

David Jiménez Morales

Estudio Bioinformático sobre la presencia de proteínas glucolíticas en la superficie celular de *Saccharomyces cerevisiae*

Departamento de Microbiología II
Facultad de Farmacia
Universidad Complutense de Madrid
Tutora: Dra. Concha Gil

INTRODUCCIÓN

En los últimos años, el grupo de investigación dirigido por la Dra. Concha Gil, a raíz de una serie de datos experimentales acumulados, ha centrado una de sus líneas de investigación en la presencia de ciertas enzimas glucolíticas –típicamente citoplasmáticas- en la superficie celular de *Saccharomyces cerevisiae* y *Candida albicans*. La proteína glucolítica seleccionada como modelo para tratar de identificar la posible vías y función en esta localización es la Enolasa (Eno2p).

Con este estudio y sirviéndonos de herramientas bioinformáticas, trataremos de aportar datos que permitan orientar la línea experimental.

Evidencias Proteómicas

La pared celular de levaduras es una estructura rígida que protege a la célula de cambios osmóticos. También es un filtro que permite el paso de ciertas sustancias y excluye el paso a otras. No se trata de una estructura inerte si no que está sujeta a cambios en función de múltiples factores (cambio de temperatura, crecimiento, transición dimórfica, etc). La composición de la misma es conocida, pero los mecanismos de ensamblaje y los encargados del mismo no están bien definidos. En ese sentido se analizaron mediante electroforesis bidimensional las proteínas que son secretadas en protoplastos de levadura en regeneración (células a las que se les ha eliminado la pared celular) (Pardo et al)

Entre las proteínas que se identificaron aparecen algunas proteínas típicamente citoplasmáticas como la 2-fosfoglicerato dehidratasa ó enolasa (Eno2p), Fructosa-1-6-bifosfato aldolasa (Fba1), gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa (TDH3-2), entre otras.

Como describiremos más adelante, son numerosos los trabajos que hablan de la presencia de ciertas enzimas glicolíticas en la superficie celular no solo de *Saccharomyces* o *Candida*, si no en numerosos organismos. Pero existe controversia en la explicación de la presencia de estas proteínas típicamente citoplasmáticas en la superficie celular de levadura, como consecuencia de lisis celular o por otros posibles mecanismos desconocidos (Eroles et al)

Evidencias moleculares

Mediante el diseño de las proteínas de fusión Eno2p y Fba1p con la Invertasa intracelular (Suc2p) se muestra que estas dos típicas proteínas citoplasmáticas son capaces de alcanzar el exterior celular (Pardo et al.). Suc2p es una hidrolasa (rompe la sacarosa para formar glucosa y fructosa) que presenta una forma intracelular y otra forma que es secretada por la vía clásica, es decir, a través del Retículo Endoplasmático-Aparato de Golgi (RE-Golgi). Para que una proteína cualquiera sea secretada de esta forma, es necesario que disponga en su extremo N-terminal un pequeño *péptido señal* y normalmente también suele modificarse post-traduccionalmente mediante glicosilación. Suc2p en su forma extracelular presenta estas características. Mediante la obtención de un mutante al que se le ha delecionado *suc2*, se consigue que la levadura sea incapaz de crecer en medios con sacarosa como única fuente de carbono. La fusión de Eno2p y Fba1p con Suc2p sin su péptido señal y la posterior traslocación en la cepa mutante permitía comprobar si esta levadura es capaz de crecer en sacarosa. Posteriores estudios han confirmado la presencia de la Enolasa en la pared celular de *Candida* (Pitarch et al.).

Con el fin de tratar de identificar los mecanismos de secreción implicados en la localización extracelular de ciertas proteínas glucolíticas, se ha centralizado el análisis en el estudio de Eno2p, realizando los siguientes experimentos:

-Determinación de la región de Eno2p involucrada en la posible exportación de Suc2:

Tras la fusión de diferentes fragmentos de Eno2p a la invertasa extracelular (Figura 1), se llegó a la conclusión de que los primeros 169 aminoácidos del extremo N-terminal eran suficientes para el crecimiento de la levadura en sacarosa.

-Medida de la actividad enzimática de Eno2p en la superficie celular de levadura.

A partir de la adición del sustrato de la enzima (2-Fosfo-D-glicerato) se midió la cantidad de producto resultante (Fosfoenolpiruvato). Mientras que en extractos celulares lisados el resultado fue de un 19%, en células completas fue de 0,7%. La actividad del buffer control blanco era de un 0,5%.

-Citometría de flujo (FACS) empleando anticuerpos anti-enolasa humana (N300) y FITC.

No hubo detección de enolasa en la superficie celular mediante ésta técnica.

-Relación entre los niveles de expresión y la exportación de la proteína de fusión Eno2p-Suc2i

Mediante el empleo de un promotor regulable se controló la expresión de la proteína de fusión viendo que a bajos niveles de expresión hay crecimiento en sacarosa.

-Estudio del posible papel de las proteínas que forman complejos proteicos con Eno2p en la localización extracelular.

Se estudió el papel que podría ejercer las proteínas Lst8p, Spf1p y Apl6p, puesto que la delección de estos genes no provocó la ausencia de enolasa en el exterior celular. Aclarar que el mutante para Lst8p es parcial puesto que se trata de un gen esencial.

-Comparación de la Enolasa presente en citoplasma, Lipid Rafts y pared celular.

En los resultados obtenidos mediante Western-Blot (empleando como anticuerpo frente a enolasa humana N300), la enolasa fue identificada en fracción de Lipid Rafts y no en pared celular.

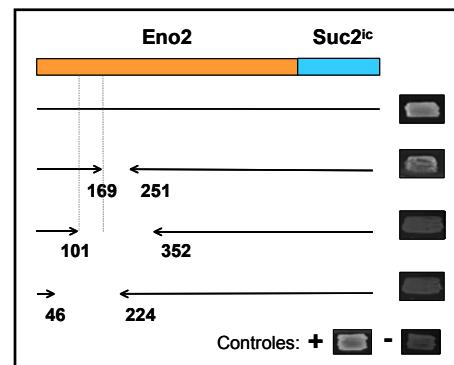


Figura 1. Representación esquemática de cada uno de los cortes efectuados con el fin de estudiar la posible región proteica mínima necesaria para la exportación.

-Revisión de la sensibilidad de N300 frente a diferentes fragmentos de Eno2p fusionados a Suc2p.

Vías de Secreción descritas en células eucariotas

Para poder descifrar la forma mediante la cual la enolasa (y demás proteínas glucolíticas relacionadas) alcanza la superficie celular, es conveniente tener en cuenta cuáles son los mecanismos actualmente descritos de secreción para **proteínas que se encuentran solubles en citoplasma**. Básicamente pueden agruparse en dos:

- **Secreción clásica dependiente del sistema RE-Golgi**

Utilizan esta vía las proteínas solubles que contienen un su extremo amino terminal (N-terminal) una pequeña secuencia de unos 20 aminoácidos que dirige la translocación a través del Retículo Endoplasmático (RE) (Walter et al). A través del transporte de vesículas y vía Golgi, finalmente son liberadas al espacio extracelular, mediante la fusión de las vesículas derivadas de Golgi con la membrana plasmática. Modificaciones post-traduccionales asociadas a esta vía es la Glicosilación. Tanto la Eno2p como el resto de glucolíticas citadas carecen de éste péptido señal.

- **Secreción no clásica**

En los últimos 11 años se han ido acumulando datos (Nickel) sobre mecanismos de secreción en los que no media el sistema RE-Golgi. Se dice que una proteína utiliza un mecanismo alternativo al clásico en células eucarióticas cuando:

- a. Carecen del péptido señal convencional.
- b. La exclusión de estas proteínas de los clásicos orgánulos de secreción tipo RE y el Golgi, combinado con la pérdida con las modificaciones post-traduccionales dependientes de RE-Golgi como es la N-glicosilación.
- c. Resistencia de estos procesos de exportación al Brefeldin A, un clásico inhibidor de la secreción dependiente de RE-Golgi.

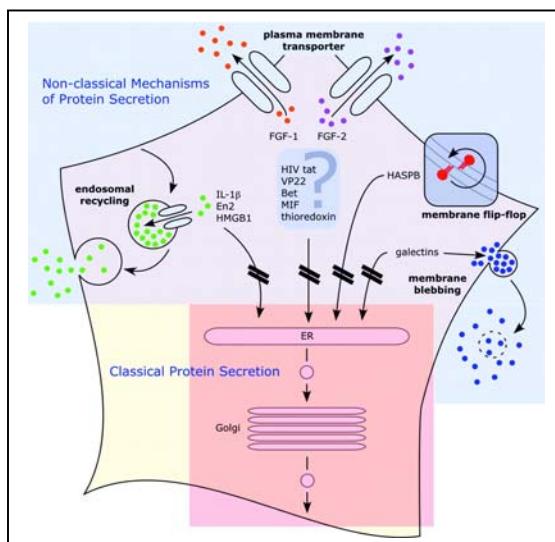


Figura 2. Resumen de los diferentes mecanismos de secreción no clásica hasta la fecha descritos

Los mecanismos de secreción no clásica hasta la fecha identificados pueden agruparse de la siguiente manera (Figura 2):

- **Exocitosis lisosomal:** podríamos citar a diferentes proteínas en principio no relacionadas como son una citokina, la interleukina-1 (IL-1 β), la homeoproteína *Engrailed* (En2) o el factor intranuclear HMGB1. Todas ellas serían translocadas al interior de ciertas vesículas intracelulares no dependientes de la maquinaria RE-Golgi, que tras la fusión con la membrana, liberarían a las mencionadas proteínas al exterior celular. La translocación al interior vesicular sería mediada por unos transportadores de membrana de tipo ABC. No obstante se ha sugerido la existencia de diferentes *poblaciones* de vesículas endolisosómicas en base a que cada proteína es secretada en respuesta a un estímulo concreto.
- **Transportadores de la Membrana Plasmática** que mediaran en la secreción de ciertas proteínas como es el caso de los Factores de Crecimiento de Fibroblastos 1 y 2 (FGF-1y FGF-2). La exportación de FGF-1 implicaría la formación del complejo FGF-1, p40-Syt1 y S100A13, seguido de la translocación directa a través de la membrana plasmática (se desconoce la maquinaria empleada). En el caso de FGF-2, los α/β heterodímeros que constituyen las Na $^{+}$ /K $^{+}$ -ATPasas funcionales en términos de transportadores de iones, serían capaces también de formar complejos funcionales que catalizaran la exportación de una manera independiente del potencial de membrana.
- **Translocación directa a través de membrana**, como sería el caso de la proteína de *Leishmania* HASPB. Para ello sería requisito previo la acetilación, palmitoilación y miristoilación de la misma. Se ha postulado que HASPB sería transferida del citoplasma a la cara externa de la membrana del Golgi, desde donde sería transportada a la cara interna de la membrana plasmática por la vía convencional. Se desconoce cómo esta proteína alcanzaría la cara externa de la membrana.
- **Formación de exosomas de membrana**, como es el caso de las galactinas. Éstas se acumularían tras determinadas regiones de la membrana plasmática a lo que seguiría un mecanismo de exportación que implicaría la formación de pequeñas vesículas de membrana, llamadas *exosomas*. En este proceso parecen estar implicadas la cadenas laterales de oligosacáridos de β -galactosa N- y O- glicosilada, junto con galactosas que contienen glucolípidos como GM₁.
- **Otras proteínas secretadas**, como es el caso de HIV-Tat, VP22, Bet, las tioredoxinas, etc, de las cuales se ha demostrado que no son secretadas por la vías clásica pero aún se desconoce los mecanismos empleados.

Ante la evidencia de los nuevos mecanismos de secreción alternativos a la vía clásica que han ido apareciendo en los últimos años, es posible plantear la posibilidad de que la Eno2p y otras proteínas alcancen la superficie celular mediante un mecanismo de secreción no clásica y que así justificara, por ejemplo, la ausencia de péptido señal

Modificaciones Post-traduccionales Proteicas Asociadas a las Vías de Secreción

El principal mecanismo que dispone una célula para *marcar* una proteína que va a ser secretada es a través de las modificaciones post-traduccionales. A continuación resumiremos aquellas modificaciones que han sido relacionadas con algún tipo de mecanismo de secreción, lo cual a su vez tratará de orientar las predicciones bioinformáticas.

N- y O- Glicosilación

Muchas proteínas en eucariotas presentan cadenas de oligosacáridos unidas covalentemente a las cadenas laterales de asparragina mediante enlaces N-glicosídicos o bien a las cadenas laterales de serina o treonina mediante enlaces O-glicosídicos.

La glicosilación puede estar involucrada (Helenius and Aebl) en (i) funciones intercelulares relacionados con procesos de información, como las interacciones y señalización célula-célula, así como en (ii) ciertos papeles intracelulares como en el control de la secreción proteica a través de la vía clásica (elegir el camino a través del cual tiene que salir una determinada proteína).

Una amplia mayoría de glicoproteínas en eucariotas menores (como la levadura) son proteínas de la pared celular.

Modificaciones Lipídicas

En eucariotas, cuatro principales formas de modificaciones lipídicas han sido reconocidas:

1.- Miristoilación (Farazi et al)

Es la unión covalente del ***miristato***, un ácido graso saturado de 14 carbonos, a la Glicina N-terminal, de forma co-traduccional y previa eliminación del residuo de Metionina inicial (mediante metionilaminopeptidases). Existe un caso (Zha et al) de miristoilación post-traduccional y sería tras la rotura proteolítica de la proteína, lo cual revelaría un sitio de miristoilación oculto.

La N-miristoilación promueve interacciones débiles y reversibles entre proteína-membrana y proteína-proteína. Típicamente, el miristato actúa junto con otros mecanismos en la regulación del marcaje proteico y la función proteica. La forma puede ser a través de los llamados "*myristoyl-electrostatic switches*", es decir, interacciones con la membrana debido a la carga positiva del miristato. También podría ser como consecuencia del llamado "*myristoyl-conformational switch*": ya sea a través de la unión de ciertos ligandos o bien como consecuencia de cortes proteolíticos en la proteína miristoilada, el resultado sería que se provocarían cambios conformacionales que ocultaran o expusieran la cadena acil.

2.- Palmitoilación (Bijlmakers and Marsh)

Es la más abundante y aparentemente más versátil de las modificaciones Lipídicas.

Es la adicción de ***ácido palmítico***, el cual es esterificado en el tiol libre de la cisteína (otros ácidos grasos pueden ser empleados, tanto saturados como insaturados).

Los mecanismos involucrados en la palmitoilación son poco conocidos y las enzimas relevantes están en su mayoría sin caracterizar. Además, el amplio rango de substratos, la ausencia de un claro motivo consenso, junto con el hecho de que ocurre en varias localizaciones, todo ello contribuye al oscuro conocimiento de ésta modificación.

Las funciones asociadas a la Palmitoilación también es de amplio rango: localización intracelular; efectos en la endocitosis, etc. Además, la corta vida media de la Palmitoilación (mucho menor que la de la proteína en si) es importante en los procesos de señalización y regulación.

3.- La modificación de las proteínas de membrana mediante el glicofosfatidil inositol.

Acetilación

Consiste en la adición de un grupo acetilo en el aminoácido del extremo N-terminal. Este tipo de modificación se produce con mucha frecuencia y sus significados pueden ser variados. En ciertos casos de secreción no convencional, como en el de las galactinas, la acetilación favoreció la exportación (Mehul and Hughes). Así mismo, la exportación de HASPB de *Leishmania* es dependiente de la acetilación (Denny et al).

Fosforilación

Es la adición de al menos un grupo fosfato a los residuos de serina, treonina o tirosina (menos frecuente es también la fosforilación del ácido aspártico y la histidina). La fosforilación es quizás la modificación post-traduccional más habitual, con un significado biológico muy amplio.

Respecto a su posible papel en la regulación de la exportación de proteínas, se ha visto que la fosforilación inhibe la secreción no clásica de la homeoproteína Engrailed 2, por tanto, es una modificación post-traduccional a tener en cuenta (Maizel et al)

Ubiquitinación

La **ubiquitina** es un polipéptido de 76 aminoácidos altamente conservado y expresado en todas las células eucariotas, el cual es enganchado al residuo de lisina específico dentro de una proteína.

Dos de las mejores funciones caracterizadas sobre la ubiquitinación proteica es la marcación de las proteínas para su posterior degradación y la promoción de la internalización de ciertas proteínas de membrana por la vía endocítica hacia su degradación en la vacuola. Pero también juega un papel en la regulación y clasificación intracelular de las proteínas de membrana (Horak).

Como veremos más adelante, la proteína Eno2p ha sido aislada en la fracción de membrana de levadura como consecuencia de una mutación en la maquinaria de degradación.

Proteínas Multifuncionales

Además de la manera en que la Eno2p alcanzan la superficie celular, la siguiente pregunta que debemos plantearnos es ¿tendría en la superficie celular la misma función glucolítica que en el citoplasma?.

Son muchos los casos recogidos (Jeffery), (Copley), (Jeffery) en los cuales una misma proteína desempeña dos o más funciones. En la multifunción pueden influir múltiples variables como cambios en la localización celular, modificaciones post-traduccionales, estado oligomérico, expresión en un nuevo tipo celular, cambios en la concentración del ligando, substrato, cofactor o producto...

Son varias las proteínas glucolíticas *pluriempleadas* que analizamos a continuación.

Una Mirada a las Enzimas Glucolíticas

Una vez analizadas las posibles vías de secreción y las modificaciones post-traduccionales relacionadas, el siguiente paso es analizar si existen enzimas glucolíticas identificadas en una localización no citoplasmática y/o con una función extra.

Son muchos los estudios que hacen referencia a la presencia de determinadas enzimas glucolíticas en la pared celular de levaduras, ya sea mediante la identificación por Espectrometría de Masas tras la separación mediante geles bidimensionales SDS/PAGE ((Pardo et al), (Molina et al) o mediante la unión de anticuerpos específicos frente a enzimas glucolíticas en el exterior de células completas (Alloush et al), (Delgado et al), (Edwards et al), (Gil-Navarro et al), estudiados de una manera global.

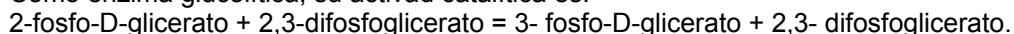
De forma concreta:

Fosfoglucosa Isomerasa (PGI)

Enzima glucolítica que cataliza en el citoplasma la interconversión de la Glucosa 6-P en Fructosa 6-P. En células de mamífero es secretada al exterior celular por varios tipos celulares y trabaja como *factor de motilidad autocrino, neuropeptido y como mediador de maduración y diferenciación*.

Fosfoglicerato mutasa (PGAM 1 o GPM1)

Como enzima glucolítica, su actividad catalítica es:



Por otro lado es secretada al exterior celular donde actúa como *reductora de puentes-disulfuro en la Plasmina* (ahora no encuentro la referencia)

Además se ha podido comprobar que cantidades significativas están presentes en la pared celular de la levadura (Motshwene et al).

Piruvato Kinasa (PYK)

Es la última enzima de la glucólisis y se encarga del paso de fosfoenolpiruvato a piruvato. En cuanto a datos que sean de interés con respecto a los objetivos de este estudio, cabe destacar tres cosas:

- a.- La piruvato kinasa es fosforilada por la protein-kinasa A y esta modificación supone un incremento de la actividad glucolítica (Portela et al)
- b.- Es exportada al núcleo, quizás a través de una vía independiente de Ran (una forma no-clásica de transporte al núcleo) (Yen et al).
- c.- La piruvato kinasa es transportada al núcleo debido a que es un factor necesario durante las etapas tempranas del ciclo celular, concretamente, en G₁ temprano (START A) (Grandori et al)

Añadir que recientemente (Min-Oo et al) se ha visto como una mutación en la piruvato kinasa protege frente a infección por *Leishmania* en ratones, y entre las causas se ha planteado que sea como consecuencia de una alteración de la membrana del eritrocito.

Gliceraldehido 3 Fosfato Dehidrogenasa (TDH3)

Esta enzima da inicio a la *segunda fase* dentro de la glucólisis. Forma un tetrámero que cataliza la siguiente conversión:



Sobre la TDH vamos a comentar tres datos que nos son de interés:

- Como monómero ha sido localizada en el núcleo celular donde presenta actividad Uracil DNA glicosilasa (UDG) (Meyer-Siegler et al).
- Se encuentra en la superficie del estafilococo como proteína receptora de transferrina (Modun et al).
- En *Streptococcus pneumoniae* es una proteína de unión de plasminógeno de la superficie (Bergmann et al)
- Es una de las proteínas de la superficie celular de *Candida albicans* que une plasminógeno humano (Crowe et al)
- Experimentos parecidos a los efectuados por nuestro grupo con la Eno2p fueron realizados construyendo proteínas de fusión con Suc2 intracelular y la Tdh3 de *Candida albicans* en levadura. La conclusión en este trabajo es que los 166 aminoácidos del extremo N-terminal son suficientes para la exportación (Delgado et al)

Fosfoglicerato kinasa

Cataliza la interconversión del 1-3 Bifosfoglicerato en 3-Fosfoglicerato.

Se ha encontrado en la pared celular de *Candida albicans* (*Alloush et al*) donde además se le ha visto unir plasminógeno humano (Crowe et al).

Fructosa Bifosfato Aldolasa (FBA)

Cataliza el final de la *primera fase* de la glucólisis (fructosa 1,6 bifosfato a glicerona fosfato y gliceraldehido 3-fosfato). Además de unir plasminógeno humano en la superficie celular de *Candida albicans* (Crowe et al) juega un papel importante en las infecciones de *Streptococcus pyogenes* como proteína de unión a fibronectina (Terao et al)

Enolasa

Capítulo aparte merece esta proteína puesto que ha sido escogida por este laboratorio como enzima glucolítica (cataliza la conversión del 2-Fosfoglicerato en Fosfoenolpiruvato con la liberación de una molécula de agua) de referencia en el abordaje de la parte experimental.

Ha sido encontrada en la pared celular de *Saccharomyces cerevisiae* ((Edwards et al) así como en *Candida albicans*, donde se ha visto que es capaz de unir plasminógeno, lo que potencia la invasión de *Candida* en las células endoteliales microvasculares del cerebro humano (Jong et al).

Además de en *Candida*, también se ha visto que une plasminógeno en la superficie celular de *Streptococcus pyogenes* y *S.pneumoniae* ((Pancholi and Fischetti), (Bergmann et al), (Derbise et al); en patógeno oportunitista *Pneumocystis carinii* (Fox and Smulian); y también se ha detectado su expresión en la superficie de células del tejido conectivo de humanos con ciertos desórdenes (Moscato et al).

En cuanto a otras localizaciones extracelulares cabe citar las evidencias de localización nuclear en *Toxoplasma gondii* en fases activas de replicación del parásito.

Características de la Enolasa

Saccharomyces cerevisiae tiene dos enolasas diferentes codificadas por dos genes distintos que presentan un 94% de homología de secuencia nucleotídica: *eno1* cuya información se encuentra almacenada en el cromosoma VII de la levadura y por otro lado está el gen *eno2*, situado en el cromosoma VIII.

La proteína en la que centraremos nuestro estudio es la Eno2p debido a que en la inmensa mayoría de los trabajos que hemos venido refiriendo la enolasa encontrada en la superficie celular es la Eno2p.

El gen de la enolasa

El gen de la enolasa (*eno2* YHR174W | ENO2 | P00925) es uno de los 3631 genes conocidos en levadura. Con 1314 nt de longitud, está situado en el cromosoma VIII de *Saccharomyces cerevisiae*, entre las coordenadas **451325** a **452638** (**Figura 3**). Con un porcentaje contenido de C-G del 47.6% (B1). Se trata de un gen **esencial**, es decir, la delección impide el crecimiento de la levadura. El producto del gen *eno2* se encarga de catalizar la interconversión del

Legend:

- Translation, ribosomal structure and biogenesis
- Transcription
- DNA replication, recombination and repair
- Cell division and separation
- Post-translational modification, protein turnover
- Cell envelope biogenesis, outer membrane
- Cell motility and secretion
- Inorganic ion transport and metabolism
- Signal transduction mechanisms
- Energy production and conversion
- Carbohydrate transport and metabolism
- Amino acid transport and metabolism
- Nucleotide transport and metabolism
- Secondary metabolites biosynthesis, transport and catabolism
- General function prediction only
- Function unknown
- No COG match

Figura 3. Representación gráfica del cromosoma VIII de *S.cerevisiae* entre 426324..476323 estraída de COG en el NCBI.

La secuencia proteica: estructura primaria

La estructura primaria es la secuencia de los aminoácidos de la enolasa.

Con una secuencia de 436 aminoácidos (sin contar la metionina inicial), alcanza un peso molecular de 46.782,9 Da. El punto Isoeléctrico teórico es de 5,67. El número y porcentaje de cada aminoácido de la secuencia es el que viene en la **tabla 1**.

El número total de aminoácidos con carga negativa (Asp + Glu) es de 59, mientras que los de carga positiva (Arg + Lys) son 49.

La vida media teórica estimada (Backhaus et al) de la proteína en levadura es de 20 horas.

Aa - Hº	Porcentaje
Ala (A)	13.30%
Leu (L)	8.70%
Gly (G)	8.00%
Lys (K)	8.00%
Val (V)	8.00%
Asp (D)	6.90%
Ser (S)	6.90%
Glu (E)	6.40%
Asn (N)	4.80%
Ile (I)	4.60%
Thr (T)	4.60%
Phe (F)	3.40%
Arg (R)	3.20%
Pro (P)	3.00%
His (H)	2.30%
Tyr (Y)	2.30%
Gln (Q)	2.10%
Met (M)	2.10%
Trp (W)	1.10%
Cys (C)	0.20%
Asx (B)	0.00%
Glx (Z)	0.00%
Xaa (X)	0.00%

Tahla 1

Las propiedades de los residuos de la enolasa, es decir, su hidrofobicidad, polaridad, carga, etc quedan representados gráficamente en la **figura 4**.

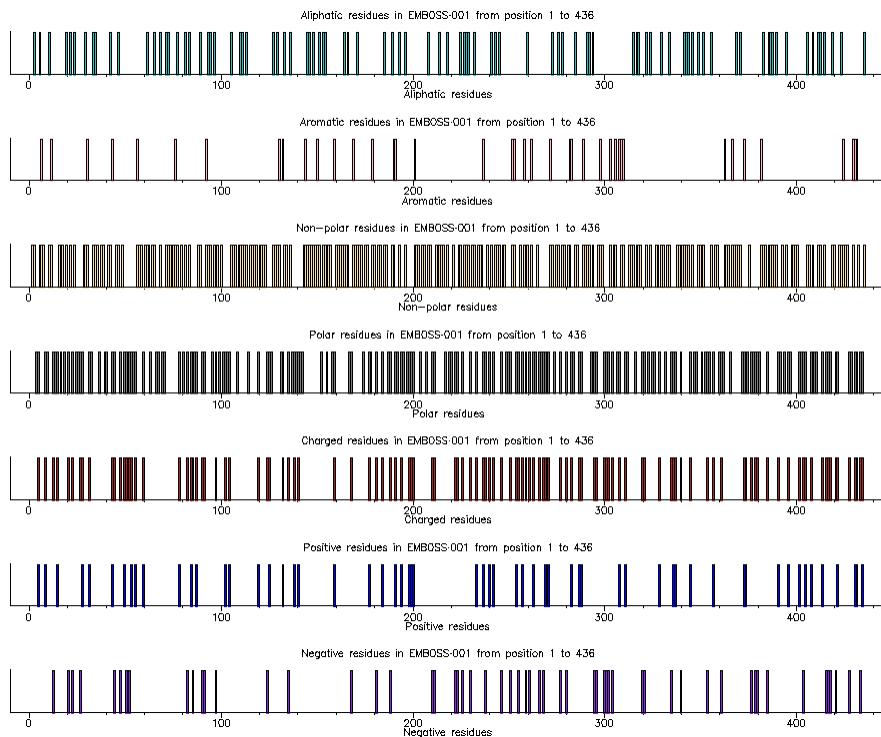


Figura 4. Representación gráfica generada por pepinfo (B2). Se representan a lo largo de la secuencia aminoacídica la distribución de residuos alifáticos, aromáticos, no-polares, polares, con carga, con carga positiva y con carga negativa.

Estructura secundaria

Los aminoácidos, mientras están siendo sintetizados y en función de la capacidad de giro del tipo de enlace, van adquiriendo una disposición espacial estable: la estructura secundaria. La enolasa de *S. cerevisiae* se encuentra cristalizada y a partir de la información contenida en dos de los archivos 4ENL.pdb y 2ONE.pdb almacenados en *The Protein Data Bank* (y que más adelante comentaremos más ampliamente), la enolasa se compone de 16 hélices alfa, 14 hélices beta y 31 regiones de giro (**figura 5**).

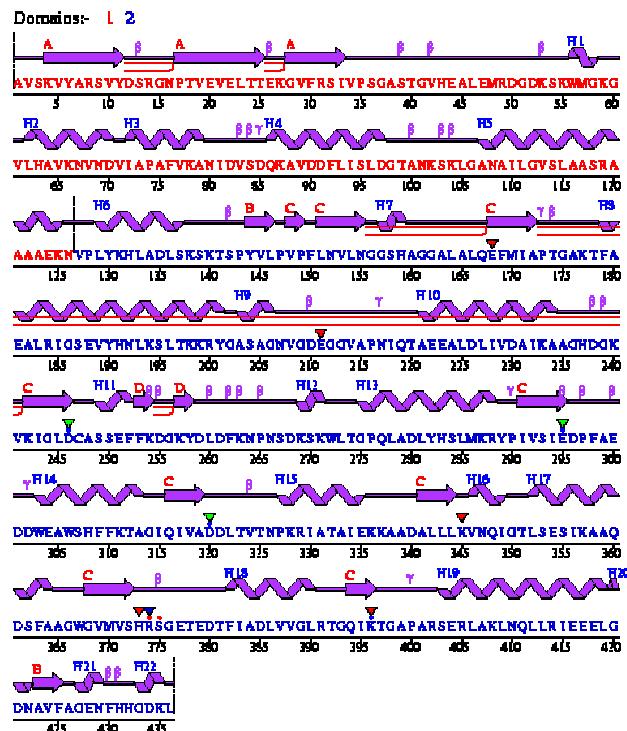


Figura 5. Representación gráfica de la estructura secundaria de la enolasa procedente de PDBSum

La estructura terciaria y cuaternaria de la Enolasa

Los 436 aminoácidos que constituyen la secuencia de la enolasa se disponen estructuralmente tal y como se representa en la **figura 6a**. Son numerosas las estructuras almacenadas en *The Protein Data Bank* pertenecientes a la enolasa de *S. cerevisiae* (3ENL, 4ENL, 5ENL, 6ENL, 7ENL, 1NEL, 1ELS, 1EBG, 1EBH, 1ONE, 2ONE, 1L8P).

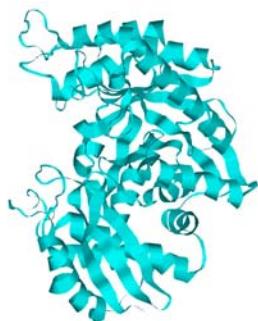
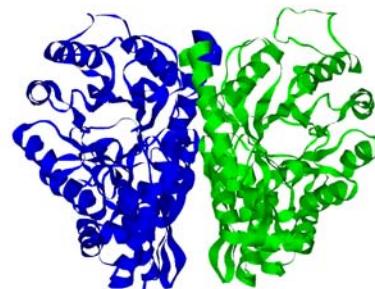


Figura 6. a. Monómero de Eno2p (4ENL.pdb)



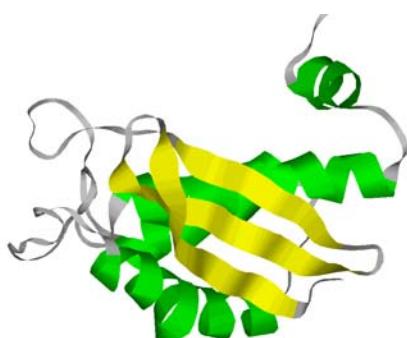
b. Dímero de Eno2p (2ONE.pdb)

Del análisis estructural y de la información procedente de las bases de clasificación de estructuras CATH (*Protein Structure Classification*) y SCOP (*Structural Classification of Proteins*), la estructura de la enolasa se divide en dos dominios principales (**figura 7**), que describimos a continuación:



Figura 7. Dominios de la Eno2p. En cian el C_terminal y en naranja el N_terminal.

Dominio Enolasa_N-terminal (aminoácidos 1 a 126)



Dominio de la clase alfa + beta proteína, con una **arquitectura** denominada de “**2-Layer Sandwich**” (**figura 8**). El **plegamiento** es **alfa(3) + beta(3)**: comenzando por el extremo N-terminal existen tres hojas **beta** dispuestas de forma **paralela**, tras las cuales nos continúan las **hélices alfa**.

Figura 8. Dominio N_terminal. En amarillo las hélices beta y en verde las alfa.

Dominio Enolasa_C-terminal (aminoácidos 146-436)

Esta región de la proteína pertenece a la clase **Alpha-Beta**, con una arquitectura en **barril**, concretamente de topología **TIM-Barrel**. Es la más común de todas las estructuras terciarias conocidas (aproximadamente el 10% de todas las enzimas conocidas la adoptan) (Farber and Petsko), incluido en levadura, donde es abrumadoramente la ‘top-fold’ en el proteoma (Jansen and Gerstein). Consiste en 8 hélices *beta* dispuestas paralela y concentricamente, como si de un barril se tratara (**figura 9**). Este grupo de hojas beta son hidrofóbicas, alrededor de las cuales se disponen 8 hélices *alfa*, que se van a encargar de proteger este *núcleo* central hidrofóbico (de hecho, la cara de las hélices que contacta con el *núcleo* es también hidrofóbica).

A pesar de la gran cantidad de proteínas que presentan este tipo de estructura, es muy diverso el rango de funciones que son capaces de realizar. De

hecho se ha visto como la sustitución de un aminoácido puede provocar promiscuidad funcional (Schmidt et al). Muchos son los trabajos que señalan a estos dominios para emplearlos en el diseño proteico (Vega et al), (Gerlt and Raushel).

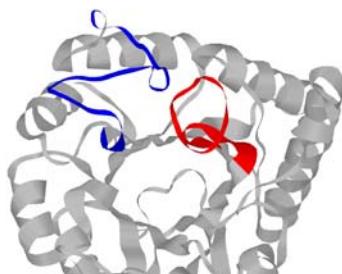


Figura 10. Detalle de los loops catalíticos.
Rojo: Val153-Phe169. Azul: Ser250-Gln270

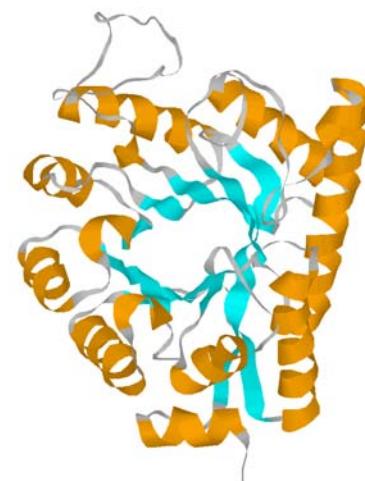


Figura 9. Dominio C-terminal. En cián las b-hélices. En naranja las alfa-hélices y en verde las alfa.

Con respecto a la **estructura cuaternaria**, dos monómeros (Zhang et al) de la enolasa se asocian para constituir un homodímero que constituye una unidad cristalográfica asimétrica (**figura 6b**). Las dos subunidades son similares, aunque su superposición resulta en una pequeña distancia entre los C_{α} de 0.91 Å, siendo la excepción los *bucles* catalíticos (Val153-Phe169 y Ser250-Gln270), que es de 4 Å (**figura 10**) (Zhang et al).

La enolasa requiere como cofactor al Magnesio para poder estabilizarse y llevar a cabo su reacción catalítica. Los aminoácidos que forman parte del **centro activo** de la enolasa (es decir, gozan directamente de algún papel catalítico), son His159, Glu168, Glu211, Asp246, Glu295, Asp320 y Lys345, todos ellos en el dominio C-terminal (**figura 11**). Por parte del dominio N-terminal forma parte del centro activo la Ser39, cuya mutación altera las propiedades catalíticas de la Enolasa (Brewer et al), (Poyner et al). Aunque también hay que apuntar que existen otros elementos que forman parte de la reacción catalítica, como es el caso de una molécula de agua (Lebioda and Stec), lo que conllevó a sugerir que la His373 está involucrada en el proceso catalítico (Brewer et al).

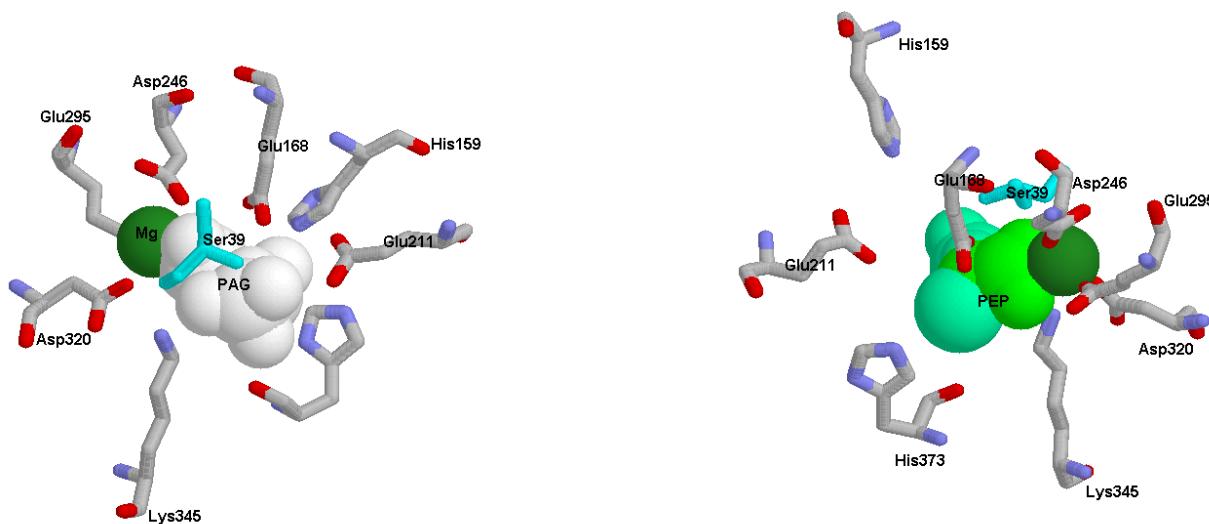


Figura 11. Representación de los aminoácidos del Centro Activo y su posición en cada uno de las dos monómeros que forman el homodímero de Eno2p y visualizado con **RasMol**. Todos los aminoácidos han sido representados como *sticks* y coloreados en CPK (excepto la Ser39 en cian). El sustrato PGA (2-fosfo-D-glicerato) coloreado en blanco y el producto PEP (fosfoenolpiruvato) en verde, ambos visualizados como *Spacefill*

Modificaciones Post-Tradiccionales de Eno2p

La enolasa es una proteína en la que han sido descritas varias modificaciones post-tradiccionales (**figura 12**)

- Fosforilación

Los aminoácidos en los que se encuentra unido covalentemente un grupo fosfato son, por un lado la Thr378, Thr323 ó Thr325 y Ser249 ó Ser250 (no se puede asegurar el sitio exacto de la modificación puesto que en ambos casos, mediante espectrometría de masas era imposible distinguir cual de las dos treoninas y serinas era la modificada, ya que se encontraban en el mismo péptido). La identificación de la enolasa fosforilada fue mediante una aproximación sistemática (Zhou et al). Por otro lado (Ficarro et al) encontraron fosforilada la Ser9 también como consecuencia de una aproximación sistemática.

- Ubiquitinación

La adicción de ubiquitina (polipéptido de 76 aminoácidos) a un residuo de lisina específico (Hitchcock et al). En este trabajo se encontró la Eno2p ubiquitinada junto con otras 210

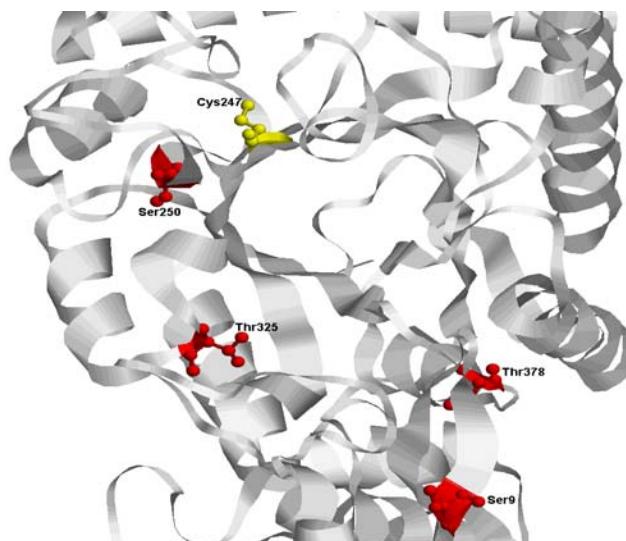


Figura 12. Eno2p representada como *ribbons*. Los aminoácidos que se fosforilan han sido representados como *ball & stick* en rojo. En amarillo la cys247

proteínas, todas ellas aisladas en la fracción de membrana de *S.cerevisiae*, como consecuencia de una mutación en la maquinaria de degradación asociada a membrana (ERAD). Estas proteínas fueron señaladas como potenciales sustratos de esta maquinaria.

- Tiolación

Adición covalente de un grupo tilo (-SH) a la cisteína. En el caso de la enolasa es Cys247. La Eno2p se tiolizó, junto con otras enzimas glucolíticas (Tdh3, Fba1) en *S. cerevisiae* en respuesta a estrés oxidativo. La tiolación inhibe la actividad de la Eno2p y también su expresión genética (igual en Tdh3) (Shenton and Grant).

Descripción de Proteínas Glucolíticas de interés

Piruvato quinasa (PYK1)

500 residuos que alcanzan un peso molecular de 54.533 Da. Cataliza el último paso de la glucólisis catalizando la siguiente interconversión:

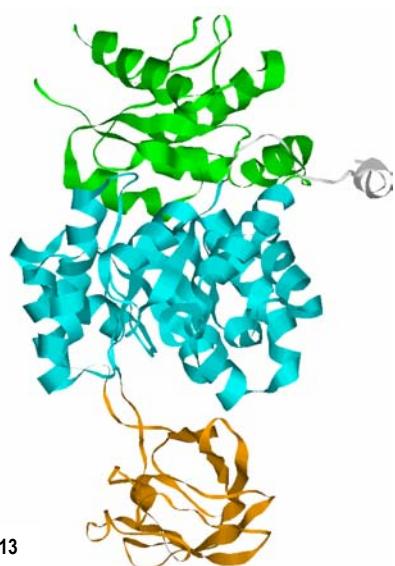


Figura 13

La estructura de la proteína en *S. cerevisiae* ha sido determinada en varias ocasiones. Nosotros elegimos 1A3X.pdb. Esta interesante proteína cuenta con tres dominios:

Dominio Central TIM BARREL (19-87, 190-355)
De las mismas características que el dominio C-terminal de la enolasa (clase *alfa-beta*, y arquitectura de barril). En la figura 13 está coloreado en cián. Entre los aminoácidos 87 a 190 sufre una “interrupción” en su estructura para formar el siguiente dominio:

Dominio Piruvato quinasa (88-189)
Estructura de clase **principalmente beta**. Se encuentra coloreado en naranja en la figura 13-

Dominio Fosfotransferasa C-terminal (356-500)
Es un dominio **fosfotransferasa** de la clase *alfa-beta*, arquitectura “3-Layer Sandwich” y topología *Plegue de Rossmann*.

Modificaciones Post-traduccionales: fosforilación de la Thr184 y Ser192 (Zhou et al)

Fructosa Bifosfato Aldolasa (FBA1 ó Aldolasa)

Proteína de 358 aa y 39.489 Da. Cataliza la siguiente interconversión:



La estructura de la proteína corresponde a *S. cerevisiae* pero utilizaremos como referencia, con la entrada 1ZEN.pdb (figura 14)

Dominio TIM-Barrel (1-287)

Presenta este dominio en la parte amino terminal de su secuencia, con las características y a vistas en la piruvato quinasa y en la enolasa.

Región PGA1_C-terminal (288-356)

Dos alfa-hélices del extremo aminoterminal que sobresalen del TIM-barrel del comienzo de la secuencia.

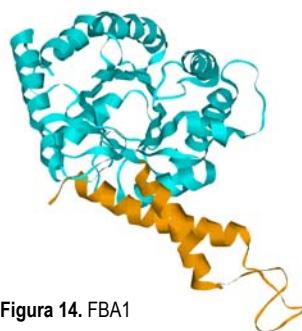


Figura 14. FBA1

Gliceraldehido 3-fosfato dehidrogenasa (TDH3 - GAPDH)

Proteína de 331 aminoácidos (aa) y peso molecular de 35.715 Da que cataliza la siguiente reacción:

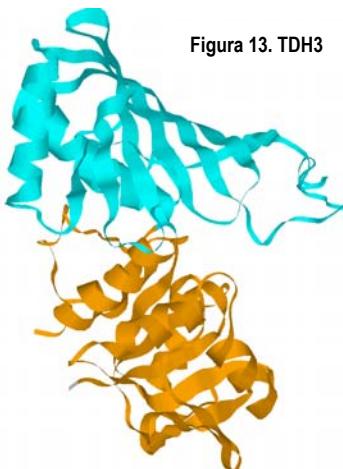
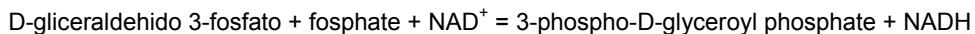


Figura 13. TDH3

La estructura de la proteína fue determinada aunque para la TDH3 de *Escherichia coli* y se encuentra almacenada en *The Protein Data Bank* con el código 1GAD (Duee et al). Consta de los siguientes dominios (figura14):

GAPDH_N-terminal (1-147 + 314-330)

Es un dominio **Rossmann-like de unión a NAD(P)** de la clase **alfa-beta**, arquitectura "**3-Layer Sandwich**" y topología **Pliegue de Rossmann** (según CATH). En la figura 13 está coloreado en naranja.

GAPDH_C-terminal (148-313)

Dominio **holo-D-gliceraldehido-3-fosfato-dehidrogenasa**, de la clase **alfa-beta**, pero de arquitectura "**2-Layer Sándwich**". Coloreado en cián en la figura 14.

Las **modificaciones post-traduccionales** descritas para esta proteína son la **S-tiolación** de las cisteínas en respuesta a estrés oxidativo (Grant et al), (Shenton and Grant); 4 sitios de **fosforilación**: Ser145; Thr150 ó Thr151; Thr208; Ser318 ó Thr319 (Zhou et al).

3 - Fosfoglicerato kinasa (PGK1)

415aa y 44.607 Da. Cataliza la siguiente interconversión:



En cuanto a los dominios que podemos encontrar en esta proteína, basándonos en el archivo 3PGK, que pertenece a *E.coli* (**figura 14**):

Fosfotransferasa N-terminal (1-184)

Es un dominio **fosfotransferasa (carboxil acceptor)** que al igual que TDH3, es de la clase *alfa-beta*, arquitectura “**3-Layer Sandwich**” y topología *Pliegue de Rossmann* (según CATH).

Fosfotransferasa C-terminal (185-415)

Es igual que su extremo n-terminal pero de mayor tamaño.

Las **modificaciones post-traduccionales** que presenta esta proteína son:

- **Fosforilación:** en los residuos thr92, thr248, ser317, ser113, ser412 (Zhou et al)
- **Acetilación** del extremo N-terminal (Polevoda et al)



Figura 14. Pgk1.

ANÁLISIS DE SECUENCIA

En análisis se ha centrado en el empleo de algoritmos de búsqueda de homólogos remotos de Eno2p (PSI-BLAST, SAM), junto con la búsqueda global de dominios y motivos funcionales (PRODOM, BLOCKS, PFAM) con la secuencia de Eno2p.

Se utilizó preferentemente como base de datos no redundante **Swiss-Prot**. A continuación mostramos los resultados que consideramos de más interés, especificando los parámetros de búsqueda seleccionados.

PSI-BLAST

Parámetros de búsqueda: BLOSUM62, valor esperado (**expect**) 10, inclusión de umbral (**inclusion threshold**) 0.005 y un rango de valor esperado de entre 0.001 – 60. Bases de datos (bd): todos los organismos.

Código NCBI/Swiss-Prot	Nombre	score	e-value
gi 14423744 sp P58187 LPXK_RICRI	Tetraacyldisaccharide 4'-kinase	33	0.88
gi 32171630 sp Q8DGC8 SAHH_SYNEL	Adenosylhomocysteinase	33	1.5
gi 20532159 sp Q92GN1 LPXK_RICCN	Tetraacyldisaccharide 4'-kinase	33	1.9
gi 14423743 sp P58186 LPXK_RICMO	Tetraacyldisaccharide 4'-kinase	32	2.9
gi 2497907 sp Q40256 MT3_MUSAC	Metallothionein-like protein type	32	3.5
gi 1706723 sp P54521 EX7L_BACSU	Probable exodeoxyribonuclease VI	32	3.6
gi 6094235 sp P74008 SAHH_SYNY3	Adenosylhomocysteinase	32	3.8
gi 17433724 sp Q02551 FLAA_LISMO	Flagellin	33	0.89
gi 730220 sp P40149 OXC_OXAFO	Oxalyl-CoA decarboxylase	35	0.23
gi 21362929 sp Q975T0 SAHH_SULTO	Adenosylhomocysteinase	43	0.001
gi 6094230 sp O27673 SAHH_METTH	Adenosylhomocysteinase	43	0.001
gi 6094232 sp O58275 SAHH_PYRHO	Adenosylhomocysteinase	42	0.004
gi 18266886 sp P50251 SAHH_PYRFU	Adenosylhomocysteinase	41	0.005

BLOSUM45, expect 100, inclusion threshold 0.001. Bd: todos los organismos

Código NCBI/Swiss-Prot	Nombre	score	e-value
gi 14423744 sp P58187 LPXK_RICRI	Tetraacyldisaccharide 4'-kinase...	33	1.0
gi 32171630 sp Q8DGC8 SAHH_SYNEL	Adenosylhomocysteinase	32	2.1
gi 20532159 sp Q92GN1 LPXK_RICCN	Tetraacyldisaccharide 4'-kinase	32	2.2
gi 6094235 sp P74008 SAHH_SYNY3	Adenosylhomocysteinase	32	3.3
gi 17865725 sp P24517 RADA_SALTY	DNA repair protein radA	31	5.5
gi 38372861 sp Q91AV2 R1AB_PEDV7	Replicase polyprotein 1ab	30	8.7
gi 1171935 sp P80324 OXDA_RHOTO	D-amino acid oxidase (DAMOX)	30	9.9
gi 38372839 sp Q8TCB6 OXE1_HUMAN	Olfactory receptor 51E1	30	12
gi 134579 sp P24554 RADA_ECOLI	DNA repair protein radA	30	13
gi 1708629 sp P50844 KDGR_BACSU	HTH-type transcriptional regulat...	30	13
gi 22654000 sp Q98MB7 PYRH_RHIL0	Uridylate kinase (UK)	30	14
gi 30580412 sp O94281 KC2C_SCHPO	Probable casein kinase II beta	30	14
gi 2497907 sp Q40256 MT3_MUSAC	Metallothionein-like protein type 3	29	16
gi 33301671 sp Q816T0 SYL_BACCR	Leucyl-tRNA synthetase	29	17
gi 42559828 sp Q8K2L8 TTCF_MOUSE	Tetratricopeptide repeat protein	29	18
gi 14548050 sp Q9X1M5 FLGI_THEMEA	Flagellar P-ring protein precursor	29	22
gi 5915881 sp Q43931 CATB_ACICA	Muconate cycloisomerase I	29	23
gi 26400896 sp Q8PBCT1 TRMD_XANCP	M1G-methyltransferase	28	28
gi 31076745 sp Q96UX5 HS78_CANAL	Heat shock protein 78	28	32
gi 2498209 sp Q08032 CC45 YEAST	Cell division control protein 45	28	32
gi 12644130 sp P15924 DESP_HUMAN	Desmoplakin (DP)	28	34
gi 2497616 sp Q61805 LBP_MOUSE	Lipopolysaccharide-binding protein	28	34
gi 33301675 sp Q81KK6 SYL_BACAA	Leucyl-tRNA synthetase	28	35
gi 11386753 sp Q9V419 CSA5_DROME	Probable cytochrome P450	28	36
gi 37999827 sp Q9Y5F7 CDGL_HUMAN	Protocadherin gamma C4 precursor	28	36
gi 29337024 sp Q8DH61 SYL_SYNEL	Leucyl-tRNA synthetase	28	38
gi 14194693 sp Q9PQ74 DP3A_UREPA	DNA polymerase III alpha subunit	28	41
gi 2495720 sp Q92609 TBC5_HUMAN	TBC1 domain family member 5	28	41
gi 37999826 sp Q9Y5F6 CDGM_HUMAN	Protocadherin gamma C5 precursor	28	41
gi 37999830 sp Q9Y5G0 CDGH_HUMAN	Protocadherin gamma B5 precursor	28	44
gi 37999832 sp Q9Y5G2 CDGE_HUMAN	Protocadherin gamma B2 precursor	27	53

gi 37999839 sp Q9Y5G9 CDG4_HUMAN	Protocadherin gamma A4 precursor	27	53
gi 37999843 sp Q9Y5H3 CDGA_HUMAN	Protocadherin gamma A10 precursor	27	53
gi 1706087 sp P21595 CP56_YEAST	Cytochrome P450-DIT2	27	54
gi 37999841 sp Q9Y5H1 CDG2_HUMAN	Protocadherin gamma A2 precursor	27	54
gi 13431474 sp Q9HM33 DP2L_THEAC	DNA polymerase II large subunit	27	55
gi 126063 sp P00343 LDH_LACCA	L-lactate dehydrogenase (L-LDH)	27	56
gi 13431669 sp Q05096 MY1B_RAT	Myosin Ib (Myosin I alpha)	27	58
gi 39932396 sp Q8DNM8 TRPB_STRR6	Tryptophan synthase beta chain	27	60
gi 2833236 sp Q12737 BLRO_MYRVE	Bilirubin oxidase precursor	27	60

BLOSUM62, inclusion threshold 0.001, expect 100, bd: *Saccharomyces cerevisiae*

Código NCBI/Swiss-Prot	Nombre	score	e-value
gi 731756 sp P38873 YHY6_YEAST	Hypothetical 175.8 kDa Trp-Asp	25	2.6
gi 729984 sp P29952 MANA_YEAST	Mannose-6-phosphate isomerase	25	3.4
gi 3122379 sp Q06005 LIPB_YEAST	Lipoate-protein ligase, mitochondrial	25	4.4
gi 728959 sp P39960 BEM2_YEAST	GTPase activating protein BEM2/IPL2	24	5.6
gi 2492680 sp Q99186 APM4_YEAST	Adaptin medium chain homolog APM4	24	6.9
gi 731674 sp P38713 OSH3_YEAST	Oxysterol-binding protein homolog 3	23	13
gi 730864 sp P32573 SP19_YEAST	Sporulation protein SPS19 (Sporul...	23	14
gi 728821 sp P39010 AKR1_YEAST	Ankyrin repeat-containing protein	23	16
gi 3025214 sp Q06567 YL53_YEAST	Hypothetical ABC1 family protein	23	18
gi 123634 sp P22202 HS74_YEAST	Heat shock protein SSA4	22	22
gi 1170924 sp P21651 MER2_YEAST	Meiotic Recombination 2 Protein	22	23
gi 1171739 sp P46970 NMD5_YEAST	Nonsense-mediated mRNA decay	22	29
gi 2498506 sp Q12446 LA17_YEAST	Proline-rich protein LAS17	22	30
gi 123635 sp P11484 HS75_YEAST	HEAT SHOCK PROTEIN SSB1	22	32
gi 549760 sp P35995 YKW2_YEAST	Putative 82.2 kDa transcriptional	22	33
gi 729768 sp P40150 HS76_YEAST	HEAT SHOCK PROTEIN SSB2	22	33
gi 586545 sp P38111 ESR1_YEAST	ESR1 protein	22	34
gi 728860 sp P32629 ANP1_YEAST	Mannan polymerase II complex ANP1	22	34
gi 18266811 sp P11710 FUS1_YEAST	Nuclear fusion protein FUS1	22	35
gi 1168395 sp P46680 AIP1_YEAST	Actin interacting protein 1	22	37
gi 464650 sp P33753 RNC1_YEAST	Endo-exonuclease NUCR	22	38
gi 121575 sp P16474 GR78_YEAST	78 Kd Glucose-Regulated Protein	22	42
gi 3122964 sp Q08686 THTR_YEAST	Putative thiosulfate sulfurtrans...	22	42
gi 1710402 sp P49723 RIR4_YEAST	Ribonucleoside-diphosphate reduc...	22	45
gi 2507385 sp P32457 CDC3_YEAST	Cell division control protein 3	21	46
gi 2497195 sp Q05021 TAF7_YEAST	Transcription initiation factor	21	52
gi 729914 sp P38703 LAG1_YEAST	Longevity-assurance protein 1	21	52
gi 128831 sp P08466 NUC1_YEAST	Mitochondrial nuclease	21	53
gi 401643 sp Q02206 RSC4_YEAST	Chromatin structure remodeling co...	21	53
gi 730893 sp P38967 TAT2_YEAST	Tryptophan permease	21	54
gi 1706485 sp P54861 DNM1_YEAST	Dynamin-related protein DNM1	21	70
gi 2498961 sp Q03446 SSH5_YEAST	SSH5 PROTEIN	20	79
gi 464348 sp P33760 PEX6_YEAST	Peroxisome biosynthesis protein P...	20	79
gi 2498628 sp Q12216 NF11_YEAST	NF11 protein	20	80
gi 2498863 sp Q02983 RRN5_YEAST	RNA polymerase I specific trans...	20	82

PSI-BLAST de los 140 aminoácidos del extremo N-terminal de Eno2p.

Parámetros: Blosum45, threshold 0.001, expect 100. Bd. *S. cerevisiae*

Código NCBI/Swiss-Prot	Nombre	score	e-value
gi 399368 sp P31116 DHOM_YEAST	Homoserine dehydrogenase (HDH)	25	2.6
gi 729984 sp P29952 MANA_YEAST	Mannose-6-phosphate isomerase	24	4.2
gi 2498506 sp Q12446 LA17_YEAST	Proline-rich protein LAS17	23	8.3
gi 728959 sp P39960 BEM2_YEAST	GTPase activating protein BEM2/IPL2	23	9.0
gi 1176003 sp P43602 YFJ2_YEAST	Hypothetical 79.7 Kd Protein In	23	9.0
gi 2501437 sp Q06624 RHC31_YEAST	DNA damage tolerance protein RHC	23	13
gi 731674 sp P38713 OSH3_YEAST	Oxysterol-binding protein homolog 3	23	13
gi 2501739 sp Q05854 YL78_YEAST	Putative transcriptional regulat...	22	14
gi 2492680 sp Q99186 APM4_YEAST	Adaptin medium chain homolog APM4	22	15
gi 731756 sp P38873 YHY6_YEAST	Hypothetical 175.8 kDa Trp-Asp re...	22	16
gi 728821 sp P39010 AKR1_YEAST	Ankyrin repeat-containing protein...	22	17
gi 33860190 sp Q00402 NUM1_YEAST	Nuclear migration protein NUM1	22	18
gi 2506501 sp P32580 SUV3_YEAST	ATP-dependent RNA helicase SUV3...	22	18

gi 1346384 sp P47042 KJF7_YEAST	Probable serine/threonine-protein kinase	22	19
gi 3122964 sp Q08686 THTR_YEAST	Putative thiosulfate sulfurtransferase	22	19
gi 13626379 sp Q08225 DPP3_YEAST	Probable dipeptidyl-peptidase I-like protein	22	20
gi 1171092 sp P36006 MYS3_YEAST	Myosin-3 isoform	22	25
gi 2506979 sp P32770 NRP1_YEAST	Asparagine-rich protein	22	25
gi 549641 sp P36163 YK67_YEAST	Hypothetical 35.8 Kd Protein In P...	22	27
gi 1350603 sp P23796 RIT1_YEAST	tRNA A64-2'-O-ribosylphosphate t...	22	27
gi 1170924 sp P21651 MER2_YEAST	Meiotic Recombination 2 Protein	22	28
gi 3025214 sp Q06567 YL53_YEAST	Hypothetical ABC1 family protein	22	28
gi 2497195 sp Q05021 TAF7_YEAST	Transcription initiation factor ...	22	30
gi 549760 sp P35995 YKW2_YEAST	Putative 82.2 kDa transcriptional...	21	31
gi 123635 sp P11484 HS75_YEAST	HEAT SHOCK PROTEIN SSB1	21	31
gi 1168395 sp P46680 AIP1_YEAST	Actin interacting protein 1	21	32
gi 2498209 sp Q08032 CC45_YEAST	Cell division control protein 45	21	34
gi 728860 sp P32629 ANP1_YEAST	Mannan polymerase II complex ANP1	21	34
gi 729768 sp P40150 HS76_YEAST	HEAT SHOCK PROTEIN SSB2	21	34
gi 1169289 sp P43550 DAK2_YEAST	Dihydroxyacetone kinase 2	21	35
gi 586342 sp P38321 YB75_YEAST	Hypothetical 101.2 kDa protein in...	21	37
gi 1171704 sp P34077 NI96_YEAST	96 kDa nucleoporin-interacting c...	21	38
gi 731264 sp P39704 ERP2_YEAST	ERP2 protein precursor	21	39
gi 401643 sp Q02206 RSC4_YEAST	Chromatin structure remodeling co...	21	44
gi 140371 sp P25568 YCD8_YEAST	Hypothetical 58.8 Kd Protein In G...	21	45
gi 1352968 sp P47061 YJC9_YEAST	Hypothetical 95.4 Kd Protein In ...	21	45
gi 417773 sp P32259 SIN4_YEAST	Global Transcriptional Regulator ...	21	46
gi 1730711 sp P53973 HDA1_YEAST	Histone deacetylase HDA1	21	46
gi 2497121 sp Q04371 YMR7_YEAST	Hypothetical 54.1 kDa protein in...	21	50
gi 1171739 sp P46970 NM5D_YEAST	Nonsense-mediated mRNA decay pro...21		53
gi 1706252 sp P53691 CYP6_YEAST	Peptidyl-prolyl cis-trans isomer...	21	53
gi 125349 sp P09620 KEX1_YEAST	Carboxypeptidase KEX1 precursor (...)	21	56
gi 121575 sp P16474 GR78_YEAST	78 Kd Glucose-Regulated Protein H...	20	57
gi 730864 sp P32573 SP19_YEAST	Sporulation protein SPS19 (Sporul...	20	58
gi 116351 sp P22516 CHL1_YEAST	CHL1 protein	20	59
gi 1730844 sp P53847 YNZ8_YEAST	Hypothetical 88.1 Kd Protein In ...	20	59
gi 2507385 sp P32457 CDC3_YEAST	Cell division control protein 3	20	61
gi 1709181 sp P50276 MUP1_YEAST	High Affinity Methionine Permease	20	62
gi 128831 sp P08466 NUC1_YEAST	Mitochondrial nuclease	20	63
gi 465515 sp P34221 P2C3_YEAST	Protein phosphatase 2C homolog 3 ...	20	64
gi 116515 sp P22137 CLH_YEAST	Clathrin heavy chain	20	65
gi 140566 sp P25612 AAD3_YEAST	Putative Aryl-Alcohol Dehydrogena...	20	66
gi 549664 sp P36099 YKD0_YEAST	Hypothetical 23.0 Kd Protein In I...	20	68
gi 730745 sp P39928 SLN1_YEAST	Osmolarity two-component system p...	20	70

BLOCKS

Parámetros: **expect 100**

Family	Strand	Blocks	Combined E-value
IPB000941 Enolase	1	7 of 7	1e-182
IPB001354 Mandelate racemase/muconate lactonii	1	2 of 3	0.00016
IPB005012 Daxx protein	1	1 of 16	0.67
IPB003153 Adaptor protein Cbl, N-terminal	1	1 of 7	3.7
IPB002932 Ferredoxin-dependent glutamate synt	1	1 of 15	5
IPB006314 Dyp-type peroxidase	1	1 of 5	7.4
IPB001990 Chromogranin/secretogranin	1	1 of 4	96

PFAM

Los resultados de Pfam para la secuencia de Eno2p son los siguientes:

Domain	Start	End	Bits	Evalue	Alignment	Mode
Enolase_N	1	133	274.20	1.5e-79	Align	ls
Enolase_C	143	434	679.10	2e-201	Align	ls
GARS_B	305	371	-24.80	0.071	Align	ls
MCM	221	233	2.60	0.54	Align	fs

Comentario:

- Los dominios **Enolase_N** y **Enolase_C** son los ya definidos para Eno2p.
- **GARS_B:** entre los aminoácidos 305 a 371 de Eno2p, Pfam encuentra homología con el dominio B de la Fosforibosilglicinamina sintetasa, la cual cataliza la segunda reacción en la biosíntesis *de novo* de la purina. En bacterias es una enzima monofuncional, mientras que en levaduras es una parte, junto con la fosforibosilformilglicinamidina ciclo-ligasa (AIRS), de una enzima bifuncional. En eucariotas superiores es enzima trifuncional.
- **MCM:** entre los aminoácidos 221 al 223. El dominio MCM es encontrado en *ATPases dependientes de DNA* requeridas para la iniciación de la replicación en eucariotas, donde han sido identificados 6 tipos de dominios MCM. En levaduras la mayoría de estos dominios tienen un papel directo en la iniciación de la replicación del cromosoma por interacción directa con secuencias de replicación autónoma (ARS). Fueron llamadas *proteínas de mantenimiento minicromosoma (proteínas MCM)*. En *S. cerevisiae* las proteínas MCM se mueven dentro y fuera del núcleo durante cada ciclo celular. El ensamblaje de los complejos MCM en la levadura en fisión es requerido para la localización, asegurándose que solo los complejos MCM permanecen en el núcleo.

Análisis mediante MAST-MEME

Este algoritmo nos permitirá identificar motivos en común entre un grupo de proteínas seleccionadas. Se han tratado de identificar motivos en común entre Eno2p y ciertas proteínas que hemos recopilado por su posible relación con Eno2p. Estos grupos de proteínas son (tabla2):

- **Interacción:** proteínas que interaccionan con Eno2p.
- **Mb-Fracción:** proteínas aisladas de la fracción de membrana de *S.cerevisiae*.
- **SC-MEM:** proteínas aisladas de la pared celular de *Candida albicans* empleando como medio de cultivo MEM (Urban et al)
- **SC-Levadura:** proteínas aisladas de la pared celular de *Candida albicans* (en medio de cultivo YPD)
- **HSP70:** proteínas *heat shock protein*
- **Miristoiladas:** proteínas miristolidas aisladas en *S. cerevisiae*
- **Palmitoiladas:** proteínas palmitoiladas aisladas en *S. cerevisiae*
- **NCP:** proteínas que utilizan vías de secreción no-clásica

Tabla2.- Conjunto de proteínas seleccionadas frente a las cuales realizar las búsquedas mediante MAST-MEME

Interacción	Mb-Fracción	SC-MEM	SC-Levadura	HSP70	Miristoiladas	Palmitoiladas	NCP
>RN15_YEAST	>Q99325	>YJK0_YEAST	CA1463	CA1463	>SSA1	>ARF1_YEAST	>AKR1_YEAST
>MED7_YEAST	>APGB_YEAST	>MK11_YEAST	P26997	6.79470	>SSA2	>ARF2_YEAST	>GBA1_YEAST
>CCA1_YEAST	>APGD_YEAST	>AGT1_YEAST	013430	P43076	>SSB1	>ARL1_YEAST	>PPOX_YEAST
>YNM7_YEAST	>YM34_YEAST	>MA3T_YEAST	094039	P46598	>SSB2	>CALB_YEAST	>RA81_YEAST
>PINP1_YEAST	>Q12142	>YJG6_YEAST	P41797	U26718		>NC81_YEAST	>RA82_YEAST
>ADB6_YEAST	>Q06604	>YG2K_YEAST	CA4474	P41797		>GBA1_YEAST	>SNC1_YEAST
>Q06148	>CCC1_YEAST	>SLG1_YEAST	6.5819	P87020		>PPZ1_YEAST	>SNC2_YEAST
>YNA6_YEAST	>YKE6_YEAST	>gij14270689	CA4474	6.4386		>PPZ2_YEAST	>GBG_YEAST
>YIJ1_YEAST	>D884_YEAST	>VPS1_YEAST	P46614	6.2580		>PR84_YEAST	>TBA1_YEAST
>ATC6_YEAST	>EM70_YEAST	>APG6_YEAST	6.1349	6.7003		>SIP2_YEAST	>VAC8_YEAST
	>FET5_YEAST	>VP34_YEAST	P16017	P16017		>VAC8_YEAST	>CK12_YEAST
	>GDI1_YEAST	>Q05919	093827	Q9P842		>VP16_YEAST	>YPT1_YEAST
	>HOR7_YEAST	>VPS8_YEAST	P43067	P46273			
	>YIA2_YEAST	>WSC2_YEAST	6.1494	6.893			
	>YNK6_YEAST	>WSC3_YEAST	P16017	6.4310			
	>Q12271	>WSC4_YEAST	Q92211	Q92211			
	>IPT1_YEAST	>YBM4_YEAST	AAB96910	P16017			
	>KIN1_YEAST	>YCE9_YEAST	6.4711	Q9Y7F0			
	>KIN2_YEAST	>YCZ1_YEAST	Q9P835				
	>KTR3_YEAST	>Q12026					
	>KTR6_YEAST	>Q04562					
	>LCB1_YEAST	>YEQ6_YEAST					
	>LCB2_YEAST	>YJN2_YEAST					
	>Q12246	>YN15_YEAST					
	>Q06147	>YN95_YEAST					
	>Q08989						

Los resultados que mostramos a continuación representan la secuencia de Eno2p, el alineamiento con los motivos identificados por MEME-MAST, el *e-value* y un número que identifica el motivo. A continuación enumeramos las proteínas correspondientes a cada motivo.

1.- Eno2p y proteínas implicadas en secreción no clásica.

LENGTH = 436 COMBINED P-VALUE = 1.20e-24 E-VALUE = 2e-23
DIAGRAM: 54-[22]-73-[21]-140-[23]-56-[19]-14-[8]-16-[15]-4

```
[8] FGF1_HUMAN, FGF2_HUMAN  
[23] TAT2, MDLB_SEPU  
[22] IL1B_HUMAN  
[21] TAT2_YEAST  
[19] HMG1_MOUSE  
[15] HMEN_DROME
```

2.- Motivos en común con las HSP70

LENGTH = 437 COMBINED P-VALUE = 1.38e-12 E-VALUE = 6.9e-12
 DIAGRAM: 117-[2]-65-[14]-159

Eno2p y HSP70

```
[2]
3.5e-06
GKKVNDAVITVPAYFNFDSQRQATKDAQTISGLN
+ + + + + + + +
76 AFVKANLDVKDQKAVDDFLSLDGTAKSGLGANAILGVSMAAAARAAAAAKNVPLYQHLADLSKSKTSPYVLPVP

VLRRIINEPTAAAIAYGL
+ + + + + +
151 FLNVLNGGSHAGGALALQEFDIAPTGAKTFAEAMRIGSEVYHNLKSLTKKRYGASAGNVDDEGGVAPNIQTAEEA

[14]
1.5e-21
RKAESHIEWLDSNTTCAKQEFDPQAKELQDAENPIMRKVYUAMGAP
++++++ ++++++ ++++++ ++++++ ++++++ ++++++
226 LDLIVDAIKAAAGHDGKVKGKIGLDCASSEFFKDGYLDKFKNPESDKSKWLTGVELADMYHSLMKRYPIVSIEDPFA
```

[14] SSA1, SSA2, SSB1, SSB2
 [2] SSA1, SSA2, SSB1, SSB2

3.- Proteínas Palmitoiladas de *Saccharomyces cerevisiae*

LENGTH = 437 COMBINED P-VALUE = 2.51e-06 E-VALUE = 3.3e-05
 DIAGRAM: 55-[23]-150-[24]-84-[11]-56-[12]-57

Eno2p y Proteínas Palmitoiladas

```
[23
5e-
KWF
+++]
1 MAVSKVYARSVYDSRGNPTEVELTTEKGVFRSIVPSGASTGVHEALEMRDEDKSCKUMGKVMNAVNINNNVIAA

[24]
1.0e-04
VRDEGGKYN
+ +++
151 FLNVLNGGSHAGGALALQEFDIAPTGAKTFAEAMRIGSEVYHNLKSLTKKRYGASAGNVDDEGGVAPNIQTAEEA

[11]
2.0e-14
DDWEAWGHFF
+++++++
301 EDDWEAWSHFFKTAGIQIVADDLTVTNPARIATAIEKKAADALLKVNQIGTLSESIIAQDSFAANWGVMVSHR

PFQDE
+ +
376 SGETEDTFIADLVVGLRTGQIKTGAPARSERLAKLNQLLRIEELGDKAVYAGENFHGDKL
```

[11] CK12
 [12] AKR1, PPOX
 [23] GBA1
 [24] Ras1, Ras2

HERRAMIENTAS DE PREDICCIÓN

Péptido señal

The SignalP V2.0.b2 (Nielsen et al)

Predice la presencia y localización de la rotura del péptido señal.

Siguiendo las recomendaciones, se insertaron los 180 aminoácidos del extremo N-terminal y con los parámetros por defecto.

Los resultados son:

```
>Eno2p      length = 180
# Measure Position Value Cutoff signal peptide?
max. C     123    0.441  0.33 YES
max. Y     123    0.322  0.32 YES
max. S     115    0.622  0.82 NO
mean S    1-122   0.068  0.47 NO
# Most likely cleavage site between pos. 122 and 123: AAA-AE
```

Los resultados predicen que el sitio más probable de rotura sería entre los aminoácidos 122 y 123.

iPSORT

No predice ni péptido señal, ni señal de mitocondria

Modificaciones Post-traduccionales

- **NMT MyristoylCoA:Protein N-Myristoyltransferase**

Herramienta de predicción de miristoilación N-terminal de proteínas a través de N-miristoiltransferasa. El resultado fue negativo

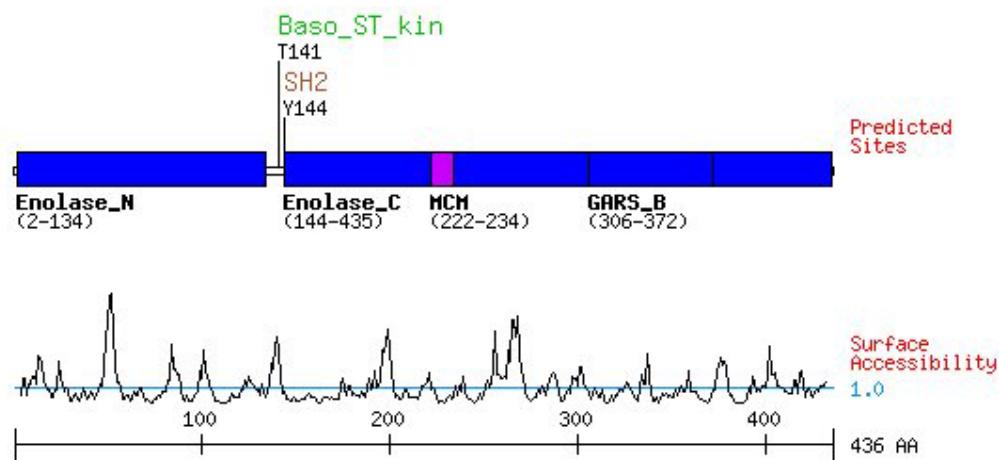
- **big-PI Predictor**

Predicción del sitio de proteínas de anclaje a glicosilfosfatidilinositol. Resultado negativo. (Eisenhaber et al)

- **Motif Scan,**

Identificación de pequeños motivos de secuencia proteica que son reconocidos por dominios de señalización modular, fosforilados por proteínas ser/thr- o tyr/- quinasas o mediante interacciones específicas con proteínas o ligandos fosfolípidos (Obenauer et al)

Con una estringencia alta, los resultados han sido:

**Src homology 2 group (SH2)**

PLC_g C-terminal SH2 Gene Card PLCG1 (1-phosphatidyl-D-myo-inositol-4,5-bisphosphate)
Site Score Percentile Sequence SA
Y144 0.1126 0.010 % SKSKTSPYVLPVPFL 0.704

Basophilic serine/threonine kinase group (Baso_ST_kin)

PKC mu Gene Card PRKCM (Protein Kinase C, mu type (EC 2.7.1.-) (nPKC-mu) (Protein kinase D).
Site Score Percentile Sequence SA
T141 0.2889 0.158 % ADLSKSKTSPYVLPV 2.878

- NetPhos 2.0 Server

Predicción mediante redes neuronales de sitios de fosforilación de serinas, treoninas y tirosinas en proteínas eucarióticas ((Blom et al).

En los resultados de más abajo se detalla la posición de la serina, treonina o tirosina, el contexto de secuencia en la Eno2p y el score

12 sitios de fosforilación en serinas

Posición	Context	Score
9	VYARHSVYDS	0.995
13	SVYDSRGNP	0.987
36	SIVPSGAST	0.613
54	DEDKSKWMG	0.976
139	DLSKSKTSP	0.861
142	KSKTSPYVL	0.995
267	KNPESDKSK	0.914
270	ESDKSKWLT	0.510
293	YPIVSIEDP	0.997
355	TLSESIKAA	0.968
375	VSHRSGETE	0.985
403	APARSERLA	0.918

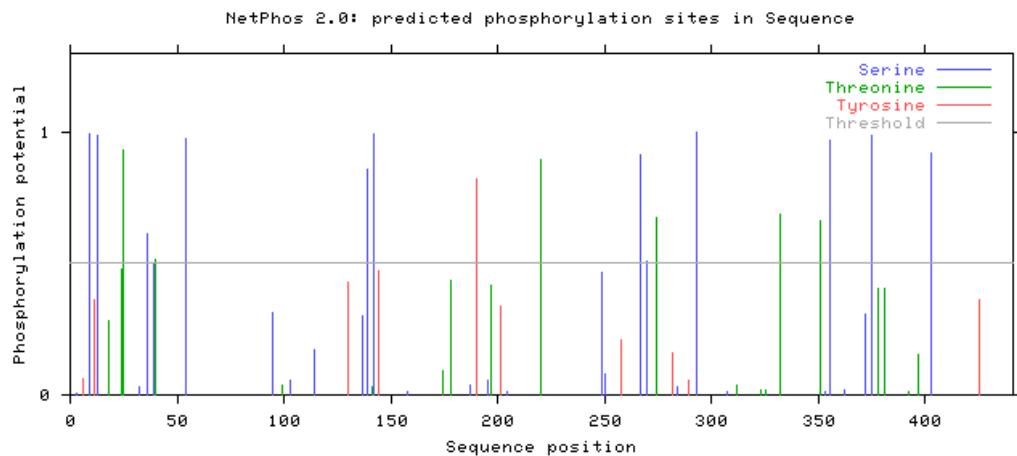
6 sitios de fosforilación en treoninas

Pos	Context	Score
25	VELTTEKGKV	0.931

40	SGASTGVHE	0.514
220	PNIQTAEEA	0.894
274	SKWLTGVEL	0.673
332	ARIATAIEK	0.685
351	NQIGTLSES	0.665

1 sitios de fosforilación en tirosinas

Pos	Context	Score
190	GSEVYHNLK	0.821



- YinYang 1.2

Predicción mediante redes neuronales de sitios de unión de O- β -GlcNAc en proteínas eucariotas.

Se especifica los residuos y la posición en los que la predicción ha sido positiva.

Residue	O-GlcNAc
3 S	++
32 S	+
325 T	+
362 S	+
403 S	++

- **NetNGlyc 1.0 Prediction**

Predicción de posibles sitios de N-glicosilación. Para Eno2p estos fueron los resultados

Position	Potential agreement
16 NPTV	0.7989
101 NKS	0.6727

- **Scan Prosite**

Sitio de predicción de modificaciones post-traduccionales mediante Prosite

Resultados para Eno2p:

> ASN,GLYCOSYLATION	> PKC_PHOSPHO_SITE
Sitios de N-glicosilación	Sitios de fosforilación de la Protein quinasa C
101 - 104 NKS	25 - 27 TeK
> MYRISTYL	197 - 199 TkK
Sitios de Miristoilación	267 - 269 SdK
28 - 33 GVfrSI	355 - 357 SiK
37 - 42 GAstGV	372 - 374 ShR
41 - 46 GVheAL	403 - 405 SeR
60 - 65 GVmnAV	
112 - 117 GVsmAA	> CK2_PHOSPHO_SITE
156 - 161 GGshAG	Sitios de fosforilación de la Casein quinase II
157 - 162 GShaGG	9 - 12 Syd
161 - 166 GGAlAL	178 - 181 TfAE
202 - 207 GAsaGN	220 - 223 TaeE
213 - 218 GVapNI	274 - 277 TgVE
244 - 249 GLdcAS	293 - 296 SieD
275 - 280 GVelAD	332 - 335 TaiE
368 - 373 GVmvSH	351 - 354 TlsE
389 - 394 GLrtGQ	
393 - 398 GQikTG	

HERRAMIENTAS DE PREDICCIÓN DE LOCALIZACIÓN

- **PSORT II**

Para secuencias eucariotas (Horton and Nakai)

k = 9/23

65.2 %: citoplasma
 13.0 %: mitocondria
 13.0 %: nucleo
 4.3 %: membrana plasmática
 4.3 %: peroxisoma

TargetP v1.01 predicts

Herramienta para la predicción de la localización subcelular en proteínas eucariotas asignándola en función de péptido de señal mitocondrial (mTP) péptido señal de la vía de secreción (SP) u otras localizaciones (Emanuelsson et al). Resultados para Eno2p

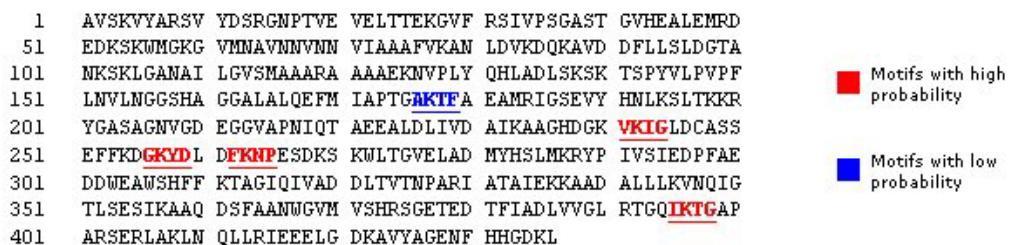
Name	Length	mTP	SP	other
Eno2p	436	0.318	0.040	0.723

mTP (señal mitocondrial): 31.8%
 SP (péptido señal de la vía de secreción): 0.4%
Otras localizaciones 72.3%

OTRAS PREDICCIONES

- SUMOplot™

Puede ayudar a explicar pesos moleculares más elevados de los esperados en geles SDS debido a la unión de proteínas SUMO (*Small Ubiquitin-related Modifier* de 11kDa) a determinados puntos de la secuencia.



1 AVSKWYARSV YDSRGNPTVE VELTTTEKGVF RSIVPSGAST GVHEALEMRD
 51 EDKSKWUMGKG VMNAVNVMVNM VIAAAFWKAN LDVKDQKAVD DFLLSLDGTA
 101 NKSKLGANAI LGVSMAAARA AAAEKNVPLY QHLADLSKSK TSPYVLPPF
 151 LNVLNNGGSHA GGALALQEFM IAPTG**IKTF**A EAMRIGSEVY HNLKSLTKKR
 201 YGASAGNVGG EGGVAPNIQT AEEALDLIVD AIKAAGHDGR **VKIG**LDCASS
 251 EFFKD**GKYL**L DFKNP**E**SDKS KWLTGVELAD MYHSLMKRYP IVSIEDPFAE
 301 DDWEAWSHFF KTAGIQIVAD DLTVTINPARI ATAIEKKAAD ALLLKVNQIG
 351 TLSESIKAAQ DSFAANWGVM VSHRSGETED TFIADLVVGL RTGQ**IKTG**GAP
 401 ARSERLAKLN QLLRIEEELG DKAVYAGENF HHGDKL

Motifs with high probability (red)
 Motifs with low probability (blue)

No.	Pos.	Group	Score	No.	Pos.	Group	Score
1	K396	LRTGQ IKTG APARS	0.7722	4	K254	ASSEF FKDG KYDLD	0.6778
2	K242	GHDGK VKIG LDCAS	0.7556	5	K257	EFFKD GKYL LDFKN	0.6722
3	K263	KYDLD FKNP ESDKS	0.7444	6	K177	IAPTG AKTF AEAMR	0.4444

- The ELM server: predicción de sitios funcionales en proteínas eucariotas

Fuente de predicción de sitios funcionales de proteínas eucariotas. La identificación se lleva a cabo a través de patrones (expresiones regulares). (Punternoll et al)

Sin especificar la localización, para *S. cerevisiae*, los resultados para Eno2p son:

ELM-NOMBRE	Fragmento	Posición	ELM-Descripción	Compartimento Celular
LIG_14-3-3_3	KSKTSP	138-143	Consenso derivado de interacciones naturales	nucleo, citoplasma, membrana plasmática
LIG_Clathr_ClatBox_1	LLSLD-LLRIE	93-97 412-416	Motivo de caja Clatrina en proteínas cargo adaptor, que interacciona con la estructura localizada en la cadena pesada de clatrina del n-terminal.	citoplasma, aparato de Golgi, citoesqueleto, vesícula endocítica de clatrina, cara-trans del Golgi
LIG_FHA_1	TAGI-TNPA- TFIA-TGQI	312-315, 325-328 381-384, 392-395	Motivo 1 de interacción del dominio FHA. La fosforilación de la treonina es requerida.	nucleo, citoplasma, membrana plasmática
LIG_WW_4	SKTSPY	139-144	Dominio WW de la Clase IV. Interacción dependiente de fosforilación.	nucleo, citoplasma
MOD_CK1_1	SGAS, SKTS SDKS, SHRS SGET	36-39, 139-142 267-270, 372-375 375-378	Sitio de fosforilación CK1	nucleo, citoplasma
MOD_CK2_1	TFAE, TAEI TGVE, TAIE TLSE	178-181, 220-223 274-277, 332-335 351-354	Sitio de fosforilación CK2	nucleo, citoplasma
MOD_N-GLC_1	NKS	101-103	Motivo genérico de N-glicosilación. Shakin-Eshleman et al. Mostraron que el trp, asp y glu no son comunes antes de la posición de Ser-thr. La glicosilación eficiente normalmente ocurre cuando 60 residuos o más separan el acceptor de glicosilación del C-terminal.	extracelular, aparato de Golgi, retículo endoplasmático
MOD_SUMO	VKAN, VKIG FKDG, FKNP LKVN, IKTG AKLN	77-80, 241-244 253-256, 262-265 344-347, 395-398 407-410	Motivo reconocido para modificación por SUMO-1	nucleo, cuerpo PML
TRG_ENDOCYTIC_2	YQHL, YHNL YHSL, YPIV	130-133, 190-193 282-285, 289-292	Señal de salida basada en tirosina responsable para la interacción con la subunidad mu del complejo AP.	citoplasma, membrana plasmática, vesícula endocítica de clatrina

Análisis Tridimensional

Alineamientos tridimensionales

Para este fin utilizamos la bases de datos y herramientas para el alineamiento y comparación de estructuras proteicas en 3D, usando el método de la extensión combinacional (*CE*) (*Shindyalov and Bourne*), disponible en <http://cl.sdsc.edu/ce.html>

Enolasa y Piruvato quinasa

Resultado del alineamiento con un nivel de similaridad medio entre Eno2p (4ENL.pdb) y Pyk1p (1A3W.pdb).

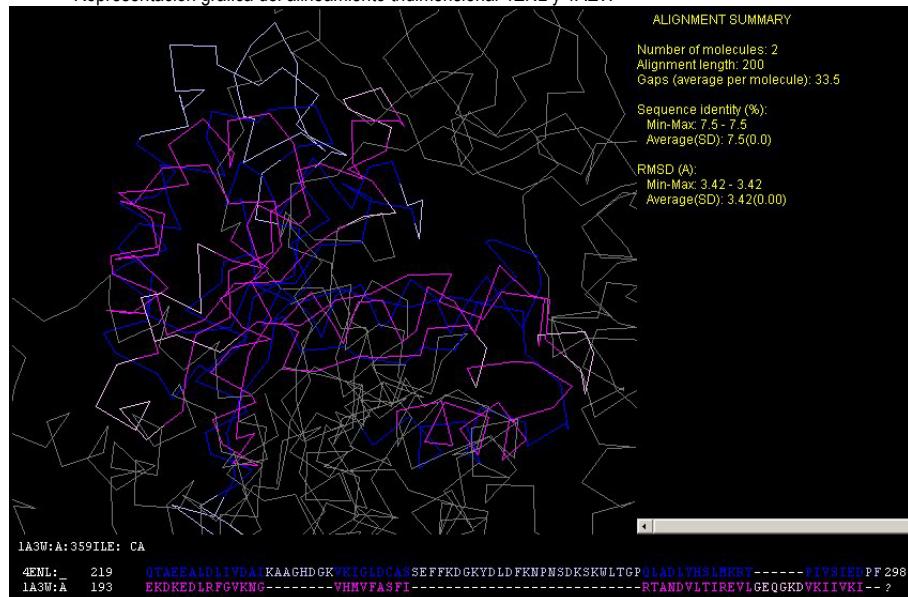
```
4ENL: 219/220 QTAEEALDLIVDAIKAAGHDGKVKGILDCAASSEFFKDGKYDLDFKNPNSDKSKWLTPQL
1A3W:A 193/194 EKDKEDELRFGVKNG-----VHMVFASFI-----RT

4ENL: 279/280 ADLYHSLMKRY-----PIVSIEDPFAEDDWAEASHFFKTAGIQIVAD--DLT---VTN
1A3W:A 218/219 ANDVLTIREVLGEQGKDVKIIIVKI--ENQQGVNNFDEILKVTGVMVARGDLGIEIPA--

4ENL: 327/328 PKRIATAIEKKAA-----DALLLKVNQIG----TLSESIKAAQDSFAAGWGVMVSH
1A3W:A 274/275 -PEVLAVQKKLIAKSNLAGKPVICATQMLESMTYNPRPTRAEVSDVGNAILDGADCVMLS

4ENL: 374/375 R--SGETEDTFIADLVVGLR
1A3W:A 333/334 GETAKGNYPINAVTTMAETA
```

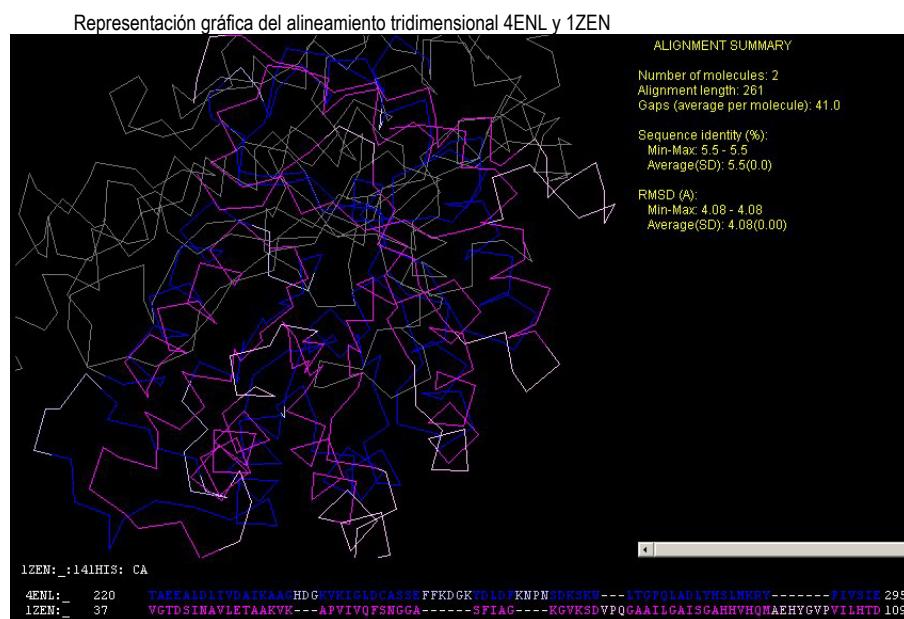
Representación gráfica del alineamiento tridimensional 4ENL y 1AEW



Enolasa y Fructosa Bifosfato Aldolasa

Resultado del alineamiento con un nivel de similaridad medio entre Eno2p (4ENL.pdb) y Fba1p (1ZEN.pdb).

4ENL: _	220/221	TAAEALDLIVDAIKAAGHDGKVKIGLDCASSEFFKDGYDLDFKNPNSDKSKW---LTGP
1ZEN: _	37/38	VGTDSINAVLETAAKVK---APVIVQFSNGGA-----SFIAG----KGVKSDVPQGAII
4ENL: _	277/278	QLADLYHSLMKRY-----PIVSIEDPFAEDDWEAWSHFFK-----TAGIQIV
1ZEN: _	84/85	LGAISGAHHVHQMAEHYGVPVILHTDHC-AKKLLPWIDGLLAGEKHFAATGKPLFSSHM
4ENL: _	319/320	ADDLTVTNPKRIATAIEKKAA-----DALLLKVNQI-----GTLSESIIKA
1ZEN: _	143/144	IDLSEESLQENIEICSKYLERMSKIGMTLEIELGCTGGEEDGVDNASHMDASALYTQPEDV
4ENL: _	359/360	AQDSFAAG-----WGMVMS--HRSGE---TEDTFIADLVVGLR-----TGQ
1ZEN: _	203/204	DYAYTELISKISPRFTIAASFGNVHGTVKPGNVVLT-PTILRDSQEYVSKHHNLPHNSLNF
4ENL: _	395/396	IKTGAPARSERLAKLNQLLRI
1ZEN: _	262/263	VFHGGSGS--TAQEIKDSVSY

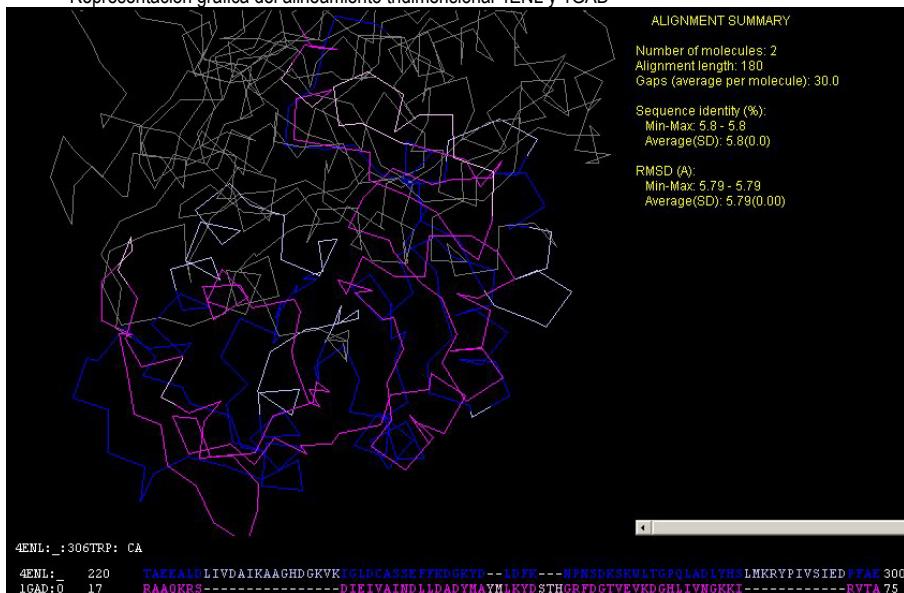


Enolasa y Gliceraldehido 3-Fosfato dehidrogenasa

Resultado del alineamiento con un nivel de similaridad medio entre Eno2p (4ENL.pdb) y Tdh3p (1GAD.pdb).

4ENL: _	220/221	TAAEALDLIVDAIKAAGHDGKVKIGLDCASSEFFKDGYD--LDFK--NPNSDKSKWL
1GAD:O	18/18	RAAQKRS-----DIEIVAINDLADYMAIMLKDYDSTHGRFDGTVEVKD
4ENL: _	275/276	GPQLADLYHSLMKRYPPIVSIEDPFAEDDWEAWSHFFKTAGIQIVADDLTVTNPKRIATAI
1GAD:O	62/63	GHLIVNGKKI-----RVTAERDPANLKUDEVGVVDVVAEATGLFLTDETARKHI
4ENL: _	335/336	EKKAADALLKVNQIGTLSSESIIKA-----AQDSFAAGWGMVSHRSGE--TED
1GAD:O	110/111	T-AGAKVVMGPSK----DNTPMFVKGANFDKYAGQ-----DIVSNASCTTNCLAP

Representación gráfica del alineamiento tridimensional 4ENL y 1GAD

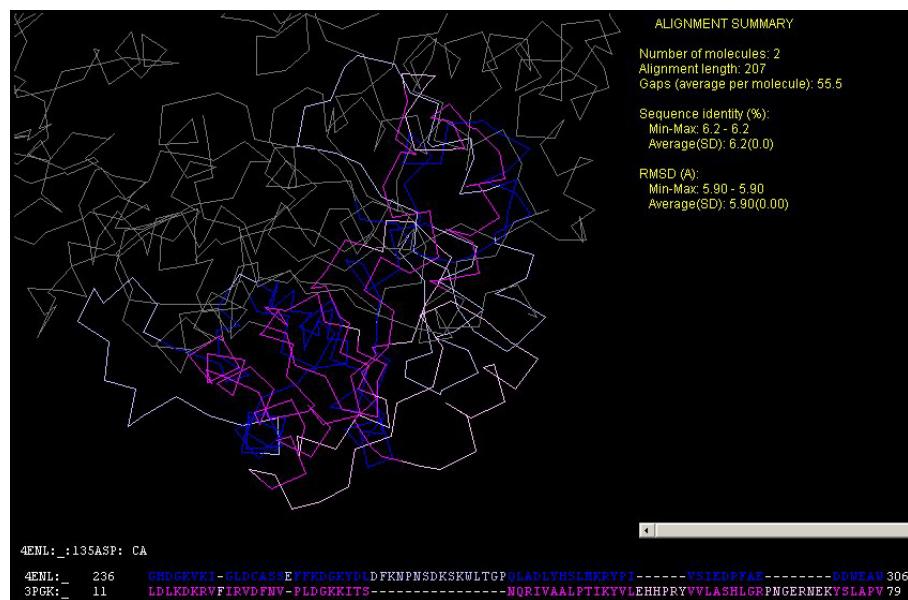


Enolasa y Fosfoglicerato quinasa

Resultado del alineamiento con un nivel de similaridad medio entre Eno2p (4ENL.pdb) y Pgk1p (3PGK.pdb).

4ENL: _	236 / 237	GHDGKVKI-GLDCASSEFFKDGKYDLDFKNPNSDKSKWLTGPQLADLYHSLMKRYPI---
3PGK: _	12 / 12	LDLKDKRKFIRVDFNV-PLDGKKITS-----NQRIVAALPTIKYVLEHH
4ENL: _	292 / 293	---VSIEDPFAE-----DDWEAWSHFFKT-----AGI
3PGK: _	55 / 55	PRYVVVLASHLGRPNGERNEKYSLAPVAKELQSLLGKDVTFLNDCVGPEVEAAVKASAPGS
4ENL: _	316 / 317	QIVADDLTVTNPKRIATAIEKKAADALLKVNQI-----GTLSESIIKAAQDSFAAGWGV
3PGK: _	115 / 115	VILLENLRYH-----IEEEGSRKVDGQKVASKEDV-----
4ENL: _	370 / 371	MVSHRSGETEDTFIADLVVGLRTGQIK
3PGK: _	146 / 146	-----QKFRHELS

Representación gráfica del alineamiento tridimensional 4ENL y 1GAD



Análisis de la superficie celular

Estudio de la superficie celular y sus características. Para ello nos centramos en las proteínas glucolíticas descritas anteriormente, es decir, la enolasa (Eno2p), piruvato quinasa (Pyk1p), fructosa bifosfato aldolasa (Fba1p), Fosfoglucosa quinasa (Pgk1p) y la gliceraldehido-3-P-dehidrogenasa.

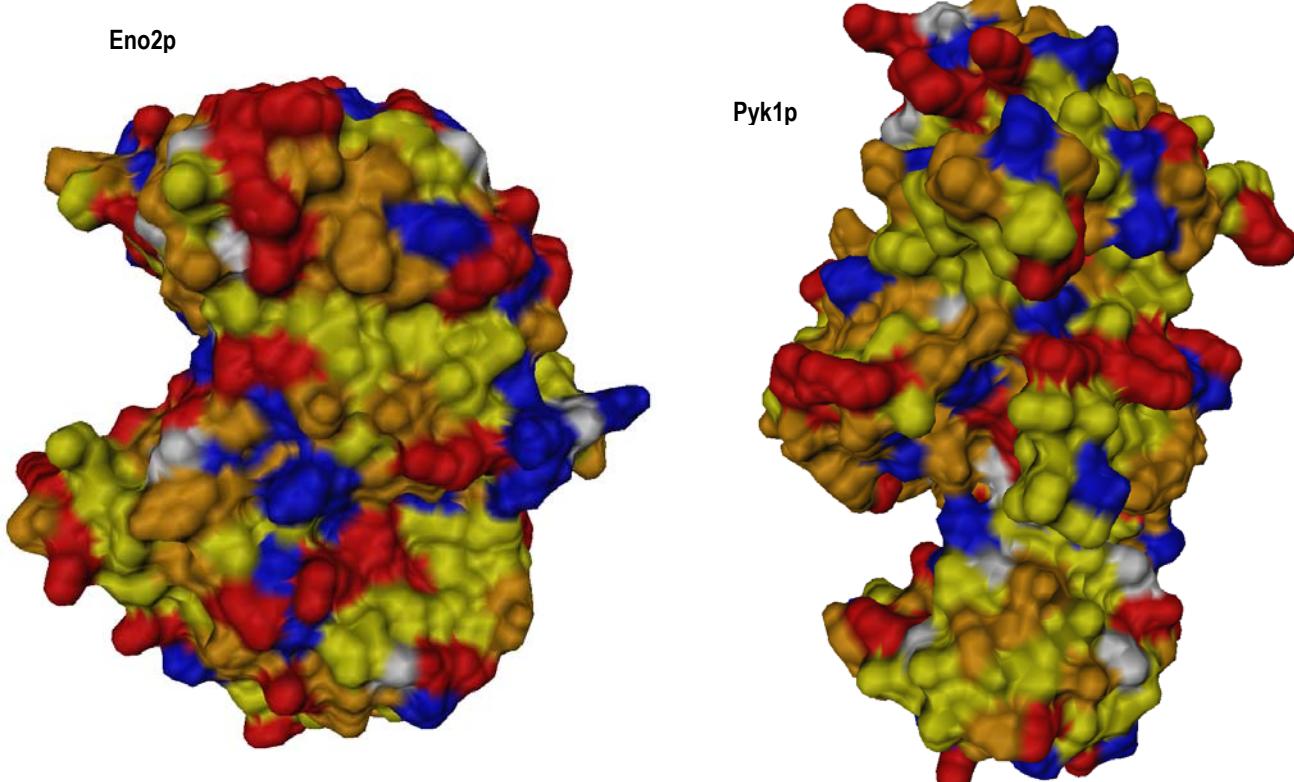
Para extraer los mapas superficiales empleamos el visualizador *Dino*; los datos de superficie mediante *MSMS (msms.i86Linux2.2.5.5.staticgcc)* y un script en perl que convierte archivos pdb en xyzr (*pdb2xyzr.pl*). Todo ello bajo entorno Linux.

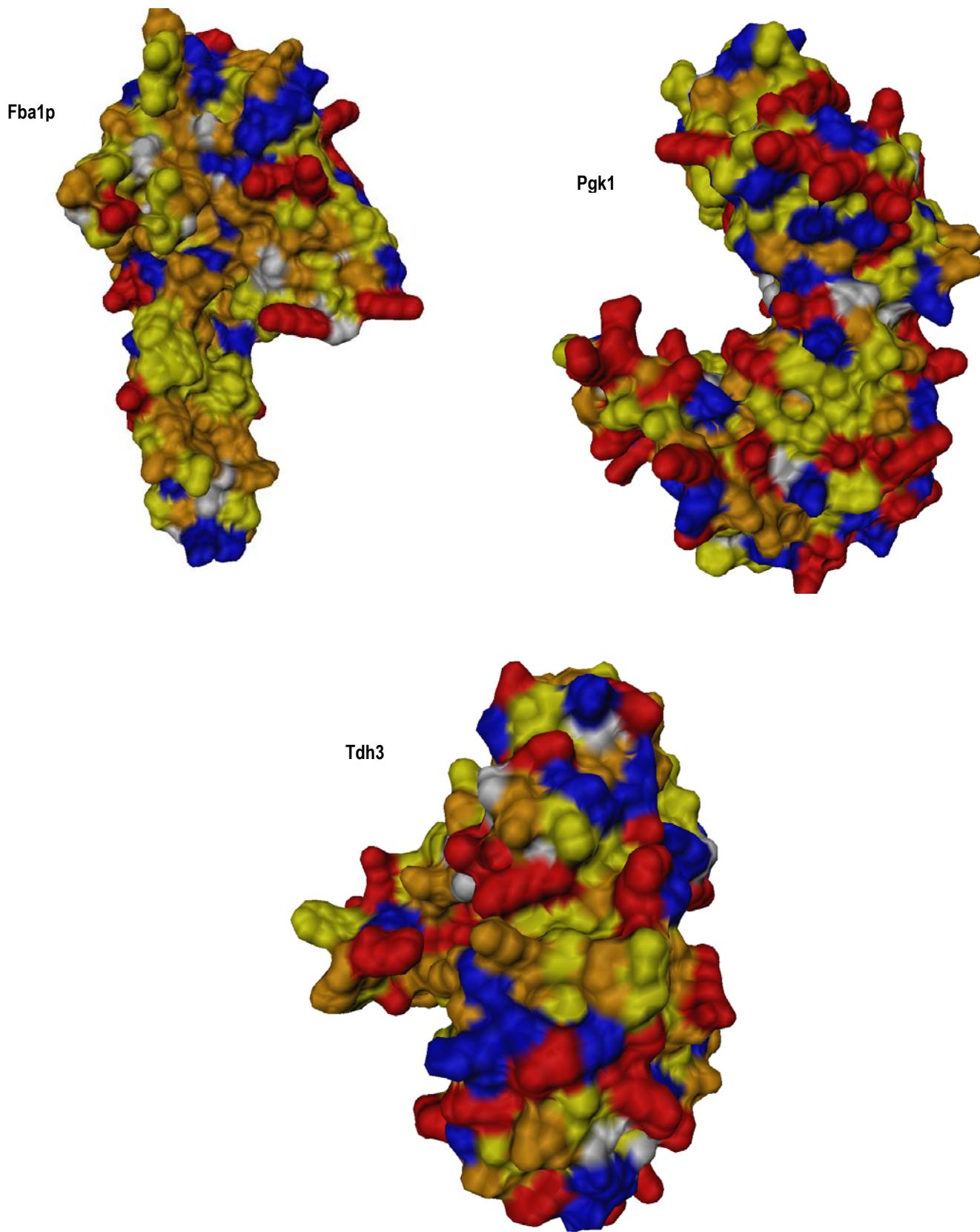
La gama de colores empleada fue:

- **Rojo:** aminoácidos básicos (carga positiva)
- **Amarillo:** hidrofóbicos
- **Naranja:** polares no cargados
- **Azul:** ácidos (carga negativa)

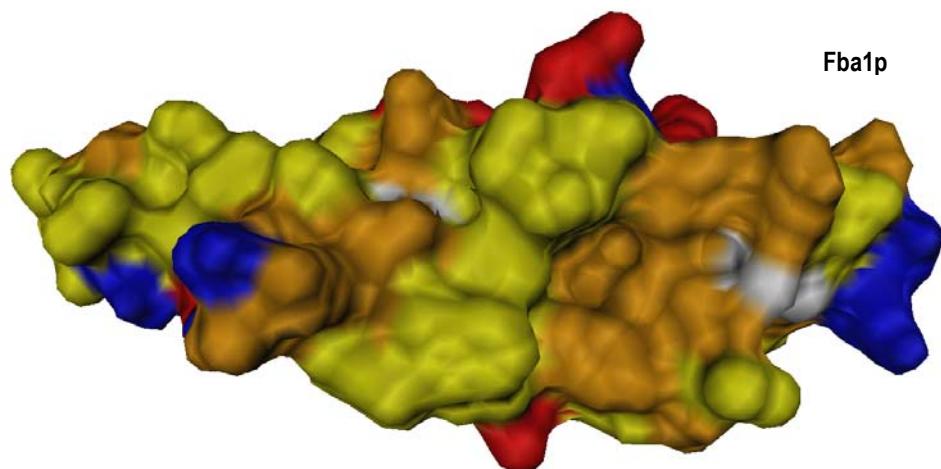
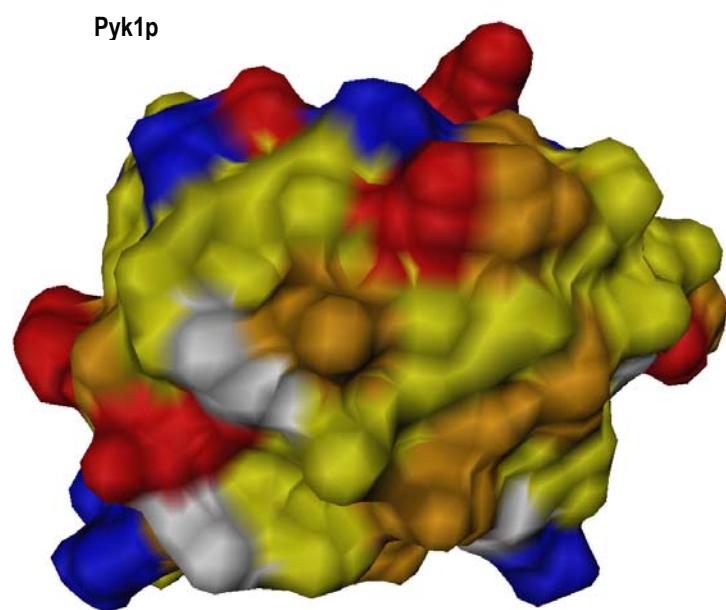
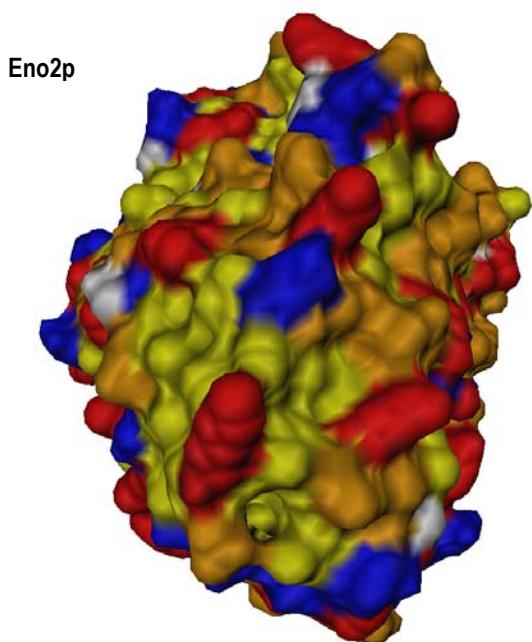
Estas fueron las figuras obtenidas

- **Vistas globales**

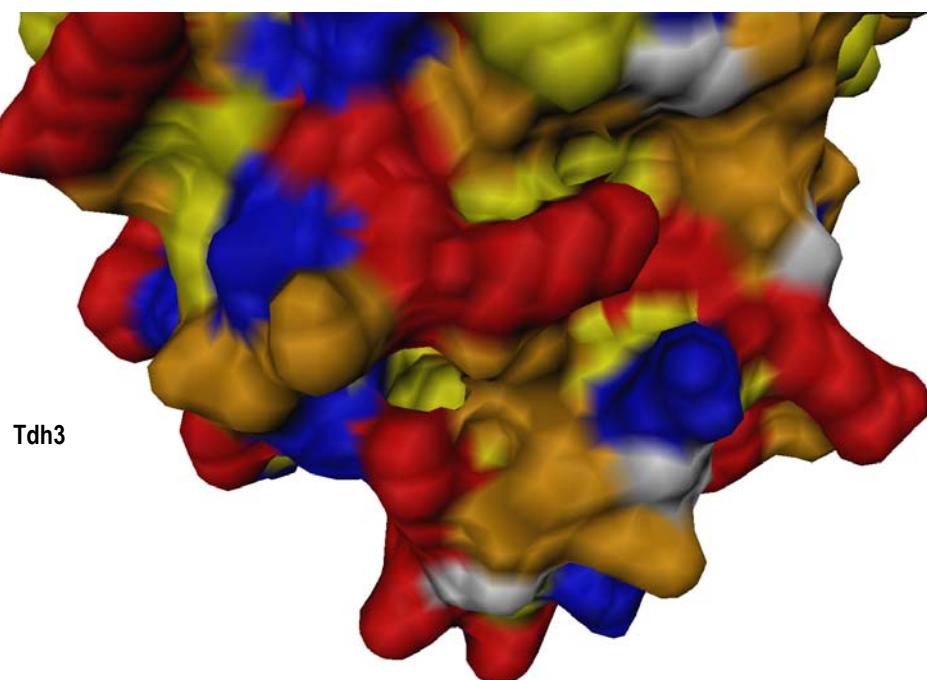
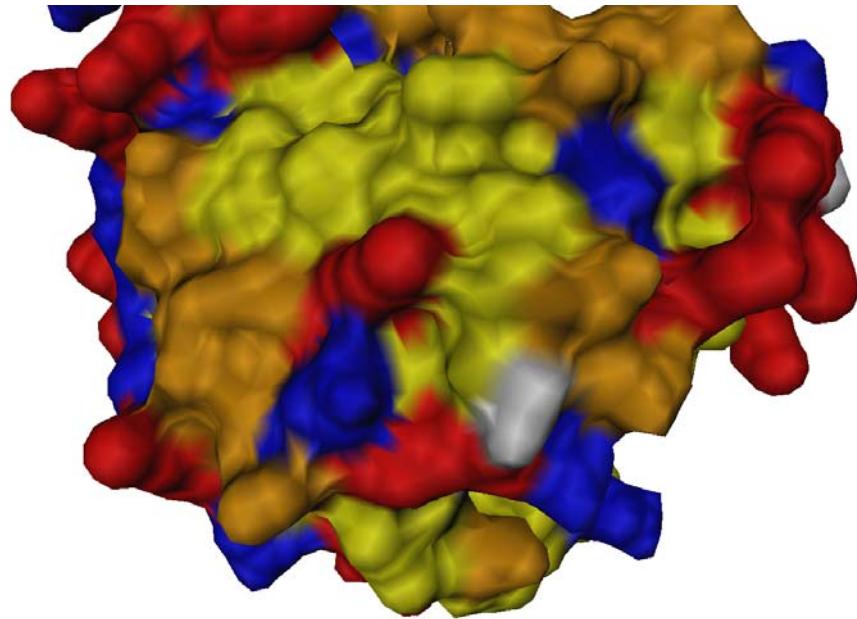




- Detalle dominios más hidrofóbicos.

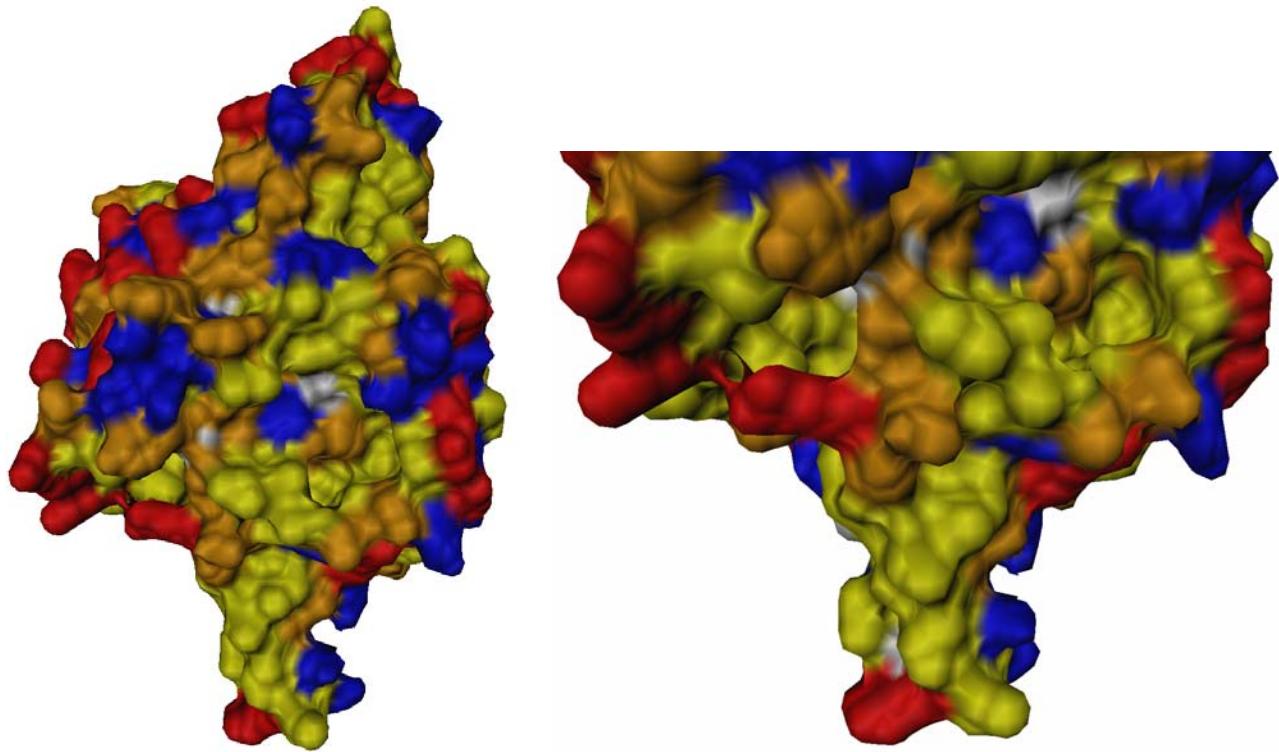


Pgk1p



Tdh3

Ejemplo al azar de proteína asociada a membrana: mandelato deshidrogenasa (de cerca y de lejos)



DISCUSIÓN

A pesar de todos los datos recopilados que podrían permitir afirmar la localización en la superficie celular de proteínas glucolíticas típicas del citoplasmática, existen datos de mucho peso que dificultan la afirmación en *S. cerevisiae*:

- Existen aproximadamente 600.000 moléculas de Eno2p por célula durante la fase exponencial de crecimiento empleando glucosa como fuente de carbono (Norbeck and Blomberg)
- El número de mRNA de Eno2p presente es de 283 copias por célula durante la fase exponencial de crecimiento en medios ricos (Kang et al)

Por tanto, lo primero que hay que demostrar es que la presencia de estas enzimas glucolíticas en la superficie celular no es como consecuencia de *contaminación*.

La principal evidencia experimental en la que nos apoyamos para plantear que la enolasa podría tener la capacidad de alcanzar el exterior celular es como consecuencia de los experimentos de construcción de la proteína de fusión entre la Eno2p y la invertasa intracelular (Suc2ip) en mutantes para Suc2ep. Además, el trabajo en el que se controla los niveles de expresión de esta fusión mediante un promotor regulable indicarían que en principio no serían necesarias grandes cantidades de la proteína de fusión para que se alcanzara la superficie (lo cual podría ayudar a luchar contra “el problema” de la contaminación).

Los ensayos moleculares que tratan de localizar la región de Eno2p suficiente para que la proteína de fusión alcance la superficie celular concluyeron de forma preliminar que con los 166 aminoácidos del extremo N-terminal de Eno2p sería suficiente y dentro de éstos, la región comprendida entre 101-169 quizás la más importante.

Tras el análisis de la estructura tridimensional de la enolasa, en la que claramente aparecen definidos dos dominios, el *Enolasa_N-terminal* (1-126), y *Enolasa_C-terminal* (146-436), junto con los resultados experimentales de los diferentes cortes dentro de la secuencia de Eno2p (figura 1) y las predicciones bioinformáticas, podemos plantear dos posibilidades de cara a estos 169 aminoácidos del N-terminal:

- a) Por un lado que lo importante para alcanzar la superficie celular sea la estructura, esto es, el dominio N-terminal de la enolasa. En este caso, podríamos ajustar el número de aminoácidos a los 126-136 aminoácidos (dependiendo de si incluimos la hélice *alfa* de 10 aminoácidos). La estructura tridimensional, junto con las propiedades de los aminoácidos que la componen (hidrofobicidad, carga, etc) y que comentaremos más adelante, permitirían que la Eno2p, por un mecanismo desconocido, alcanzar la superficie celular.

Evidentemente, estas dos características mencionadas, es decir, estructura y propiedades aminoacídicas, podrían ir acompañadas de otro conjunto de factores, como por ejemplo, alguna de las modificaciones post-traduccionales predichas.

- b) Que la información de salida corresponda a la secuencia lineal de los 169 aminoácidos N-terminal. En este punto, y basándonos en las predicciones bioinformáticas, las causas o mecanismos implicados podrían ser aún más variado que el anterior si cabe.

Pero de la comparación de características estructurales de proteínas glucolíticas sospechosas de hallarse de igual modo en la superficie celular, como es el caso directo de la Fba1p o la Tdh3p, trataremos a continuación de ajustar y complementar estas hipótesis.

Nota: hasta aquí por ahora. Lo iré completando estos días. Davidjm

Reference List

1. Alloush,H.M., Lopez-Ribot,J.L., Masten,B.J. & Chaffin,W.L. (1997) 3-phosphoglycerate kinase: a glycolytic enzyme protein present in the cell wall of *Candida albicans*. *Microbiology*, **143**, 321-330.
2. Alloush,H.M., Lopez-Ribot,J.L., Masten,B.J. & Chaffin,W.L. (1997) 3-phosphoglycerate kinase: a glycolytic enzyme protein present in the cell wall of *Candida albicans*. *Microbiology*, **143**, 321-330.
3. Backhaus,R., Zehe,C., Wegehingel,S., Kehlenbach,A., Schwappach,B. & Nickel,W. (2004) Unconventional protein secretion: membrane translocation of FGF-2 does not require protein unfolding. *J.Cell Sci.*, **Pt..**
4. Bergmann,S., Rohde,M., Chhatwal,G.S. & Hammerschmidt,S. (2001) alpha-Enolase of *Streptococcus pneumoniae* is a plasmin(ogen)-binding protein displayed on the bacterial cell surface. *Mol.Microbiol.*, **40**, 1273-1287.
5. Bergmann,S., Rohde,M. & Hammerschmidt,S. (2004) Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase of *Streptococcus pneumoniae* Is a Surface-Displayed Plasminogen-Binding Protein. *Infect.Immun.*, **72**, 2416-2419.
6. Bijlmakers,M.J. & Marsh,M. (2003) The on-off story of protein palmitoylation. *Trends Cell Biol.*, **13**, 32-42.
7. Blom,N., Gammeltoft,S. & Brunak,S. (1999) Sequence and structure-based prediction of eukaryotic protein phosphorylation sites. *J.Mol.Biol.*, **294**, 1351-1362.
8. Brewer,J.M., Glover,C.V., Holland,M.J. & Lebioda,L. (1997) Effect of site-directed mutagenesis of His373 of yeast enolase on some of its physical and enzymatic properties. *Biochim.Biophys.Acta*, **1340**, 88-96.
9. Brewer,J.M., Glover,C.V., Holland,M.J. & Lebioda,L. (1998) Significance of the enzymatic properties of yeast S39A enolase to the catalytic mechanism. *Biochim.Biophys.Acta*, **1383**, 351-355.
10. Copley,S.D. (2003) Enzymes with extra talents: moonlighting functions and catalytic promiscuity. *Curr.Opin.Chem.Biol.*, **7**, 265-272.
11. Crowe,J.D., Sievwright,I.K., Auld,G.C., Moore,N.R., Gow,N.A. & Booth,N.A. (2003) *Candida albicans* binds human plasminogen: identification of eight plasminogen-binding proteins. *Mol.Microbiol.*, **47**, 1637-1651.
12. Delgado,M.L., Gil,M.L. & Gozalbo,D. (2003) *Candida albicans* TDH3 gene promotes secretion of internal invertase when expressed in *Saccharomyces cerevisiae* as a glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase-invertase fusion protein. *Yeast*, **20**, 713-722.
13. Delgado,M.L., O'Connor,J.E., Azorin,I., Renau-Piquer,J., Gil,M.L. & Gozalbo,D. (2001) The glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase polypeptides encoded by the *Saccharomyces cerevisiae* TDH1, TDH2 and TDH3 genes are also cell wall proteins. *Microbiology*, **147**, 411-417.
14. Denny,P.W., Gokool,S., Russell,D.G., Field,M.C. & Smith,D.F. (2000) Acylation-dependent protein export in *Leishmania*. *J.Biol.Chem.*, **275**, 11017-11025.
15. Derbise,A., Song,Y.P., Parikh,S., Fischetti,V.A. & Pancholi,V. (2004) Role of the C-terminal lysine residues of streptococcal surface enolase in Glu- and Lys-plasminogen-binding activities of group A streptococci. *Infect.Immun.*, **72**, 94-105.
16. Duee,E., Olivier-Deyris,L., Fanchon,E., Corbier,C., Branlant,G. & Dideberg,O. (1996) Comparison of the structures of wild-type and a N313T mutant of *Escherichia coli* glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenases: implication for NAD binding and cooperativity. *J.Mol.Biol.*, **257**, 814-838.
17. Edwards,S.R., Braley,R. & Chaffin,W.L. (1999) Enolase is present in the cell wall of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol.Lett.*, **177**, 211-216.
18. Edwards,S.R., Braley,R. & Chaffin,W.L. (1999) Enolase is present in the cell wall of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol.Lett.*, **177**, 211-216.
19. Eisenhaber,B., Bork,P. & Eisenhaber,F. (1998) Sequence properties of GPI-anchored proteins near the omega-site: constraints for the polypeptide binding site of the putative transamidase. *Protein Eng.*, **11**, 1155-1161.

20. Emanuelsson,O., Nielsen,H., Brunak,S. & von Heijne,G. (2000) Predicting subcellular localization of proteins based on their N-terminal amino acid sequence. *J.Mol.Biol.*, **300**, 1005-1016.
21. Eroles,P., Sentandreu,M., Elorza,M.V. & Sentandreu,R. (1997) The highly immunogenic enolase and Hsp70p are adventitious *Candida albicans* cell wall proteins. *Microbiology*, **143**, 313-320.
22. Farazi,T.A., Waksman,G. & Gordon,J.I. (2001) The biology and enzymology of protein N-myristoylation. *J.Biol.Chem.*, **276**, 39501-39504.
23. Farber,G.K. & Petsko,G.A. (1990) The evolution of alpha/beta barrel enzymes. *Trends Biochem.Sci.*, **15**, 228-234.
24. Ficarro,S.B., McCleland,M.L., Stukenberg,P.T., Burke,D.J., Ross,M.M., Shabanowitz,J., Hunt,D.F. & White,F.M. (2002) Phosphoproteome analysis by mass spectrometry and its application to *Saccharomyces cerevisiae*. *Nat.Biotechnol.*, **20**, 301-305.
25. Fox,D. & Smulian,A.G. (2001) Plasminogen-binding activity of enolase in the opportunistic pathogen *Pneumocystis carinii*. *Med.Mycol.*, **39**, 495-507.
26. Gerlt,J.A. & Raushel,F.M. (2003) Evolution of function in (beta/alpha)8-barrel enzymes. *Curr.Opin.Chem.Biol.*, **7**, 252-264.
27. Gil-Navarro,I., Gil,M.L., Casanova,M., O'Connor,J.E., Martinez,J.P. & Gozalbo,D. (1997) The glycolytic enzyme glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase of *Candida albicans* is a surface antigen. *J.Bacteriol.*, **179**, 4992-4999.
28. Grandori,R., Popolo,L., Vai,M. & Alberghina,L. (1990) cAMP promotes the synthesis in early G1 of gp115, a yeast glycoprotein containing glycosyl-phosphatidylinositol. *J.Biol.Chem.*, **265**, 14315-14320.
29. Grant,C.M., Quinn,K.A. & Dawes,I.W. (1999) Differential protein S-thiolation of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase isoenzymes influences sensitivity to oxidative stress. *Mol.Cell Biol.*, **19**, 2650-2656.
30. Guruprasad,K., Reddy,B.V. & Pandit,M.W. (1990) Correlation between stability of a protein and its dipeptide composition: a novel approach for predicting in vivo stability of a protein from its primary sequence. *Protein Eng.*, **4**, 155-161.
31. Helenius,A. & Aebi,M. (2001) Intracellular functions of N-linked glycans. *Science*, **291**, 2364-2369.
32. Hitchcock,A.L., Auld,K., Gygi,S.P. & Silver,P.A. (2003) A subset of membrane-associated proteins is ubiquitinated in response to mutations in the endoplasmic reticulum degradation machinery. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, **100**, 12735-12740.
33. Horak,J. (2003) The role of ubiquitin in down-regulation and intracellular sorting of membrane proteins: insights from yeast. *Biochim.Biophys.Acta*, **1614**, 139-155.
34. Horton,P. & Nakai,K. (1997) Better prediction of protein cellular localization sites with the k nearest neighbors classifier. *Proc.Int.Conf.Intell.Syst.Mol.Biol.*, **5:147-52.**, 147-152.
35. Ikai,A. (1980) Thermostability and aliphatic index of globular proteins. *J.Biochem.(Tokyo)*, **88**, 1895-1898.
36. Jansen,R. & Gerstein,M. (2000) Analysis of the yeast transcriptome with structural and functional categories: characterizing highly expressed proteins. *Nucleic Acids Res.*, **28**, 1481-1488.
37. Jeffery,C.J. (1999) Moonlighting proteins. *Trends Biochem.Sci.*, **24**, 8-11.
38. Jeffery,C.J. (2003) Moonlighting proteins: old proteins learning new tricks. *Trends Genet.*, **19**, 415-417.
39. Jong,A.Y., Chen,S.H., Stins,M.F., Kim,K.S., Tuan,T.L. & Huang,S.H. (2003) Binding of *Candida albicans* enolase to plasmin(ogen) results in enhanced invasion of human brain microvascular endothelial cells. *J.Med.Microbiol.*, **52**, 615-622.
40. Kang,J.J., Watson,R.M., Fisher,M.E., Higuchi,R., Gelfand,D.H. & Holland,M.J. (2000) Transcript quantitation in total yeast cellular RNA using kinetic PCR. *Nucleic Acids Res.*, **28**, e2.

41. Lebioda,L. & Stec,B. (1991) Mechanism of enolase: the crystal structure of enolase-Mg²⁺-2-phosphoglycerate/phosphoenolpyruvate complex at 2.2-A resolution. *Biochemistry*, **30**, 2817-2822.
42. Maizel,A., Tassetto,M., Filhol,O., Cochet,C., Prochiantz,A. & Joliot,A. (2002) Engrailed homeoprotein secretion is a regulated process. *Development*, **129**, 3545-3553.
43. Mehul,B. & Hughes,R.C. (1997) Plasma membrane targetting, vesicular budding and release of galectin 3 from the cytoplasm of mammalian cells during secretion. *J.Cell Sci.*, **110**, 1169-1178.
44. Meyer-Siegler,K., Mauro,D.J., Seal,G., Wurzer,J., deRiel,J.K. & Sirover,M.A. (1991) A human nuclear uracil DNA glycosylase is the 37-kDa subunit of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, **88**, 8460-8464.
45. Min-Oo,G., Fortin,A., Tam,M.F., Nantel,A., Stevenson,M.M. & Gros,P. (2003) Pyruvate kinase deficiency in mice protects against malaria. *Nat.Genet.*, **35**, 357-362.
46. Modun,B., Morrissey,J. & Williams,P. (2000) The staphylococcal transferrin receptor: a glycolytic enzyme with novel functions. *Trends Microbiol.*, **8**, 231-237.
47. Molina,M., Gil,C., Pla,J., Arroyo,J. & Nombela,C. (2000) Protein localisation approaches for understanding yeast cell wall biogenesis. *Microsc.Res.Tech.*, **51**, 601-612.
48. Moscato,S., Pratesi,F., Sabbatini,A., Chimenti,D., Scavuzzo,M., Passatino,R., Bombardieri,S., Giallongo,A. & Migliorini,P. (2000) Surface expression of a glycolytic enzyme, alpha-enolase, recognized by autoantibodies in connective tissue disorders. *Eur.J.Immunol.*, **30**, 3575-3584.
49. Motshwene,P., Brandt,W. & Lindsey,G. (2003) Significant quantities of the glycolytic enzyme phosphoglycerate mutase are present in the cell wall of yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem.J.*, **369**, 357-362.
50. Nickel,W. (2003) The mystery of nonclassical protein secretion. A current view on cargo proteins and potential export routes. *Eur.J.Biochem.*, **270**, 2109-2119.
51. Nielsen,H., Engelbrecht,J., Brunak,S. & von Heijne,G. (1997) Identification of prokaryotic and eukaryotic signal peptides and prediction of their cleavage sites. *Protein Eng.*, **10**, 1-6.
52. Norbeck,J. & Blomberg,A. (1997) Two-dimensional electrophoretic separation of yeast proteins using a non-linear wide range (pH 3-10) immobilized pH gradient in the first dimension: reproducibility and evidence for isoelectric focusing of alkaline (pI > 7) proteins. *Yeast*, **13**, 1519-1534.
53. Obenauer,J.C., Cantley,L.C. & Yaffe,M.B. (2003) Scansite 2.0: Proteome-wide prediction of cell signaling interactions using short sequence motifs. *Nucleic Acids Res.*, **31**, 3635-3641.
54. Pancholi,V. & Fischetti,V.A. (1998) alpha-enolase, a novel strong plasmin(ogen) binding protein on the surface of pathogenic streptococci. *J.Biol.Chem.*, **273**, 14503-14515.
55. Pardo,M., Monteoliva,L., Pla,J., Sanchez,M., Gil,C. & Nombela,C. (1999) Two-dimensional analysis of proteins secreted by *Saccharomyces cerevisiae* regenerating protoplasts: a novel approach to study the cell wall. *Yeast*, **15**, 459-472.
56. Pardo,M., Ward,M., Bains,S., Molina,M., Blackstock,W., Gil,C. & Nombela,C. (2000) A proteomic approach for the study of *Saccharomyces cerevisiae* cell wall biogenesis. *Electrophoresis*, **21**, 3396-3410.
57. Pitarch,A., Sanchez,M., Nombela,C. & Gil,C. (2002) Sequential fractionation and two-dimensional gel analysis unravels the complexity of the dimorphic fungus *Candida albicans* cell wall proteome. *Mol.Cell Proteomics.*, **1**, 967-982.
58. Polevoda,B., Norbeck,J., Takakura,H., Blomberg,A. & Sherman,F. (1999) Identification and specificities of N-terminal acetyltransferases from *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J.*, **18**, 6155-6168.
59. Portela,P., Howell,S., Moreno,S. & Rossi,S. (2002) In vivo and in vitro phosphorylation of two isoforms of yeast pyruvate kinase by protein kinase A. *J.Biol.Chem.*, **277**, 30477-30487.
60. Poyner,R.R., Larsen,T.M., Wong,S.W. & Reed,G.H. (2002) Functional and structural changes due to a serine to alanine mutation in the active-site flap of enolase. *Arch.Biochem.Biophys.*, **401**, 155-163.

61. Puntervoll,P., Linding,R., Gemund,C., Chabanis-Davidson,S., Mattingsdal,M., Cameron,S., Martin,D.M., Ausiello,G., Brannetti,B., Costantini,A., Ferre,F., Maselli,V., Via,A., Cesareni,G., Diella,F., Superti-Furga,G., Wyrwicz,L., Ramu,C., McGuigan,C., Gudavalli,R., Letunic,I., Bork,P., Rychlewski,L., Kuster,B., Helmer-Citterich,M., Hunter,W.N., Aasland,R. & Gibson,T.J. (2003) ELM server: A new resource for investigating short functional sites in modular eukaryotic proteins. *Nucleic Acids Res.*, **31**, 3625-3630.
62. Schmidt,D.M., Mundorff,E.C., Dojka,M., Bermudez,E., Ness,J.E., Govindarajan,S., Babbitt,P.C., Minshull,J. & Gerlt,J.A. (2003) Evolutionary potential of (beta/alpha)8-barrels: functional promiscuity produced by single substitutions in the enolase superfamily. *Biochemistry*, **42**, 8387-8393.
63. Shenton,D. & Grant,C.M. (2003) Protein S-thiolation targets glycolysis and protein synthesis in response to oxidative stress in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem.J.*, **374**, 513-519.
64. Shindyalov,I.N. & Bourne,P.E. (1998) Protein structure alignment by incremental combinatorial extension (CE) of the optimal path. *Protein Eng*, **11**, 739-747.
65. Terao,Y., Kawabata,S., Kunitomo,E., Murakami,J., Nakagawa,I. & Hamada,S. (2001) Fba, a novel fibronectin-binding protein from *Streptococcus pyogenes*, promotes bacterial entry into epithelial cells, and the fba gene is positively transcribed under the Mga regulator. *Mol.Microbiol.*, **42**, 75-86.
66. Urban,C., Sohn,K., Lottspeich,F., Brunner,H. & Rupp,S. (2003) Identification of cell surface determinants in *Candida albicans* reveals Tsa1p, a protein differentially localized in the cell. *FEBS Lett.*, **544**, 228-235.
67. Vega,M.C., Lorentzen,E., Linden,A. & Wilmanns,M. (2003) Evolutionary markers in the (beta/alpha)8-barrel fold. *Curr.Opin.Chem.Biol.*, **7**, 694-701.
68. Walter,P., Gilmore,R. & Blobel,G. (1984) Protein translocation across the endoplasmic reticulum. *Cell*, **38**, 5-8.
69. Yen,Y.M., Roberts,P.M. & Johnson,R.C. (2001) Nuclear localization of the *Saccharomyces cerevisiae* HMG protein NHP6A occurs by a Ran-independent nonclassical pathway. *Traffic*, **2**, 449-464.
70. Zha,J., Weiler,S., Oh,K.J., Wei,M.C. & Korsmeyer,S.J. (2000) Posttranslational N-myristoylation of BID as a molecular switch for targeting mitochondria and apoptosis. *Science*, **290**, 1761-1765.
71. Zhang,E., Brewer,J.M., Minor,W., Carreira,L.A. & Lebioda,L. (1997) Mechanism of enolase: the crystal structure of asymmetric dimer enolase-2-phospho-D-glycerate/enolase-phosphoenolpyruvate at 2.0 Å resolution. *Biochemistry*, **36**, 12526-12534.
72. Zhou,H., Watts,J.D. & Aebersold,R. (2001) A systematic approach to the analysis of protein phosphorylation. *Nat.Biotechnol.*, **19**, 375-378.