Caracterización de la *Familia ECM33* como etapa en la predicción de la estructura y función de Ecm33p

David Jiménez-Morales
Departamento de Microbiología II. Facultad de Farmacia. Universidad Complutense de Madrid (UCM)

Introducción

Ecm33p/YBR078W (SaEcm33p) es una proteína de 469 aminoácidos de anclaje Glicosil Fosfatidil inositol (GPI) perteneciente a la **Familia ECM33** [1] (anteriormente llamada, *Familia SPS2 [2]*) formada en *Saccharomyces cerevisiae* por un conjunto de genes homólogos que son, PSTI/YDR055W, SPS2/YDL052 y SPS22/YCL048W. Todas ellas comparten características típicas de proteínas de anclaje a GPI, es decir, tienen péptido señal, una región de la secuencia rica en serinas y treoninas, junto con un dominio C-terminal de anclaje a GPI [3]. A este respecto, en el caso de SaEcm33p, se ha demostrado que presenta en su secuencia del sitio ***"w"*** (sitio de anclaje GPI en una proteína dada), una glicina en la posición 407. Pues bien, la región que precede a este sitio de anclaje, la llamada ***w-minus,*** determina el anclaje GPI a la membrana plasmática de SaEcm33, de tal forma que modificando esta región se ha logrado determinar el anclaje a membrana o pared celular de SaEcm33 [4].

Aunque la función molecular exacta de este grupo de proteínas es desconocida, diferentes evidencias experimentales la relacionan en general con la integridad de la pared celular.

- En el caso de Ecm33p, el mutante de levadura *ecm33Δ* es termosensible, incrementa la sensibilidad a calcofluor y estrés oxidativo [5], [6], [7]. Además presenta un crecimiento desorganizado de la pared celular [1]. Otro dato sobre SaEcm33p es que complementa al mutante parcial de *fsr2-1,* gen esencial con función en la síntesis de GPI. También complementa al mutante *las21Δ*, también involucrado en la síntesis de GPI [6]. A este respecto y con anterioridad se había demostrado que *LAS1* no controla la expresión de Ecm33 [8].
- *PST1* aumenta su expresión en diferentes cepas mutantes para la pared celular o en respuesta a daño en la pared celular transitorio [9], [10], actuando en el mecanismo compensatorio que desencadena la cascada de Slt2p, MAP kinasa responsable de la integridad de la pared celular. El mutante *pst1Δ* de levadura no presenta ningún fenotipo, pero la deleción de *PST1* en mutantes *ecm33Δ* (es decir, la construcción de un doble mutante *ecm33Δ* y *pst1Δ)* incrementa las anomalías en la pared celular del mutante *ecm33Δ*.
- Por su parte, *SPS2* se expresa en las etapa media-tardía de la meiosis [11] [12], y parece estar relacionada con la síntesis de la pared de la espora.
- *SPS22* es requerida redundantemente junto con *SPS2* en la organización de la capa de Beta-glucano de la pared de la espora.

Algunas de estas proteínas de la familia de Ecm33 han sido identificadas en *Candida albicans,* como es el caso de CaEcm33p (Ecm33.3f|CA3115 [1]). La deleción del gen *ECM33* en *Candida* tiene como consecuencia defectos en la pared celular y superficie. Además es requerida para la filamentación normal *in vitro* y se ha visto que presenta un efecto dosis dependiente. También fue relacionada su implicación en la virulencia [1]. Otras dos proteínas de la familia de Ecm33 en *Candida albicans* son CA2181|ECM331 (homóloga de SaPst1) y CA0513|IPF13972 (alta homología con SaSps22), aunque no existen datos experimentales sobre ellas. El hecho de que no

exista el homólogo de SaSps2p está en concordancia, en principio, con la ausencia de meiosis en el hongo patógeno.

Puesto que la función molecular de este conjunto de proteínas es desconocida, nos hemos propuesto el empleo de diferentes herramientas y estrategias bioinformáticas que, con carácter predictivo, puedan orientar la posterior investigación científica. Entre ellas figura la caracterización de la familia ECM33. Como proteína-referencia de cara a la predicción de la estructura tridimensional (desconocida para todas ellas) nos decidimos por Ecm33. Entre los motivos se encuentra el hecho de que la delección de este gen, aunque viable, presenta una manifestación fenotípica de interés: la desorganización de la pared celular de la levadura (Imagen 1). Esta es una de las principales pruebas existentes de vincula a estas proteínas con la pared celular.

Una de las causas en la dificultad para poder detectar una función es consecuencia de que no presenta homologías significativas con proteínas de función conocida (también de estructura conocida). Un primer intento en tratar de atribuirle una función lo hicieron *Lussier et.al.*, los cuales sugirieron que podría tener una función en la síntesis de los polisacáridos de la pared celular [5]. En este punto trataremos de servirnos del paradigma de la predicción de la función mediante la estructura en proteínas de función desconocida –el también llamado paradigma de la "secuencia-a-estructura-de-estructura-a-función". Esta paradigma está basado en el hecho de asumir que los patrones de la estructura tridimensional están conservados a lo largo de una mayor distancia evolutiva que los patrones reconocibles en la secuencia primaria [13]. Ésto a su vez está basado en los datos que pueden extraerse de la base de datos de estructuras proteicas (PDB), donde pueden apreciarse plegamientos similares entre proteínas con secuencias que tienen baja similitud [13], [14], [15], [16], [17].

Todo ello para tratar de explicar la presencia de proteínas de la Familia ECM33 en la superficie celular y la relación que tienen con la pared celular de los organismos fúngicos en los que han sido identificadas, especialmente, *S .cerevisiae* y *C. albicans*.

Métodos

Bases de datos

NCBI Non Redundant, nr, pdbaa, yeastaa
Proteín Data Bank
Swiss-Prot Release 44.7 of 11-Oct-2004
Candida Data Release R2 (Feb 9, 2004)
S. pombe database (Trust Sanger Institute http://www.sanger.ac.uk/)
A. fumigatus (Trust Sanger Institute http://www.sanger.ac.uk/)
SGD (*Saccharomyces* Genome Database): http://www.yeastgenome.org/

Los datos de interacciones proteicas fueron obtenidos de BIND (http://bind.ca/), GRID (http://biodata.mshri.on.ca/yeast_grid/) o PathCalling (http://portal.curagen.com/pathcalling_portal/index.htm).

Se emplearon diferentes algoritmos para la búsqueda de homólogos de la familia de Ecm33, BLAST, PSI-BLAST [18] y FASTA [19]. Los alineamientos entre dos secuencias los hicimos con *Blast 2 Sequence* [18]. Los alineamientos múltiples entre las proteínas seleccionadas fueron realizados con T-Coffee [20] y con HMMer se construyeron los Modelos Ocultos de Markov (HMM) [21]. Para la visualización de los resultados de las búsquedas realizadas con HMMer empleamos NAIL [22].

En la construcción el árbol filogenético se empleó *Evolutionary Trace Server* (TraceSuite II: http://www-cryst.bioc.cam.ac.uk/~jiye/evoltrace/evoltrace.html) [23]

En los análisis preliminares se llevaron a cabo búsquedas en las diferentes base de datos de familias, dominios, sitios funcionales y demás herramientas de análisis de secuencias tales como

- PFAM (http://www.sanger.ac.uk/Software/Pfam),
- CDD (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/cdd.shtml)
- InterPro (http://www.ebi.ac.uk/interpro),
- BLOCKS (http://blocks.fhcrc.org/blocks/),
- PRINTS (http://www.bioinf.man.ac.uk/dbbrowser/PRINTS/),
- SMART (http://smart.embl-heidelberg.de/)
- ProDom (http://protein.toulouse.inra.fr/prodom/current/html/home.php),
- Prosite (http://us.expasy.org/prosite/).
- MEME & MAST (http://meme.sdsc.edu/meme/website/)

Para la predicción de la presencia de péptido señal y localización celular de las diferentes proteínas se emplearon los servidores de PSORT II (http://psort.ims.u-tokyo.ac.jp/) y Signal IP [24]. En la predicción de proteínas de anclaje a GPI se empleó big-PI Predictor [25].

En el estudio y análisis de las composición y características de la secuencia, utilizamos ProtParam Tool (http://www.expasy.org/tools/protparam.html).

En la predicción de la estructura secundaria tuvimos en cuenta los datos obtenidos a través de PSIPRED [26] y PHD-PredictProtein ([27], además de Jufo, Jufo3D y SAM, todos ellos disponibles en el servidor automático de predicción de estructuras Robetta. El conjunto de resultados de las predicciones de estructuras secundarias, junto con los datos de los alineamientos múltiples, orientó el proceso que seguimos para dividir la secuencia de SaEcm33.

Para la predicción de la estructura tridimensional y basándonos en los resultados de PSI-BLAST frente a la base de datos de estructuras, consideramos más adecuado el empleo de servidores de

Reconocimiento de Plegamiento (*Fold Recognition*), o aquellos que modelen *de novo*. Los análisis de *Reconocimiento de Plegamiento* fueron realizados con FFAS [28] [29], mientras que los modelos fueron obtenidos mediante 3D-PSSM [30] y LOOPP [31]. Para el empleo de métodos de modelado *de novo* utilizamos el servidor automático Robetta [32], que combina en función de la secuencia remitida, el modelado comparativo y el modelado *de novo*.

Robetta sigue varios pasos en su proceso predictivo, comenzando por el empleo de un procedimiento de investigación jerarquizado, llamado *Ginzu*, con el objetivo de identificar los posibles dominios de la secuencia. Le sigue el empleo de *K*Sync*, un nuevo método para el alineamiento de una secuencia problema frente a la secuencia-estructura de un parental seleccionado, seguido a continuación por el *modelado comparativo* [33], que se basa en el método de la inserción de fragmentos *Rosetta*. En el caso de que no existe un modelo parental, Robetta procede al modelado mediante el empleo de una ligera modificación del protocolo para la predicción de estructuras *de novo* [34]. Una vez obtenido los modelos se hacen búsquedas mediante MAMMOTH [35] para la detección de similitudes estructurales entre modelos y estructuras de PDB.

Las imágenes fueron generadas con Rasmol [36] y PyMOL (DeLano Scientific; http://pymol.sourceforge.net/)

Resultados

Contexto genético

El conocimiento de un determinado gen en otros genomas (Predicción de la Función basado en ortólogos) proporciona información más específica sobre la función proteica, mientras que el análisis de la secuencia en su contexto genómico (Predicción de la Función basado en el contexto) proporciona información sobre su contexto funcional. Con este fin hemos analizado la región de DNA de entre 30-40kb alrededor de los genes motivos de este estudio (ver resumen **tabla 1**)

En levadura, lo primero que llama la atención es que *ECM33* y *PST1*, cromosomas II y IV respectivamente, tienen en sus proximidades genes que están relacionados con el transporte de aminoácidos, como es *TAT1* en Ecm33, mientras que en el caso de *PST1* tiene cerca a *BAP3*, una permeasa relacionada con los mismos aminoácidos. Además, genes implicados en el transporte intracelular, como *YOS9* en el cromosoma IV(*PST1)* y *SEC18* en el cromosoma II (*ECM33)*. También se encuentra en el contexto de *ECM33* proteínas necesarias para la viabilidad celular (YBR070C). Cerca de *PST1* está *TPI1*, con la misma característica. En ambos entornos podemos encontrar también genes que median en los procesos de degradación proteica (*UBC4* en el cromosoma II; *CDC 34* y *UBC5* en el cromosoma IV). En los alrededores de *SPS2*, situado también en el cromosoma IV, principalmente se encuentran genes involucrados en la meiosis (*EMI1, EMI2, SPS1)*. También existen los de transporte intracelular (*FPR2*) y la viabilidad celular *(RBA50*). Algo parecido sucede en el caso de *SPS22,* en cuyas proximidades encontramos a *MRC1* y *KAR4* implicados en la meiosis, o *LRE1*, relacionada con la estructura de la pared celular; *GRX1 y STE50*, genes de respuesta a stress oxidativo.

Con respecto al estudio de *ECM33* en otros genomas conocidos, como es el de *C. albicans,* encontramos que en sus contextos genéticos se encuentra una mayoría de genes de función aún por determinar. A pesar de esto, en las proximidades de *ECM33.3* (cromosoma I), encontramos, al igual que sucede en la levadura, tres genes implicados en el **transporte intracelular** *(BMH2, CDC12, GGA1)* y otro implicado en la **degradación** (*COQ4*).

Interacciones genéticas-proteicas

En trabajos recientes se está comenzando a establecer modelos de predicción de la función basados en los datos disponibles de interacciones [37] [38] [39]. Los datos de interacción genética y proteica disponibles en las bases de datos sobre SaEcm33 son las siguientes:

2-híbridos Levadura
YNL124W (*NAF1*) : Factor de ensamblaje nuclear

BIND (Biomolecular Interaction Network Database)
- ABF1 - FKH2 - MBP1 - NDD1 - SWI4 - SWI6 –>[40]: Factores de transcripción que se unen a una determinada secuencia consenso que tiene *ECM33*
- CSE1 - MLP1 - MLP2 - NIC96 - NUP100 - NUP116 - NUP2 - XPO1 -> [41]: factores de transporte nuclear relacionados con muchos genes entre ellos *ECM33.*

Yeast GRID (Base de datos de interacciones genéticas y físicas)
-SLT2 / YHR030C – Sintético letal [42]: la delección de SLT2, una MAP-Kinasa que regula rutas de integridad de la pared celular, es viable en levadura. Pero la delección de ECM33 y SLT2 es letal (no hay crecimiento). Otros genes directamente relacionados con la pared, además de *ECM33*, con los *SLT2* produce sintéticos letales son:

-CHS3: Sintetasa de Quitina III
-CWH41: Alfa-glucosidasa I
-KRE11: función desconocida pero involucrada en la biosíntesis de los betaglucanos de la pared celular.
-SMI1: Función desconocida pero involucrada en la biosíntesis de los betaglucanos de la pared.
-HOC1: alfa-1,6-manosiltrasferasa
-CHS5: Involucrada en la biosíntesis de quitina.

-FKS1: 1,3-beta-D-glucano sintetasa (esta tiene a su vez 86 interacciones sintéticas)

-HRT1 / YOL133W: **Complejo Asociado a HRT1** y compuesto por las siguientes proteínas [43]: *ADR1, BBC1, CDC39, CDC53, CRM1, DUR1,2, ECM29, ECM33, FAA4, GAL3, GCN1, GUF1, HYP2(pb), IDH1(met), KIM3, MKT1, MYO2, PFK1, PMA2, RPA190, RPN1, RPN8, RTT101, SEC27, TPS1, UBI4, VPS13, YAR009C, YGP1, YLL034C, YLR035C-A, YLR106C*

Predicciones de Péptido señal y anclaje a Gpi. Motivos

De forma experimental se ha demostrado que Ecm33 presentan anclaje GPI a membrana, así como la región de su secuencia responsable de la localización de este anclaje en la membrana y no en la pared celular. Es por lo tanto interesante estudiar las predicciones en este sentido para el resto de miembros iniciales de la familia, que son las que se muestran en la **tabla 1**.

Predicción de Asn-glucosilaciones, características físico-químicas, y estructura secundaria

La modificación post-traduccional estudiada es la glucosilación. Los resultados para los principales componentes de la Familia ECM33 se muestran en ***datos complementarios*** disponibles *on line*.

Los resultados de la predicción de la estructura secundaria apuntan hacia una estructura principalmente beta, y existe un relativo consenso por parte de todos los servidores empleados, y en general, para todas las proteínas analizadas. Un análisis más detallado de la predicción de la estructura secundaria lo llevamos a cabo en SaEcm33 (**Figura 2**), para lo cual se emplearon un mayor número de servidores de predicción de estructura secundaria. Los resultados que obtuvimos nos sugirieron la subdivisión de la secuencia en dos regiones. Esto se veía reforzado a raíz de los datos obtenidos de las búsquedas a través de servidores de familias y dominios proteicos (ver métodos), de tal forma que variaban las predicciones de regiones de SaEcm33p que presentaban homología con el dominio del "*Dominio-L*" del Receptor, y en función de si la búsqueda se realizaba en PFAM o en CDD.

Tras esta subdivisión, analizamos las características físico-químicas, dedicando especial atención a la composición aminoacídica y a la proporción de aminoácidos con carga positiva (Argininas y Lisinas) y a los cargados negativamente (Aspartato y Glutámico). Cabe destacar que mientras en la región N-terminal existe una mayor cantidad de aminoácidos con carga negativa, en la región C-terminal ocurre lo contrario, es decir, un mayor número de aminoácidos con carga positiva, aunque la diferencia es menor. Para extrapolar estos análisis al resto de miembros de la Familia ECM33, dividimos las secuencias en función de los alineamientos múltiples. Como puede observarse en la **tabla 3**, podemos comprobar que los resultados son muy similares para el resto de miembros de la familia y en las proteínas que son seleccionados como parentales en el *modelado comparativo* y para *el reconocimiento de plegamiento*, como veremos más adelante.

BLAST, PSI-BLAST, HMMER: Caracterización de la Familia Ecm33 a nivel de secuencia.

Para la caracterización de la familia de Ecm33, y partiendo de los miembros de esta proteína en levadura (esto es, Ecm33p, Pst1, Sps2 y Sps22), comenzamos la identificación de los principales ortólogos en otros organismos. Las búsquedas comenzaron frente a la base de datos de *Candida*, a fin de identificar los homólogos ya de sobra conocidos: Ecm33.3|CaEcm33 (homólogo de SaEcm33), Ecm33.1|CaPst1 (homólogo de Pst1) e IPF13972|CaSps22 (proteína homóloga de Sps22). Todo este conjunto de proteínas, junto con las nuevas que iban siendo identificadas en otros organismos, fueron incorporándose a la construcción de los alineamientos múltiples y los correspondientes HMMs de cara a mejorar las búsquedas.

En la **tabla 4** se muestran los organismos en los cuales han sido identificados los homólogos (cuya mayoría de genomas están aún por secuenciar completamente).

Estudio Filogenético

De cara al estudio filogenético del conjunto de proteínas que forman parte de la Familia ECM33 utilizamos el *TraceSuite II Server* (ver Métodos). En el estudio se utilizaron los alineamientos múltiples correspondientes a todos los miembros de la Familia de Ecm33 que hemos identificado (**tabla3**), junto con las regiones C-terminal y N-terminal de los principales miembros de la familia. Los resultados se muestran en la **figura 1**.

Predicción de Estructura

Del análisis de los resultados obtenidos mediante búsquedas frente a la base de datos de estructuras (PDB) a través de métodos sensibles como son HMMer y PSI-Blast, llegamos a la conclusión de que el bajo porcentaje de identidad descartan el empleo de métodos basados en el modelado por homología tal como Swiss-Model [44], CHPmodels [45], 3D-JIGSAW [46] o ESyPred3D [47]. Por tanto, para la predicción y análisis de la estructura proteica nos decidimos por el empleo de servidores de *reconocimiento de plegamiento* (*Fold Recognition*, **tabla 4**) y métodos *Ab initio* (ver **"Resultados de Robetta"**).

Los *Resultados* complementarios están disponibles en la url:
http://www.ucm.es/biwo/ecm33davidjm.htm

Discusión

Tras los resultados obtenidos, parece evidente que se trata de una familia de proteínas que forma parte exclusivamente de organismos fúngicos. Conforme se vayan ampliando y completando el número de genomas (especialmente de organismos fúngicos), podremos ir detectando un mayor número de proteínas que pertenezcan a la Familia ECM33.

Del análisis de las homologías y sobre todo, tras el análisis filogenético realizado en este trabajo, pueden apreciarse dos principales ramas evolutivas, las cuales se corresponden con dos tipos proteicos. Esto nos permite dividir la Familia ECM33 en dos Subfamilias:

- **Proteínas del tipo Ecm33 y Pst1.**
- **Proteínas del tipo Sps2 y Sps22.**

Estas subfamilias están en correspondencia con los datos experimentales que hasta la fecha hay disponibles, puesto que mientras la Subfamilia de Ecm33 y Pst1 se expresa en la célula normal, la subfamilia de Sps22 y Sps2 está relacionada con la formación de la espora.

Aunque no es descartable la posibilidad de que Ecm33 se encuentre formando parte de la pared celular [48], no hay duda del anclaje GPI a la membrana plasmática [4]. Ahora bien, Terashima et. al. afirmaban que la secuencia de la región *w-minus* necesaria para la localización en la membrana plasmática de Ecm33 es SKKSK. Teniendo en cuenta que CaEcm33 complementa la función de SaEcm33 [1], podemos asumir que CaEcm33 también presenta anclaje GPI a la membrana. La región w-5 y w-1 candidata en CaEcm33p es 364-SSKKSG. Ello puede deducirse del análisis de la homología entre SaEcm33 y CaEcm33 (ver material complementario), puesto que se encuentra a una distancia similar a la de la misma región en SaEcm33, tomando como referencia la Cys conservada en la posición 351 de SaEcm33p. Estos datos pueden ser de utilidad de cara al diseño de experimental.

Como ha sido descrito previamente [49], entre las propiedades biológicas que obtiene una proteína que ha sido o-glucosilada, destaca aquella en la que adquiere rigidez y estabilidad proteica. Además se ha visto que la adición de o-glucanos en dominios ricos en Ser/Thr (/Pro) puede ser importante para un reconocimiento funcional. Estos dominios glucosilados pueden proporcionar a las glucoproteínas de la superficie celular resistencia frente a proteasas. Entre las principales características de la Familia ECM33 destaca que presentan regiones ricas en Serinas y Treoninas y que están localizadas en las superficie celular. Por tanto, es de esperar que entre las modificaciones post-traduccionales que presenta este grupo de proteínas se encuentre la o-glucosilación. Estas sospechas están en concordancia con los resultados obtenidos mediante el empleo de herramientas predictivas (ver métodos), puesto que todas las proteínas de la Familia tienen varios sitios posibles de glucosilación (ver datos complementarios).

A la espera de que se determine la estructura proteica de algún miembro de la familia y con la cautela propia con la que en general deben de recibirse las predicciones de estructura secundaria, la primera característica en común desde un punto de vista estructural, es que se trata de un grupo de proteínas que adquiere una conformación principalmente *beta*, basándonos en el amplio consenso apreciado entre diferentes servidores de predicción de estructura secundaria.

En lo que respecta a los modelos de predicción de estructura proteica tridimensional generados a través de los diferentes métodos seleccionados, existe consenso a la hora de establecer los parentales en la construcción de los modelos: la Internalina de *Listeria mononcytogenes* o el Receptor del Factor de Crecimiento Insulina-like (IGFR). La elección de uno u otro parental está estrechamente relacionado con la parte de la secuencia que enviemos y el método empleado. Uno u

otro parental son siempre seleccionados por los servidores de reconocimiento de plegamiento, con la excepción Robetta.
Robetta emplea como parental en la construcción de sus *modelos comparativos* la *Internalina* para la secuencia procesada de Ecm33 (19-407). Sin embargo emplea como parental a IGFR cuando enviamos la región N-terminal. Ahora bien, si lo que enviamos es la región C-terminal, concretamente el fragmento 279 a 407 existe un cambio y Robetta procede al modelado *de novo*.

Pero analicemos las características de los parentales. La *Internalina* (INLA_LISMO) es una proteína que se encuentra en la superficie celular de *Listeria monocytogenes.* Esta proteína se encarga de interaccionar con una proteína humana, la Cadherina 1 (CAD1_HUMAN), proteína que forma parte de la membrana de determinadas células humanas, de tal forma que la interacción entre ambas tiene como consecuencia la entrada en la célula humana de *L. monocytogenes.* La Internalina A presenta dos dominios en su estructura, el dominio LRR, de 400 aminoácidos de lóngitud, caracterizado a nivel de secuencia por 15 repeticiones en tanden ricas en leucina y que está caracterizado estructuralmente por la repetición de una lámina *beta* en un lado y una hélice-3_{10} antiparalela en el lado opuesto (**Imagen 2**, en cian). La base de datos de clasificación de estructuras proteicas SCOP [15] la cataloga como un dominio de la clase alfa-beta, con un tipo de plegamiento de repeticiones ricas en Leucina (LRR), de la superfamilia de los L-Domains. Tras el dominio LRR, le sigue el dominio *parecido a Inmunoglobulina*, que está formado por 4 láminas *beta* imperfectas, es decir, de diferente longitud, y de unos 100 aminoácidos de longitud aproximadamente (**Imagen 2**, color rojo). Según las predicciones de estructura secundaria para la parte final de la secuencia de SaEcm33, no existiría homología estructural con este dominio *parecido a Inmunoglobulina.*

Con respecto a *IGFR*, se trata de un receptor que se dispone en la membrana plasmática de determinadas células humanas formando dímeros y que se caracteriza por la repetición de dos dominios (llamados L1 y L2) de unos 140 aminoácidos cada uno, separados por una región rica en Cys (ver **Imagen 3**). Estos dominios, llamados en general *L-Domain* son idénticos entre si y corresponde con la región del IGFR que es seleccionado como parental de cara a la elaboración de los modelos predictivos. Se caracterizan por la repetición de una lámina beta mayor (6 aminoácidos), giro, seguido de una lámina beta menor (de unos 3 aminoácidos). SCOP clasifica los *L-domains* de la clase proteínas alfa-beta, con un tipo de pliegue de repeticiones ricas en leucina y de la superfamilia y familia de los *L-domains*.

Por tanto, se trata en realidad de un mismo tipo de conformación proteica la que es seleccionada de cara a la elaboración de los modelos estructurales, tanto en el caso del *fold recognition* como en el *modelado comparativo* de Robetta: el dominio LRR de la internalina y el Dominio-L del IGFR.

El hecho de que los diferentes métodos seleccionen uno u otro parental está en función del fragmento de la secuencia que enviemos. Si estudiamos la secuencia del procesado de SaEcm33, esto es, sin el péptido señal y el fragmento que se elimina tras el anclaje mediante GPI (A21 a G407), el parental seleccionado es la Internalina, proteínas de mayor tamaño y por tanto una mayor homología estructural "en general". Pero si enviamos diferentes fragmentos, tanto de la región N-terminal como de la C-terminal, el parental seleccionado es el *Dominio L* de IGFR, de menor longitud. Esto nos permite afirmar que en realidad, SaEcm33 presenta una mejor homología estructural con el *Dominio-L* del IGFR.

Teniendo en cuenta los resultados de las predicciones de estructura secundaria, en el que se obtiene predicción de mayoritaria de láminas *beta* (excepto la parte final), es posible afirmar que los modelos propuestos para el procesado de SaEcm33 están basados en un parental que no es el más adecuado, puesto que en él se suceden láminas beta y hélices alfa. El parental más adecuado y por tanto, la estructura más probable de SaEcm33, es la basada en el *Dominio-L* del IGFR, al menos en lo que respecta a los primeros 300 aminoácidos.

Sin embargo, para los 130 aminácidos restantes del extremo C-terminal, Robetta opta por el modelado *de novo*, en lugar del modelado comparativo (ver Resultados de Robetta, Predicción 3). Con respecto a la fidelidad predictiva de los modelos en los que Robetta emplea el protocolo *de novo* para esta región C-terminal, existen varios factores a tener en cuenta. El método de modelado *de novo* está optimizado para fragmentos inferiores a 120 residuos. Pero los mejores modelos obtenidos por Robetta en el LIVEBENCH 7 y 8 (http://bioinfo.pl/LiveBench/) [50], tanto para proteínas con estructuras principalmente α como para las principalmente β, fueron para las secuencias que tenían entre 151-200 aminoácidos de longitud. En lo que respecta a las proteínas αβ, como sería el fragmento de SaEcm33 analizado, los resultados fueron mejores para dominios de entre 100-150 aminoácidos [32].

Con respecto a los resultados de las búsquedas que se obtienen mediante MAMMOTH de los modelos de la región c-terminal de Ecm33, el mejor Z-score obtenido corresponde al modelo 3 (Z-score = 6.32), que corresponde a una transferasa (Dihydropteroate synthase 1), la cual presenta una estructura de tipo TIM-Barrel. El modelo 3 presentaría homología estructural con un fragmento de este dominio en barril.

Sobre la función proteica

A la vista de los resultados obtenidos de los modelos, SaEcm33p presentaría una estructura de "Receptor", en el sentido de una conformación estructural preparada para establecer una interacción física, desde con una molécula pequeña, hasta con un complejo proteico. Un dato a favor de esta afirmación es el patrón de mayor carga negativa que apreciamos en el extremo N-terminal de la mayoría de los miembros de la familia que hemos analizado (además de los parentales). Como en principio no podemos señalar una función catalítica en Ecm33, al menos en los 300 aminoácidos del extremo N-terminal, más que un Receptor, en el sentido de proteína de superficie capaz de recibir un estímulo y transmitir una señal, podemos afirmar que presenta una estructura más bien de "proteína andamio" o de *apoyo* para otras proteínas.

Ahora bien, ¿con quién interaccionaría SaEcm33? Para tratar de responder a esa pregunta buscamos en las bases de datos las interacciones genéticas y proteicas descritas sobre SaEcm33. En el trabajo de Hu et.al, SaEcm33 fue encontrada en el complejo HTR1. En este complejo existen varias proteínas que tienen algún tipo de función en el proceso de ubiquitinación o relacionadas con la maquinaria de degradación (*CDC53, ECM29, HTR1, RPN1, RPN8, RTT101, UBI4*). También otras relacionadas con el tamaño celular y pared celular (*CDC39, HYP2*), o bien proteínas relacionadas con el movimiento de orgánulos (*VPS13, UBI4, BBC1*). Y las hay relacionadas con respuesta a inanición frente a la carencia de determinados aminoácidos (*GCN1, YGP1*) y otros tipos de stress (*TPS1*). Teniendo en cuenta además los datos del estudio del *contexto genético*, SaEcm33 así como sus ortólogos (en este caso, CaEcm33), presentan genes con función en el transporte celular, la viabilidad celular, transporte de aminoácidos y sobre todo, relacionados con ubiquitinación, un tipo de gen presente en el contexto genético de todos los miembros de la familia Ecm33 en levadura. Esta cierta similitud nos podría invitar a no descartar la relación con alguna de estas proteínas, en la pared celular, como por ejemplo, la maquinaria de degradación.

Sí tenemos en cuenta la *desorganización* que se produce en la pared celular como consecuencia de la deleción de Ecm33, más el hecho de que van disminuyendo los efectos de la desorganización a medida que vamos añadiendo Ecm33 (efecto fenotípico dosis-dependiente), también es posible pensar que Ecm33 interaccione con una (o varias proteínas) que estén relacionadas con la construcción o la regulación en la construcción de la pared celular.

Los efectos fenotípicos que podemos apreciar tras la deleción de *ECM33* en levadura son consecuencia de la respuesta celular que activa la ruta de integridad celular dependiente de Slt2p. Este gen, el cual se encuentra muy expresado en los mutantes *ecm33Δ (Martínez et al,* datos sin publicar), activa una cascada de genes que tienen como función paliar los daños detectados en la pared. Por tanto, podría resultar de ayuda la deleción del gen *SLT2* junto con la deleción de *ECM33*, para poder apreciar los efectos fenotípicos *reales* de *ECM33*. Pero la consecuencia de este doble mutante es que no hay crecimiento de la levadura (sintético letal) [42]. Existen hasta la fecha 61 interacciones genéticas descritas para *SLT2*, de tal forma que 46 son sintético letales. De entre ellas, 7 genes tienen una función directa en la pared celular. Esto nos puede dar una idea de la importancia de *SLT2*, pero a su vez de cómo se puede ver afectada la estructura de la pared celular como consecuencia de la deleción de un solo gen. Si *ECM33* establece una relación con otra proteína en la pared celular, la deleción de este gen debería de presentar efectos fenotípicos similares a los de *ECM33*.

El mismo tipo de función desempeñarían en principio el resto de componentes de la Familia ECM33, cada uno en sus determinados contextos, tanto en la pared del organismo fúngico como en la pared de la espora. En función de la importancia de las relaciones entre cada uno de los componentes de la familia y la maquinaria de degradación, tendría una mayor o menor importancia.

Sugerencias experimentales

De cara a la identificación de sitios importantes para la función de ECM33, podría resultar de interés mutar los aminoácidos que se encuentran conservados en toda la familia ECM33. Estos aminoácidos, en SaEcm33 son: L118, N171, N194, L205, L224, G247, G298, G304, L314, V317, G319, C332, C351.

También podría ser de interés el estudio de interacciones proteicas con SaEcm33 mediante el uso de proteínas recombinantes GST.

Tabla 1. Genes de la familia ECM33 en sus respectivos contextos genéticos (30-40kb entorno a los genes estudiados). Están agrupados según la función principal que desempeñen.

	SaEcm33	**CaEcm33**	**SaPst1**	**SaSps2**	**SaSps22**
Transporte de aa	*TAT1*		*BAP3*		*MRC1*
Transporte intracelular / Movilidad celular	*SEC18*	*GGA1* *CDC12* *BMH2*	*YOS9*	*FPR2*	*SRO9*
Viabilidad celular / Stress	*YBR070C*		*TPI1*	*RBA50* *HLR1*	*KRR1* *FYV5* *GRX1* *STE50*
Degradación proteica	*UBC4*	*COQ4*	*CDC34* *UBC5*	*SMT3*	*GID7*
Meiosis				*EMI1* *EMI2* *SPS1*	*KAR4*
Estructura de la pared celular					*LRE1*

Tabla 2. Predicción de Péptido Señal y GPI

	Signal IP	**Psort II**	**GPI**	**DGPI**	**GPI Dem**
SaEcm33	Si (21-22)	Si (19-20)	No (445)	SI (445)	Gpi: 407*
CaEcm33	Si (18-19)	Si (1-18)	Si (399)	Si (394)	
SaPst1	Si (19-20)	Si (24-25)	No (419)	No (419)	
CaPst1	Si (20-21)	Si (23-24)	No (384)	Si (385)	
SaSps2	No (23-24)	Si (56-57)	No (475)	No (475)	
SaSps22	Si (25-26)	Si (1-25)	Si (440)	Si (440)	
CaSps22	No (28-29)	No	Si (452)	No (440)	
SpMeu10	Si (29-30)	No (29-30)	No (395)	Si (389)	
EgSps22	Si (19-20)	Si (19-20)	No (457)	Si (455)	

* [4]

Tabla 3. Tabla comparativa. En ella se recogen la composición aminoacídica de los principales miembros de la Familia de Ecm33, junto con los principales homólogos parentales seleccionados por los diferentes servidores de predicción de estructura.

Ecm33 21-200	**CaEcm33 19-204**	**SaPst1 19-199**	**CaPst1**	**SaSps2**
Amino acid composition: Ala (A) 12 6.7% Arg (I) 1 0.6% Asn (N) 16 8.9% Asp (D) 11 6.1% Cys (C) 2 1.1% Gln (Q) 7 3.9% Glu (E) 6 3.3% Gly (G) 10 5.6% His (H) 0 0.0% Ile (I) 17 9.4% Leu (L) 18 10.0% Lys (K) 5 2.8% Met (M) 2 1.1% Phe (F) 8 4.4% Pro (P) 2 1.1% Ser (S) 35 19.4% Thr (T) 19 10.6% Trp (W) 0 0.0% Tyr (Y) 1 0.6% Val (V) 8 4.4% - (Asp + Glu): 17 + (Arg + Lys): 6	Amino acid composition: Ala (A) 18 9.7% Arg (I) 0 0.0% Asn (N) 17 9.2% Asp (D) 10 5.4% Cys (C) 2 1.1% Gln (Q) 9 4.9% Glu (E) 8 4.3% Gly (G) 12 6.5% His (H) 1 0.5% Ile (I) 12 6.5% Leu (L) 18 9.7% Lys (K) 8 4.3% Met (M) 0 0.0% Phe (F) 7 3.8% Pro (P) 2 1.1% Ser (S) 17 9.2% Thr (T) 25 13.5% Trp (W) 0 0.0% Tyr (Y) 2 1.1% Val (V) 17 9.2% -(Asp + Glu): 18 +(Arg + Lys): 8	Amino acid composition: Ala (A) 14 7.7% Arg (I) 1 0.6% Asn (N) 16 8.8% Asp (D) 9 5.0% Cys (C) 2 1.1% Gln (Q) 6 3.3% Glu (E) 3 1.7% Gly (G) 9 5.0% His (H) 1 0.6% Ile (I) 14 7.7% Leu (L) 19 10.5% Lys (K) 11 6.1% Met (M) 0 0.0% Phe (F) 8 4.4% Pro (P) 3 1.7% Ser (S) 35 19.3% Thr (T) 19 10.5% Trp (W) 0 0.0% Tyr (Y) 2 1.1% Val (V) 9 5.0% - (Asp + Glu): 12 + (Arg + Lys): 12	Amino acid composition: Ala (A) 11 6.2% Arg (I) 0 0.0% Asn (N) 22 12.4% Asp (D) 10 5.6% Cys (C) 2 1.1% Gln (Q) 9 5.1% Glu (E) 5 2.8% Gly (G) 9 5.1% His (H) 0 0.0% Ile (I) 18 10.1% Leu (L) 24 13.5% Lys (K) 8 4.5% Met (M) 0 0.0% Phe (F) 6 3.4% Pro (P) 2 1.1% Ser (S) 26 14.6% Thr (T) 16 9.0% Trp (W) 0 0.0% Tyr (Y) 0 0.0% Val (V) 10 5.6% - (Asp + Glu): 15 + (Arg + Lys): 8	Amino acid composition: Ala (A) 8 3.7% Arg (I) 4 1.8% Asn (N) 23 10.6% Asp (D) 12 5.5% Cys (C) 2 0.9% Gln (Q) 6 2.8% Glu (E) 17 7.8% Gly (G) 11 5.0% His (H) 4 1.8% Ile (I) 25 11.5% Leu (L) 24 11.0% Lys (K) 18 8.3% Met (M) 1 0.5% Phe (F) 8 3.7% Pro (P) 6 2.8% Ser (S) 16 7.3% Thr (T) 11 5.0% Trp (W) 2 0.9% Tyr (Y) 4 1.8% Val (V) 16 7.3% - (Asp + Glu): 29 + (Arg + Lys): 22
Sa Sps22	**1igr (285-463)**	**1n8y (28-225)**	**1o6sAn**	
Amino acid composition: Ala (A) 8 3.6% Arg (I) 8 3.6% Asn (N) 23 10.4% Asp (D) 12 5.4% Cys (C) 3 1.4% Gln (Q) 11 5.0% Glu (E) 16 7.2% Gly (G) 9 4.1% His (H) 7 3.2% Ile (I) 24 10.9% Leu (L) 25 11.3% Lys (K) 12 5.4% Met (M) 1 0.5% Phe (F) 11 5.0% Pro (P) 9 4.1% Ser (S) 18 8.1% Thr (T) 8 3.6% Trp (W) 1 0.5% Tyr (Y) 2 0.9% Val (V) 13 5.9% - (Asp + Glu): 28 + (Arg + Lys): 20	Amino acid composition: Ala (A) 6 3.1% Arg (I) 9 4.6% Asn (N) 15 7.7% Asp (D) 11 5.7% Cys (C) 7 3.6% Gln (Q) 9 4.6% Glu (E) 18 9.3% Gly (G) 14 7.2% His (H) 3 1.5% Ile (I) 13 6.7% Leu (L) 19 9.8% Lys (K) 14 7.2% Met (M) 5 2.6% Phe (F) 6 3.1% Pro (P) 4 2.1% Ser (S) 14 7.2% Thr (T) 9 4.6% Trp (W) 2 1.0% Tyr (Y) 6 3.1% Val (V) 10 5.2% - (Asp + Glu): 29 + (Arg + Lys): 23	Amino acid composition: Ala (A) 8 5.9% Arg (I) 10 7.4% Asn (N) 8 5.9% Asp (D) 9 6.6% Cys (C) 2 1.5% Gln (Q) 14 10.3% Glu (E) 6 4.4% Gly (G) 9 6.6% His (H) 1 0.7% Ile (I) 6 4.4% Leu (L) 19 14.0% Lys (K) 5 3.7% Met (M) 2 1.5% Phe (F) 3 2.2% Pro (P) 7 5.1% Ser (S) 4 2.9% Thr (T) 5 3.7% Trp (W) 1 0.7% Tyr (Y) 4 2.9% Val (V) 13 9.6% - (Asp + Glu): 15 + (Arg + Lys): 15	Amino acid composition: Ala (A) 14 5.0% Arg (I) 3 1.1% Asn (N) 39 13.9% Asp (D) 17 6.0% Cys (C) 0 0.0% Gln (Q) 11 3.9% Glu (E) 8 2.8% Gly (G) 9 3.2% His (H) 0 0.0% Ile (I) 23 8.2% Leu (L) 61 21.7% Lys (K) 12 4.3% Met (M) 1 0.4% Phe (F) 5 1.8% Pro (P) 9 3.2% Ser (S) 29 10.3% Thr (T) 29 10.3% Trp (W) 1 0.4% Tyr (Y) 3 1.1% Val (V) 7 2.5% - (Asp + Glu): 25 + (Arg + Lys): 15	

Tabla 4. Familia Ecm33. Las proteínas identificadas han sido ordenadas por columnas y en función de la mayor homología con los miembros de *Saccharomyces cerevisiae*, única especie en la que se han conseguido verificar todas las proteínas de la familia de Ecm33.

Saccharomyces cerevisiae (Sc)	**SaEcm33**	**SaPst1**	**SaSps2**	**SaSps22|YCE8**
Candida albicans (Ca)	**CaEcm33.3**	**CaPst1|Ecm33.1**		**CaSps22 IPF13972**
Schizosaccharomyces pombe(Sp)	**SpYin3**	**SpMeu10**		
Eremothecium gossypii (Eg)	**EgEcm33|Q75DT6**			**EgSps22|AFR723Cp**
Kluyveromyces lactis (Kl)	**01Kl|gi|50305773**			**02Kl|gi|50304567**
Neurospora crassa (Nc)		**NcMeu10|XP_3313281|**		
Candida glabrata (Cg)	**01Cg|gi|50294025** **02Cg|gi|50286919**			**03Cg|gi|50288883** **04Cg|gi|50285137**
Debaryomyces hansenii (Dh)	**01Dh|gi|50427223**	**03Dh|ref|XP_4625991**		**Dh|gi|50428239** **01Dh|gi|50427223?**
Yarrowia lipolytica (Yl)	**01Yl|gi|50550121**			
Aspergillus nidulans (An)		**An01|gi|40741117**		
Magnaporthe grisea(Mg)		**01Mg|gb|EAA530611**		
Gibberella zeae(Gz)		**01Gz|gb|EAA704051**		

Tabla 5. Resultados de los diferentes servidores de Fold Recognition

Resultados de FFAS.

Principales proteínas de la Familia Ecm33 y junto con fragmentos de SaEcm33

Query	Length	Result vs.	Range	Score	%id	Covered by template(s)
SaEc33_pr	401	pdb0504	3-382	-25.200	12	1m6b_A mol:protein length:621 Receptor Protein-Tyrosine Kinase Erbb-3
			10-321	-25.700	13	1igr_A mol:protein length:478 Insulin-Like Growth Factor Receptor 1
SaEcm33_pr	401	scop165	6-165	-23.300	18	d1igra2 c.10.2.5 (A:300-478) Type 1 insulin-like growth factor receptor extrac-domain
			17-354	-15.800	11	d1o6va2 c.10.2.1 (A:33-416) Internalin A {*L. monocytogenes*}
C-t SaEcm33	167	pdb0504	7-158	-19.600	12	**1igr_A** mol: 478 Insulin-Like Growth Factor Receptor 1
N-t SaEcm33	234	pdb0504	29-182	-28.900	17	**1igr_A** mol: 478 Insulin-Like Growth Factor Receptor 1
Ecm33p_Candida	423	scop165	33-130	-22.300	16	d1igra1 c.10.2.5 (A:1-149) Type 1 insulin-like growth factor receptor extrac-domain
			44-322	-12.500	14	d1o6va2 c.10.2.1 (A:33-416) Internalin A {Listeria monocytogenes}
			59-285	-15.300	8	d1h6ua2 c.10.2.1 (A:36-262) Internalin H {Listeria monocytogenes}
PST1_YEAST	444	pdb0504	27-320	-16.200	15	1m6b_A mol:protein length:621 Receptor Protein-Tyrosine Kinase Erbb-3
			29-396	-14.600	9	1igr_A mol:protein length:478 Insulin-Like Growth Factor Receptor 1
SPS2_YEAST	502	pdb0504	3-484	-15.200	9	1g9u_A mol:protein length:454 Outer Protein Yopm
			6-388	-26.100	13	1o6s_A mol:protein length:466 Internalin A
			101-443	-20.700	13	1igr_A mol:protein length:478 Insulin-Like Growth Factor Receptor 1
SPS22_Yeast	463	pdb0504	4-377	-16.700	12	1g9u_A mol:protein length:454 Outer Protein Yopm
			34-451	-12.800	7	1a4y_A mol:protein length:460 Ribonuclease Inhibitor
			36-415	-22.500	14	1o6s_A mol:protein length:466 Internalin A
			111-377	-25.000	13	1h6u_A mol:protein length:308 Internalin H

Resultados de 3D-PSSM

SaEcm33 procesado (21-407)

Fold Library	Template Lengh	PSSM E_Value	Fold	Superfamily
c1o6sa_ 15%i.d.	460	0.00154	bacterial infection	Internalin a
c1h6ua_ 14%i.d.	308	0.00809	Cell adhesion	Internalin h
c1jl5a_ 13%i.d.	353	0.032	Toxin	outer protein yopm;.
c1h6ta_ 12%i.d.	291	0.0547	Cell adhesion.	Internalin b
		Ecm240_407 C-terminal		
d1igra1 17%i.d .	149	3.84e-05	tyrosine,insulin,iii-like Leucine-rich repeat, LRR (right-handed beta-alpha superhelix)	L domain-like
		SaEcm33 (19-300) N-terminal		
c1h6ua_ 15%i.d.	308	0.133	membrane Signal Transmembrane	internalin

Resultados de LOOPP para el procesado de Ecm33 (21-407)

Nombre	Confidence	score	Homolog	hits	length	Seq, Ident
1O6V_A	HIGH	3.142	0	1	97.94%	19.47%
1JL5_A	HIGH	1.901	0	1	85.05%	14.67%
1M9S_A	GOOD	1.763	0	1	97.94%	13.47%
1OZN_A	GOOD	1.632	1	1	68.30%	14.59%

Figura 1. Árboles filogenéticos mediante el empleo de TraceSuite 2.

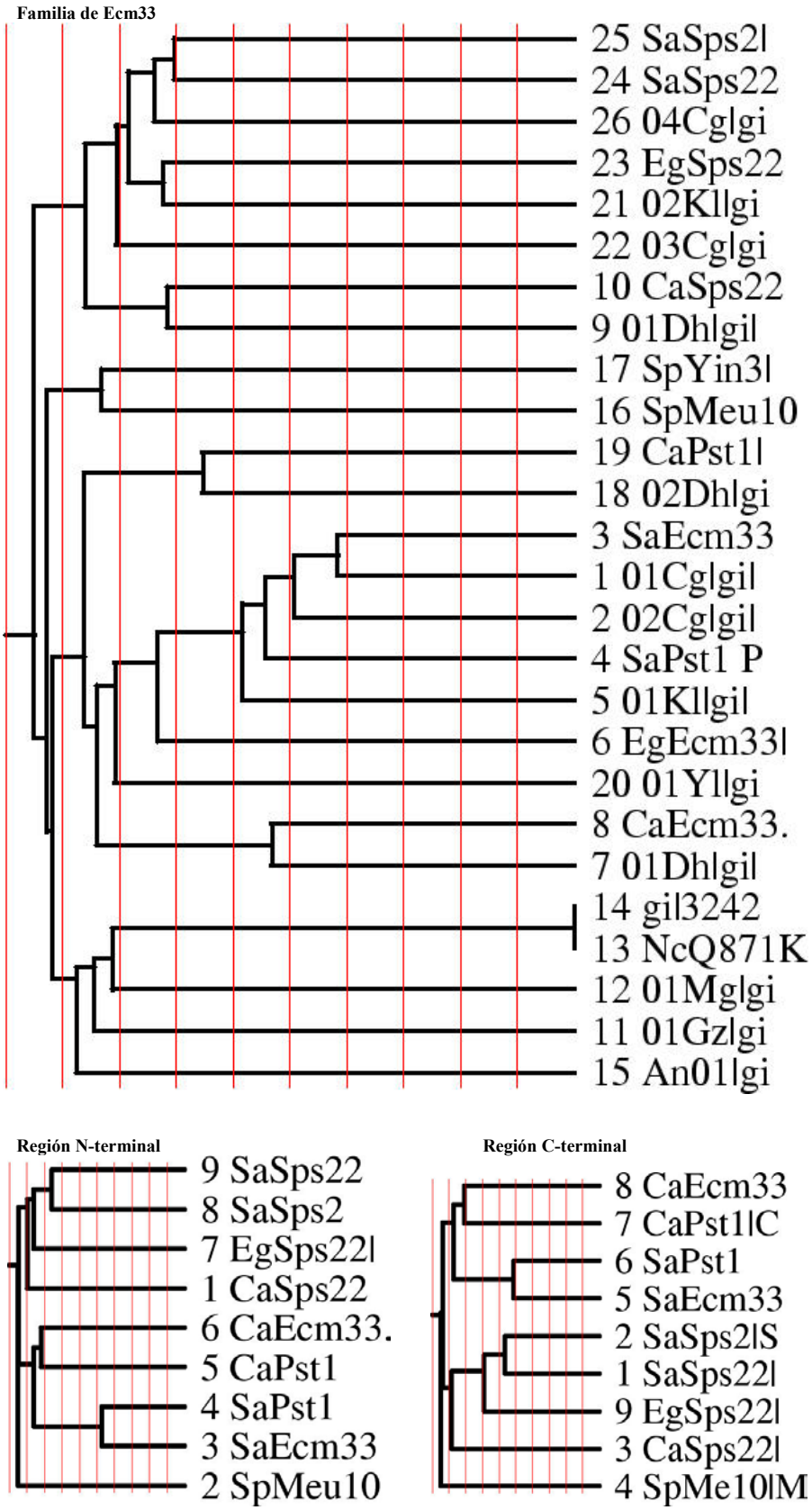
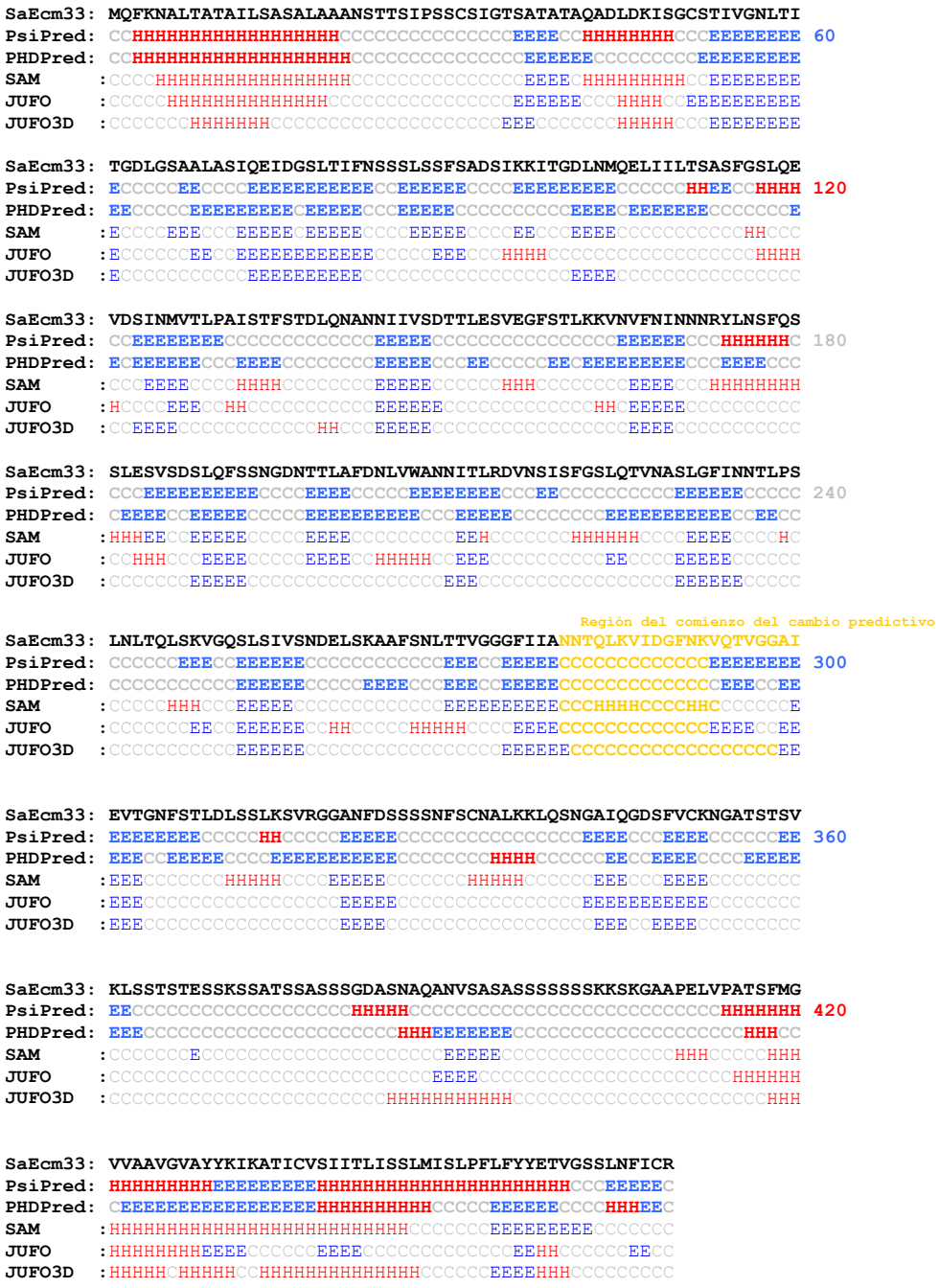


Figura 2. Predicción de la estructura secundaria de SaEcm33



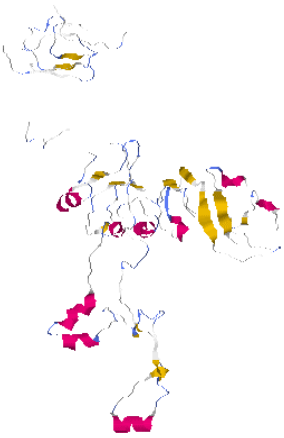
Resultados de Robetta [32]

Predicción 1. Corresponde a la secuencia procesada de Ecm33p (19-407).
Es identificado un solo dominio a través de pdbblast y el Pdb parental seleccionado es 1o6sA correspondiente a la Internalina de Listeria monocytogenes. Mediante el método de alineamiento

Span	Source	Parent	Parent Span	Confidence	Annotations
1-388	pdbblast	1o6sA_	81-356	8.698970	Bacterial Infection

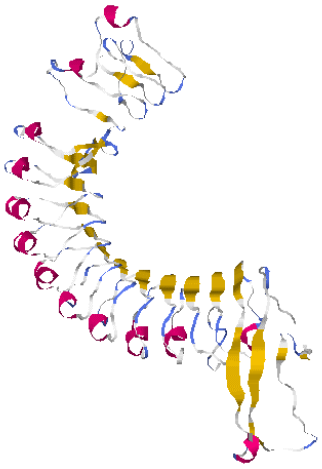
Modelo1

Modelo 2



Modelo3

Modelo 4



Modelo5

Predicción 2. Correspondiente a los primeros 234 aa del extremo N-terminal de Ecm33.

1-234	pdbblast	1igrA_	285-463	45.397940	Hormone Receptor

(Modelos aún en desarrollo)

Predicción 3. Corresponde a SaEcm33, el fragmento 279-407. El modelado en este caso fue *de novo*

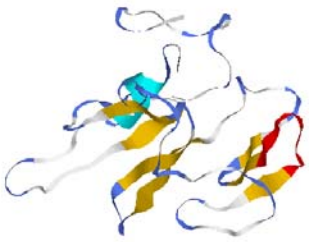
279-407	cutpref	denovo

cutpref -> de novo -> conf = 0 -> note: domain boundaries solely determined by sequence transitions, strongly predicted loop, occupancy, and distance from nearest block or terminus

Diez modelos son propuestos para este fragmento de la secuencia. Además de los modelos, se presentan los resultados de las búsquedas en MAMMOTH.
Los modelos están representados de al forma que el extremo amino (aminoácido 279 de SaEcm33) está orientado hacia arriba. Las hélices alfa se representan en color cián, las láminas beta en amarillo, los giros en azul y el motivo Phosphatase-like en rojo.

Modelo1

Cb	co	description	env	hbbb	hs	pair	rama	rg	rsigma	score	sheet
44.3	19.95	F_0019_5206	-36.01	-46.2	-0.39	-35.61	97.01	15.52	-11.9	-101.23	0.69



Modelo 2

cb	co	description	env	hbbb	hs	pair	rama	rg	rsigma	score	sheet
46.26	19.35	F_0047_1338	-38.66	-50.44	0	-21.68	30.3	15.36	-16.21	-98.77	0.34

MAMMOTH Hits (Top 10 w/ mininum Z-score of 4.5) Total Hits: 1

Z-score	PDB ID	PDB Title	SCOP	Superfamily	Nsup	Nss	PDB resnum
4.65	1mroC	METHANOGENESIS	d.58.31	Methyl-coenzyme M reductase subunits	127	67	247

Modelo 3

cb	co	description	env	hbbb	hs	pair	rama	rg	rsigma	score	sheet
45.44	15.5	F_0046_0069	-36.65	-70.84	-2.49	-23.75	-21.63	16.1	-20.36	-115.22	0.34

MAMMOTH Hits (Top 10 w/ mininum Z-score of 4.5) Total Hits: 33

Z-score	PDB ID	PDB Title	SCOP	Superfamily	Nsup	Nss	PDB resnum
6.32	1eyeA	TRANSFERASE	c.1.21	Dihydropteroate synthetase-like	120	80	256
6.09	1f6yA	TRANSFERASE	c.1.21	Dihydropteroate synthetase-like	128	75	258
5.52	1qr6A	OXIDOREDUCTASE	c.58.1	Aminoacid dehydrogenase-like, N-terminal domain			
			c.2.1	NAD(P)-binding Rossmann-fold domains	127	81	537
5.52	1euaA	LYASE	c.1.10	Aldolase	127	77	213
5.39	1onrA	TRANSFERASE	c.1.10	Aldolase	128	88	316
5.36	1rpxA	3-EPIMERASE	c.1.2	Ribulose-phoshate binding barrel	124	88	230
5.34	1gox0	oxidoreductase (oxygen(a))	c.1.4	FMN-linked oxidoreductases	127	78	350
5.31	1qopA	LYASE	c.1.2	Ribulose-phoshate binding barrel	123	88	265
5.17	1ee2A	OXIDOREDUCTASE	b.35.1	GroES-like			
			c.2.1	NAD(P)-binding Rossmann-fold domains	127	85	373
5.15	1aj20	SYNTHASE	c.1.21	Dihydropteroate synthetase-like	120	76	282

Las similitudes encontradas en este caso por MAMMOTH no parecen estar muy de acuerdo con el contexto de nuestra secuencia, puesto que las transferasas son TIM/BARRELS, la oxidoreductasa es principalmente alfa, la lyasa es una maraña de alfa estructuras en TIMBARREL también, la empimerasa otra maraña de timbarrel.... o sea, poco acertados

Modelo 4

cb	co	description	env	hbbb	hs	pair	rama	rg	rsigma	score	sheet
46.54	17.91	F_0055_0446	-24.11	-53.7	-0.43	-22.9	-1.43	15.45	-21.8	-106.92	0.34

MAMMOTH Hits (Top 10 w/ mininum Z-score of 4.5) Total Hits: 4

Z-score	PDB ID	PDB Title	SCOP	Superfamily	Nsup	Nss	PDB resnum
5.02	1a800	OXIDOREDUCTASE	c.1.7	NAD(P)-linked oxidoreductase	124	78	277
4.90	1eokA	HYDROLASE	c.1.8	(Trans)glycosidases	125	60	282
4.87	1e79D	ATP PHOSPHORYLASE	a.69.1	C-terminal domain of alpha and beta subunits of F1 ATP synthase			

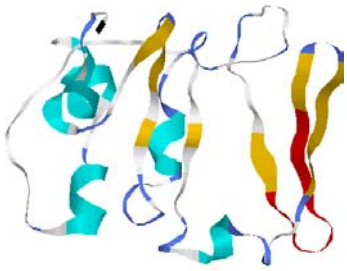
			c.37.1 P-loop containing nucleoside triphosphate hydrolases				
		b.49.1	N-terminal domain of alpha and beta subunits of F1 ATP synthase	128	78	466	
4.50	1rpxA	3-EPIMERASE	c.1.2 Ribulose-phoshate binding barrel	124	72	230	

Modelo 5

cb	co	description	env	hbbb	hs	pair	rama	rg	rsigma	score	sheet
47.33	19.87	F_0016_0850	-30.27	-57.52	0.58	-33.02	9.91	16.32	-17.98	-101.96	2.99

MAMMOTH Hits (Top 10 w/ mininum Z-score of 4.5) Total Hits: 1

Z-score	PDB ID	PDB Title	SCOP Superfamily		Nsup	Nss	PDB resnum
4.60	1bed0	OXIDOREDUCTASE	c.47.1 Thioredoxin-like	126	49	181	
			a.44.1 Disulphide-bond formation facilitator (DSBA), insertion domain				

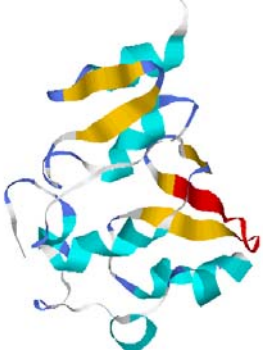


Modelo 6

cb	co	description	env	hbbb	hs	pair	rama	rg	rsigma	score	sheet
44.62	20.38	F_0062_3232	-36.84	-68.39	-0.15	-32.71	17.61	14.79	-14.02	-100.91	0.34

MAMMOTH Hits (Top 10 w/ mininum Z-score of 4.5) Total Hits: 1

4.65	1fcjA	LYASE	c.79.1 Tryptophan synthase beta subunit-like PLP-dependent enzymes	127	86	302



Modelo 7

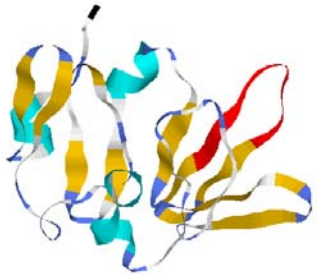
cb	co	description	env	hbbb	hs	pair	rama	rg	rsigma	score	sheet
45.4	18.62	F_0017_7221	-39.36	-56.73	0.19	-28.91	27.61	15.41	-15.52	-103.94	1.57

MAMMOTH Hits (Top 10 w/ mininum Z-score of 4.5) Total Hits: 2

5.04	1iso0	OXIDOREDUCTASE	c.77.1 Isocitrate/Isopropylmalate dehydrogenases	128	70	414
4.67	1iba0	phoshphotransferase	d.95.1 Glucose permease domain IIB	75	30	78

Modelo 8

cb	co	description	env	hbbb	hs	pair	rama	rg	rsigma	score	sheet
46.6	15.89	F_0054_0942	-31.87	-54.7	0.34	-30.15	10.26	16.1	-21.36	-106.78	0.69



Modelo 9

cb	co	description	env	hbbb	hs	pair	rama	rg	rsigma	score	sheet
47.68	20.46	F_0100_6498	-44.27	-41.52	0.23	-37.25	-3.6	15.77	-15.09	-110.96	1.57

MAMMOTH Hits (Top 10 w/ mininum Z-score of 4.5) Total Hits: 1

4.53	1tia0	hydrolase(carboxylic esterase)	c.69.1	alpha/beta-Hydrolases	121	76	271

Modelo 10

cb	co	description	env	hbbb	hs	pair	rama	rg	rsigma	score	sheet
44.71	27.39	S_0011_7839	-42.37	-50.84	-0.31	-23.3	6.05	16.67	-26.81	-124.69	2.99

MAMMOTH Hits (Top 10 w/ mininum Z-score of 4.5) Total Hits: 1

4.65	1eyqA	ISOMERASE	d.36.1	Chalcone isomerase	127	80	212

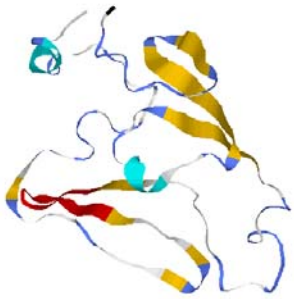
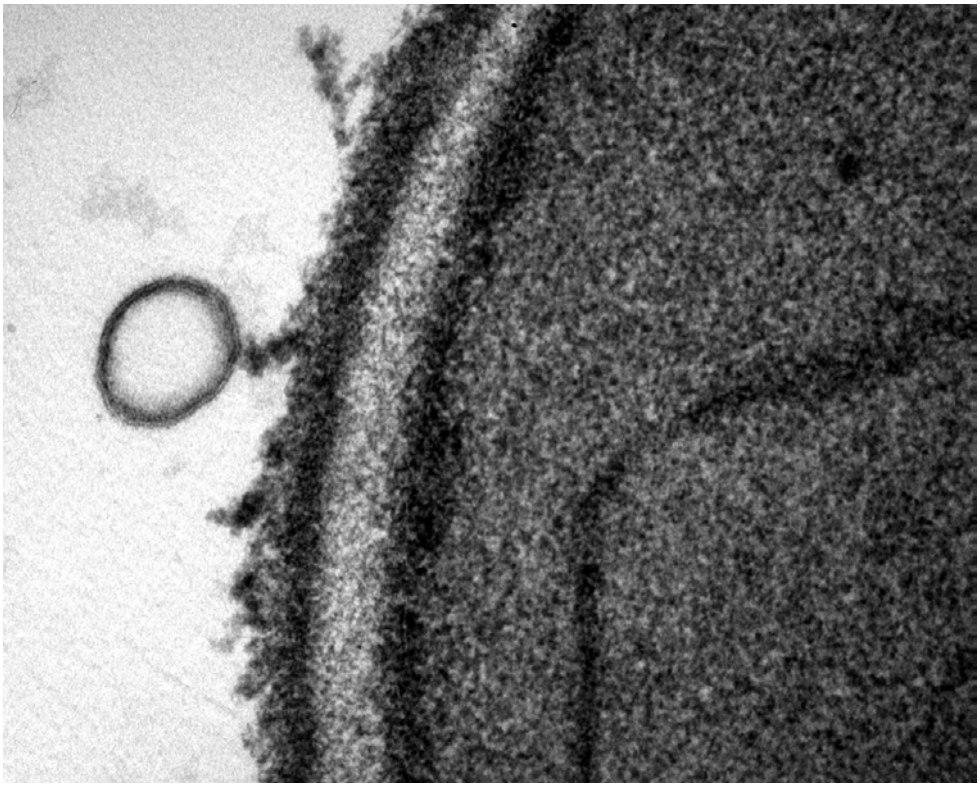


Imagen 1. Micrografía electrónica donde puede apreciarse la pared celular del tipo silvestre (a) y el fenotipo del mutante *ecm33Δ* de *Saccharomyces cerevisiae* (b)

(a)



(b)

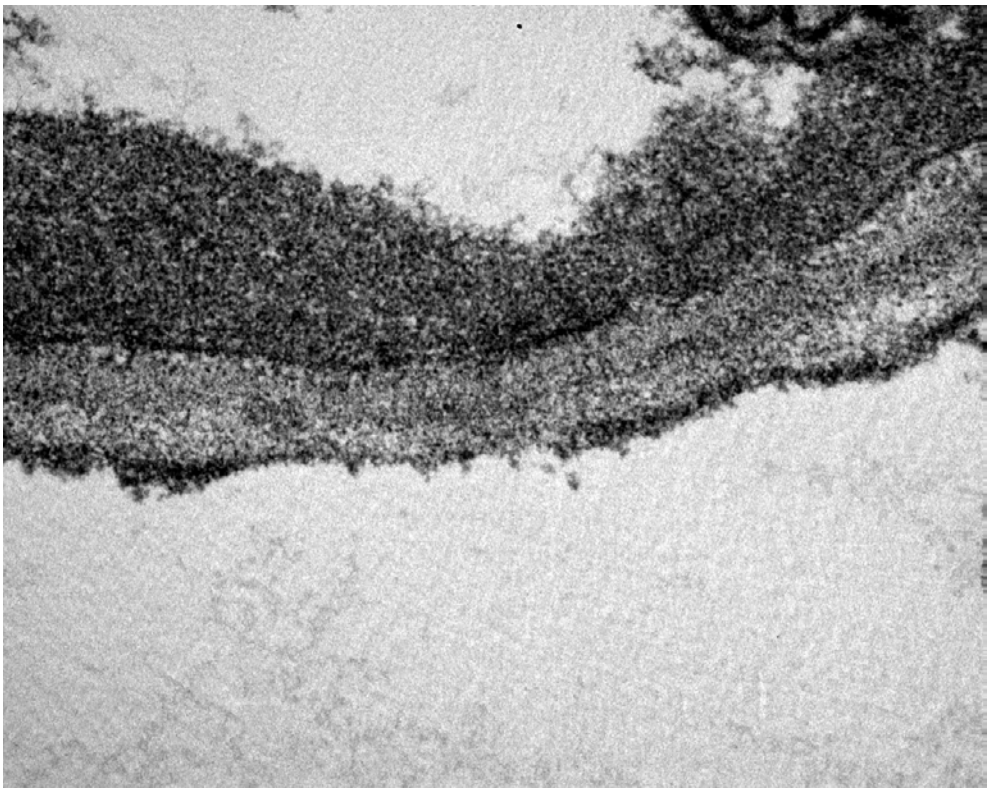


Imagen 2. Internalina. En azul el domino LRR y en rojo el dominio *parecido a inmunoglobulina*

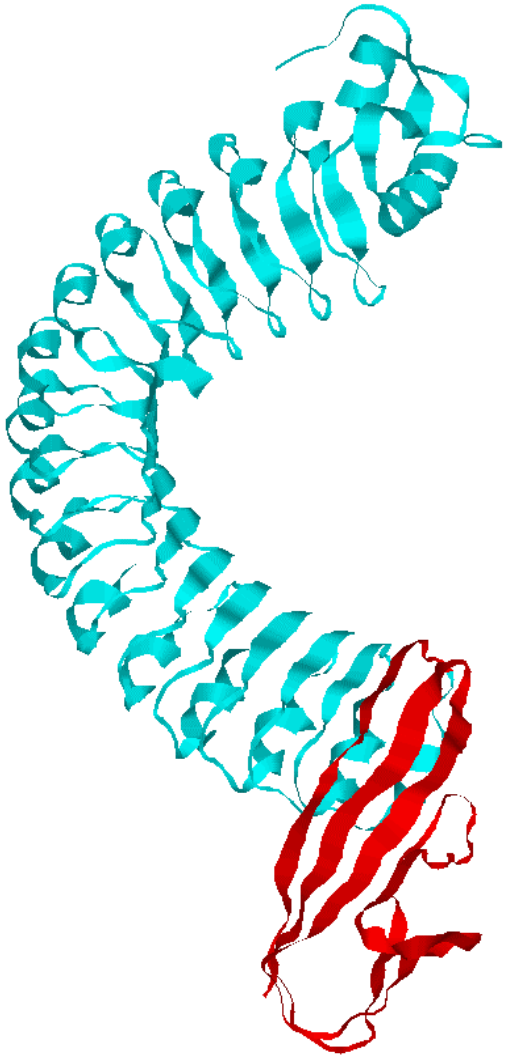
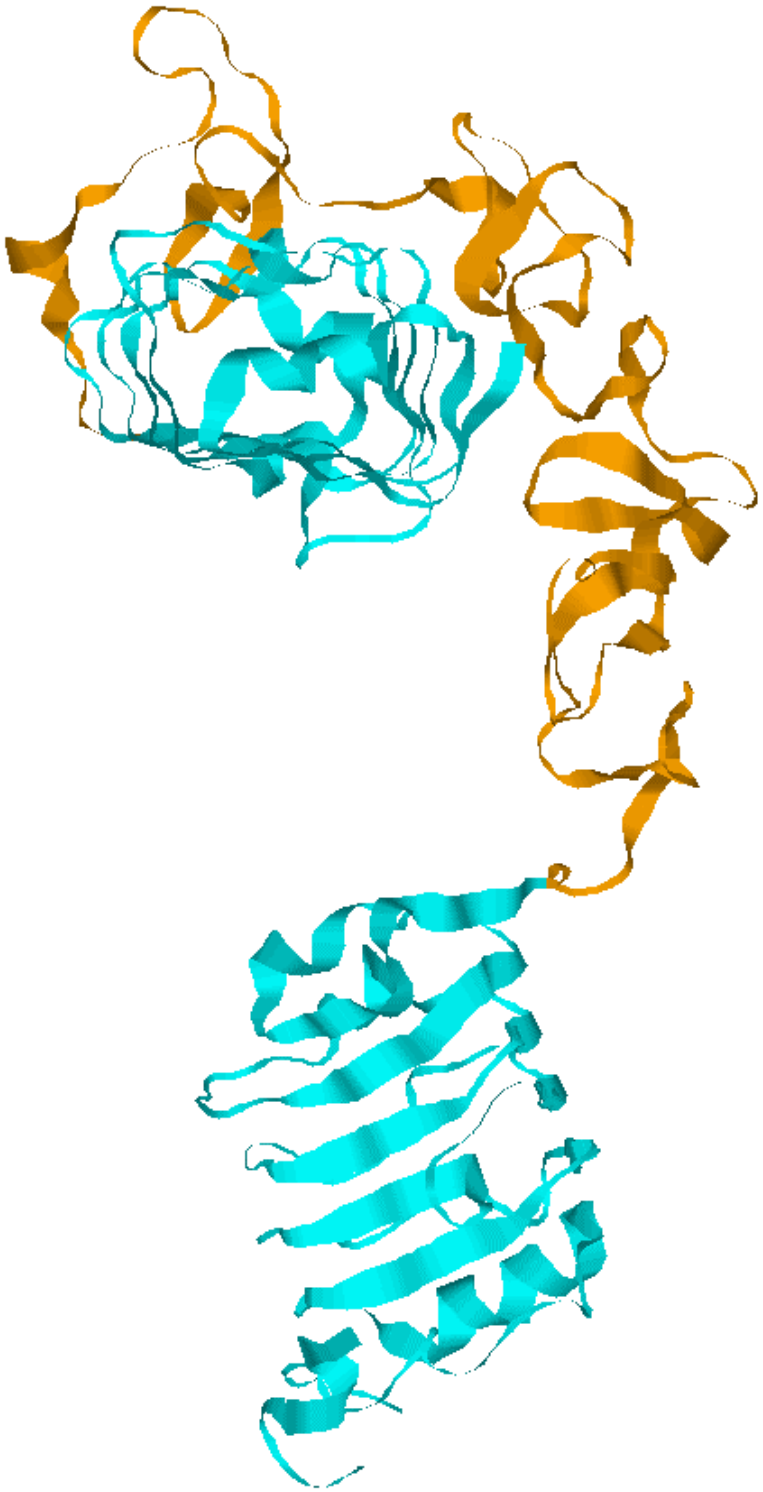


Imagen 3. Receptor del factor de crecimiento *como la insulina* (IGFR)



Referencias

1. Martinez-Lopez R, Monteoliva L, Diez-Orejas R, Nombela C, Gil C: **The GPI-anchored protein CaEcm33p is required for cell wall integrity, morphogenesis and virulence in Candida albicans**. *Microbiology 2004.Oct.* 150,3341-3354.

2. Caro LH, Tettelin H, Vossen JH, Ram AF, van den EH, Klis FM: **In silicio identification of glycosyl-phosphatidylinositol-anchored plasma-membrane and cell wall proteins of *Saccharomyces cerevisiae***. *Yeast 1997.Dec.* 1913,1477-1489.

3. de Groot PW, Hellingwerf KJ, Klis FM: **Genome-wide identification of fungal GPI proteins**. *Yeast 2003.Jul.15.* 1920,781-796.

4. Terashima H, Hamada K, Kitada K: **The localization change of Ybr078w/Ecm33, a yeast GPI-associated protein, from the plasma membrane to the cell wall, affecting the cellular function**. *FEMS Microbiol.Lett.2003.Jan.21* 218,175-180.

5. Lussier M, White AM, Sheraton J, di Paolo T, Treadwell J, Southard SB, Horenstein CI, Chen-Weiner J, Ram AF, Kapteyn JC, Roemer TW, Vo DH, Bondoc DC, Hall J, Zhong WW, Sdicu AM, Davies J, Klis FM, Robbins PW, Bussey H: **Large scale identification of genes involved in cell surface biosynthesis and architecture in *Saccharomyces cerevisiae***. *Genetics 1997.Oct.* 147,435-450.

6. Oguchi T, Oguchi T: **Genetic characterization of genes encoding enzymes catalyzing addition of phospho-ethanolamine to the glycosylphosphatidylinositol anchor in *Saccharomyces cerevisiae***. *Genes Genet.Syst.2002.Oct.* 1977,309-322.

7. Higgins VJ, Alic N, Thorpe GW, Breitenbach M, Larsson V, Dawes IW: **Phenotypic analysis of gene deletant strains for sensitivity to oxidative stress**. *Yeast 2002.Feb.* 1919,203-214.

8. Tohe A, Oguchi T: **Las21 participates in extracellular/cell surface phenomena in *Saccharomyces cerevisiae***. *Genes Genet.Syst.1999.Oct.* 1974,241-256.

9. Garcia R, Bermejo C, Grau C, Perez R, Rodriguez-Pena JM, Francois J, Nombela C, Arroyo J: **The global transcriptional response to transient cell wall damage in *Saccharomyces cerevisiae* and its regulation by the cell integrity signaling pathway**. *J.Biol.Chem.2004.Apr 9.* 279,15183-15195.

10. Jung US, Levin DE: **Genome-wide analysis of gene expression regulated by the yeast cell wall integrity signalling pathway**. *Mol.Microbiol.1999.Dec.* 1934,1049-1057.

11. Chu S, DeRisi J, Eisen M, Mulholland J, Botstein D, Brown PO, Herskowitz I: **The transcriptional program of sporulation in budding yeast**. *Science* 1998, **282:**699-705.

12. Percival-Smith A, Segall J: **Characterization and mutational analysis of a cluster of three genes expressed preferentially during sporulation of *Saccharomyces cerevisiae***. *Mol.Cell Biol.* 1986, **6:**2443-2451.

13. Fetrow JS, Skolnick J: **Method for prediction of protein function from sequence using the sequence-to-structure-to-function paradigm with application to glutaredoxins/thioredoxins and T1 ribonucleases**. *J.Mol.Biol.1998.Sep.4* 281,949-968.

14. Todd AE, Orengo CA, Thornton JM: **Evolution of function in protein superfamilies, from a structural perspective** . *J.Mol.Biol.2001.Apr 6.* 307,1113-1143.

15. Lo CL, Ailey B, Hubbard TJ, Brenner SE, Murzin AG, Chothia C: **SCOP: a structural classification of proteins database**. *Nucleic Acids Res.2000.Jan.1* 1928,257-259.

16. Bateman A, Coin L, Durbin R, Finn RD, Hollich V, Griffiths-Jones S, Khanna A, Marshall M, Moxon S, Sonnhammer EL, Studholme DJ, Yeats C, Eddy SR: **The Pfam protein families database**. *Nucleic Acids Res.2004.Jan.1* 1932,D138-D141.

17. Martin AC, Orengo CA, Hutchinson EG, Jones S, Karmirantzou M, Laskowski RA, Mitchell JB, Taroni C, Thornton JM: **Protein folds and functions**. *Structure.1998.Jul.15.* 1906,875-884.

18. Altschul SF, Madden TL, Schaffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ: **Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs**. *Nucleic Acids Res.1997.Sep.1* 1925,3389-3402.

19. Pearson WR, Lipman DJ: **Improved tools for biological sequence comparison**. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A 1988.Apr* 1985,2444-2448.

20. Notredame C, Higgins DG, Heringa J: **T-Coffee: A novel method for fast and accurate multiple sequence alignment** . *J.Mol.Biol.2000.Sep.8.* 302,205-217.

21. Eddy SR: **Profile hidden Markov models**. *Bioinformatics.1998.* 1914,755-763.

22. Sanchez-Pulido L, Yuan YP, Andrade MA, Bork P: **NAIL-Network Analysis Interface for Linking HMMER results**. *Bioinformatics.* 2000, **16:**656-657.

23. Lichtarge O, Bourne HR, Cohen FE: **An evolutionary trace method defines binding surfaces common to protein families**. *J.Mol.Biol.1996.Mar.29.* 257,342-358.

24. Bendtsen JD, Nielsen H, von Heijne G, Brunak S: **Improved prediction of signal peptides: SignalP 3.0**. *J.Mol.Biol.2004.Jul.16.* 340,783-795.

25. Eisenhaber B, Bork P, Eisenhaber F: **Prediction of potential GPI-modification sites in proprotein sequences**. *J.Mol.Biol.1999.Sep.24.* 292,741-758.

26. Rost B: **PHD: predicting one-dimensional protein structure by profile-based neural networks**. *Methods Enzymol.1996.* 266,525-539.

27. Rost B, Yachdav G, Liu J: **The PredictProtein server**. *Nucleic Acids Res.2004.Jul.1* 1932,W321-W326.

28. Jaroszewski L, Rychlewski L, Godzik A: **Improving the quality of twilight-zone alignments**. *Protein Sci.2000.Aug.* 1909,1487-1496.

29. Rychlewski L, Jaroszewski L, Li W, Godzik A: **Comparison of sequence profiles. Strategies for structural predictions using sequence information**. *Protein Sci.2000.Feb.* 1909,232-241.

30. Kelley LA, MacCallum RM, Sternberg MJ: **Enhanced genome annotation using structural profiles in the program 3D-PSSM**. *J.Mol.Biol.2000.Jun.2* 299,499-520.

31. Teodorescu O, Galor T, Pillardy J, Elber R: **Enriching the sequence substitution matrix by structural information**. *Proteins 2004.Jan.1* 1954,41-48.

32. Kim DE, Chivian D, Baker D: **Protein structure prediction and analysis using the Robetta server**. *Nucleic Acids Res.2004.Jul.1* 1932,W526-W531.

33. Rohl CA, Strauss CE, Chivian D, Baker D: **Modeling structurally variable regions in homologous proteins with rosetta**. *Proteins 2004.May.15.* 1955,656-677.

34. Chivian D, Kim DE, Malmstrom L, Bradley P, Robertson T, Murphy P, Strauss CE, Bonneau R, Rohl CA, Baker D: **Automated prediction of CASP-5 structures using the Robetta server**. *Proteins 2003.* 1953,524-533.

35. Ortiz AR, Strauss CE, Olmea O: **MAMMOTH (matching molecular models obtained from theory): an automated method for model comparison**. *Protein Sci.2002.Nov.* 1911,2606-2621.

36. Sayle RA, Milner-White EJ: **RASMOL: biomolecular graphics for all**. *Trends Biochem.Sci.1995.Sep.* 1920,374.

37. Vazquez A, Flammini A, Maritan A, Vespignani A: **Global protein function prediction from protein-protein interaction networks**. *Nat.Biotechnol.2003.Jun.* 1921,697-700.

38. Deng M, Zhang K, Mehta S, Chen T, Sun F: **Prediction of protein function using protein-protein interaction data** . *J.Comput.Biol.2003.* 1910,947-960.

39. Bader GD, Hogue CW: **Analyzing yeast protein-protein interaction data obtained from different sources**. *Nat.Biotechnol.2002.Oct.* 1920,991-997.

40. Lee TI, Rinaldi NJ, Robert F, Odom DT, Bar-Joseph Z, Gerber GK, Hannett NM, Harbison CT, Thompson CM, Simon I, Zeitlinger J, Jennings EG, Murray HL, Gordon DB, Ren B, Wyrick JJ, Tagne JB, Volkert TL, Fraenkel E, Gifford DK, Young RA: **Transcriptional regulatory networks in *Saccharomyces cerevisiae***. *Science* 2002, **298:**799-804.

41. Casolari JM, Brown CR, Komili S, West J, Hieronymus H, Silver PA: **Genome-wide localization of the nuclear transport machinery couples transcriptional status and nuclear organization**. *Cell* 2004, **117:**427-439.

42. Tong AH, Lesage G, Bader GD, Ding H, Xu H, Xin X, Young J, Berriz GF, Brost RL, Chang M, Chen Y, Cheng X, Chua G, Friesen H, Goldberg DS, Haynes J, Humphries C, He G, Hussein S, Ke L, Krogan N, Li Z, Levinson JN, Lu H, Menard P, Munyana C, Parsons AB, Ryan O, Tonikian R, Roberts T, Sdicu AM, Shapiro J, Sheikh B, Suter B, Wong SL, Zhang LV, Zhu H, Burd CG, Munro S, Sander C, Rine J, Greenblatt J, Peter M, Bretscher A, Bell G, Roth FP, Brown GW, Andrews B, Bussey H, Boone C: **Global mapping of the yeast genetic interaction network**. *Science* 2004, **303:**808-813.

43. Ho Y, Gruhler A, Heilbut A, Bader GD, Moore L, Adams SL, Millar A, Taylor P, Bennett K, Boutilier K, Yang L, Wolting C, Donaldson I, Schandorff S, Shewnarane J, Vo M, Taggart J, Goudreault M, Muskat B, Alfarano C, Dewar D, Lin Z, Michalickova K, Willems AR, Sassi H, Nielsen PA, Rasmussen KJ, Andersen JR, Johansen LE, Hansen LH, Jespersen H, Podtelejnikov A, Nielsen E, Crawford J, Poulsen V, Sorensen BD, Matthiesen J, Hendrickson RC, Gleeson F, Pawson T, Moran MF, Durocher D, Mann M, Hogue CW, Figeys D, Tyers M: **Systematic identification of protein complexes in *Saccharomyces cerevisiae* by mass spectrometry**. *Nature* 2002, **415:**180-183.

44. Schwede T, Kopp J, Guex N, Peitsch MC: **SWISS-MODEL: An automated protein homology-modeling server**. *Nucleic Acids Res.2003.Jul.1* 1931,3381-3385.

45. Lund O, Frimand K, Gorodkin J, Bohr H, Bohr J, Hansen J, Brunak S: **Protein distance constraints predicted by neural networks and probability density functions**. *Protein Eng 1997.Nov.* 1910,1241-1248.

46. Bates PA, Kelley LA, MacCallum RM, Sternberg MJ: **Enhancement of protein modeling by human intervention in applying the automatic programs 3D-JIGSAW and 3D-PSSM**. *Proteins 2001.* 2005,39-46.

47. Lambert C, Leonard N, De B, X, Depiereux E: **ESyPred3D: Prediction of proteins 3D structures**. *Bioinformatics.2002.Sep.* 1918,1250-1256.

48. de Groot PW, de Boer AD, Cunningham J, Dekker HL, de Jong L, Hellingwerf KJ, de Koster C, Klis FM: **Proteomic analysis of *Candida albicans* cell walls reveals covalently bound carbohydrate-active enzymes and adhesins**. *Eukaryot.Cell 2004.Aug.* 2003,955-965.

49. Van den SP, Rudd PM, Dwek RA, Opdenakker G: **Concepts and principles of O-linked glycosylation**. *Crit Rev.Biochem.Mol.Biol.1998.* 1933,151-208.

50. Rychlewski L, Fischer D, Elofsson A: **LiveBench-6: large-scale automated evaluation of protein structure prediction servers**. *Proteins 2003.* 1953,542-547.