the raw spectra sets by the Trans-Proteomic Pipeline (TPP) (Deutsch *et al.*, 2010), a suite of software tools for processing shotgun proteomic datasets. The TPP tools are run in a well-established sequential pipeline spanning steps from creating appropriate standard files to be used as input by the search engine to statistical validation of protein inference and calculation of the False Discovery Rate (FDR).

The collected raw spectra files in different proprietary file formats were converted to the standard format for mass spectrometry output data mzML (Martens *et al.*, 2011), searched using X!Tandem (Craig and Beavis, 2004) with the K-score algorithm plug-in (MacLean *et al.*, 2006) and the output search results were converted to the search engine-independent pepXML format (Keller *et al.*, 2005).

The target fasta sequence file used for the search was obtained from the *Candida* Genome Database (CGD) (Costanzo *et al.*, 2006) (Assembly 21)

Common contaminants from the common Repository of Adventitious Proteins (cRAP) were appended. Then for each of these sequences, counterpart reversed decoy sequences were appended.

PeptideProphet (Keller *et al.*, 2002) was then run on the search results to model the distributions of correctly and incorrectly assigned Peptide-to-Spectrum Matches (PSMs). It then assigns probabilities of being correct for each PSM, yielding a sensitive and flexible approach to report results in a comparable manner. Next, iProphet (Shteynberg *et al.*, 2011) was used to combine additional sources of evidence including multiple identifications of the same peptide across spectra, experiments, and charge and modification states, allowing a more precise integration of evidence supporting the identification of each unique peptide sequence. ProteinProphet (Nesvizhskii *et al.*, 2003) was then run to refine iProphet probabilities by adding the information at the protein level, like the number of sibling peptides within a protein and to compute final protein level probabilities. The prophet tools together combine multiple layers of evidence and refine the model iteratively to achieve an optimal analysis of the

data. Finally MAYU (Reiter *et al.*, 2009) estimated FDR at different levels for each contributing experiment and for the entire dataset based on the PSMs to decoy proteins.

This process followed the pipeline first implemented in the construction of the human plasma PeptideAtlas described in (Farrah *et al.*, 2011) and successfully applied to other builds such as the bovine milk and mammary gland PeptideAtlas (Bislev *et al.*, 2012).

Construction of the PeptideAtlas

The PeptideAtlas building process calculates the cumulative number of identified peptide and proteins across the experiments, gathers information on protein to genome location mappings and estimates the peptides' Empirical Suitability Score and Predicted Suitability Score (ESS and PSS). The genomic mappings, since *C. albicans* is not present in the Ensembl database, which is the default PeptideAtlas uses to that purpose, were extracted from the generic feature file *C. albicans* SC5314 versionA21 s02m05r10 features.gff obtained from CGD.

An overview of how the different experiments contribute, in terms of the number of identified spectra and peptides, to the atlas build is depicted in Fig. 1.

Besides, and due to the particularly rich number of identifications in experiments aimed at the detection of phosphorylated proteins (experiments #3 to #13), a similarly processed version of the PeptideAtlas was created including in this case PTMProphet results which provide, alongside each modified residue, the probability that the post-translational modification is truly detected at that site.

Results and discussion

Assessment of proteome coverage and functional enrichment analysis

The assembled proteomic datasets (Table 1) were subject to uniform data processing in order to build the *C. albicans* PeptideAtlas.

The PSM assignment and protein inference processes were conducted by means of the consistent and robust pipeline TPP. The prophet tools integrate

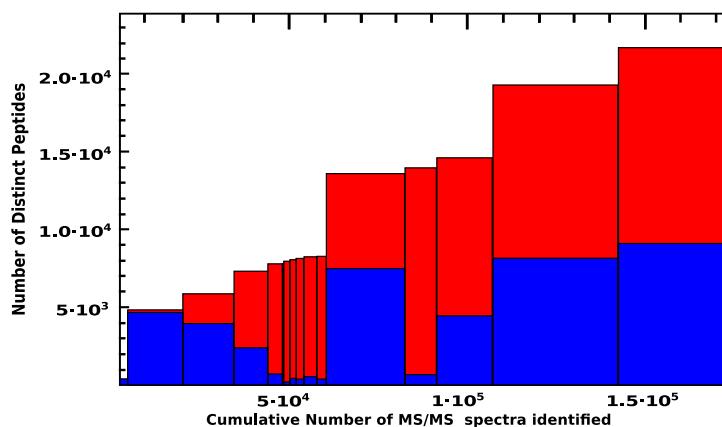


Figure 1. Histogram showing the cumulative number of distinct peptides in the *C. albicans* PeptideAtlas. Each bar represents a different experiment that has contributed to the build. Bar width is proportional to the number of high confidence PSMs. Height of the blue section of the bar represents the number of distinct peptides in each experiment and total height of the bar (red plus blue sections) indicates the cumulative number of peptides. The order of experiments is the same as in Table 1.

various levels of information and report identification results in statistical terms so that spectrum assignments, peptide to protein mappings and protein groups are statistically validated, leading to an overall improved sensitivity for a defined FDR level. As a result the generated *C. albicans* PeptideAtlas comprises 21,938 peptides identified at a 0.24 % FDR allocated to 2562 proteins at a 1.2 % FDR, that is, a coverage of 41.3 % of the 6209 *C. albicans* translated ORF sequences from the fasta database used for searches. While the presented instance of the *C. albicans* PeptideAtlas has reached unprecedented coverage, it does not represent a final representation of the respective proteome. Like other PeptideAtlas instances for other species, the *C. albicans* atlas will be expanded upon submission and processing of new MS data generated in ongoing projects.

To determine the biological functions encompassed by the covered part of the proteome in this PeptideAtlas a Gene Ontology (GO) annotation enrichment analysis was carried out for the list of all detected *C. albicans* canonical proteins, excluding decoy hits, using the biological process ontology and Genecodis software (Tabas-Madrid *et al.*, 2012). Predictably, it generated a diverse array of clusters heterogeneously annotated, among which the largest in num-

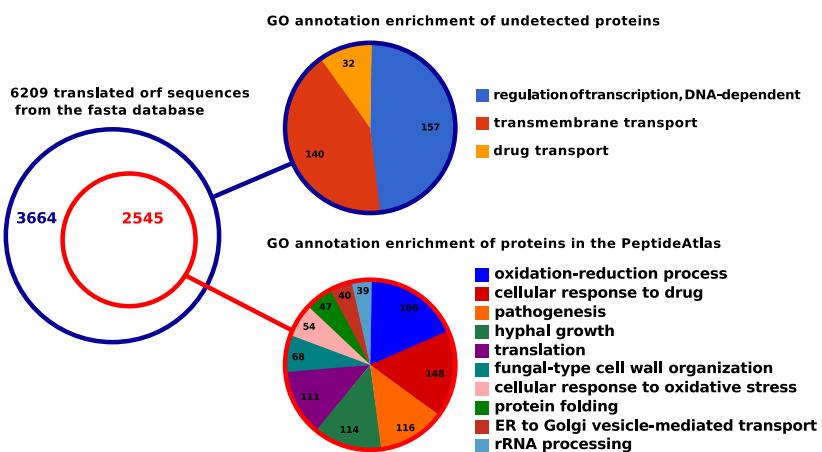


Figure 2. Gene Ontology annotation enrichment analysis for both the covered and undetected proteome subsets. All shown GO annotations correspond to the biological process ontology and were found significant for a p-value cut-off below 0.01.

ber of proteins are associated with the GO terms oxidation-reduction process, cellular response to drug, pathogenesis and hyphal growth respectively (Fig. 2). The enrichment in some very generic GO terms such as oxidation-reduction process, cellular response to drug and translation supports the hypothesis that the diversity of experiments assembled to build the atlas provides a representative, unbiased subset of the *C. albicans* proteome. In contrast, the more precise groups resulting from the analysis related to pathogenesis, hyphal growth and fungal-type cell wall organization are consistent with the large contribution to the atlas by the experiment aimed at identifying proteins from cells in hyphal form and by the profusion of these sort of annotations in the source database.

As for the set of proteins present in the fasta database used for the searches that are not covered in the PeptideAtlas, they were subject to a similar analysis and were found to be enriched in annotations related to the transmembrane transport GO term (Fig. 2). These proteins are not easily observed by LC-MS/MS techniques as previously reported (Gunaratne *et al.*, 2013). Also, we observed enrichment in regulation of transcription, DNA-dependent in the undetected part of the proteome. Given the short life span and low abundance of many transcription factors it is plausible that they were not detected in the collected datasets and their under representation in proteomic data has also been reported in other proteomic studies and in PeptideAtlas instances from

other species (Gunaratne *et al.*, 2013; Ding *et al.*, 2013; Simicevic *et al.*, 2013). The low number of protein groups significantly associated with GO annotations in the undiscovered set is understandably due to the fact that 2460 out of 3665 of the undetected protein sequences, roughly two thirds, correspond to unnamed ORFs, meaning that little is known about their biological function.

In addition to the groups of functionally characterized proteins, this PeptideAtlas offers solid empirical evidence for the existence of 1564 proteins, showing a ProteinProphet probability score greater than 0.9, corresponding to uncharacterized ORFs in the CGD database (i.e., one-third of all 4566 uncharacterized ORFs).

Proteins of interest. Case of use

From the clinical angle, the characterization of the *C. albicans* proteome is focused on particular subproteomes, including cell surface constituents, and the set of proteins involved in the yeast-to-hypha transition. The cell wall, as the outermost cell structure represents the contact surface with host cells and therefore gathers many antigens, virulence factors and Pathogen Associated Molecular Patterns (PAMPs) (Vialás *et al.*, 2012). Proteins involved in hyphal growth are also relevant in pathogenesis, in the sense that hyphae have been proven as key for invasiveness whereas the switch back to yeast form plays a role in dissemination (Saville *et al.*, 2003).

Within these groups, a selected set of proteins of interest present in the atlas, are the adhesins from the ALS family with a role in invasiveness Als2p and Als3p; those required for cell wall biogenesis and organization glycosidases Phr1p, Phr2p and Utr2p; mannosyltransferases Pmt1p, Pmt4 and Pmt6; those involved in the cell-wall glucan metabolism Mp65p and Ecm33p, and the hyphal cell wall constituents Hwp1, Csp37p and Rbt1p.

Other relevant proteins in the atlas are the ones related to apoptosis, since those would make an ideal target for the treatment of invasive candidiasis. Among those, the atlas contains Mca1p, Bcy1p, Ras1p and three unnamed ORFs with orthologous in other species showing roles in the apoptotic process (orf19.713, orf19.967 and orf19.7365).

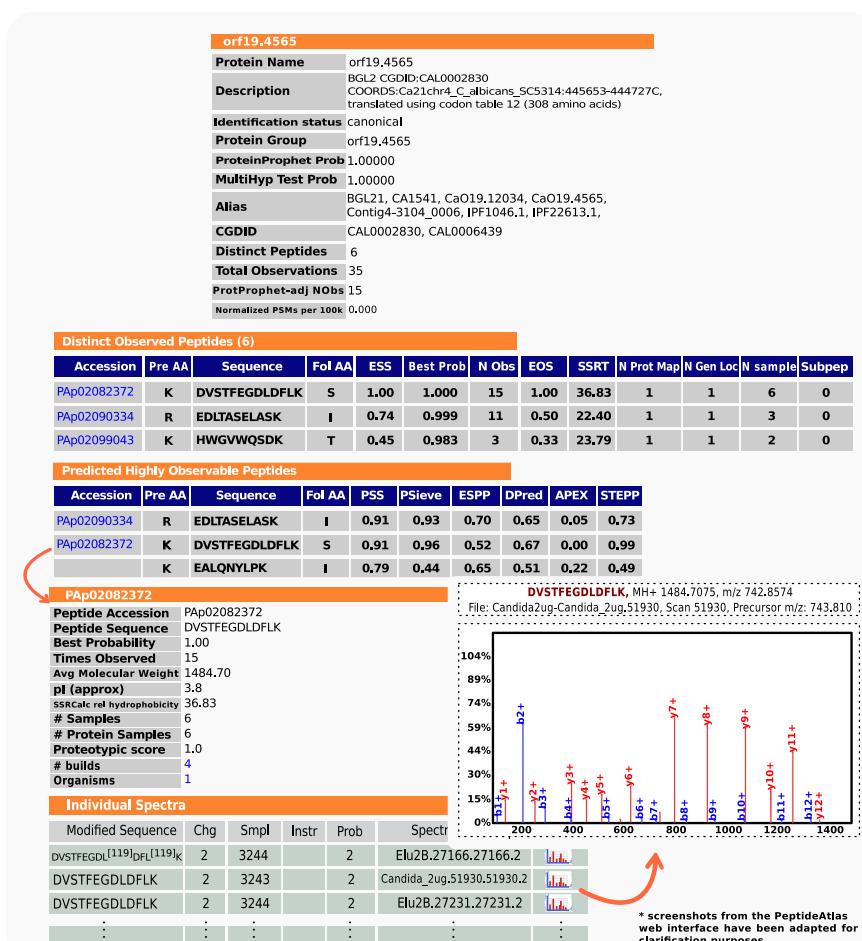


Figure 3. Protein- and peptide-centric views for Bgl2p are depicted. Distinct observed peptides are ranked by the BestProb parameter (representing the PeptideProphet probability). Of those, most probably, some will also be present in the following Predicted Highly Observable Peptides table were peptides are ranked by PSS, a combination of different prediction algorithms. For all observed peptides, spectra from the different experiments are also available.

For any particular proteins of interest, the PeptideAtlas web interface provides tools to explore the data. A user can browse through a set of protein and peptide-centric views as illustrated in Fig. 3 for the specific case of Bgl2p, a cell wall glucosyltransferase. Its corresponding observed peptides are highlighted in the protein sequence and sorted by the Empirical Suitability Score (ESS), which represents the proportion of the number of samples in which the peptide is observed with regard to the number of samples in which the original protein is observed. This parameter, in combination with others, such as a number of

protein mappings, genome location and amino acid composition will help the user to select candidate proteotypic peptides for a targeted proteomics (SRM, Selected Reaction Monitoring) experiment.

Concerning those cases where a selected protein of interest is not observed in the selected build, the PeptideAtlas also provides the Predicted Suitability Score (PSS), a value resulting from the combination of different observability prediction algorithms based upon physico-chemical properties derived from the amino acid composition and previous training datasets as described in (Mallick *et al.*, 2007).

The build that assembles the phosphoprotein enrichment experiments may be of great potential interest to study biological processes such as signal transduction, since it encompasses a number of kinases and phosphatases. A total of 421 different phosphopeptides were detected and allocated to 210 phosphoproteins. The largest number of phosphorylation sites occurs in S, 410 phosphopeptides contain, at least, one phosphorylation in S; 79 phosphopeptides contain, at least, one phosphorylation in T; and 10 phosphopeptides contain one phosphorylation in Y.

Conclusions

This *C. albicans* PeptideAtlas build provides empirical identification evidence for 21,938 unique peptides including 421 phosphopeptides at a 0.24 % peptide-level FDR that account for a high-confidence set (as defined in (Farrah *et al.*, 2011)) of 2562 canonical proteins at a 1.2 % protein-level FDR representing thus a significant advance in the proteomic characterization of *C. albicans*. Through the web interface, an important set of tools are made available to the scientific community, enabling a solid foundation to study different basic biological processes like dimorphism, signal transduction, apoptosis and the interaction with the human host. Furthermore, its value as a resource for proteotypic peptide selection is of great potential interest for future SRM experiments. The current version of the PeptideAtlas can be found at: https://db.systemsbiology.net/sbeams/cgi/PeptideAtlas/buildDetails?atlas_build_id=323 and the version including PTM results at: https://db.systemsbiology.net/sbeams/cgi/PeptideAtlas/buildDetails?atlas_build_id=324

References

- Bislev, S., Deutsch, E., and Sun, Z. (2012), A Bovine PeptideAtlas of milk and mammary gland proteomes, Molecular & Cellular Proteomics, 12(18), 2895-2899.
- Cabezón, V., Llama-Palacios, A., Nombela, C., Monteoliva, L., and Gil, C. (2009), Analysis of *Candida albicans* plasma membrane proteome., Proteomics, 9(20), 4770-86.
- Chan, Q. W. T., Parker, R., Sun, Z., Deutsch, E. W., and Foster, L. J. (2011), A honey bee (*Apis mellifera* L.) PeptideAtlas crossing castes and tissues., BMC genomics, 12(1), 290.
- Costanzo, M. C., Arnaud, M. B., Skrzypek, M. S., Binkley, G., Lane, C., Miyasato, S. R., and Sherlock, G. (2006), The Candida Genome Database: facilitating research on *Candida albicans* molecular biology., FEMS yeast research, 6(5), 671-84.
- Craig, R. and Beavis, R. C. (2004), TANDEM: matching proteins with tandem mass spectra., Bioinformatics, 20(9), 1466-7.
- Desiere, F., Deutsch, E. W., King, N. L., Nesvizhskii, A. I., Mallick, P., Eng, J., Chen, S., Eddes, J., Loevenich, S. N., and Aebersold, R. (2006), The PeptideAtlas project., Nucleic acids research, 34(Database issue), D655-8.
- Deutsch, E., Lam, H., and Aebersold, R. (2008), Data analysis and bioinformatics tools for tandem mass spectrometry in proteomics, Physiological genomics, 33(1), 18-25.
- Deutsch, E. E. W., Mendoza, L., Shteynberg, D., Farrah, T., Lam, H., Tasman, N., Sun, Z., Nilsson, E., Pratt, B., Prazen, B., Eng, J. K., Martin, D. B., Nesvizhskii, A. I., and Aebersold, R. (2010), A guided tour of the TransProteomic Pipeline, Proteomics, 10(6), 1150-1159.
- Ding, C., Chan, D. W., Liu, W., Liu, M., Li, D., Song, L., Li, C., Jin, J., Malovannaya, A., Jung, S. Y., Zhen, B., Wang, Y., and Qin, J. (2013), Proteome-wide profiling of activated transcription factors with a concatenated tandem array of transcription factor response elements, Procee-

dings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 110(17), 6771-6.

Farrah, T., Deutsch, E. W., Omenn, G. S., Campbell, D. S., Sun, Z., Bletz, J. a., Mallick, P., Katz, J. E., Malmstrom, J., Ossola, R., Watts, J. D., Lin, B., Zhang, H., Moritz, R. L., and Aebersold, R. (2011), A high-confidence human plasma proteome reference set with estimated concentrations in PeptideAtlas., Molecular & Cellular Proteomics, 10(9), M110.006353.

Fernández-Arenas, E., Cabezón, V., Bermejo, C., Arroyo, J., Nombela, C., Diez-Orejas, R., and Gil, C. (2007), Integrated proteomics and genomics strategies bring new insight into *Candida albicans* response upon macrophage interaction., Molecular & cellular proteomics: MCP, 6(3), 460-478.

Gillet, L. C., Navarro, P., Tate, S., Rost, H., Selevsek, N., Reiter, L., Bonner, R., and Aebersold, R. (2012), Targeted data extraction of the MS/MS spectra generated by data-independent acquisition: a new concept for consistent and accurate proteome analysis., Molecular & Cellular Proteomics, 11(6), O111.016717.

Gunaratne, J., Schmidt, A., Quandt, A., Neo, S. P., Sarac, O. S., Gracia, T., Loguercio, S., Ahrne, E., Li Hai Xia, R., Tan, K. H., Loessner, C., Bahler, J., Beyer, A., Blackstock, W., and Aebersold, R. (2013), Extensive Mass Spectrometry-Based Analysis of the Fission Yeast Proteome: The *S. pombe* PeptideAtlas, Molecular & Cellular Proteomics, pp. 1741-1751.

Keller, A., Nesvizhskii, A. I., Kolker, E., and Aebersold, R. (2002), Empirical statistical model to estimate the accuracy of peptide identifications made by MS/MS and database search., Analytical chemistry, 74(20), 5383-92.

Keller, A., Eng, J., Zhang, N., Li, X.-j., and Aebersold, R. (2005), A uniform proteomics MS/MS analysis platform utilizing open XML file formats, Molecular systems biology, 1(August 2005), 2005.0017.

King, N. L., Deutsch, E. W., Ranish, J. A., Nesvizhskii, A. I., Eddes, J. S., Mallick, P., Eng, J., Desiere, F., Flory, M., Martin, D. B., Kim, B., Lee, H., Raught, B., and Aebersold, R. (2006), Analysis of the *Saccharomyces cerevisiae* proteome with PeptideAtlas., Genome biology, 7(11), R106

Lindner, S. E., Swearingen, K. E., Harupa, A., Vaughan, A. M., Sinnis, P., Moritz, R. L., and Kappe, S. H. I. (2013), Total and putative surface proteomics of malaria parasite salivary gland sporozoites., Molecular & Cellular Proteomics, 12(5), 1127-43.

Loevenich, S. N., Brunner, E., King, N. L., Deutsch, E. W., Stein, S. E., Aebersold, R., and Hafen, E. (2009), The *Drosophila melanogaster* PeptideAtlas facilitates the use of peptide data for improved fly proteomics and genome annotation., BMC bioinformatics, 10, 59.

MacLean, B., Eng, J., Beavis, R., and McIntosh, M. (2006), General framework for developing and evaluating database scoring algorithms using the TANDEM search engine, Bioinformatics, 22(22), 2830-2832.

Mallick, P., Schirle, M., Chen, S. S., Flory, M. R., Lee, H., Martin, D., Ranish, J., Raught, B., Schmitt, R., Werner, T., Kuster, B., and Aebersold, R. (2007), Computational prediction of proteotypic peptides for quantitative proteomics., Nature biotechnology, 25(1), 125-31.

Martens, L., Chambers, M., Sturm, M., Kessner, D., Levander, F., Shofstahl, J., Tang, W. H., Rompp, A., Neumann, S., Pizarro, A. D., Montecchi-Palazzi, L., Tasman, N., Coleman, M., Reisinger, F., Souda, P., Hermjakob, H., Binz, P.-A., and Deutsch, E. W. (2011), mzML-a community standard for mass spectrometry data., Molecular & cellular proteomics : MCP, 10(1), R110.000133.

Monteoliva, L., Martinez-Lopez, R., Pitarch, A., Hernaez, M. L., Serna, A., Nombela, C., Albar, J. P., and Gil, C. (2011), Quantitative proteome and acidic subproteome profiling of *Candida albicans* yeast-to-hypha transition, Journal of Proteome Research, 10(2), 502-517.

Moran, C., Grussemeyer, C. A., Spalding, J. R., Benjamin, D. K., and Reed, S. D. (2010), Comparison of costs, length of stay, and mortality associated with *Candida glabrata* and *Candida albicans* bloodstream infections., American journal of infection control, 38(1), 78- 80.

Nesvizhskii, A. I., Keller, A., Kolker, E., and Aebersold, R. (2003), A statistical model for identifying proteins by tandem mass spectrometry., Analytical chemistry, 75(17), 4646-58.

Pitarch, A., Nombela, C., and Gil, C. (2006a), *Candida albicans* biology and pathogenicity: insights from proteomics., Methods of biochemical analysis, 49, 285-330.

Reiter, L., Rinner, O., Picotti, P., Huttenhain, R., Beck, M., Brusniak, M.-Y., Hengartner, M. O., and Aebersold, R. (2011), mProphet: automated data processing and statistical validation for large-scale SRM experiments., Nature methods, 8(5), 430-5.

Saville, S. P., Lazzell, A. L., Monteagudo, C., and Lopez-Ribot, J. L. (2003), Engineered control of cell morphology in vivo reveals distinct roles for yeast and filamentous forms of *Candida albicans* during infection., Eukaryotic cell, 2(5), 1053-60.

Schubert, O. T., Mouritsen, J., Ludwig, C., Rost, H. L., Rosenberger, G., Arthur, P. K., Claassen, M., Campbell, D. S., Sun, Z., Farrah, T., Gengenbacher, M., Maiolica, A., Kaufmann, S. H. E., Moritz, R. L., and Aebersold, R. (2013), The Mtb Proteome Library: A Resource of Assays to Quantify the Complete Proteome of Mycobacterium tuberculosis., Cell host & microbe, 13(5), 602-12.

Shteynberg, D., Deutsch, E. W., Lam, H., Eng, J. K., Sun, Z., Tasman, N., Mendoza, L., Moritz, R. L., Aebersold, R., and Nesvizhskii, a. I. (2011), iProphet: Multi-level Integrative Analysis of Shotgun Proteomic Data Improves Peptide and Protein Identification Rates and Error Estimates, Molecular & Cellular Proteomics, 10(12), M111.007690-M111.007690.

Simicevic, J., Schmid, A. W., Gilardoni, P. A., Zoller, B., Raghav, S. K., Krier, I., Gubelmann, C., Lisacek, F., Naef, F., Moniatte, M., and Deplancque, B. (2013), Absolute quantification of transcription factors during cellular differentiation using multiplexed targeted proteomics., Nature methods, advance on.

Smith, B. E., Hill, J. A., Gjukich, M. A., and Andrews, P. C. (2011), Tranche distributed repository and ProteomeCommons.org., Methods in molecular biology (Clifton, N.J.), 696, 123-45.

Tabas-Madrid, D., Nogales-Cadenas, R., and Pascual-Montano, A. (2012), GeneCodis3: a non-redundant and modular enrichment analysis tool for

functional genomics., Nucleic acids research, 40(Web Server issue), W478-83.

Tong, K. B., Murtagh, K. N., Lau, C., and Seifeldin, R. (2008), The impact of esophageal candidiasis on hospital charges and costs across patient subgroups., Current medical research and opinion, 24(1), 167-74.

Van, P. T., Schmid, A. K., King, N. L., Kaur, A., Pan, M., Whitehead, K., Koide, T., Facciotti, M. T., Goo, Y. A., Deutsch, E. W., Reiss, D. J., Mallik, P., and Baliga, N. S. (2008), Halobacterium salinarum NRC-1 PeptideAtlas: toward strategies for targeted proteomics and improved proteome coverage., Journal of proteome research, 7(9), 3755-64.

Vialás, V., Nogales-Cadenas, R., Nombela, C., Pascual-Montano, A., and Gil, C. (2009), Proteopathogen, a protein database for studying *Candida albicans*-host interaction., Proteomics, 9(20), 4664-8.

Vialás, V., Perumal, P., Gutierrez, D., Ximénez-Embún, P., Nombela, C., Gil, C., and Chaffin, W. L. (2012), Cell surface shaving of *Candida albicans* biofilms, hyphae and yeast form cells., Proteomics, 12(14), 2331-2339.

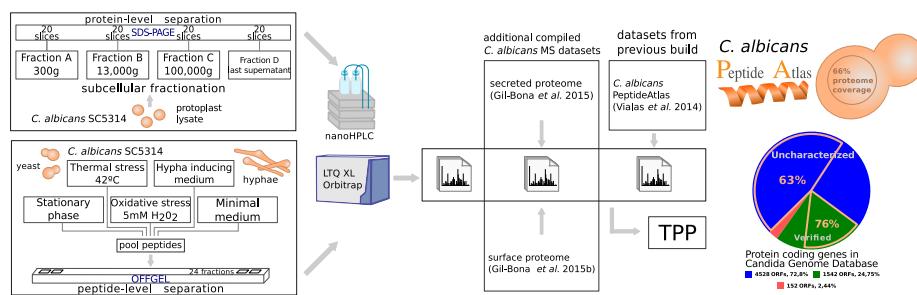
Vizcaíno, J. A., Coté, R. G., Csordas, A., Dianes, J. a., Fabregat, A., Foster, J. M., Griss, J., Alpi, E., Birim, M., Contell, J., O Kelly, G., Schoenegger, A., Ovelleiro, D., Pérez-Riverol, Y., Reisinger, F., Ríos, D., Wang, R., and Hermjakob, H. (2013), The PRoteomics IDEntifications (PRIDE) database and associated tools: status in 2013., Nucleic acids research, 41(Database issue), D1063-9.

Wisplinghoff, H., Bischoff, T., Tallent, S. M., Seifert, H., Wenzel, R. P., and Edmond, M. B. (2004), Nosocomial bloodstream infections in US hospitals: analysis of 24,179 cases from a prospective nationwide surveillance study., Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America, 39(3), 309-17.

A comprehensive *Candida albicans* PeptideAtlas build enables deep proteome coverage

Vital Vialas, Zhi Sun, Jose A. Reales Calderón, María L. Hernández, Vanessa Casas, Montserrat Carrascal, Joaquín Abián, Lucía Monteoliva, Eric W. Deutsch, Robert L. Moritz, Concha Gil

Journal of Proteomics 2015, In Press, Accepted Manuscript



Abstract

To provide new and expanded proteome documentation of the opportunistic pathogen *Candida albicans*, we have developed new protein extraction and analysis routines to provide a new, extended and enhanced version of the *C. albicans* PeptideAtlas. Two new datasets, resulting from experiments consisting of exhaustive subcellular fractionations and different growing conditions, plus two additional datasets from previous experiments on the surface and the secreted proteomes, have been incorporated to increase the coverage of the proteome. High resolution precursor mass spectrometry (MS) and ion trap tandem MS spectra were analyzed with three different search engines using a database containing allele-specific sequences. This approach, novel for a large-scale *C. albicans* proteomics project, was combined with the post-processing and filtering implemented in the Trans Proteomic Pipeline consistently used in the PeptideAtlas project resulted in 49372 additional peptides (3-fold increase) and 1630 more proteins (1.6-fold increase) identified in the new *C. albicans* PeptideAtlas with respect to the previous build. A total of 71310 peptides and 4174 canonical (minimal non-redundant set) proteins (4115 if one protein per pair of alleles is considered) were identified representing 66 % of the 6218 proteins in the predicted proteome. This makes the new PeptideAtlas build the most comprehensive *C. albicans* proteomics resource available and the only large-scale one with detections of individual alleles.

Introduction

Candida albicans, an inhabitant fungus of the gastrointestinal and genitourinary tracts in the human microbiota, may under certain circumstances (e.g., present in patients with a weakened immune system from AIDS or patients in an intensive care unit), become opportunistically pathogenic and hence become the etiological agent of a severe type of infection called candidiasis. In the search for diagnostic and prognostic biomarkers for candidiasis, a large assortment of proteomics studies have been performed (Pitarch *et al.*, 2011), or with the objective to better understand clinically relevant biological processes such as the interaction with cells of the immune system (Fernández-Arenas *et al.*, 2007; Cheng *et al.*, 2012; Gow and van de Veerdonk, 2011), apoptosis (Ramsdale, 2008; Hao *et al.*, 2013) or the virulence-associated morphological yeast-to-hypha switch (Monteoliva *et al.*, 2011; Vialás *et al.*, 2012).

However, despite the extensive efforts on clinical aspects from the proteomics view (Pitarch *et al.*, 2006a; Cabezón *et al.*, 2009; Pitarch *et al.*, 2009; Rupp, 2004), online public proteomic repositories were sparse. Our previously published *C. albicans* PeptideAtlas (Vialas *et al.*, 2013) described the first large-scale public proteomic resource for the study of this opportunistic pathogenic fungus. With over 2500 proteins and representing approximately 41 % of the predicted proteome, the *C. albicans* PeptideAtlas attained unprecedented proteome coverage and is still is the first human fungal pathogen present in the PeptideAtlas project (Desiere *et al.*, 2006; Deutsch *et al.*, 2015). However, this coverage lags far behind the coverage for other species, such as the yeast species *Saccharomyces cerevisiae* (61 %) (King *et al.*, 2006) and *Schizosaccharomyces pombe* (71 %) (Gunaratne *et al.*, 2013). To bridge this gap we have added additional high resolution precursor MS datasets based on purification strategies that collectively strive for maximizing the coverage of the detectable proteome. One of the approaches consists of an exhaustive subcellular fractionation based on differential sequential centrifugations followed by protein-level separation on SDS-PAGE; the other approach is based on a peptide-level separation by OFFGEL preparative isoelectric focusing of peptides (Ros *et al.*, 2002; Hörrth *et al.*, 2006) from a pool from five different culture conditions. In addition, two high-resolution *C. albicans* MS datasets corresponding to published works on the secreted proteome (Gil-Bona *et al.*, 2014) and on the yeast and hyphal cell forms surface proteome (Gil-Bona *et al.*, 2015) have also been included in

Table 1. Overview of the new datasets that were reprocessed together with the datasets from the previous version of the PeptideAtlas to produce the new build.

Sample (as named in the web interfa- ce)	ExperimentPASS id	MS ty- pe	Fractions/Replicate#	spectra files
Calb_subcel_fract	PASS00402	Differential sequential centrifugations and SDS-PAGE	LTQ XL Orbitrap	FractionA x20 FractionB x20 FractionC 2x20 FractionD x20
Calb_offGel	PASS00447	OFFGEL Preparative Isoelectric focusing of peptides	LTQ XL Orbitrap	24 OFFGEL fractions
Calb_ves_secretom	PASS00408	Gil-Bona <i>et al.</i> , 2014)	LTQ Orbitrap Velos	Wt and RMLU2 strains Vesicle-free: x3 Vesicles: x3
Calb_surfome	PASS00446	Gil-Bona <i>et al.</i> , 2015)	LTQ Orbitrap Velos	Yest form: x3 serum-induced hyphae: x3 I.serum- induced hyphae: x2 Lee-induced hyphae: x4

the compilation of MS data files. These new datasets, along with the previously stored raw MS datafiles comprising the former version of the *C. albicans* PeptideAtlas (Vialas *et al.*, 2013), have all been reprocessed and analyzed through the Trans Proteomics Pipeline, TPP (Keller *et al.*, 2005; Deutsch *et al.*, 2015) using multi-search search engine approach utilizing a sequence database with allele-specific sequences to generate the most comprehensive existing *C. albicans* proteomics resource with unprecedented proteome coverage.

Materials and methods

Cell strains and culture media

The *C. albicans* strain used throughout this development is the widely adopted wild-type SC5314, the strain used as the reference sequence in Candida Genome Database, CGD (Costanzo *et al.*, 2006), which was also used as the reference sequence database for spectra to peptide assignment. The exhaustive subcellular fractionation is derived from protoplasts obtained from cells cul-

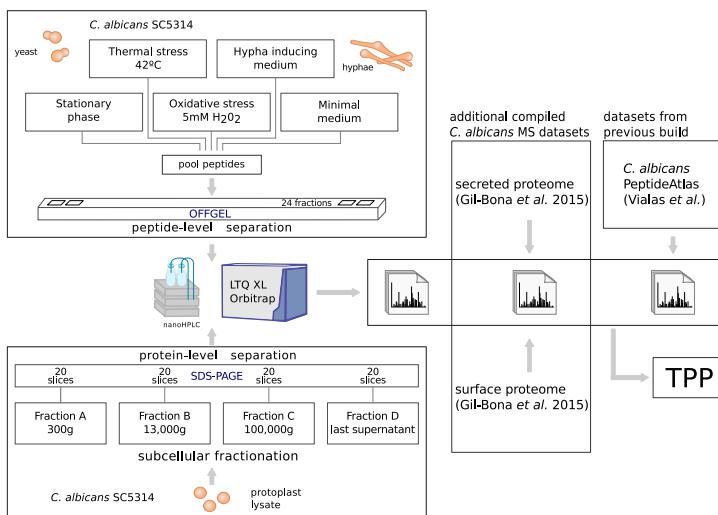


Figure 1. The strategies implemented *ad hoc* to maximize the coverage of the proteome consist of a subcellular fractionation based on increasing centrifugation speeds followed by exhaustive protein- level separation on SDS-PAGE; and OFFGEL peptide-level separation from a pool of peptides from different growing and culture conditions. The MS output results, combined with additional MS datasets from works on the secreted and surface proteomes, along with the datasets in the first atlas were all processed with the TPP.

tivated in YED culture medium (1 % D-glucose, 1 % Difco yeast extract and 2 % agar, w/v). For fractionation based on preparative isoelectric focusing of tryptic peptides, the following culture conditions were used: YED medium + 5 % H₂O₂ at 30° C; YED medium at 42° C; YED medium at 30° C until stationary phase; RPMI 1640 medium (supplemented with 5 % Fetal Bovine Serum, v/v) at 37° C and Minimal Medium at 30° C.

Cell lysis and protein digestion

C. albicans cells from the different culture conditions were washed three times with ice-cold PBS and then scraped and collected by centrifugation at 5000g. Pellets were resuspended in lysis buffer (30mM Tris-HCl pH 8.5, 7M urea, 2M thiourea, 4 % CHAPS, 1 % protease inhibitor cocktail -Roche- and 0.5 % PMSF). An equal volume of 0.4-0.6 mm diameter glass beads was added. Subsequently, cells were disrupted in a FastPrep cell breaker. Supernatants were separated by centrifugation at 3000g for 10 min and protein quantitation was measured using a Bradford assay (Biorad). Equal amounts of each

condition (250 µg/sample) were pooled and denatured by adding 25 mM DTT for 30 min at 60°C. Then, samples were loaded into an Amicon (Nanosep 10K Omega; Pall Corporation) and centrifuged 45 min at 12000 g. Samples were washed twice with DB2 buffer (20mM TEAB, 0,5 % sodium deoxycolate, w/v) and alkylated with 50 mM Iodoacetamide during 20 min in the dark. After twice washes with DB2, digestion was performed by adding sequence grade-modified trypsin (Roche) at an enzyme to substrate ratio of 1:50. After 12h in the dark at RT, peptides were collected into a clean collection tube and the Amicon was washed with DB2 and the flow-through was collected with samples acidified with 0.5% (v/v) TFA. Any protein precipitation was separated by centrifugation for 5 min at 16000 g.

OFFGEL peptide fractionation

For peptide isoelectric focusing (IEF) separation, the resulting peptide mixture (1.2mg in total) was resuspended in a buffer containing 6 % glycerol and 1.2% ampholytes in the 3-10 pH linear OFFGEL buffer (7M Urea, 2M thiourea, 1 % DTT w/v) (GE Healthcare, Uppsala, Sweden). Sample volumes of 150 µl were loaded onto a commercially available 24-cm IPG strip with a linear 3-10 pH gradient (GE Healthcare) after rehydration of the gel for 20 min in a well of 40 µl rehydration solution. Cover fluid (mineral oil, Agilent Technologies) was applied to both ends of the gel strip. Electrofocusing of the peptides was performed at 20C and 50µA until 50 kWh were reached using an Agilent 3100 OFFGEL fractionator (Agilent Technologies) following the manufacturer instructions. Fractions were recovered, peptides extracted from each well with 2 % TFA (v/v) and desalted by passing through a home-made column packed with Poros 50 R2 resin (Applied Biosystem, Foster City, CA, USA). Peptides were eluted with 50 % ACN (v/v) in 0.1 % TFA (v/v) and the fractions were dried and reconstituted in 0.1 % formic acid (v/v) just before LC-MS analysis.

Subcellular fractionation

Sequential incremental centrifugations was used to selectively enrich for different types of membranes and organelles in the pellets, while also collecting soluble proteins from the supernatant (Figure 1). First, protoplasts were obtained as described in (Pitarch *et al.*, 2006a) and then lysed using a combination of osmotic shock and Dounce homogenization. Protoplast lysates were then

subjected to a low centrifugal force, 300 g, resulting in a pellet, P 300, containing unlysed cells and large debris (Fraction A), and a supernatant, S 300, that is subsequently, subjected to increasing centrifugation speeds of 13,000 and 100,000 g. These steps, respectively, generate a pellet, P 13000, containing vacuolar and plasma membrane and other structures such as ER, mitochondria and nuclei (Fraction B), and a pellet, P 100000, containing Golgi membranes and transport vesicles (Fraction C). The supernatant of the last centrifugation containing soluble proteins was also collected, S 100000 (Fraction D). For each of these 4 fractions (P 300 , P 13000 , P 100000 and S 100000), 120 µg of protein was separated by one- dimensional SDS-PAGE 4-20% Bis-Tris gels (mini-protean TGX Stain-free precast Gels, BioRad). The gel was stained with Coomassie blue and each lane was cut into 20 bands. Gel slices were cut into 1mm³ cubes, washed twice with water, dehydrated with 100 % ACN (v/v), and incubated with 10 mM DTT in 50 mM NH₄HCO₃ for 30 min at 56°C for protein reduction. The resulting solution was subsequently alkylated by incubation with 55 mM iodoacetamide in 50 mM NH₄HCO₃ for 20 min at room temperature in the dark. The gel pieces were washed with 50 % ACN (v/v), and then washed again with 10 mM NH₄HCO₃, dehydrated with 100 % ACN (v/v), and then dried in a vacuum concentrator. The gel pieces were rehydrated by adding sequence grade-modified trypsin (Roche) 1:20 in 50 mM NH₄HCO₃ and incubated overnight at room temperature in the dark for protein digestion. Supernatants were transferred to clean tubes, and gel pieces were incubated in 50 mM NH₄HCO₃ at 50°C for 1h. The supernatants were collected and the remaining peptides were extracted by incubation with 5 % formic acid for 15 min and with 100 % ACN for 15 min more. The extracts were combined, and the organic solvent was removed in a vacuum concentrator.

Compilation of additional *C. albicans* MS datasets

In addition to the current datasets, two high-resolution precursor *C. albicans* MS datasets were compiled in order to contribute to the new PeptideAtlas build, extending the coverage in two more specific niches, the set of secreted proteins obtained following the method described in (Gil-Bona *et al.*, 2014) and the set of surface-exposed proteins, also termed surfacome, of both hyphal and yeast form cells as described in (Gil-Bona *et al.*, 2015).

LC-MS/MS

All the samples obtained in the exhaustive subcellular fractionation and the OFFGEL peptide separation were analyzed in an LTQ XL Orbitrap (Thermo-Fisher) equipped with a nanoESI ion source. Samples were loaded into a chromatographic system consisting in a C18 preconcentration cartridge (Agilent Technologies) connected to a 60 cm long, 100 μm i.d. C18 column (NanoSeparations) for the OFFGEL samples and a 15 cm long, 100 μm i.d. C18 column (Nikkyo Technos Co.) for the subcellular fractionation samples. For samples obtained using the OFFGEL approach, the injected volume was 8 % of the volume from each fraction whereas in the subcellular fractionation, one-third of the volume of each digested gel band was injected. High-resolution LC separation was performed at 0.25 $\mu\text{L}/\text{min}$ using a 360-min acetonitrile gradient (OFFGEL samples) and at 0.4 $\mu\text{L}/\text{min}$ in a 90-min acetonitrile gradient (subcellular fractionation samples). Both gradients ranged from 3 to 40 % (solvent A: 0.1 % formic acid, solvent B: acetonitrile 0.1 % formic acid). The HPLC system was composed of an Agilent 1200 capillary nano pump, a binary pump, a thermostated micro injector and a micro switch valve. The LTQ XL Orbitrap was operated in the positive ion mode with a spray voltage of 1.8 kV. The spectrometric analysis was performed in a data dependent mode, acquiring a full scan followed by 10 MS/MS scans (CID, collision energy 35 %) of the 10 most intense signals detected in the MS scan. The full MS (range 300-1800) was acquired in the Orbitrap with a resolution of 60.000. The MS/MS spectra were acquired in the linear ion trap. Precursor ion charge state screening was set up to select monoisotopic ions and reject singly charged ions. In all cases, dynamic exclusion was enabled with a repeat count of 1 and exclusion duration of 30 s.

Post spectra acquisition processing

LC-MS/MS spectra files resulting from the subcellular fractionation and the OFFGEL approaches and the secreted and surface proteomes (Figure 1), in their native vendor-specific format, along with the meta data corresponding to each approach, were submitted to PeptideAtlas via the PeptideAtlas Submission System (PASS) on-line submission form with dataset identifications PASS00402, PASS00447, PASS00408 and PASS00446. LC-MS/MS spectra files were converted to XML-based HUPO-PSI-adopted standard format for mass spectrometry output, mzML (Martens *et al.*, 2011). The protein sequence

fasta file was obtained from the Candida Genome Database (C_albicans_SC5314_version_A22-s05-m01-r01). Unlike the previous *C. albicans* PeptideAtlas, for this new build the sequences in the database are allele-specific, taking advantage of the recent assembly of phased diploid *C. albicans* (Muzey *et al.*, 2013). Sequences were appended with a set of common contaminant proteins from the cRAP (common Repository of Adventitious Proteins) set from the GPM (<http://www.thegpm.org/crap/>) and decoy counterparts for every entry to add up a total of 25168 entries.

Then database searches was performed using three different search engines: Comet (Eng *et al.*, 2013), an open-source, freely available version of SEQUEST (Eng *et al.*, 1994), X!Tandem (Craig and Beavis, 2004) with the k-score algorithm plugin (MacLean *et al.*, 2006), and OMSSA (Geer *et al.*, 2004). The search parameters were established depending on the type of experiment and instrument (see supplementary table *database_search_parameters* for a list of parameters).

Following sequence database searching, we used the TPP tool suite to validate the results. First, PeptideProphet (Keller *et al.*, 2002) creates a discriminant search engine-independent score, models distributions of correctly and incorrectly assigned peptide spectrum matches (PSMs) and computes PSM posterior probabilities. Next, iProphet (Shteynberg *et al.*, 2011), was used to further refine the PSM-level probabilities and calculated distinct peptide-level probabilities using corroborating information from other PSMs in the dataset. ProteinProphet (Nesvizhskii *et al.*, 2003) then was used to further refine peptide probabilities based on the Number of Sibling Peptides (NSP) that each peptide shares within a protein; it also groups and reports proteins with a protein-level probability estimated from peptide-level probabilities.

To assemble the *C. albicans* PeptideAtlas, all individual iProphet files from the 20 compiled datasets (16 corresponding to the previous build plus 4 new extensive datasets) were filtered at a variable probability threshold to reach a constant PSM-level FDR threshold of 0.001 across all datasets.

The new *Candida albicans* PeptideAtlas is made available at https://db.systemsbiology.net/sbeams/cgi/PeptideAtlas/buildDetails?atlas_build_id=443

The Mayu (Reiter *et al.*, 2009) software designed for large-scale protein FDR estimation was used to report FDR values at different levels (PSM, uni-

que peptides and protein-level) for the whole build based on a strategy that estimates the number of false positive protein identifications from the number of proteins containing false positive PSMs, including a correction for high proteome coverage.

Functional analysis and estimation of protein abundances

To perform functional analyses, we used the resources available at CGD GOSlim, a tailor made subset of GO terms specific to Candida biology, and GOSlimMapper, a software that maps a provided list of genes to the high-level set of GOSlim terms in either of the three ontologies. Protein abundances were estimated using the emPAI method (Ishihama *et al.*, 2005) and the online software emPAI Calc (Shinoda *et al.*, 2010) for the set of proteins identified in the subcellular fractionation approach since it represents the largest contribution to this PeptideAtlas build. The emPAI values were log transformed in order to obtain a normalized, symmetrical around 0 abundance scale that was apportioned in the group of the most abundant proteins (from the largest value up to the one representing percentile 0.85 in the scale); the group of proteins with high abundance (between 0.85 and 0.75 in the scale); proteins with abundance around the median (the two central quartiles); low abundant proteins (those with emPAI values between percentiles 0.25 and 0.15); and the least abundant proteins (those corresponding to percentile 0.15 and lower in the emPAI scale).

Results and discussion

Strategies for exhaustive proteome characterization

The experimental approaches were specifically designed to improve as much as possible of the *C. albicans* proteome, especially considering its great plasticity and variability. In the subcellular fractionation approach, (Figure 1) each of the fractions is enriched in different organelles and therefore ideally contributes with different subsets of proteins (Harford and Bonifacino, 2001). In Fraction A, the low centrifugal force enriches for larger membranes and complexes. The subsequent increasing centrifugation speed enriches Fraction B in other types of membranes (vacuolar, nuclear, endosomal and plasma) and also in Golgi complex and endoplasmic reticulum. Fraction C, the pellet resulting from the highest speed, contains some smaller structures like some endosomal

membranes, parts of Golgi complex and transport vesicles. Finally, Fraction D, the final supernatant, contains soluble cytoplasmic and other released proteins. A total of 100 MS output files, corresponding to 20 slices from each of the four fractions run in SDS-PAGE (plus one extra replicate for fraction C) (Table 1) were obtained. This approach makes by itself the largest contribution to the *C. albicans* PeptideAtlas build with over 650,000 spectra of which 350,499 could be identified, and allocated to 28,599 peptides (5,839 identified exclusively in this dataset) corresponding to roughly 3,000 proteins, 48 % of the full proteome.

In the OFFGEL approach, the variability of the proteome was stimulated by the different growing conditions. The thermal and oxidative types of stress ideally enforce the cell to produce certain populations of proteins to face these culture conditions; the minimal medium makes cells adapt to deprivation of certain nutrients and therefore activate alternative mechanisms or pathways; hyphae generated in RPMI medium supplemented with FBS, provide a set of proteins inherent to this growing form; and finally, cells in the stationary phase also ideally contribute with proteins that would not be present in other more favorable conditions. These multiple growing conditions subjected to peptide-level separation by the OFFGEL system, generated 24 fractions and equivalent MS output files that make, as a dataset, the second largest contribution to the *C. albicans* PeptideAtlas with 460,000 spectra searched, 223,395 of them identified and assigned to 27,360 peptides (5,846 unique to this dataset) which, in turn, were assigned to more than 3,000 proteins. An overview of the contributions of each dataset to the entirety of the atlas is depicted in Figure 2.

Assessment of increment in proteome coverage

A total 229 MS runs (124 corresponding to the datasets implemented ad hoc, plus 26 corresponding to the additionally compiled datasets on secreted and surface proteomes, plus 79 datasets from the previous *C. albicans* PeptideAtlas build) generated 2,255,208 spectra of which more than one-third, 984,462, could be allocated to a peptide sequence. In the resulting outcome, for a PSM FDR threshold set at 0.10 %, 71,310 peptides are detected which can be explained by the minimal non-redundant set of 4174 canonical *C. albicans* protein sequences (4115 if only one protein sequence per pair of alleles is considered), representing 66 % of the 6218 (as of March 2015) predicted different protein sequences. With respect to the 22,000 peptides and 2545 proteins re-

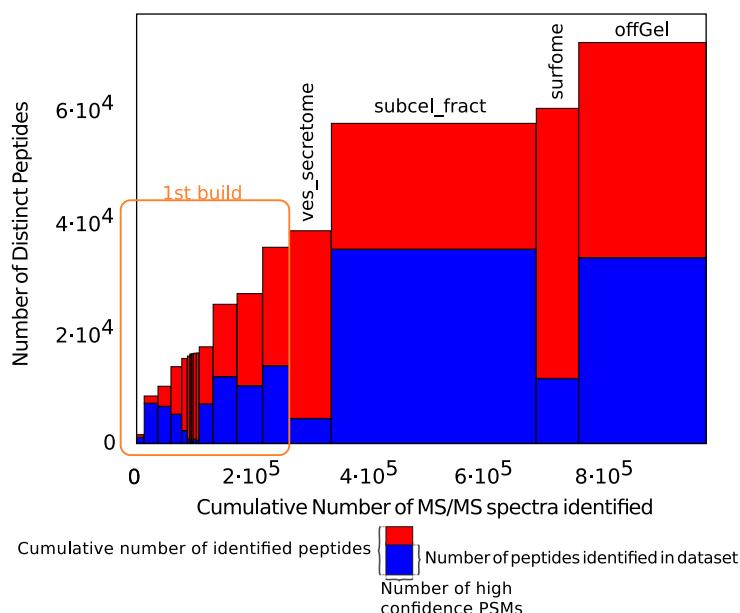


Figure 2. Contribution of the different constituent datasets of the *C. albicans* PeptideAtlas. The two implemented *ad hoc* strategies (subcel_fract and OFF-GEL, as named in the web interface) have both the largest numbers of distinct peptides (height of blue bars) and contribute most to the increasing of the cumulative number of distinct peptides identified (total height of bars), and also represent the largest contributions in terms of spectra identified (width of bars). The experiments that constituted the previous PeptideAtlas are annotated for comparison.

ported in analogous manner in the first version of the *C. albicans* PeptideAtlas, the multi-search engine reprocessing with the new LC-MS/MS datasets represents an increment of more than 3-fold in terms of peptides and 1.6-fold in the number of identified proteins.

One remarkable additional value in the *C. albicans* PeptideAtlas is the report of highly confident (ProteinProphet probability >0.9) identification of proteins corresponding to uncharacterized genes (following the terminology in CGD), i.e. those genes without previously known empirical evidence for a translated product. These amounted to 1564 in the previous PeptideAtlas build and has notably increased to 2860 (note that uncharacterized is unrelated to which of the alleles originates the protein product), representing an increment from one-third to almost two-thirds (63 %) of the total uncharacterized genes in CGD (Figure 3). As for the verified set of genes, those that do have experimental evidence for a gene product, 76 % are covered in the list of canonical proteins in

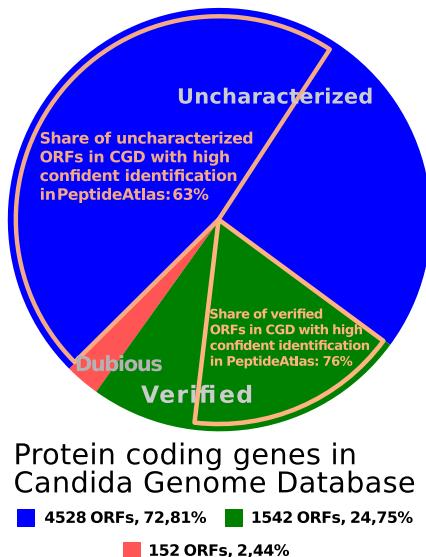


Figure 3. Share of the uncharacterized genes (genes for which there is no empirical evidence of a protein product) and Verified genes (those having a protein product with a given GO annotation) in CGD that are covered by canonical (with high confidence identification) proteins in the *C. albicans* PeptideAtlas.

this build. (See Supplementary Tables CGD_uncharacterized_vs_PA_canonical.xls and CGD_verified_vs_PA_canonical.xls)

Gene Ontology enrichment analysis of the covered and undetected proteome subsets

The set of 4174 identified canonical proteins was subjected to a GO term enrichment analysis using GOSlimMapper in CGD. This analysis revealed no specific bias towards any particular biological process in the covered part of the proteome showing a very similar (no statistically significant difference) histogram of frequencies of GO Slim biological process terms as that for the entire genome at CGD.

The undetected set of 2103 proteins, obtained by subtracting the 4115 canonical proteins in PeptideAtlas from the 6218 predicted proteins in CGD, was similarly enriched in GO Slim biological processes revealing, as expected, very heterogeneous annotations with a majority of the genes that cannot be grouped under a more precise category (in the Slim pruned GO tree) than "biological process" which means these are likely uncharacterized genes. This undetec-

ted set is where the focus should be laid on to further extend the proteome coverage in future builds of the *C. albicans* PeptideAtlas by designing specific strategies to detect, at least, those proteins that do have some specific biological process or cellular component annotations.

Both GO analyses for the covered and undetected subsets are available in supplementary material (GO_SLIM_PA_201503.xls and GO_SLIM_undetectedCGD_201503.xls)

Assessment of protein abundance and functional analysis

Once the abundance clusters were established based on the emPAI method for the set of 3,000 proteins identified in the subcellular fractionation approach (supplementary file *emPAI_results.xls*), a functional analysis was carried out on them. First, they were mapped onto the ergosterol biosynthesis pathway (Figure 4), which is of great interest since it is specific to fungi (the functional equivalent in mammalian cell membranes is cholesterol) and is therefore the target of many antifungal drugs that exploit selective toxicity. In addition, farnesol, a by-product in this pathway, has been shown to have a role in quorum sensing (Albuquerque and Casadevall, 2012) and apoptosis induction (Léger *et al.*, 2015). As depicted in Figure 4, most of the proteins, representing 18 out of 22 steps in the pathway, were detected, with a majority of them belonging in the high abundance groups.

Then, a GO enrichment analysis was also applied to the abundance sets, in this case combining the two high abundance protein groups on one hand, and the two low abundance groups on the other. The top 3 enriched and under-represented GO-Slim annotations of each the Biological Process (BP), Cellular Component (CC) and Molecular Function (MF) ontologies were selected and shown in figure 5. Interestingly, low abundance proteins appear to be enriched in the BP terms *pseudohyphal growth* and *cell budding* and consistently in *hyphal tip* and *site of polarized growth* CC annotations. Signal transduction and kinase activities are also enriched in this set of low abundance proteins, in agreement with the described low quantities of the proteins that carry out these functions. The set of high abundance proteins, as expected, are enriched in some of the terms for which the low abundance proteins are under-represented, such as *cell wall* and *extracellular region*, and conversely are under-represented in some other processes and functions in which low abundance proteins seem to be involved, like *pseudohyphal growth* and *kinase activity*.

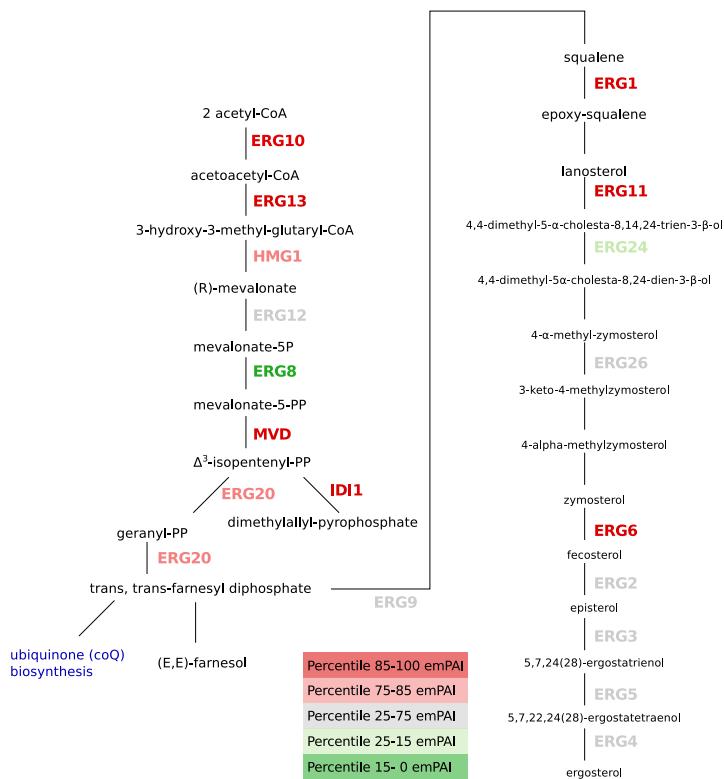


Figure 4. The *C. albicans* PeptideAtlas contains information on the detection and estimated abundances (emPAI) of proteins representing 18 out of 22 steps in the biosynthesis of ergosterol, an essential pathway comprising targets of many antifungal drugs.

Allele specific proteins

Taking advantage of the database containing allele specific sequences, we have examined the lists of proteins that can be allocated to their specific originating allele. Of the 4174 identified canonical *C. albicans* protein sequences, there are 59 pairs of alleles with different sequences for which both protein products have been identified through their differentiating peptides.

There are 354 proteins from allele B that have been labeled canonical without a similar detection of their corresponding allele A counterparts. This means there is solid evidence for the presence of the protein originating from allele B, but does not necessarily imply that only the form from allele B was present. Proteins from allele A might have also been present in the samples but are not included in the minimal non-redundant list either because all their

AN EXTENDED, ENHANCED *C. albicans* PEPTIDEATLAS BUILD

Table 2. Distribution of the canonical proteins in PeptideAtlas by genomic origin.

Allele A	Allele B	Sequences A and B	mtDNA
59 canonical	59 canonical	different	-
subsumed or possibly distinguished	354 canonical	different	-
-	3 canonical from MTL exist only in B	-	-
-	-	-	11 canonical
2070 canonical (chosen as representative)	identical	identical	-
1205 canonical	indistinguishable	different	-
413 canonical	subsumed or possibly distinguished	different	-

In the PeptideAtlas terminology, *subsumed* refers to proteins whose peptides are also present in another canonical protein which has additional independent peptide evidence; *possibly distinguished* means a weak peptide evidence that could possibly distinguish the protein from the canonical identification (these are conservatively excluded from the canonical list); and *indistinguishable* refers to proteins having different sequence but with peptide evidence only in the common parts.

identified peptides are shared and can be explained by the canonical B which do have additional exclusive peptide evidence (the A protein forms are subsumed, in PeptideAtlas terminology); or because they have a too weak peptide evidence that could distinguish them from the canonical identification (termed possibly distinguished and conservatively excluded from the canonical list). Three more proteins (C5_01745W_B, C5_01765C_B and C5_01775C_B) from allele B were identified but are related to the mating type locus (MTL), and therefore exist only in haplotype B. And 11 more proteins, encoded by mitochondrial DNA, cannot be allocated to either allele. Subtracting the canonical proteins from allele B and the described particular cases from the 4056 protein count that excludes identifications from both alleles, there remain 3688 (4056 - 354 - 3 - 11) identifications that could be originated from allele A. However, within these, 2070 have identical allele A and B sequences. In those cases, eit-

her allele is equally likely the origin of the identified protein and any one allele can be chosen as representative. Notably, this does not imply that the remaining 1618 (3688 - 2070) proteins necessarily correspond exclusively to allele A. Out of these, 1205 allele B forms are indistinguishable to that from A, which means their identified peptides are the same and mapped to common parts of the protein sequence. And lastly, 413 do have independent peptide evidence of being originated from allele A, but yet again this is not exclusive, the form from allele B might be subsumed or possibly distinguished. An overview of how the canonical proteins in the *C. albicans* PeptideAtlas are distributed by genomic origin and the presence level is summarized in Table 2.

The significance of the characterization and study of allelic variant proteins in *C. albicans* has previously been highlighted for the case of the ALS gene family (Hoyer *et al.*, 2008). This gene family encodes eight cell-wall glycoproteins (Als1p to Als7p and Als9p) involved in adhesion to host surfaces, a key virulence factor (de Groot *et al.*, 2013). In particular, Als3p allelic protein isoforms have been shown to have functional differences (Oh *et al.*, 2005). In this PeptideAtlas build, 3 proteins from the ALS family have been identified with independent peptide evidence from either allele. Als2p and Als4p have peptide evidence with single genome mapping to allele A, whereas Als9p has exclusive peptide evidence from allele B. This information could be used as a foundation to enable targeted proteomics assays to independently monitor each of the allelic variants and provide some insights on whether these proteins, like Als3p, contribute differently to adhesion.

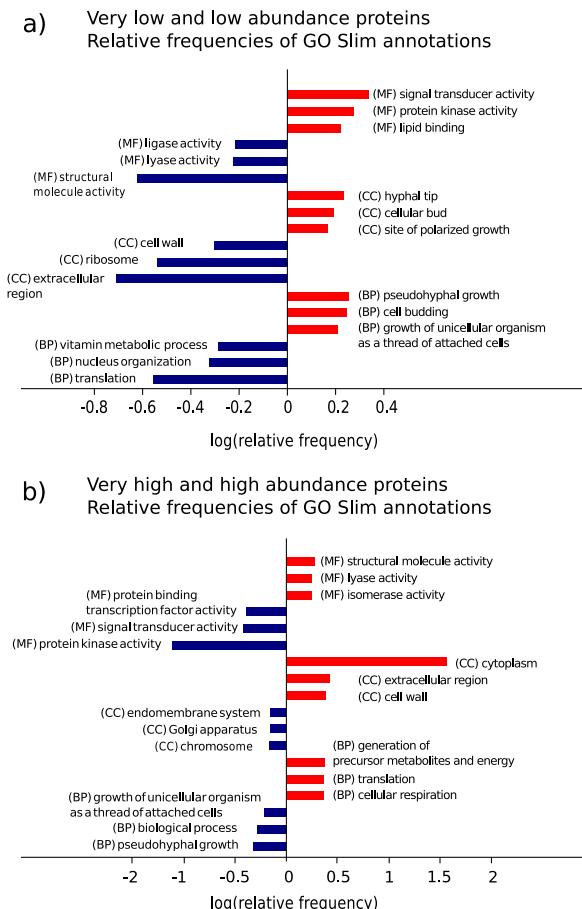


Figure 5. Top three enriched and under-represented annotations for the Molecular Function, Cellular Component and Biological Process ontologies for the sets of very low and low abundance proteins (a) and high and very high abundance proteins (b) in the subcellular fractionation approach.

Conclusions

We have described the new *C. albicans* PeptideAtlas 2015-02 which represents a great increase in the number of characterized peptides and proteins with respect to the previous build. A total of 71,310 peptides and 4174 protein sequences make it the most comprehensive proteomics resource available up to date with a coverage of 66 % of the total predicted proteome. In addition, highly confident protein identifications have been reported for 63 % of the genes termed uncharacterized (without a known protein product) in CGD.

Furthermore, for the first time in a large-scale *C. albicans* proteomics project, an allele-specific protein sequence database has been searched and integrated into the resource enabling the ability to trace the identified proteins back to their originating allele. This, for example, enables the development of targeted assays to distinguish protein isoforms via the PeptideAtlas web interface (Farrah *et al.*, 2011) to select candidate proteotypic peptides for the basis of the best peptides to use.

While this effort provides an unbiased representative picture of the whole *C. albicans* proteome, there is still room for further improvement. Future PeptideAtlas builds may include other *C. albicans* datasets generated by the community reusing for instance spectra deposited in ProteomeXchange, or datasets specifically generated to detect the elusive proteins that may be expressed only under very particular circumstances, difficult to extract proteins, or may be translated in very low quantities. Finally, improvements in the software pipeline used for post-acquisition analysis or in the protein sequence database will also motivate the construction of new *C. albicans* PeptideAtlas builds in the future.

References

- Albuquerque, P. and Casadevall, A. (2012), Quorum sensing in fungi - a review., *Medical mycology*, 50(4), 337-45.
- Cabezón, V., Llama-Palacios, A., Nombela, C., Monteoliva, L., and Gil, C. (2009), Analysis of *Candida albicans* plasma membrane proteome., *Proteomics*, 9(20), 4770-86.
- Cheng, S.-C., Joosten, L. a. B., Kullberg, B.-J., and Netea, M. G. (2012), Interplay between *Candida albicans* and the mammalian innate host defense., *Infection and immunity*, 80(4), 1304-13.
- Costanzo, M. C., Arnaud, M. B., Skrzypek, M. S., Binkley, G., Lane, C., Miyasato, S. R., and Sherlock, G. (2006), The Candida Genome Database: facilitating research on *Candida albicans* molecular biology., *FEMS yeast research*, 6(5), 671-84.
- Craig, R. and Beavis, R. C. (2004), TANDEM: matching proteins with tandem mass spectra., *Bioinformatics*, 20(9), 1466-7.

de Groot, P. W., Bader, O., de Boer, A. D., Weig, M., Chauhan, N. (2013), Adhesins in human fungal pathogens: glue with plenty of stick., *Eukaryotic Cell* 12, 470-81.

Desiere, F., Deutsch, E. W., King, N. L., Nesvizhskii, A. I., Mallick, P., Eng, J., Chen, S., Eddes, J., Loevenich, S. N., and Aebersold, R. (2006), The PeptideAtlas project., *Nucleic acids research*, 34(Database issue), D655-8.

Deutsch, E. W., Mendoza, L., Shteynberg, D., Slagel, J., Sun, Z., and Moritz, R. L. (2015), Trans-Proteomic Pipeline, a standardized data processing pipeline for large-scale reproducible proteomics informatics., *Proteomics. Clinical applications*.

Eng, J. K., Jahan, T. A., and Hoopmann, M. R. (2013), Comet: an open-source MS/MS sequence database search tool., *Proteomics*, 13(1), 22-4.

Fernández-Arenas, E., Cabezón, V., Bermejo, C., Arroyo, J., Nombela, C., Diez-Orejas, R., and Gil, C. (2007), Integrated proteomics and genomics strategies bring new insight into *Candida albicans* response upon macrophage interaction., *Molecular & cellular proteomics: MCP*, 6(3), 460-478.

Geer, L. Y., Markey, S. P., Kowalak, J. A., Wagner, L., Xu, M., Maynard, D. M., Yang, X., Shi, W., and Bryant, S. H. (2004), Open mass spectrometry search algorithm., *Journal of proteome research*, 3(5), 958-64.

Gil-Bona, A., Llama-Palacios, A., Parra, C. M., Vivanco, F., Nombela, C., Monteoliva, L., and Gil, C. (2014), Proteomics unravels extracellular vesicles as carriers of classical cytoplasmic proteins in *Candida albicans*., *Journal of proteome research*, 14(1), 142-53.

Gil-Bona, A., Parra-Giraldo, C. M., Hernaez, M. L., Reales-Calderon, J. A., Solis, N. V., Fi-ller, S. G., Monteoliva, L., and Gil, C. (2015), *Candida albicans* cell shaving uncovers new proteins involved in cell wall integrity, yeast to hypha transition, stress response and host-pathogen interaction., *Journal of proteomics*.

Gow, N. and van de Veerdonk, F. (2011), *Candida albicans* morphogenesis and host defence: discriminating invasion from colonization, *Nature Reviews*, 10(2), 112-122.

Gunaratne, J., Schmidt, A., Quandt, A., Neo, S. P., Sarac, O. S., Gracia, T., Loguerio, S., Ahrne, E., Li Hai Xia, R., Tan, K. H., Loessner, C., Bahler, J., Beyer, A., Blackstock, W., and Aebersold, R. (2013), Extensive Mass Spectrometry-Based Analysis of the Fission Yeast Proteome: The *S. pombe* PeptideAtlas, *Molecular & Cellular Proteomics*, pp. 1741-1751.

Hao, B., Cheng, S., Clancy, C. J., and Nguyen, M. H. (2013), Caspofungin kills *Candida albicans* by causing both cellular apoptosis and necrosis., *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 57(1), 326-32.

Harford, J. B. and Bonifacino, J. S. (2001), Subcellular Fractionation and Isolation of Organelles, in *Current Protocols in Cell Biology*. John Wiley & Sons, Inc.

Hoyer, L. L., Green, C. B., Oh, S. H., Zhao, X. (2008), Discovering the secrets of the *Candida albicans* agglutinin-like sequence (ALS) gene family - a sticky pursuit., *Medical Mycology* (46)1-15.

Horth, P., Miller, C. A., Preckel, T., and Wenz, C. (2006), Efficient fractionation and improved protein identification by peptide OFFGEL electrophoresis., *Molecular & cellular proteomics : MCP*, 5(10), 1968-74.

Ishihama, Y., Oda, Y., Tabata, T., Sato, T., Nagasu, T., Rappaport, J., and Mann, M. (2005), Exponentially modified protein abundance index (emPAI) for estimation of absolute protein amount in proteomics by the number of sequenced peptides per protein., *Molecular & cellular proteomics : MCP*, 4(9), 1265-72.

Keller, A., Nesvizhskii, A. I., Kolker, E., and Aebersold, R. (2002), Empirical statistical model to estimate the accuracy of peptide identifications made by MS/MS and database search., *Analytical chemistry*, 74(20), 5383-92.

Keller, A., Eng, J., Zhang, N., Li, X.-j., and Aebersold, R. (2005), A uniform proteomics MS/MS analysis platform utilizing open XML file formats, *Molecular systems biology*, 1(August 2005), 2005.0017.

King, N. L., Deutsch, E. W., Ranish, J. A., Nesvizhskii, A. I., Eddes, J. S., Mallick, P., Eng, J., Desiere, F., Flory, M., Martin, D. B., Kim, B., Lee, H., Raught, B., and Aebersold, R. (2006), Analysis of the *Saccharomyces cerevisiae* proteome with PeptideAtlas., *Genome biology*, 7(11), R106

Léger, T., Garcia, C., Ounissi, M., Lelandais, G., and Camadro, J.-M. (2015), The metacaspase (Mca1p) has a dual role in farnesol-induced apoptosis in *Candida albicans*., *Molecular & cellular proteomics : MCP*, 14(1), 93-108.

MacLean, B., Eng, J., Beavis, R., and McIntosh, M. (2006), General framework for developing and evaluating database scoring algorithms using the TANDEM search engine, *Bioinformatics*, 22(22), 2830-2832.

Martens, L., Chambers, M., Sturm, M., Kessner, D., Levander, F., Shofstahl, J., Tang, W. H., Rompp, A., Neumann, S., Pizarro, A. D., Montecchi-Palazzi, L., Tasman, N., Coleman, M., Reisinger, F., Souda, P., Hermjakob, H., Binz, P.-A., and Deutsch, E. W. (2011), mzML-a community standard for mass spectrometry data., *Molecular & cellular proteomics : MCP*, 10(1), R110.000133.

Monteoliva, L., Martinez-Lopez, R., Pitarch, A., Hernaez, M. L., Serna, A., Nombela, C., Albar, J. P., and Gil, C. (2011), Quantitative proteome and acidic subproteome profiling of *Candida albicans* yeast-to-hypha transition, *Journal of Proteome Research*, 10(2), 502-517.

Muzzey, D., Schwartz, K., Weissman, J. S., and Sherlock, G. (2013), Assembly of a phased diploid *Candida albicans* genome facilitates allele-specific measurements and provides a simple model for repeat and indel structure., *Genome biology*, 14(9), R97.

Nesvizhskii, A. I., Keller, A., Kolker, E., and Aebersold, R. (2003), A statistical model for identifying proteins by tandem mass spectrometry., *Analytical chemistry*, 75(17), 4646-58.

Oh, S. H., Cheng, G., Nuessen, J. A., Jajko, R., Yeater, K. M., Zhao, X., Pujol, C., Soll, D. R., Hoyer, L. L. (2005) Functional specificity of *Candida albicans* Als3p proteins and clade specificity of ALS3 alleles discriminated by the number of copies of the tandem repeat sequence in the central domain., *Microbiology*, 151, 673-81.

Pitarch, A., Nombela, C., and Gil, C. (2006a), *Candida albicans* biology and pathogenicity: insights from proteomics., Methods of biochemical analysis, 49, 285-330.

Pitarch, A., Nombela, C., and Gil, C. (2009), Proteomic profiling of serologic response to *Candida albicans* during host-commensal and host-pathogen interactions., in Methods in molecular biology (Clifton, N.J.), vol. 470, pp. 369-411.

Pitarch, A., Nombela, C., and Gil, C. (2011), Prediction of the clinical outcome in invasive candidiasis patients based on molecular fingerprints of five anti-Candida antibodies in serum., Molecular & Cellular Proteomics, 10(1), M110.004010.

Ramsdale, M. (2008), Programmed cell death in pathogenic fungi, Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research, 1783(7), 1369-1380.

Ros, A., Faupel, M., Mees, H., van Oostrum, J., Ferrigno, R., Reymond, F., Michel, P., Rossier, J. S., and Girault, H. H. (2002), Protein purification by Off-Gel electrophoresis., Proteomics, 2(2), 151-6.

Rupp, S. (2004), Proteomics on its way to study host- pathogen interaction in *Candida albicans*, Current opinion in microbiology, 7(4), 330-335.

Shinoda, K., Tomita, M., and Ishihama, Y. (2010), emPAI Calc - for the estimation of protein abundance from large-scale identification data by liquid chromatography - tandem mass spectrometry., Bioinformatics (Oxford, England), 26(4), 576-7.

Shteynberg, D., Deutsch, E. W., Lam, H., Eng, J. K., Sun, Z., Tasman, N., Mendoza, L., Moritz, R. L., Aebersold, R., and Nesvizhskii, a. I. (2011), iProphet: Multi-level Integrative Analysis of Shotgun Proteomic Data Improves Peptide and Protein Identification Rates and Error Estimates, Molecular & Cellular Proteomics, 10(12), M111.007690-M111.007690.

Vialás, V., Perumal, P., Gutierrez, D., Ximénez-Eembún, P., Nombela, C., Gil, C., and Chaffin, W. L. (2012), Cell surface shaving of *Candida albicans* biofilms, hyphae and yeast form cells., Proteomics, 12(14), 2331-2339.

AN EXTENDED, ENHANCED *C. albicans* PEPTIDEATLAS BUILD

Vialas, V., Sun, Z., Loureiro Y Penha, C. V., Carrascal, M., Abián, J., Montoliva, L., Deutsch, E. W., Aebersold, R., Moritz, R. L., and Gil, C. (2013), A *Candida albicans* PeptideAtlas., Journal of proteomics, 97, 62-8.

DISCUSIÓN

Discusión

Estudios proteómicos llevados a cabo utilizando *C. albicans* como organismo modelo para el estudio de infecciones fúngicas han permitido profundizar en algunos de los aspectos más básicos de su biología y también en algunos procesos y mecanismos interesantes desde el punto de vista de la patogenicidad. Así, se han realizado estudios que intentan identificar el mayor número de proteínas posibles en extractos celulares totales, estudios de la transición levadura a hifa, enfocados a las proteínas de la superficie celular y secretadas, o a las implicadas en la formación de biopelículas entre otros aspectos. Esta heterogenidad en los diseños experimentales también existe en el análisis que continúa tras la adquisición de espectros de masas por LC-MS/MS. Los datos son analizados bioinformáticamente utilizando distintos motores de búsqueda, distintos métodos de validación, flujos de análisis diferentes en definitiva. Además, hasta hace relativamente poco tiempo, los primeros años del siglo XXI, la presencia de resultados de proteómica en repositorios públicos era muy escasa, casi nula, y en ocasiones poco fiable.

En este contexto las bases de datos y estándares desarrollados en Proteómica tienen un papel esencial para analizar, compartir y difundir resultados. Las herramientas aquí descritas contribuyen a estos objetivos.

Desarrollo de una aplicación web para recoger, visualizar y analizar resultados de estudios de proteómica de *C. albicans*

La base de datos y herramienta web Proteopathogen es la primera aplicación *on line* descrita para recoger y analizar resultados de Proteómica centrados en el estudio de hongos patógenos usando principalmente el modelo de *C. albicans*.

En el momento del desarrollo de Proteopathogen existían repositorios públicos *online* de proteómica, algunos para experimentos basados en gel como World 2-D PAGE (Hoogland *et al.*, 2008), o Proteome 2D-PAGE Database (Pleissner *et al.*, 2004) y otros más globales como PRIDE (Martens *et al.*, 2005) o PeptideAtlas (Desiere *et al.*, 2006). Y también existían recursos específicos para hongos como BioBase MycoPathPD (Csank *et al.*, 2002) o Candida Genome Database (Arnaud *et al.*, 2005). Sin embargo no existía un recurso específico para datos experimentales de proteómica relacionados con el estudio de hongos patógenos. Proteopathogen en este contexto, fue diseñado para cumplir esta función, recopilar y analizar identificaciones en el contexto de estudios proteómicos de interacción hongo patógeno - hospedador, usando principalmente el modelo de *C. albicans*.

Así, durante algunos años Proteopathogen ha recogido resultados de identificaciones de proteínas en estudios de *C. albicans* (Cabezón *et al.*, 2009; Monteoliva *et al.*, 2011; Vialás *et al.*, 2012) y otras especies de hongos patógenos como *Aspergillus fumigatus* y también del hospedador (*Mus musculus*), facilitando la visualización y el análisis de dichos resultados a los usuarios del laboratorio, pero también su examen por parte de los revisores de las revistas científicas del campo de la Proteómica.

En ese tiempo, la Iniciativa de Estandarización del Proyecto Proteoma Humano HUPO-PSI (*Human Proteome Organization - Proteomics Standards Initiative*, Iniciativa de Estandarización en Proteómica del Proyecto Proteoma Humano) ha desarrollado y promovido el uso de estándares en Proteómica, formatos que faciliten el intercambio, re-análisis y comparación de protocolos experimentales, datos y resultados entre distintos laboratorios. En este sentido Proteopathogen se ha beneficiado de la aparición del estándar mzIdentML (Jo-

nes *et al.*, 2012), el formato creado por HUPO-PSI y posteriormente adoptado por la comunidad, para recoger la información relacionada con la identificación de péptidos y proteínas, es decir el análisis bioinformático desde la asignación de los PSM hasta la presentación de una lista de proteínas.

Proteopathogen emplea el lenguaje de programación interpretado Ruby. A diferencia de lenguajes compilados (Java, C/C++) que se usan frecuentemente en otras herramientas para la visualización de contenidos en formatos de proteómica (Griss *et al.*, 2012; Barsnes *et al.*, 2011), esto posibilita una manera muy rápida y flexible de implementar un sistema de extracción de la información de archivos basados en XML como es el caso de mzIdentML. La plataforma de desarrollo web Rails, también basada en Ruby, además cuenta con un gran soporte por parte de la comunidad informática y se está convirtiendo en una de las tecnologías de referencia elegida por los programadores de aplicaciones web.

Con la adopción del formato mzIdentML (versión 1.1.0) como fuente de resultados, Proteopathogen ha adquirido la capacidad de crecer de manera robusta y fiable. Por una parte, usar un único tipo de formato (a diferencia de lo que ocurre en la versión original de Proteopathogen), estándar, como fuente de datos ha permitido desarrollar un *software* estable que extrae la información independientemente de cómo se hayan obtenido los resultados. De esta manera, datos originados en distintos experimentos en los que se empleen procedimientos experimentales, espectrómetros de masas y análisis computacionales diferentes podrán ser incorporados a Proteopathogen siempre que se obtengan archivos de resultados en el formato mzIdentML.

Pero además, el uso de este estándar permite realizar validaciones, un control de calidad, tanto de la estructura, sintaxis y orden de los elementos XML de los archivos (validación semántica), como del contenido mínimo (validación MIAPE) usando para ello algunas herramientas como la creada por HUPO-PSI, mzidValidator (Ghali *et al.*, 2013).

La base de datos relacional implementada *ad hoc* para recoger el contenido de los archivos constituye la base fundamental de la aplicación y permite que Proteopathogen sea el primer recurso *on-line* descrito que recoge y permite visualizar resultados, individualmente para cada archivo mzIdentML o en conjunto, procedentes de múltiples experimentos en el campo de los hongos patógenos usando principalmente el modelo de *C. albicans*.

DISCUSIÓN

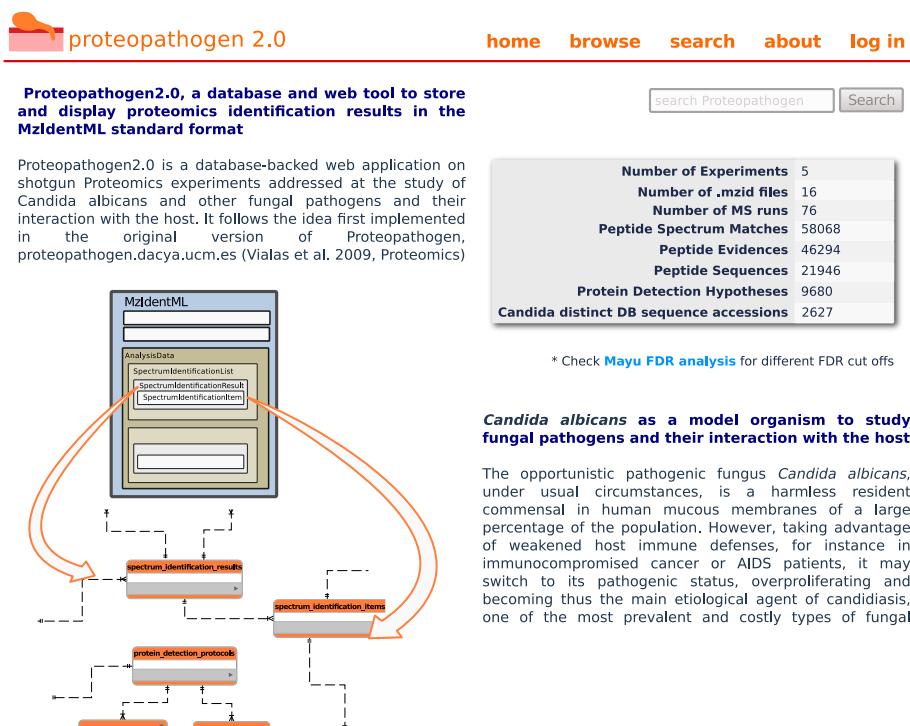


Figura 2.1: Página de inicio de Proteopathogen2, la nueva versión de Proteopathogen adaptada al estándar mzIdentML. Proteopathogen2 está disponible públicamente *online* desde comienzos de 2015 en <http://proteopathogen2.dacya.ucm.es>

Inicialmente, la base de datos ha sido poblada con los resultados de identificaciones del PeptideAtlas descrito en Vialas *et al.* (2013). Para ello, los archivos pepXML y protXML característicos del flujo de trabajo TPP (que integra principalmente las herramientas PeptideProphet y ProteinProphet), se han combinado y convertido, por medio de una herramienta de software Ruby creada *ad hoc*, en ficheros mzIdentML. Y éstos, han sido validados (validación semántica y validación MIAPE) usando mzidValidator (Ghali *et al.*, 2013). De esta manera, Proteopathogen cuenta desde el inicio con datos de contrastada robustez y fiabilidad y además se ha establecido una rutina de inserción de nuevos resultados generados mediante el flujo de trabajo TPP (formatos pepXML y protXML).

En cuanto al futuro de esta herramienta bioinformática, es importante destacar que el desarrollo de nuevos formatos estándar es continuo. Si bien no es probable que mzIdentML sea sustituido por otro, sí es cierto que pronto

verá una versión actualizada (1.2.0). En ese escenario, los programas que transfieren el contenido a la base de datos deberán ser adaptados, aunque previsiblemente los cambios no provocarán incompatibilidades sino que serán fundamentalmente aditivos añadiendo algún nuevo tipo de información. Para ello, la flexibilidad que proporciona el uso del lenguaje de programación Ruby y el entorno de desarrollo web Rails permitirá que los cambios desde el periodo de pruebas hasta la producción en el servidor puedan implementarse rápidamente y con seguridad.

Otro tipo de posible mejora en la aplicación podría consistir en implementar un nuevo modo de leer los archivos mzIdentML. Esta posibilidad vendría motivada por la creciente capacidad de adquisición de datos de los espectrómetros de masas y las mejoras en el análisis bioinformático subsiguiente, que se traduce en archivos de resultados que llegan a tener un gran tamaño (hasta el orden de gigabytes). El modo en que Proteopathogen lee los archivos consiste en una representación en memoria de toda la jerarquía XML (*parser DOM*). Esto, que es muy efectivo para localizar los distintos elementos referenciados en el contenido y guardarlos en el orden adecuado en cada tabla correspondiente de la base de datos, puede convertirse en una tarea difícil (requerir computadores con gran memoria de trabajo, RAM) o incluso imposible en algunos casos. Por este motivo puede ser interesante explorar otro tipo de implementaciones de lectura de archivos XML (*parser SAX*) que permitan leer la información contenida en archivos de gran tamaño ya que no almacenan en memoria todo el contenido XML sino que leen secuencialmente cada elemento. A cambio, en este tipo de implementación es más complicado manipular y buscar elementos referenciados en distintas partes del documento.

Creación de un PeptideAtlas de *C. albicans*

El proyecto PeptideAtlas, desde su inicio hace casi una década (Desiere *et al.*, 2006), ha animado a la comunidad proteómica a contribuir con sus experimentos y resultados de LC-MS/MS. La particularidad de PeptideAtlas reside en que, a diferencia de otros grandes repositorios públicos de proteómica como PRIDE, todos los resultados son analizados mediante un flujo de trabajo homogéneo, proporcionado por las herramientas de *software* agrupadas

DISCUSIÓN

en TPP. Así, el proyecto se ha convertido en un gran compendio de atlas de diferentes especies caracterizados por una reconocida calidad y fiabilidad en las identificaciones de péptidos y proteínas.

La creación del PeptideAtlas de *C. albicans* supuso la incorporación por primera vez de un modelo de hongo patógeno en el proyecto PeptideAtlas y la primera recopilación de resultados de proteómica que alcanzó una gran escala para este organismo. En su primera versión (Vialas *et al.*, 2013), se alcanzó una cobertura del proteoma sin precedentes para resultados experimentales agrupados en un solo proyecto, un PeptideAtlas para *C. albicans*. Casi 22.000 péptidos correspondientes a más de 2500 proteínas suponían una cobertura de más del 40 % del proteoma predicho.

Pero PeptideAtlas permite y promueve que los espectros sean reprocesados cuando se obtienen nuevos resultados de LC-MS/MS, cuando aparecen nuevas bases de datos de secuencias, o cuando se desarrollan nuevas mejoras en los motores de búsqueda o en el software de análisis.

Por otra parte, otras especies de hongos presentes en el proyecto global PeptideAtlas contaban con versiones que alcanzaban coberturas mayores de sus respectivos proteomas, como el PeptideAtlas de *Schizosaccharomyces pombe* (71 %) (Gunaratne *et al.*, 2013) o el PeptideAtlas de *Saccharomyces cerevisiae* descrito en King *et al.* (2006) (66 %).

Así, tras el desarrollo del PeptideAtlas original se obtuvieron nuevos resultados experimentales. Algunos de ellos fueron específicamente destinados a la ampliación de la cobertura del proteoma mediante fraccionamientos extensivos a varios niveles: subcelular (mediante centrifugacion), proteína (SDS-PAGE) y péptido (OFF-GEL); mientras que otros eran procedentes de trabajos destinados al estudio de proteínas de la pared celular (Gil-Bona *et al.*, 2015) o proteínas secretadas (mediante vesículas o por la vía clásica de secreción) al medio extracelular (Gil-Bona *et al.*, 2014).

Además, en ese tiempo apareció un nuevo ensamblaje de la secuencia de *C. albicans* que por primera vez incluía secuencias específicas de alelo (Muzzey *et al.*, 2013). En este contexto, con los resultados de los nuevos experimentos y la nueva información de secuencia disponible, el PeptideAtlas original ha sido reanalizado, en conjunto con los resultados de los experimentos que formaban la primera versión, y empleando tres motores de búsqueda

DISCUSIÓN

(SEQUEST, OMSSA y Comet) para finalmente obtener una cobertura de dos terceras partes del proteoma predicho de *C. albicans*. Más de 71.000 péptidos asignados a 4174 secuencias de proteínas (para un FDR de 0,10 % a nivel de PSM) suponen exactamente 66,17 % del proteoma, y con respecto a la versión inicial, un incremento de 3 veces el número de péptidos y 1,6 veces el de proteínas.

El uso de una base de datos con secuencias específicas de alelo ha permitido integrar esta información por primera vez en un proyecto de proteómica a gran escala de *C. albicans*, de forma que se puede mantener la trazabilidad desde el péptido detectado hasta el alelo originario de la proteína. Esta información, podría potencialmente ser utilizada para elegir péptidos proteotípicos que, en un ensayo SRM, puedan discernir isoformas específicas de alelo.

DISCUSIÓN

C2_10030C_A Status: canonical

C2_10030C_A						
Protein Name	C2_10030C_A					
Description	MP65 CGID:CAL000177294 COORDS:Ca22chr2A_C.albicans_SC5314:2054606-2053470C, translated using codon table 12 (378 amino acids) Verified ORF: (orf19.1779) Cell surface mannoprotein; cell-wall glucan metabolism, adhesion; adhesin motif; O-glycosylation; induced by heat, germ tube formation, wall regeneration;					
Identification Status	canonical					
Protein Group	C2_10030C_A					
ProteinProphet Probability	1.00000					
Mult Hyp Testing Probability	1.00000					
Alias	orf6.708, SCW1.3f, C2_10030C, orf6.2667, C2_10030C_B, IPF15898.1, orf19.9345, CA6263, Contig4-1875_0004, CMP65, IPF9023.3, orf19.1779, SCW1, SCW1.5f, CAWG_06074, CA0156, CaO19.1779, SCW10					
CGID	CAL0001777294					
Gene name	MP65					
ORF name	C2_10030C_A					
Distinct Peptides	175					
Total Observations	10508					
ProteinProphet adjusted N Obs	10508					
Normalized PSMs per 100k	1355.118					
Distinct observed peptides (175)						
Accession	Pre AA	Sequence	Fol AA	ESS	EOS	Best Prob
PAP05509949	R	LYGVDCSQVEAVLK	A	0.61	0.11	1.000
PAP05510179	K	IFAGIFDVSSITSGIESLAEAVK	S	0.56	0.33	1.000
PAP05509950	K	NVLITETGWPSR	G	0.52	0.44	1.000
PAP05509982	K	SCGSWDDIYTVSIGNELVNAGSATPSQIK	A	0.48	0.11	1.000
PAP05509924	R	GDSNGVAVPSK	S	0.42	0.22	1.000
PAP05510181	K	AYVEEGR	K	0.41	0.22	1.000
		...				

Figura 2.2: Información básica para Mp65p, una manoproteína de pared, inmungénica, implicada en adhesión, (La Valle *et al.*, 2000; Sandini *et al.*, 2011) y péptidos observados en PeptideAtlas. El parámetro EOS (*Empirical Observability Score*) estima cómo de probable es que si una proteína es detectada lo sea por medio de ese péptido y no otro. Los péptidos se presentan ordenados por el parámetro ESS (*Empirical Suitability Score*) que combina la información de la probabilidad del péptido, su observabilidad (EOS) y el número de veces que es detectado. Además se muestra si un péptido presenta sitios de corte no efectuado o si su secuencia es mapeable con múltiples sitios en el genoma. Toda esta información puede ser de gran utilidad para seleccionar péptidos proteotípicos candidatos para un ensayo de proteómica dirigida SRM o MRM.

Con estas notables mejoras, en sentido cuantitativo en referencia al número total de identificaciones, y en sentido cualitativo, en cuanto a la incorporación de información de los alelos originales, este PeptideAtlas continúa siendo el recurso público de datos proteómicos de *C. albicans* más completo.

Pero además de describir una lista de proteínas que representa un 66 % del proteoma predicho en CGD (*Candida Genome Database*), la base de datos de secuencias de referencia para *C. albicans*, este PeptideAtlas supone una novedad y un gran valor añadido al proporcionar evidencia empírica sólida de la

existencia de proteínas para dos terceras partes de los genes que en CGD se denominan *uncharacterized* por carecer de un producto génico caracterizado.

Una aplicación de gran utilidad que permite la interfaz web consiste en facilitar la selección de péptidos proteotípicos candidatos para ser monitorizados en ensayos de proteómica dirigida (SRM o MRM). Para ello, en la interfaz web se sugieren péptidos con una única localización genómica (única incluso a nivel de alelo para aquellos casos en que existan péptidos diferenciadores), lo que permite asegurar que sean exclusivos de una sola proteína y no compartidos. Además, los péptidos se ordenan por un índice de observabilidad que indica la probabilidad de que una proteína sea detectada por medio de esos péptidos y no otros (Deutsch *et al.*, 2008b). (Ver Figura 2.2. *Información básica para Mp65p y péptidos observados en PeptideAtlas*)

El PeptideAtlas creado proporciona una visión general representativa del proteoma de *C. albicans* como demuestra la semejanza entre la distribución de frecuencias de términos GO en el subconjunto de proteínas detectadas y la distribución correspondiente para todo el genoma. Y sin embargo, aún será posible en el futuro crear nuevas versiones mejoradas del atlas en las que se reanalicen otros resultados depositados en ProteomeXchange (Vizcaíno *et al.*, 2014), resultados de estudios enfocados a detectar proteínas elusivas expresadas en circunstancias muy particulares, proteínas difíciles de extraer, o traducidas en muy escasa cantidad. Además, mejoras en los elementos del software que integran el flujo de análisis, o en la base de datos de secuencias también contribuirán a motivar la construcción de futuras versiones de este PeptideAtlas.

Por último, y para favorecer la comunicación e interconexión entre ambos recursos, CGD y PeptideAtlas, se ha contactado con los desarrolladores e impulsores de CGD proporcionándoles un formato de enlace para que, a través de la información en la pestaña *proteína* en CGD, se pueda acceder a los datos correspondientes a la identificación en PeptideAtlas para aquellas proteínas para las que existan estos datos.

En definitiva, las herramientas bioinformáticas descritas en esta tesis contribuyen a ampliar y mejorar el catálogo existente de péptidos y proteínas detectadas en estudios de proteómica que utilizan el modelo de *C. albicans* bajo distintas condiciones. Estas herramientas descritas, Proteopathogen y Pepti-

DISCUSIÓN

deAtlas, ocupan nichos diferentes pero complementarios en este objetivo. PeptideAtlas cuenta con su propio flujo de análisis y validación estadística de los resultados y proporciona una base de datos y una interfaz web para visualizar los resultados de identificaciones. Es actualmente el catálogo más completo del proteoma de *C. albicans*, cuenta con una contrastada robustez y fiabilidad y forma parte de un proyecto global de reconocido prestigio. Proteopathogen, una base de datos y aplicación web basada en el estándar mzIdentML, es versátil y completamente independiente del procesamiento experimental y computacional que origina los resultados. Permite integrar rápidamente resultados de identificaciones de orígenes diversos independientemente del post-procesamiento y análisis estadístico empleado ya sea el proporcionado por el flujo de trabajo TPP característico de PeptideAtlas u otro.

CONCLUSIONES

Conclusiones

1. Se ha desarrollado una base de datos y aplicación web denominada Proteopathogen, una herramienta pública *online* de gran utilidad para la visualización y análisis de resultados de proteómica en estudios que usan *C. albicans* como organismo modelo de hongos patógenos.
2. La adopción del estándar mzIdentML como formato de origen para incorporar nuevos datos en Proteopathogen asegura la estabilidad y futuro de este proyecto ya que es posible obtener archivos con resultados de identificaciones en este formato independientemente del procesamiento experimental y computacional.
3. Se ha creado un PeptideAtlas de *C. albicans* estableciendo por primera vez una caracterización a gran escala del proteoma de un organismo modelo de hongo patógeno en el proyecto global PeptideAtlas.
4. El PeptideAtlas de *C. albicans* describe 71310 péptidos y 4174 proteínas (para un FDR de 0,10 % a nivel de PSM), supone la caracterización más exhaustiva del proteoma de este organismo (66 %), proporciona información sobre los alelos originales y es el recurso más completo y fiable disponible públicamente.
5. En el PeptideAtlas de *C. albicans* se describen 2860 proteínas para las que sus correspondientes ORFs se denominan *uncharacterized* por carecer de un producto génico conocido, lo que supone un 63 % de éstos.

Bibliografía

..y así, del poco dormir y del mucho leer,
se le secó el celebro de manera que vino a
perder el juicio.

*Primera parte de El Ingenioso Caballero
Don Quijote de la Mancha
Miguel de Cervantes Saavedra*

- Abdi, H. H. (2007), 'The Bonferroni and Sidak Corrections for Multiple Comparisons', *Encyclopedia of Measurement and Statistics*, **1**, 1–9.
- Albuquerque, P. and Casadevall, A. (2012), 'Quorum sensing in fungi—a review.', *Medical mycology*, **50** (4), 337–45.
- Arnaud, M. B., Costanzo, M. C., Skrzypek, M. S., Binkley, G., Lane, C., Miyamoto, S. R., and Sherlock, G. (2005), 'The Candida Genome Database (CGD), a community resource for *Candida albicans* gene and protein information.', *Nucleic acids research*, **33** (Database issue), D358–63.
- Barsnes, H., Vaudel, M., Colaert, N., Helsens, K., Sickmann, A., Berven, F. S., and Martens, L. (2011), 'compomics-utilities: an open-source Java library for computational proteomics.', *BMC bioinformatics*, **12**, 70.
- Benjamini, Y. and Hochberg, Y. (1995), 'Controlling the False Discovery Rate: A Practical and Powerful Approach to Multiple Testing', *Journal of the Royal Statistical Society. Series B (Methodological)*, **57** (1), 289–300.
- Berman, H. M., Westbrook, J., Feng, Z., Gilliland, G., Bhat, T. N., Weissig, H., Shindyalov, I. N., and Bourne, P. E. (2000), 'The Protein Data Bank.', *Nucleic acids research*, **28** (1), 235–42.

- Berman, J. and Sudbery, P. E. (2002), ‘*Candida albicans*: a molecular revolution built on lessons from budding yeast.’, *Nature reviews. Genetics*, **3** (12), 918–30.
- Bislev, S., Deutsch, E., and Sun, Z. (2012), ‘A Bovine PeptideAtlas of milk and mammary gland proteomes’, *Molecular & Cellular Proteomics*, **12** (18), 2895–2899.
- Bult, C. J., Eppig, J. T., Kadin, J. A., Richardson, J. E., and Blake, J. A. (2008), ‘The Mouse Genome Database (MGD): mouse biology and model systems.’, *Nucleic acids research*, **36** (Database issue), D724–8.
- Burlingame, A. L., Boyd, R. K., and Gaskell, S. J. (1996), ‘Mass spectrometry.’, *Analytical chemistry*, **68** (12), 599R–651R.
- Cabezón, V., Llama-Palacios, A., Nombela, C., Monteoliva, L., and Gil, C. (2009), ‘Analysis of *Candida albicans* plasma membrane proteome.’, *Proteomics*, **9** (20), 4770–86.
- Calderone, R. (2012), *Candida and candidiasis*. ASM Press, Washington DC.
- Castillo, L., Calvo, E., Martínez, A. I., Ruiz-Herrera, J., Valentín, E., Lopez, J. A., and Sentandreu, R. (2008), ‘A study of the *Candida albicans* cell wall proteome.’, *Proteomics*, **8** (18), 3871–81.
- Chambers, M. C., Maclean, B., Burke, R., Amodei, D., Ruderman, D. L., Neumann, S., Gatto, L., Fischer, B., Pratt, B., Egertson, J., Hoff, K., Kessner, D., Tasman, N., Shulman, N., Frewen, B., Baker, T. A., Brusniak, M.-Y., Paulse, C., Creasy, D., Flashner, L., Kani, K., Moulding, C., Seymour, S. L., Nuwaysir, L. M., Lefebvre, B., Kuhlmann, F., Roark, J., Rainer, P., Detlev, S., Hemeway, T., Huhmer, A., Langridge, J., Connolly, B., Chadick, T., Holly, K., Eckels, J., Deutsch, E. W., Moritz, R. L., Katz, J. E., Agus, D. B., MacCoss, M., Tabb, D. L., and Mallick, P. (2012), ‘A cross-platform toolkit for mass spectrometry and proteomics.’, *Nature biotechnology*, **30** (10), 918–20.
- Chan, Q. W. T., Parker, R., Sun, Z., Deutsch, E. W., and Foster, L. J. (2011), ‘A honey bee (*Apis mellifera* L.) PeptideAtlas crossing castes and tissues.’, *BMC genomics*, **12** (1), 290.

- Cheng, S.-C., Joosten, L. a. B., Kullberg, B.-J., and Netea, M. G. (2012), 'Interplay between *Candida albicans* and the mammalian innate host defense.', *Infection and immunity*, **80** (4), 1304–13.
- Choi, H. and Nesvizhskii, A. I. (2008), 'Semisupervised model-based validation of peptide identifications in mass spectrometry-based proteomics.', *Journal of proteome research*, **7** (1), 254–65.
- Costanzo, M. C., Arnaud, M. B., Skrzypek, M. S., Binkley, G., Lane, C., Miyasato, S. R., and Sherlock, G. (2006), 'The Candida Genome Database: facilitating research on *Candida albicans* molecular biology.', *FEMS yeast research*, **6** (5), 671–84.
- Craig, R. and Beavis, R. C. (2004), 'TANDEM: matching proteins with tandem mass spectra.', *Bioinformatics*, **20** (9), 1466–7.
- Csank, C., Costanzo, M. C., Hirschman, J., Hodges, P., Kranz, J. E., Mangan, M., O'Neill, K., Robertson, L. S., Skrzypek, M. S., Brooks, J., and Garrels, J. I. (2002), 'Three yeast proteome databases: YPD, PombePD, and CalPD (MycoPathPD).', *Methods in enzymology*, **350**, 347–73.
- de Groot, P. W. J., Bader, O., de Boer, A. D., Weig, M., and Chauhan, N. (2013), 'Adhesins in human fungal pathogens: glue with plenty of stick.', *Eukaryotic cell*, **12** (4), 470–81.
- Desiere, F., Deutsch, E. W., King, N. L., Nesvizhskii, A. I., Mallick, P., Eng, J., Chen, S., Eddes, J., Loevenich, S. N., and Aebersold, R. (2006), 'The PeptideAtlas project.', *Nucleic acids research*, **34** (Database issue), D655–8.
- Deutsch, E. (2012), 'File formats commonly used in mass spectrometry proteomics', *Molecular & Cellular Proteomics*, **11** (12), 1612–1621.
- Deutsch, E., Lam, H., and Aebersold, R. (2008a), 'Data analysis and bioinformatics tools for tandem mass spectrometry in proteomics', *Physiological genomics*, **33** (1), 18–25.
- Deutsch, E. E. W., Lam, H., and Aebersold, R. (2008b), 'PeptideAtlas: a resource for target selection for emerging targeted proteomics workflows', *EMBO reports*, **9** (5), 429–434.

- Deutsch, E. E. W., Mendoza, L., Shteynberg, D., Farrah, T., Lam, H., Tasman, N., Sun, Z., Nilsson, E., Pratt, B., Prazen, B., Eng, J. K., Martin, D. B., Nesvizhskii, A. I., and Aebersold, R. (2010), 'A guided tour of the TransProteomic Pipeline', *Proteomics*, **10** (6), 1150–1159.
- Deutsch, E. W. (2010), 'Mass spectrometer output file format mzML.', *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, **604**, 319–31.
- Deutsch, E. W., Chambers, M., Neumann, S., Levander, F., Binz, P.-A., Shofstahl, J., Campbell, D. S., Mendoza, L., Ovelleiro, D., Helsens, K., Martens, L., Aebersold, R., Moritz, R. L., and Brusniak, M.-Y. (2012), 'TraML—a standard format for exchange of selected reaction monitoring transition lists.', *Molecular & cellular proteomics : MCP*, **11** (4), R111.015040.
- Deutsch, E. W., Mendoza, L., Shteynberg, D., Slagel, J., Sun, Z., and Moritz, R. L. (2015), 'Trans-Proteomic Pipeline, a standardized data processing pipeline for large-scale reproducible proteomics informatics.', *Proteomics. Clinical applications*.
- Ding, C., Chan, D. W., Liu, W., Liu, M., Li, D., Song, L., Li, C., Jin, J., Malovannaya, A., Jung, S. Y., Zhen, B., Wang, Y., and Qin, J. (2013), 'Proteome-wide profiling of activated transcription factors with a concatenated tandem array of transcription factor response elements', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **110** (17), 6771–6.
- Ding, Y., Choi, H., and Nesvizhskii, A. I. (2008), 'Adaptive discriminant function analysis and reranking of MS/MS database search results for improved peptide identification in shotgun proteomics.', *Journal of proteome research*, **7** (11), 4878–89.
- Elias, J. E. and Gygi, S. P. (2007), 'Target-decoy search strategy for increased confidence in large-scale protein identifications by mass spectrometry.', *Nature methods*, **4** (3), 207–14.
- Eng, J. K., Jahan, T. A., and Hoopmann, M. R. (2013), 'Comet: an open-source MS/MS sequence database search tool.', *Proteomics*, **13** (1), 22–4.
- Eng, J. K., McCormack, A. L., and Yates, J. R. (1994), 'An approach to correlate tandem mass spectral data of peptides with amino acid sequences in a protein database.', *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, **5** (11), 976–89.

- Fanning, S. and Mitchell, A. P. (2012), 'Fungal biofilms.', *PLoS pathogens*, **8** (4), e1002585.
- Farrah, T., Deutsch, E. W., Omenn, G. S., Campbell, D. S., Sun, Z., Bletz, J. a., Mallick, P., Katz, J. E., Malmström, J., Ossola, R., Watts, J. D., Lin, B., Zhang, H., Moritz, R. L., and Aebersold, R. (2011), 'A high-confidence human plasma proteome reference set with estimated concentrations in PeptideAtlas.', *Molecular & Cellular Proteomics*, **10** (9), M110.006353.
- Fenn, J. B., Mann, M., Meng, C. K., Wong, S. F., and Whitehouse, C. M. (1989), 'Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules.', *Science (New York, N.Y.)*, **246** (4926), 64–71.
- Fenyö, D. and Beavis, R. (2003), 'A method for assessing the statistical significance of mass spectrometry-based protein identifications using general scoring schemes', *Analytical Chemistry*, **75** (4), 768–774.
- Fernández-Arenas, E., Cabezón, V., Bermejo, C., Arroyo, J., Nombela, C., Diez-Orejas, R., and Gil, C. (2007), 'Integrated proteomics and genomics strategies bring new insight into *Candida albicans* response upon macrophage interaction.', *Molecular & cellular proteomics : MCP*, **6** (3), 460–478.
- Geer, L. Y., Markey, S. P., Kowalak, J. A., Wagner, L., Xu, M., Maynard, D. M., Yang, X., Shi, W., and Bryant, S. H. (2004), 'Open mass spectrometry search algorithm.', *Journal of proteome research*, **3** (5), 958–64.
- Gerber, S. A., Rush, J., Stemman, O., Kirschner, M. W., and Gygi, S. P. (2003), 'Absolute quantification of proteins and phosphoproteins from cell lysates by tandem MS.', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **100** (12), 6940–5.
- Ghali, F., Krishna, R., Lukasse, P., Martínez-Bartolomé, S., Reisinger, F., Hermjakob, H., Vizcaíno, J. A., and Jones, A. R. (2013), 'Tools (Viewer, Library and Validator) that facilitate use of the peptide and protein identification standard format, termed mzIdentML.', *Molecular & cellular proteomics : MCP*, **12** (11), 3026–35.
- Gil-Bona, A., Llama-Palacios, A., Parra, C. M., Vivanco, F., Nombela, C., Monteoliva, L., and Gil, C. (2014), 'Proteomics unravels extracellular vesicles as carriers of classical cytoplasmic proteins in *Candida albicans*', *Journal of proteome research*, **14** (1), 142–53.

- Gil-Bona, A., Parra-Giraldo, C. M., Hernández, M. L., Reales-Calderon, J. A., Solis, N. V., Filler, S. G., Monteoliva, L., and Gil, C. (2015), ‘*Candida albicans* cell shaving uncovers new proteins involved in cell wall integrity, yeast to hypha transition, stress response and host-pathogen interaction.’, *Journal of proteomics*.
- Gillet, L. C., Navarro, P., Tate, S., Röst, H., Selevsek, N., Reiter, L., Bonner, R., and Aebersold, R. (2012), ‘Targeted data extraction of the MS/MS spectra generated by data-independent acquisition: a new concept for consistent and accurate proteome analysis.’, *Molecular & Cellular Proteomics*, **11** (6), O111.016717.
- Gow, N. and van de Veerdonk, F. (2011), ‘*Candida albicans* morphogenesis and host defence: discriminating invasion from colonization’, *Nature Reviews*, **10** (2), 112–122.
- Griss, J., Reisinger, F., Hermjakob, H., and Vizcaíno, J. A. (2012), ‘jmzReader: A Java parser library to process and visualize multiple text and XML-based mass spectrometry data formats.’, *Proteomics*, **12** (6), 795–8.
- Gunaratne, J., Schmidt, A., Quandt, A., Neo, S. P., Sarac, O. S., Gracia, T., Loguercio, S., Ahrne, E., Li Hai Xia, R., Tan, K. H., Loessner, C., Bahler, J., Beyer, A., Blackstock, W., and Aebersold, R. (2013), ‘Extensive Mass Spectrometry-Based Analysis of the Fission Yeast Proteome: The *S. pombe* PeptideAtlas’, *Molecular & Cellular Proteomics*, pp. 1741–1751.
- Gygi, S. P., Corthals, G. L., Zhang, Y., Rochon, Y., and Aebersold, R. (2000), ‘Evaluation of two-dimensional gel electrophoresis-based proteome analysis technology.’, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **97** (17), 9390–5.
- Hao, B., Cheng, S., Clancy, C. J., and Nguyen, M. H. (2013), ‘Caspofungin kills *Candida albicans* by causing both cellular apoptosis and necrosis.’, *Antimicrobial agents and chemotherapy*, **57** (1), 326–32.
- Harford, J. B. and Bonifacino, J. S. (2001), ‘Subcellular Fractionation and Isolation of Organelles’, in *Current Protocols in Cell Biology*. John Wiley & Sons, Inc.

- Hatt, P. D., Quadroni, M., Staudenmann, W., and James, P. (1997), 'Concentration of, and SDS Removal from Proteins Isolated from Multiple two-Dimensional Electrophoresis Gels', *European Journal of Biochemistry*, **246** (2), 336–343.
- Henzel, W. J., Billeci, T. M., Stults, J. T., Wong, S. C., Grimley, C., and Watanabe, C. (1993), 'Identifying proteins from two-dimensional gels by molecular mass searching of peptide fragments in protein sequence databases.', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **90** (11), 5011–5.
- Hoehamer, C. F., Cummings, E. D., Hilliard, G. M., and Rogers, P. D. (2010), 'Changes in the proteome of *Candida albicans* in response to azole, polyene, and echinocandin antifungal agents.', *Antimicrobial agents and chemotherapy*, **54** (5), 1655–64.
- Hoogland, C., Mostaguir, K., Appel, R. D., and Lisacek, F. (2008), 'The World-2DPAGE Constellation to promote and publish gel-based proteomics data through the ExPASy server.', *Journal of proteomics*, **71** (2), 245–8.
- Hörth, P., Miller, C. A., Preckel, T., and Wenz, C. (2006), 'Efficient fractionation and improved protein identification by peptide OFFGEL electrophoresis.', *Molecular & cellular proteomics : MCP*, **5** (10), 1968–74.
- Hoyer, L. L., Green, C. B., Oh, S.-H., and Zhao, X. (2008), 'Discovering the secrets of the *Candida albicans* agglutinin-like sequence (ALS) gene family - a sticky pursuit', *Medical Mycology*, **46** (1), 1–15.
- Insenser, M., Nombela, C., Molero, G., and Gil, C. (2006), 'Proteomic analysis of detergent-resistant membranes from *Candida albicans*', *Proteomics*, **6 Suppl 1**, S74–81.
- Ishihama, Y., Oda, Y., Tabata, T., Sato, T., Nagasu, T., Rappaport, J., and Mann, M. (2005), 'Exponentially modified protein abundance index (emPAI) for estimation of absolute protein amount in proteomics by the number of sequenced peptides per protein.', *Molecular & cellular proteomics : MCP*, **4** (9), 1265–72.
- Jacobsen, I. D., Wilson, D., Wächtler, B., Brunke, S., Naglik, J. R., and Hube, B. (2012), 'Candida albicans dimorphism as a therapeutic target.', *Expert review of anti-infective therapy*, **10** (1), 85–93.

- Jones, A. R., Eisenacher, M., Mayer, G., Kohlbacher, O., Siepen, J., Hubbard, S. J., Selley, J. N., Searle, B. C., Shofstahl, J., Seymour, S. L., Julian, R., Binz, P.-A., Deutsch, E. W., Hermjakob, H., Reisinger, F., Griss, J., Vizcaíno, J. A., Chambers, M., Pizarro, A., and Creasy, D. (2012), 'The mzIdentML data standard for mass spectrometry-based proteomics results.', *Molecular & cellular proteomics : MCP*, **11** (7), M111.014381.
- Käll, L., Storey, J. D., MacCoss, M. J., and Noble, W. S. (2008), 'Assigning significance to peptides identified by tandem mass spectrometry using decoy databases.', *Journal of proteome research*, **7** (1), 29–34.
- Kanehisa, M., Araki, M., Goto, S., Hattori, M., Hirakawa, M., Itoh, M., Katayama, T., Kawashima, S., Okuda, S., Tokimatsu, T., and Yamanishi, Y. (2007), 'KEGG for linking genomes to life and the environment', *Nucleic Acids Research*, **36** (Database), D480–D484.
- Karas, M. and Hillenkamp, F. (1988), 'Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10,000 daltons.', *Analytical chemistry*, **60** (20), 2299–301.
- Keller, A., Eng, J., Zhang, N., Li, X.-j., and Aebersold, R. (2005), 'A uniform proteomics MS/MS analysis platform utilizing open XML file formats', *Molecular systems biology*, **1** (August 2005), 2005.0017.
- Keller, A., Nesvizhskii, A. I., Kolker, E., and Aebersold, R. (2002), 'Empirical statistical model to estimate the accuracy of peptide identifications made by MS/MS and database search.', *Analytical chemistry*, **74** (20), 5383–92.
- King, N. L., Deutsch, E. W., Ranish, J. A., Nesvizhskii, A. I., Eddes, J. S., MaIick, P., Eng, J., Desiere, F., Flory, M., Martin, D. B., Kim, B., Lee, H., Raught, B., and Aebersold, R. (2006), 'Analysis of the *Saccharomyces cerevisiae* proteome with PeptideAtlas.', *Genome biology*, **7** (11), R106.
- Klose, J. (1975), 'Protein mapping by combined isoelectric focusing and electrophoresis of mouse tissues. A novel approach to testing for induced point mutations in mammals.', *Humangenetik*, **26** (3), 231–43.
- Klose, J. and Kobalz, U. (1995), 'Two-dimensional electrophoresis of proteins: an updated protocol and implications for a functional analysis of the genome.', *Electrophoresis*, **16** (6), 1034–59.

- Kuhn, E., Wu, J., Karl, J., Liao, H., Zolg, W., and Guild, B. (2004), 'Quantification of C-reactive protein in the serum of patients with rheumatoid arthritis using multiple reaction monitoring mass spectrometry and ¹³C-labeled peptide standards.', *Proteomics*, **4** (4), 1175–86.
- La Valle, R., Sandini, S., Gomez, M. J., Mondello, F., Romagnoli, G., Nisini, R., and Cassone, A. (2000), 'Generation of a Recombinant 65-Kilodalton Mannoprotein, a Major Antigen Target of Cell-Mediated Immune Response to *Candida albicans*', *Infection and Immunity*, **68** (12), 6777–6784.
- Lam, H., Deutsch, E. W., Eddes, J. S., Eng, J. K., King, N., Stein, S. E., and Aebersold, R. (2007), 'Development and validation of a spectral library searching method for peptide identification from MS/MS.', *Proteomics*, **7** (5), 655–67.
- Lange, V., Malmström, J. a., Didion, J., King, N. L., Johansson, B. P., Schäfer, J., Rameseder, J., Wong, C.-H., Deutsch, E. W., Brusniak, M.-Y., Bühlmann, P., Björck, L., Domon, B., and Aebersold, R. (2008), 'Targeted quantitative analysis of *Streptococcus pyogenes* virulence factors by multiple reaction monitoring.', *Molecular & Cellular Proteomics*, **7** (8), 1489–500.
- Léger, T., Garcia, C., Ounissi, M., Lelandais, G., and Camadro, J.-M. (2015), 'The metacaspase (Mca1p) has a dual role in farnesol-induced apoptosis in *Candida albicans*', *Molecular & cellular proteomics : MCP*, **14** (1), 93–108.
- Lindner, S. E., Swearingen, K. E., Harupa, A., Vaughan, A. M., Sinnis, P., Moritz, R. L., and Kappe, S. H. I. (2013), 'Total and putative surface proteomics of malaria parasite salivary gland sporozoites.', *Molecular & Cellular Proteomics*, **12** (5), 1127–43.
- Loevenich, S. N., Brunner, E., King, N. L., Deutsch, E. W., Stein, S. E., Aebersold, R., and Hafen, E. (2009), 'The *Drosophila melanogaster* PeptideAtlas facilitates the use of peptide data for improved fly proteomics and genome annotation.', *BMC bioinformatics*, **10**, 59.
- Louris, J. N., Cooks, R. G., Syka, J. E. P., Kelley, P. E., Stafford, G. C., and Todd, J. F. J. (1987), 'Instrumentation, applications, and energy deposition in quadrupole ion-trap tandem mass spectrometry', *Analytical Chemistry*, **59** (13), 1677–1685.

- Ma, K., Vitek, O., and Nesvizhskii, A. I. (2012), 'A statistical model-building perspective to identification of MS/MS spectra with PeptideProphet.', *BMC bioinformatics*, **13 Suppl 1** (Suppl 16), S1.
- MacLean, B., Eng, J., Beavis, R., and McIntosh, M. (2006), 'General framework for developing and evaluating database scoring algorithms using the TANDEM search engine', *Bioinformatics*, **22** (22), 2830–2832.
- Madeo, F., Herker, E., and Wissing, S. (2004), 'Apoptosis in yeast', *Current opinion in microbiology*, **7** (6), 655–660.
- Makarov, A. (2000), 'Electrostatic axially harmonic orbital trapping, a high performance technique of mass analysis', *Analytical chemistry*, **72** (6), 1156–62.
- Mallick, P., Schirle, M., Chen, S. S., Flory, M. R., Lee, H., Martin, D., Ranih, J., Raught, B., Schmitt, R., Werner, T., Kuster, B., and Aebersold, R. (2007), 'Computational prediction of proteotypic peptides for quantitative proteomics.', *Nature biotechnology*, **25** (1), 125–31.
- Mann, M., Højrup, P., and Roepstorff, P. (1993), 'Use of mass spectrometric molecular weight information to identify proteins in sequence databases.', *Biological mass spectrometry*, **22** (6), 338–45.
- Martens, L., Chambers, M., Sturm, M., Kessner, D., Levander, F., Shofstahl, J., Tang, W. H., Römpf, A., Neumann, S., Pizarro, A. D., Montecchi-Palazzi, L., Tasman, N., Coleman, M., Reisinger, F., Souda, P., Hermjakob, H., Binz, P.-A., and Deutsch, E. W. (2011), 'mzML—a community standard for mass spectrometry data.', *Molecular & cellular proteomics : MCP*, **10** (1), R110.000133.
- Martens, L., Hermjakob, H., Jones, P., Adamski, M., Taylor, C., States, D., Gevaert, K., Vandekerckhove, J., and Apweiler, R. (2005), 'PRIDE: the proteomics identifications database.', *Proteomics*, **5** (13), 3537–45.
- Martínez-Bartolomé, S., Binz, P.-A., and Albar, J. P. (2014), 'The Minimal Information about a Proteomics Experiment (MIAPE) from the Proteomics Standards Initiative.', *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, **1072**, 765–80.
- Martínez-Solano, L., Nombela, C., Molero, G., and Gil, C. (2006), 'Differential protein expression of murine macrophages upon interaction with *Candida albicans*', *Proteomics*, **6 Suppl 1**, S133–S144.

- Mayer, F. L., Wilson, D., and Hube, B. (2013), 'Candida albicans pathogenicity mechanisms.', *Virulence*, **4** (2), 119–28.
- Monteoliva, L. and Albar, J. P. (2004), 'Differential proteomics: an overview of gel and non-gel based approaches.', *Briefings in functional genomics & proteomics*, **3** (3), 220–39.
- Monteoliva, L., Martinez-Lopez, R., Pitarch, A., Hernaez, M. L., Serna, A., Nombela, C., Albar, J. P., and Gil, C. (2011), 'Quantitative proteome and acidic subproteome profiling of Candida albicans yeast-to-hypha transition', *Journal of Proteome Research*, **10** (2), 502–517.
- Moran, C., Grussemeyer, C. A., Spalding, J. R., Benjamin, D. K., and Reed, S. D. (2010), 'Comparison of costs, length of stay, and mortality associated with Candida glabrata and Candida albicans bloodstream infections.', *American journal of infection control*, **38** (1), 78–80.
- Muzzey, D., Schwartz, K., Weissman, J. S., and Sherlock, G. (2013), 'Assembly of a phased diploid *Candida albicans* genome facilitates allele-specific measurements and provides a simple model for repeat and indel structure.', *Genome biology*, **14** (9), R97.
- Navarro, P. and Vázquez, J. (2009), 'A refined method to calculate false discovery rates for peptide identification using decoy databases.', *Journal of proteome research*, **8** (4), 1792–6.
- Nesvizhskii, A. (2010), 'A survey of computational methods and error rate estimation procedures for peptide and protein identification in shotgun proteomics', *Journal of proteomics*, **73** (11), 2092–2123.
- Nesvizhskii, A. I. (2007), 'Protein identification by tandem mass spectrometry and sequence database searching.', *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, **367**, 87–119.
- Nesvizhskii, A. I. and Aebersold, R. (2005), 'Interpretation of shotgun proteomic data: the protein inference problem.', *Molecular & Cellular Proteomics*, **4** (10), 1419–40.
- Nesvizhskii, A. I., Keller, A., Kolker, E., and Aebersold, R. (2003), 'A statistical model for identifying proteins by tandem mass spectrometry.', *Analytical chemistry*, **75** (17), 4646–58.

- O'Farrell, P. H. (1975), 'High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins.', *The Journal of biological chemistry*, **250** (10), 4007–21.
- Oh, S.-H., Cheng, G., Nuessen, J. a., Jajko, R., Yeater, K. M., Zhao, X., Pujol, C., Soll, D. R., and Hoyer, L. L. (2005), 'Functional specificity of *Candida albicans* Als3p proteins and clade specificity of ALS3 alleles discriminated by the number of copies of the tandem repeat sequence in the central domain.', *Microbiology (Reading, England)*, **151** (Pt 3), 673–81.
- Olsen, J. V., Macek, B., Lange, O., Makarov, A., Horning, S., and Mann, M. (2007), 'Higher-energy C-trap dissociation for peptide modification analysis.', *Nature methods*, **4** (9), 709–12.
- Pappin, D. J., Hojrup, P., and Bleasby, A. J. (1993), 'Rapid identification of proteins by peptide-mass fingerprinting.', *Current biology : CB*, **3** (6), 327–32.
- Pedrioli, P. G. A., Eng, J. K., Hubley, R., Vogelzang, M., Deutsch, E. W., Raught, B., Pratt, B., Nilsson, E., Angeletti, R. H., Apweiler, R., Cheung, K., Costello, C. E., Hermjakob, H., Huang, S., Julian, R. K., Kapp, E., McComb, M. E., Oliver, S. G., Omenn, G., Paton, N. W., Simpson, R., Smith, R., Taylor, C. F., Zhu, W., and Aebersold, R. (2004), 'A common open representation of mass spectrometry data and its application to proteomics research.', *Nature biotechnology*, **22** (11), 1459–66.
- Pfaller, M. A. and Diekema, D. J. (2010), 'Epidemiology of invasive mycoses in North America.', *Critical reviews in microbiology*, **36** (1), 1–53.
- Phan, Q. T., Myers, C. L., Fu, Y., Sheppard, D. C., Yeaman, M. R., Welch, W. H., Ibrahim, A. S., Edwards, J. E., and Filler, S. G. (2007), 'Als3 is a *Candida albicans* invasin that binds to cadherins and induces endocytosis by host cells.', *PLoS biology*, **5** (3), e64.
- Pitarch, A., Abian, J., Carrascal, M., Sánchez, M., Nombela, C., and Gil, C. (2004), 'Proteomics-based identification of novel *Candida albicans* antigens for diagnosis of systemic candidiasis in patients with underlying hematological malignancies.', *Proteomics*, **4** (10), 3084–106.
- Pitarch, A., Nombela, C., and Gil, C. (2006a), '*Candida albicans* biology and pathogenicity: insights from proteomics.', *Methods of biochemical analysis*, **49**, 285–330.

- Pitarch, A., Nombela, C., and Gil, C. (2006b), 'Contributions of proteomics to diagnosis, treatment, and prevention of candidiasis.', *Methods of biochemical analysis*, **49**, 331–61.
- Pitarch, A., Nombela, C., and Gil, C. (2009), 'Proteomic profiling of serologic response to *Candida albicans* during host-commensal and host-pathogen interactions.', in *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, vol. 470, pp. 369–411.
- Pitarch, A., Nombela, C., and Gil, C. (2011), 'Prediction of the clinical outcome in invasive candidiasis patients based on molecular fingerprints of five anti-Candida antibodies in serum.', *Molecular & Cellular Proteomics*, **10** (1), M110.004010.
- Plaine, A., Walker, L., Da Costa, G., Mora-Montes, H. M., McKinnon, A., Gow, N. A. R., Gaillardin, C., Munro, C. A., and Richard, M. L. (2008), 'Functional analysis of *Candida albicans* GPI-anchored proteins: roles in cell wall integrity and caspofungin sensitivity.', *Fungal genetics and biology : FG & B*, **45** (10), 1404–14.
- Pleissner, K.-P., Eifert, T., Buettner, S., Schmidt, F., Boehme, M., Meyer, T. F., Kaufmann, S. H. E., and Jungblut, P. R. (2004), 'Web-accessible proteome databases for microbial research.', *Proteomics*, **4** (5), 1305–13.
- Prieto, G., Aloria, K., Osinalde, N., Fullaondo, A., Arizmendi, J. M., and Mattiesien, R. (2012), 'PAnalyzer: a software tool for protein inference in shotgun proteomics.', *BMC bioinformatics*, **13**, 288.
- Ramsdale, M. (2008), 'Programmed cell death in pathogenic fungi', *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, **1783** (7), 1369–1380.
- Reiter, L., Claassen, M., Schrimpf, S. S. P., Jovanovic, M., Schmidt, A., Buhmann, J. M., Hengartner, M. O., and Aebersold, R. (2009), 'Protein identification false discovery rates for very large proteomics data sets generated by tandem mass spectrometry', *Molecular & Cellular Proteomics*, **8** (11), 2405–2417.
- Reiter, L., Rinner, O., Picotti, P., Hüttenhain, R., Beck, M., Brusniak, M.-Y., Hengartner, M. O., and Aebersold, R. (2011), 'mProphet: automated data processing and statistical validation for large-scale SRM experiments.', *Nature methods*, **8** (5), 430–5.

- Roepstorff, P. and Fohlman, J. (1984), 'Proposal for a common nomenclature for sequence ions in mass spectra of peptides.', *Biomedical mass spectrometry*, **11** (11), 601.
- Rogowska-Wrzesinska, A., Le Bihan, M.-C., Thaysen-Andersen, M., and Roepstorff, P. (2013), '2D gels still have a niche in proteomics.', *Journal of proteomics*, **88**, 4–13.
- Ros, A., Faupel, M., Mees, H., van Oostrum, J., Ferrigno, R., Reymond, F., Michel, P., Rossier, J. S., and Girault, H. H. (2002), 'Protein purification by Off-Gel electrophoresis.', *Proteomics*, **2** (2), 151–6.
- Rossignol, T., Lechat, P., Cuomo, C., Zeng, Q., Moszer, I., and DÉnfert, C. (2008), 'CandidaDB: a multi-genome database for Candida species and related Saccharomycotina.', *Nucleic acids research*, **36** (Database issue), D557–61.
- Rupp, S. (2004), 'Proteomics on its way to study host-pathogen interaction in *Candida albicans*', *Current opinion in microbiology*, **7** (4), 330–335.
- Sandini, S., Stringaro, A., Arancia, S., Colone, M., Mondello, F., Murtas, S., Girolamo, A., Mastrangelo, N., and De Bernardis, F. (2011), 'The MP65 gene is required for cell wall integrity, adherence to epithelial cells and biofilm formation in *Candida albicans*', *BMC microbiology*, **11** (1), 106.
- Saville, S. P., Lazzell, A. L., Monteagudo, C., and Lopez-Ribot, J. L. (2003), 'Engineered control of cell morphology in vivo reveals distinct roles for yeast and filamentous forms of *Candida albicans* during infection.', *Eukaryotic cell*, **2** (5), 1053–60.
- Schubert, O. T., Mouritsen, J., Ludwig, C., Röst, H. L., Rosenberger, G., Arthur, P. K., Claassen, M., Campbell, D. S., Sun, Z., Farrah, T., Gengenbacher, M., Maiolica, A., Kaufmann, S. H. E., Moritz, R. L., and Aebersold, R. (2013), 'The MtB Proteome Library: A Resource of Assays to Quantify the Complete Proteome of Mycobacterium tuberculosis.', *Cell host & microbe*, **13** (5), 602–12.
- Shinoda, K., Tomita, M., and Ishihama, Y. (2010), 'emPAI Calc—for the estimation of protein abundance from large-scale identification data by liquid chromatography-tandem mass spectrometry.', *Bioinformatics (Oxford, England)*, **26** (4), 576–7.

- Shteynberg, D., Deutsch, E. W., Lam, H., Eng, J. K., Sun, Z., Tasman, N., Mendoza, L., Moritz, R. L., Aebersold, R., and Nesvizhskii, A. I. (2011), 'iProphet: Multi-level Integrative Analysis of Shotgun Proteomic Data Improves Peptide and Protein Identification Rates and Error Estimates', *Molecular & Cellular Proteomics*, **10** (12), M111.007690–M111.007690.
- Simicevic, J., Schmid, A. W., Gilardoni, P. A., Zoller, B., Raghav, S. K., Krier, I., Gubelmann, C., Lisacek, F., Naef, F., Moniatte, M., and Deplancke, B. (2013), 'Absolute quantification of transcription factors during cellular differentiation using multiplexed targeted proteomics.', *Nature methods*, **advance on**.
- Smith, B. E., Hill, J. A., Gjukich, M. A., and Andrews, P. C. (2011), 'Tranche distributed repository and ProteomeCommons.org.', *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, **696**, 123–45.
- Steen, H. and Mann, M. (2004), 'The ABC's (and XYZ's) of peptide sequencing', *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, **5** (9), 699–711.
- Sundstrom, P., Balish, E., and Allen, C. M. (2002), 'Essential role of the *Candida albicans* transglutaminase substrate, hyphal wall protein 1, in lethal oroesophageal candidiasis in immunodeficient mice.', *The Journal of infectious diseases*, **185** (4), 521–30.
- Syka, J. E. P., Coon, J. J., Schroeder, M. J., Shabanowitz, J., and Hunt, D. F. (2004), 'Peptide and protein sequence analysis by electron transfer dissociation mass spectrometry.', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **101** (26), 9528–33.
- Tabas-Madrid, D., Nogales-Cadenas, R., and Pascual-Montano, A. (2012), 'GeneCodis3: a non-redundant and modular enrichment analysis tool for functional genomics.', *Nucleic acids research*, **40** (Web Server issue), W478–83.
- Tanaka, K., Waki, H., Ido, Y., Akita, S., Yoshida, Y., Yoshida, T., and Matsuo, T. (1988), 'Protein and polymer analyses up to m/z 100 000 by laser ionization time-of-flight mass spectrometry', *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, **2** (8), 151–153.
- The Uniprot Consortium (2008), 'The universal protein resource (UniProt).', *Nucleic acids research*, **36** (Database issue), D190–5.

- Tong, K. B., Murtagh, K. N., Lau, C., and Seifeldin, R. (2008), 'The impact of esophageal candidiasis on hospital charges and costs across patient subgroups.', *Current medical research and opinion*, **24** (1), 167–74.
- Van, P. T., Schmid, A. K., King, N. L., Kaur, A., Pan, M., Whitehead, K., Koidé, T., Facciotti, M. T., Goo, Y. A., Deutsch, E. W., Reiss, D. J., Mallick, P., and Baliga, N. S. (2008), 'Halobacterium salinarum NRC-1 PeptideAtlas: toward strategies for targeted proteomics and improved proteome coverage.', *Journal of proteome research*, **7** (9), 3755–64.
- Vialas, V. and Gil, C. (2015), 'Proteopathogen2, a database and web tool to store and display proteomics identification results in the mzIdentML standard', *EuPA Open Proteomics*.
- Vialás, V., Nogales-Cadenas, R., Nombela, C., Pascual-Montano, A., and Gil, C. (2009), 'Proteopathogen, a protein database for studying *Candida albicans*–host interaction.', *Proteomics*, **9** (20), 4664–8.
- Vialás, V., Perumal, P., Gutierrez, D., Ximénez-Embún, P., Nombela, C., Gil, C., and Chaffin, W. L. (2012), 'Cell surface shaving of *Candida albicans* biofilms, hyphae and yeast form cells.', *Proteomics*, **12** (14), 2331–2339.
- Vialas, V., Sun, Z., Loureiro Y Penha, C. V., Carrascal, M., Abián, J., Monteoliva, L., Deutsch, E. W., Aebersold, R., Moritz, R. L., and Gil, C. (2013), 'A *Candida albicans* PeptideAtlas.', *Journal of proteomics*, **97**, 62–8.
- Vizcaíno, J. A., Côté, R. G., Csordas, A., Dianes, J. a., Fabregat, A., Foster, J. M., Griss, J., Alpi, E., Birim, M., Contell, J., O'Kelly, G., Schoenegger, A., Ovelleiro, D., Pérez-Riverol, Y., Reisinger, F., Ríos, D., Wang, R., and Hermjakob, H. (2013), 'The PRoteomics IDEntifications (PRIDE) database and associated tools: status in 2013.', *Nucleic acids research*, **41** (Database issue), D1063–9.
- Vizcaíno, J. A., Deutsch, E. W., Wang, R., Csordas, A., Reisinger, F., Ríos, D., Dianes, J. A., Sun, Z., Farrah, T., Bandeira, N., Binz, P.-A., Xenarios, I., Eisenacher, M., Mayer, G., Gatto, L., Campos, A., Chalkley, R. J., Kraus, H.-J., Albar, J. P., Martinez-Bartolomé, S., Apweiler, R., Omenn, G. S., Martens, L., Jones, A. R., and Hermjakob, H. (2014), 'ProteomeXchange provides globally coordinated proteomics data submission and dissemination.', *Nature biotechnology*, **32** (3), 223–6.

- Wasinger, V. C., Cordwell, S. J., Cerpa-Poljak, A., Yan, J. X., Gooley, A. A., Wilkins, M. R., Duncan, M. W., Harris, R., Williams, K. L., and Humphery-Smith, I. (1995), 'Progress with gene-product mapping of the Mollicutes: Mycoplasma genitalium.', *Electrophoresis*, **16** (7), 1090–4.
- Wisplinghoff, H., Bischoff, T., Tallent, S. M., Seifert, H., Wenzel, R. P., and Edmond, M. B. (2004), 'Nosocomial bloodstream infections in US hospitals: analysis of 24,179 cases from a prospective nationwide surveillance study.', *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, **39** (3), 309–17.
- Wolters, D. A., Washburn, M. P., and Yates, J. R. (2001), 'An automated multidimensional protein identification technology for shotgun proteomics.', *Analytical chemistry*, **73** (23), 5683–90.
- Zubarev, R. A., Kelleher, N. L., and McLafferty, F. W. (1998), 'Electron Capture Dissociation of Multiply Charged Protein Cations. A Nonergodic Process', *Journal of the American Chemical Society*, **120** (13), 3265–3266.

Lista de acrónimos

- 1D-PAGE *Monodimensional PoliAcrylamide Gel Electrophoresis*, Electroforesis en Gel de Poliacrilamida Monodimensional
- 2D-PAGE *Bidimensional PoliAcrylamide Gel Electrophoresis*, Electroforesis en Gel de Poliacrilamida Bidimensional
- CGD *Candida Genome Database*
- CID *Collision Induced Dissociation*, Disociación Inducida por Colisión
- DDA *Data Dependent Acquisition*, Adquisición Dependiente de Datos
- DIA *Data Independent Acquisition*, Adquisición Independiente de Datos
- ECD *Electron Capture Dissociation*, Disociación por Captura de Electrones
- EM *Expectation-Maximization*, Esperanza-Maximización
- ESI *Electrospray Ionization*, Ionización por Electrospray
- ETD *Electron Transfer Dissociation*, Disociación por Transferencia de Electrones
- FAB *Fast Atom Bombardment*, Bombardeo con Átomos Rápidos
- FD *Field Desorption*, Desorción por Campo Eléctrico
- FDR *False Discovery Rate*, Tasa de Falsos Descubrimientos

FNR	<i>False Negative Rate</i> , Tasa de Falsos Negativos
FPR.....	<i>False Positive Rate</i> , Tasa de Falsos Positivos
FTICR	<i>Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance</i> , Resonancia Iónica Ciclotrónica - Transformada de Fourier
FWHM	<i>Full Width at Half Mass</i> , Ancho de Pico a Media Altura
HCD	<i>Higher Energy Collision Dissociation</i> , Disociación por Colisión de Alta Energía
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i> , Cromatografía Líquida de Alta Eficacia
HUPO-PSI....	<i>Human Proteome Organization - Proteomics Standards Initiative</i> , Iniciativa de Estandarización en Proteómica del Proyecto Proteoma Humano
LIT.....	<i>Linear Ion Trap</i> , Trampa Iónica Lineal
LTQ.....	<i>Linear Trap Quadrupole</i> , Cuadrupolo de confinamiento lineal
MALDI.....	<i>Matrix Assisted Laser Desorption Ionization</i> , Ionización mediante Desorción por Láser Asistida por Matriz
MRM.....	<i>Multiple Reaction Monitoring</i> , Monitorización de Reacción Múltiple
MS/MS	<i>Tandem Mass Spectrometry</i> , Espectrometría de masas en tandem
MUDPIT.....	<i>Multidimensional Protein Identification Technology</i> , Tecnología Multidimensional de Identificación de Proteínas
NIST	<i>National Institute for Standards and Technology</i> , Instituto Nacional Americano de Estándares y Tecnología
NMC	<i>Number of Missed Cleavages</i> , Número de puntos de corte no efectuados
NRS	<i>Number of Replicate Spectra</i> , Número de Espectros Réplica

NSE	<i>Number of Sibling Experiments</i> , Número de Experimentos Hermanos
NSI	<i>Number of Sibling Ions</i> , Número de Iones Hermanos
NSM	<i>Number of Sibling Modifications</i> , Numero de Modificaciones Hermanas
NSP	<i>Number of Sibling Peptides</i> , Número de Péptidos Hermanos
NSS	<i>Number of Sibling Searches</i> , Número de Búsquedas Hermanas
NTT	<i>Number of Tryptic Termini</i> , Número de Extremos Trípticos
OMSSA	<i>Open Mass Spectrometry Search Algorithm</i> , Algoritmo Abierto de Búsqueda de Espectrometría de Masas
PAGE	<i>Polycrylamide Gel Electrophoresis</i> , Electroforesis en Gel de Poliacrilamida
PD	<i>Plasma Desorption</i> , Desorción por Plasma
PMF	<i>Peptide Mass Fingerprint</i> , Huella de Masas Peptídicas
PRIDE	<i>Protein Identifications Database</i>
PSM	<i>Peptide-Spectrum Match</i> , Asignación Péptido-Espectro
PTM	<i>Post-Translational Modification</i> , Modificación Post-Tradiccional
QIT	<i>Quadrupole Ion Trap</i> , Trampa Iónica Cuadrupolar
QTOF	<i>Quadrupole-Time Of Flight</i> , Cuadrupolo-Tiempo de Vuelo
QTRAP	<i>Quadrupole-Ion Trap</i> , Cuadrupolo-Trampa Iónica
RP-HPLC	<i>Reverse Phase High Performance Liquid Chromatography</i> , Cromatografía Líquida de Alta Eficacia en Fase Reversa
SCX	<i>Strong Cation Exchange</i> , Intercambio Catiónico Fuerte

SDS-PAGE	... <i>Sodium Dodecyl Sulfate PoliAcrylamide Gel Electrophoresis</i> , Electroforesis en Gel de Poliacrilamida con Dodecilsulfato Só- dico
SLD <i>Soft Laser Desorption</i> , Desorción Suave por Láser
SRM <i>Selected Reaction Monitoring</i> , Monitorización de Reacción Se- leccionada
TOF <i>Time Of Flight</i> , Tiempo de Vuelo
TPP <i>Trans Proteomics Pipeline</i>
TPR <i>True Positive Rate</i> , Tasa de Verdaderos Positivos

*—¿Qué te parece desto, Sancho? — Dijo Don Quijote —
Bien podrán los encantadores quitarme la ventura,
pero el esfuerzo y el ánimo, será imposible.*

*Segunda parte de El Ingenioso Caballero
Don Quijote de la Mancha
Miguel de Cervantes Saavedra*

*—Buena está — dijo Sancho —; firmela vuestra merced.
—No es menester firmarla — dijo Don Quijote—,
sino solamente poner mi rúbrica.*

*Primera parte de El Ingenioso Caballero
Don Quijote de la Mancha
Miguel de Cervantes Saavedra*

