



**Benemérita Universidad Autónoma de Puebla**  
Facultad de Ciencias Químicas-Centro de Química ICUAP  
Posgrado en Ciencias Químicas  
Doctorado en Ciencias Químicas

**Identificación del papel funcional de la metaloproteasa Ermp1 de  
*Schizosaccharomyces pombe* en la respuesta al estrés en retículo  
endoplasmático**

Tesis presentada para obtener el grado de:

**Doctorado en Ciencias Químicas  
Área de Bioquímica y Biología Molecular**

Presenta:

**M.C. Dalia González Esparragoza**

**Directoras de tesis:**

Dra. Irma Herrera Camacho

Dra. Nora Hilda Rosas Murrieta

Laboratorio de Bioquímica y Biología Molecular  
Centro de Química-ICUAP

**Mayo 2024**

## AGRADECIMIENTOS ACADÉMICOS E INSTITUCIONALES

### **A mis directoras de tesis**

Este proyecto se realizó en el Laboratorio de Bioquímica y Biología Molecular del Centro de Química del Instituto de Ciencias de la BUAP bajo la dirección de la Dra. Irma Herrera Camacho y la Dra. Nora Hilda Rosas Murrieta.

Agradezco sinceramente su incondicional apoyo. Su orientación y asesoramiento fueron fundamentales para el desarrollo de este trabajo.

### **Colaboración académica**

Un agradecimiento especial al Dr. Alan Carrasco Carballo del Laboratorio de Elucidación y Síntesis en Química Orgánica del ICUAP, por proporcionar acceso a las herramientas del software BioLuminate a través de su licencia activa de Schrödinger. Estas herramientas fueron fundamentales para la preparación de modelos 3D, *docking* molecular, simulaciones de hidratación y dinámica molecular.

### **Al comité tutorial y comisión revisora**

Dra. Lourdes Millán Pérez Peña por su apoyo académico y técnico durante mi estancia en el laboratorio y por las sugerencias constructivas ofrecidas en cada seminario de tesis.

Dra. Verónica Vallejo Ruiz por sus consejos y sugerencias en cada uno de los seminarios de avances de tesis. Su experiencia y retroalimentación fueron de gran ayuda para el progreso de este trabajo.

Dr. Samuel Treviño Mora por dedicar su tiempo en las primeras asesorías y compartir su vasto conocimiento, lo cual me motivó a profundizar en el tema y aprender más.

Dr. Alan Carrasco Carballo por dedicar su tiempo y ofrecer su apoyo invaluable en el trabajo bioinformático. Su colaboración fue esencial para la resolución de dudas.

Dr. Abraham Marcelino Vidal Limón por haber aceptado formar parte de la comisión revisora. Agradezco su tiempo y opinión profesional para la revisión de esta tesis.

**Agradezco a las instituciones que apoyaron financieramente para la asistencia a congresos:**

Programa de apoyo a Proyectos de Investigación VIEP-BUAP.

Apoyo a Proyectos registrados en el ICUAP.

Posgrado de Ciencias Químicas.

**Agradezco el apoyo a becas de CONAHCYT**

Beca CONAHCYT, de enero de 2020 a diciembre de 2023 (No. CVU 820490)



**BUAP**

**A QUIEN CORRESPONDA:**

Por este conducto la Comisión Revisora formada por la D. C. Lourdes Millán Pérez Peña, D.C. Verónica Vallejo Ruiz, D.C. Samuel Treviño Mora, D.C. Alan Carrasco Carballo y el D.C Abraham Marcelino Vidal Limón, informan haber leído y aprobado para su impresión, la tesis denominada **“Identificación del papel funcional de la metaloproteasa Ermp1 de *Schizosaccharomyces pombe* en la respuesta a estrés en retículo endoplasmático”**, que presenta la alumna **M. en C. Dalia González Esparragoza** para obtener el grado de Doctora en Ciencias Químicas.

Se extiende la presente a los treinta días del mes de abril del año dos mil veinticuatro.

**ATENTAMENTE**

D.C. Lourdes Millán Pérez Peña

D.C. Verónica Vallejo Ruiz

D.C. Samuel Treviño Mora

D.C. Alan Carrasco Carballo

D.C Abraham Marcelino Vidal Limón

# ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS .....	vi
ÍNDICE DE TABLAS .....	vii
ABREVIATURAS .....	viii
ABSTRACT .....	1
RESUMEN .....	2
1. INTRODUCCIÓN.....	3
1.1. Relación entre ERMP1 humana y la Respuesta a Proteínas Desplegadas (UPR).....	3
1.2. La levadura de fisión como organismo modelo en estudios de biología molecular .....	5
1.3. Vía UPR conservada en <i>S. pombe</i> .....	6
1.4. Agentes químicos que inducen estrés en RE.....	7
1.5. Interacción proteína-proteína: una estrategia comparativa de interólogos entre especies.....	10
2. ANTECEDENTES DIRECTOS .....	12
3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA .....	13
4. JUSTIFICACIÓN .....	13
5. HIPÓTESIS .....	14
6. OBJETIVOS .....	14
6.1. OBJETIVO GENERAL .....	14
6.2. OBJETIVOS PARTICULARES.....	14
7. METODOLOGÍA.....	15
7.1. Esquema metodológico.....	15
7.2. Predicción de interacciones proteína-proteína.....	15
7.3. Selección de proteínas diana: predicción de secuencias de escisión proteolítica.....	16
7.4. Modelado 3D de Ermp1 y proteínas diana .....	17
7.5. Análisis del dominio M28 de Ermp1 y región transmembranal .....	18
7.6. Optimización de la estabilidad conformacional y minimización de energía de los modelos 3D.....	18
7.7. <i>Docking</i> proteína-proteína .....	19
7.8. Solvatación de modelos de interacción: dominio M28 de Ermp1 y proteínas diana .....	20
7.9. Dinámica molecular: dominio M28 de Ermp1 y proteínas diana .....	20
7.10. Inducción de estrés reticular en células de <i>S. pombe</i> .....	21

7.11.	Extracción de ARN total .....	22
7.12.	Síntesis de ADNc (RT-PCR) .....	23
7.13.	Diseño de <i>primers</i> .....	23
7.14.	PCR de punto final .....	24
7.15.	PCR en tiempo real .....	25
7.16.	Determinación de la eficiencia de reacción q-PCR de <i>primers</i> .....	27
7.17.	Cuantificación relativa por el método de la curva estándar .....	31
8.	RESULTADOS.....	32
8.1.	Predicción de interacciones proteína-proteína de Ermp1 en <i>S. pombe</i> .....	32
8.2.	Comparación del dominio M28 de Ermp1 entre humanos y <i>S. pombe</i> .....	39
8.3.	Modelado 3D del dominio M28 de Ermp1 de <i>S. pombe</i> .....	40
8.4.	Validación de herramientas computacionales para la predicción de interacciones metaloenzima-proteína diana .....	44
8.5.	Identificación de secuencias consenso de escisión y generación de modelos 3D de proteínas diana de Ermp1 .....	48
8.6.	Docking proteína-proteína del dominio M28 de Ermp1 y candidatos proteolíticos.....	52
8.7.	Dinámica molecular.....	58
8.8.	Docking molecular entre la cinasa Gsk3 y el dominio M28 de Ermp1 .....	61
8.9.	Análisis del dominio transmembranal de Ermp1 y docking molecular.....	62
8.10.	Inducción de estrés reticular en <i>S. pombe</i> .....	65
8.11.	Expresión de Ermp1 en condiciones de estrés de RE .....	69
9.	DISCUSIÓN .....	71
9.1.	Comparación de interólogos: interacción de Ermp1 con 45 proteínas en <i>S. pombe</i> .....	71
9.2.	Interacción del dominio M28 de Ermp1 con posibles proteínas diana.....	73
9.3.	Interacción del dominio transmembranal de Ermp1 con posibles proteínas diana .....	76
9.4.	Cambios en la expresión de Ermp1 durante el estrés reticular en <i>S. pombe</i> .....	78
10.	CONCLUSIONES.....	83
11.	PERSPECTIVAS.....	84
12.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	85
13.	ANEXOS (PREPARACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO Y SOLUCIONES) .....	98
14.	CONGRESOS NACIONALES Y PUBLICACIONES.....	100

## ÍNDICE DE FIGURAS

<i>Figura 1. Modulación del estrés de RE a través de la vía de señalización UPR en mamíferos.</i>	4
<i>Figura 2. Microfotografías de Schizosaccharomyces pombe.</i>	5
<i>Figura 3. Ciclo celular de S. pombe.</i>	5
<i>Figura 4. Mecanismos de respuesta al estrés de RE en S. pombe.</i>	7
<i>Figura 5. Mecanismos potenciales de agentes químicos que inducen estrés en RE.</i>	9
<i>Figura 6. Validación de la eficiencia de reacción q-PCR mediante la determinación del rango dinámico.</i>	29
<i>Figura 7. Red PPI de ERMP1 humana.</i>	32
<i>Figura 8. Predicción de red PPI para Ermp1 en S. pombe.</i>	33
<i>Figura 9. Agrupación de proteínas que interactúan con Ermp1 en S. pombe.</i>	38
<i>Figura 10. Alineamiento de secuencias del dominio M28 de Ermp1 en humanos y S. pombe.</i>	39
<i>Figura 11. Estructura 3D del dominio M28 de Ermp1 de S. pombe.</i>	42
<i>Figura 12. Representación de la cavidad catalítica del dominio M28 de Ermp1 de S. pombe.</i>	43
<i>Figura 13. Docking molecular de MMP8 y MMP12 con sus respectivas proteínas diana Fibronectina 1 y Factor XII de Coagulación en ClusPro y BioLuminate.</i>	47
<i>Figura 14. Estructuras 3D de posibles proteínas diana de Ermp1 de S. pombe.</i>	51
<i>Figure 15. Predicción la estructura 3D de Amk2 de S. pombe.</i>	52
<i>Figura 16. Docking molecular del dominio M28 de Ermp1 con posibles dianas proteicas en BioLuminate.</i>	54
<i>Figura 17. Representación del docking molecular del dominio M28 de Ermp1 con posibles dianas proteicas en BioLuminate.</i>	55
<i>Figura 18. Representación de Interacción 2D de DIMPLOT.</i>	56
<i>Figura 19. Representación de la solvatación de los complejos de interacción del dominio M28 de Ermp1 y dianas proteicas.</i>	57
<i>Figura 20. Simulación de dinámica molecular.</i>	59
<i>Figura 21. Análisis de trayectorias RMSF de residuos de los complejos de interacción del dominio M28 de Ermp1 de S. pombe.</i>	60
<i>Figura 22. Docking molecular Gsk3-Ermp1.</i>	61
<i>Figura 23. Estructura 3D de Ermp1 de S. pombe y predicción de sitios de unión a Ca<sup>2+</sup>.</i>	62
<i>Figura 24. Docking molecular de Ermp1 y dianas proteicas de membrana en BioLuminate 4.5.</i>	64
<i>Figura 25. Inducción de estrés de RE en la cepa 972 h<sup>-</sup> de S. pombe crecidas en medio YNB.</i>	66
<i>Figura 26. Determinación del número de células/mL viables de S. pombe.</i>	68
<i>Figura 27. Nivel de expresión relativa de genes de interés en condiciones de estrés reticular de células de S. pombe.</i>	69

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Preparación de reacciones para síntesis de ADNc con ProtoScript® II First Strand cDNA Synthesis Kit.	23
<b>Tabla 2.</b> Propiedades de primers diseñados para qRT-PCR.	24
<b>Tabla 3.</b> Preparación de reacciones de PCR de punto final con Kit PCR Master Mix 2X de Thermo Scientific.	25
<b>Tabla 4.</b> Condiciones de termociclador para PCR de punto final.	25
<b>Tabla 5.</b> Preparación de reacciones de PCR con kit Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (Thermo Scientific).	26
<b>Tabla 6.</b> Condiciones de amplificación en el equipo StepOne™ Real Time PCR System de Applied Biosystems, Thermo Scientific para la detección cuantitativa de los productos de PCR.	27
<b>Tabla 7.</b> Parámetros de validación de la eficiencia de reacción de q-PCR de genes de <i>S. pombe</i> a una temperatura de alineamiento de 61°C.	30
<b>Tabla 8.</b> Comparación de proteínas ortólogas que interactúan con ERMP1/Ermp1 en humano y <i>S. pombe</i> .	34
<b>Tabla 9.</b> Predicción de sitios de escisión de Fibronectina-1 y Factor XII humanas por el grupo de metaloproteasas en PROSPER.	45
<b>Tabla 10.</b> Resultados del docking proteína-proteína de MMP8-Fibronectina 1 y MMP12-Factor XII en ClusPro 2.0, BioLuminate 4.5. y PatchDock.	46
<b>Tabla 11.</b> Predicción de segmentos escindibles de posibles proteínas diana de Ermp1 en <i>S. pombe</i> realizada en PROSPER.	49
<b>Tabla 12.</b> Plantillas utilizadas para el modelado por homología en Phyre2 de proteínas diana. Parámetros de validación obtenidos de PDBeFold y PROCHECK-SAVES v6.0.	50
<b>Tabla 13.</b> Predicción de la interacción del dominio M28 con las secuencias consenso de escisión de posibles proteínas diana de <i>S. pombe</i> .	53
<b>Tabla 14.</b> Comparación de los resultados del docking molecular en ClusPro y BioLuminate utilizando modelos de AlphaFold de Ermp1 y dianas proteicas de membrana.	64

## ABREVIATURAS

aa	Aminoácido
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	ADN complementario
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	ARN mensajero
ARNt	ARN de transporte
c.b.p.	Cuanto baste para
DO	Densidad óptica
DTT	Ditiotreitol
Fxna	Felixina
GO	Gene ontology
IDR	Región intrínsecamente desordenada
MMP	Matriz metaloproteinasa
ns	nano segundo
PPI	interacción proteína-proteína
RE	Retículo endoplasmático
RIDD	Regulación de la degradación dependiente de Ire1
RMSD	Desviación cuadrática media
RMSF	Fluctuación cuadrática media
rpm	Revoluciones por minuto
Tg	Tapsigargina
Tm	Tunicamicina
UA	Unidades de absorbancia

## ABSTRACT

Ermp1 is a putative metalloprotease from *S. pombe* and a member of the Fxna peptidases, the function of which is not yet fully understood. Previous investigations of orthologous proteins in rats and humans suggest their involvement in the maturation of ovarian follicles and in increasing proteotoxic stress in the endoplasmic reticulum (ER). To elucidate the function of Ermp1 in fission yeast and what role it would have in the ER stress response, this study reports the first *in silico* predictions of protein-protein interactions of this metalloprotease. To achieve this, bioinformatics tools were used to predict protein-protein interactions by comparing human-yeast interologues and molecular *docking*. Thanks to this strategy, it is proposed that Ermp1 could interact with 45 highly conserved proteins in humans and yeast. These proteins include Gsk3 and Amk2, previously genetically related to Ermp1 in fission yeast. It is also proposed that Ermp1 would not only act as a proteolytic enzyme, but also play an important role in maintaining ER lumen homeostasis by interacting with other proteins. Therefore, three chemical agents were evaluated to induce the stress response in ER, evidencing Tunicamycin as the most effective inducer *in S. pombe*. Gene expression analysis of *wild type* cells revealed fluctuations in the expression of the *erm1*, *amk2*, and *gsk3* genes during stress induction. The expression of *erm1* initially decreased followed by a significant increase over time, while *amk2* and *gsk3* exhibited a progressive increase in expression. At the protein level, Amk2 and Gsk3 participate in key signaling pathways that regulate cellular activity and response to metabolic and stress signals. Therefore, elucidating the correlation of Ermp1 with Amk2 and Gsk3 would support in the identification of more cellular regulatory processes that have not yet been described. In conclusion, the bioinformatic and experimental findings reported in this thesis would serve as support for future investigations of Fxna peptidases from other species such as humans.

**KEY WORDS:** Ermp1; *S. pombe*; metalloprotease; protein-protein interactions; *docking* molecular; stress; UPR.

## RESUMEN

Ermp1 es una metaloproteasa putativa de *S. pombe* y miembro de las Fxna peptidasas, cuya función aún no se comprende completamente. Investigaciones previas de proteínas ortólogas en rata y humano han demostrado su relación en la maduración de folículos ováricos y en el incremento del estrés proteo-tóxico en el retículo endoplásmico (RE). Para elucidar la función de Ermp1 en la levadura de fisión y qué papel tendría en la respuesta al estrés en RE, este estudio reporta las primeras predicciones *in silico* de interacciones proteína-proteína de la metaloproteasa. Para lograrlo, se emplearon herramientas bioinformáticas para predecir interacciones proteína-proteína mediante comparación de interólogos humano-levadura y *docking* molecular. Gracias a esta estrategia, se propone que Ermp1 pudiera interactuar con 45 proteínas altamente conservadas en humanos y levaduras. Entre estas proteínas se incluyen Gsk3 y Amk2, previamente relacionadas genéticamente con Ermp1 en la levadura de fisión. También se plantea que Ermp1 no solo ejercería una función como enzima proteolítica, sino que también desempeñaría un papel importante en el mantenimiento de la homeostasis del lumen del RE al interactuar con otras proteínas. Por lo tanto, se evaluaron tres agentes químicos para inducir la respuesta al estrés en RE, evidenciando a Tunicamicina como el inductor más efectivo en *S. pombe*. El análisis de la expresión génica de células *wilde type* reveló fluctuaciones en la expresión de los genes *erm1*, *amk2* y *gsk3* durante la inducción del estrés. La expresión de *erm1* experimentó una disminución inicial seguida de un aumento significativo en función del tiempo, mientras que *amk2* y *gsk3* exhibieron un aumento progresivo en su expresión. A nivel de proteínas, Amk2 y Gsk3 están implicadas en vías de señalización clave que regulan la actividad celular y la respuesta a señales metabólicas y de estrés. Por lo tanto, elucidar la correlación de Ermp1 con Amk2 y Gsk3 ayudaría en la identificación de más procesos de regulación celular que aún no han sido descritas. En conclusión, los hallazgos bioinformáticos y experimentales reportados en esta tesis servirían de apoyo para futuras investigaciones de Fxna peptidasas de otras especies como los humanos.

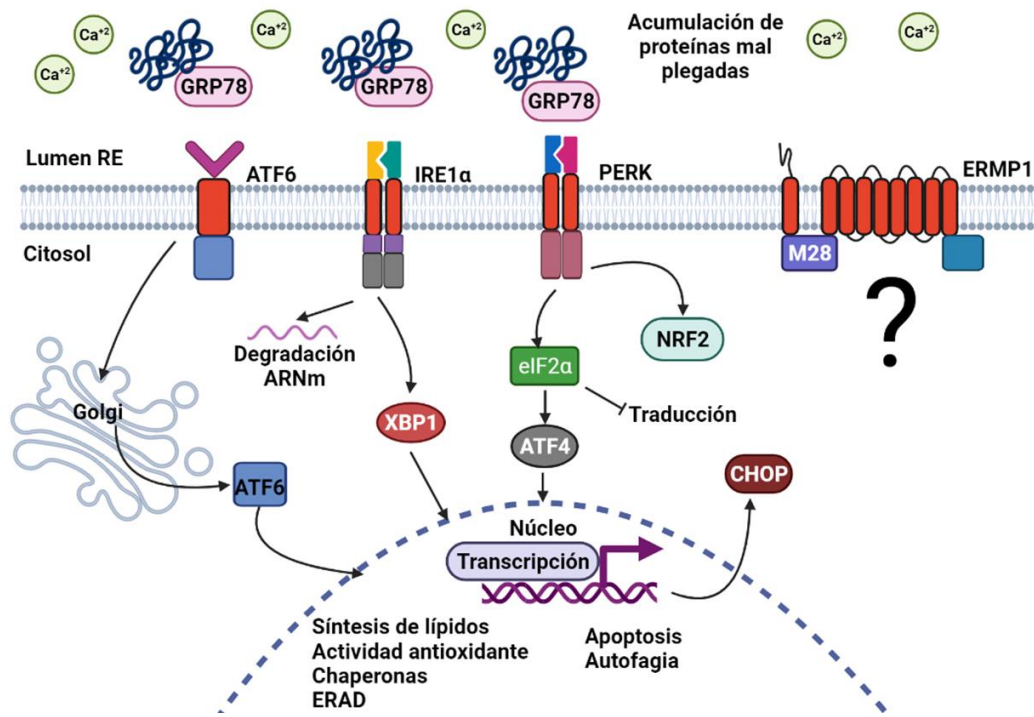
**PALABRAS CLAVE:** Ermp1; *S. pombe*; metaloproteasa; interacciones proteína-proteína; *docking* molecular; estrés; UPR.

## 1. INTRODUCCIÓN

La Metaloproteasa 1 de Retículo Endoplásmico (ERMP1), Fxna peptidasa o Felixina, es una proteasa de nueve dominios transmembranales y tiene un dominio de la familia M28 de zinc metalopeptidasas [1,2]. El gen se identificó por primera vez en las células de la granulosa de los folículos ováricos de rata, donde su expresión es necesaria para la organización folicular, probablemente para facilitar el procesamiento de precursores proteicos necesarios en la comunicación celular intraovárica [1].

### 1.1. Relación entre ERMP1 humana y la Respuesta a Proteínas Desplegadas (UPR)

Los estudios *in vitro* han demostrado que la sobreexpresión de ERMP1 humana contribuye al aumento del estrés del RE al activar la Respuesta a Proteínas Desplegadas (UPR) a través de GRP78-PERK-CHOP [2-4]. La vía UPR requiere de tres proteínas transmembranales que actúan como sensores del estrés en el RE: IRE1, PERK y ATF6 [5-7] (Figura 1). Cada sensor se encuentra unido a la chaperona GRP78/BiP formando un complejo inactivo, el cual se disocia cuando existe una acumulación de proteínas mal plegadas en el RE [5-7]. En seguida, estos mediadores activan la vía de rescate UPR para mantener la integridad y la funcionalidad del organelo mediante la regulación de otros procesos como la expansión de la membrana del RE, la síntesis selectiva de chaperonas, así como la disminución de la carga proteica a través de la ubiquitinación, degradación por el proteosoma y/o autofagia [8,9]. Si el estrés proteo-tóxico se reduce rápidamente, las células logran adaptarse con éxito al estrés, pero si persiste y compromete la homeostasis celular, la vía de señalización activa la apoptosis a través de CHOP [10] (Figura 1). UPR compromete otros procesos que son críticos para la célula, como la proliferación y supervivencia celular, la respuesta antioxidante, la regulación metabólica, así como las respuestas inmune e inflamatoria [6,11,12].

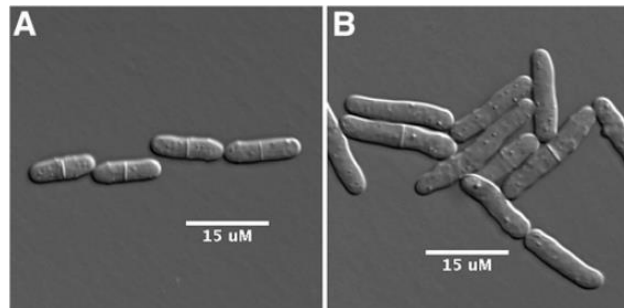


**Figura 1.** Modulación del estrés de RE a través de la vía de señalización UPR en mamíferos. Imagen creada en BioRender.com.

Por otro lado, existen estudios donde se ha demostrado que la regulación positiva de ERMP1 se relaciona con la proliferación celular y progresión de cáncer a través de la vía PI3K/AKT/mTOR/ $\beta$ -catenina, por lo que se ha considerado como un posible marcador de detección y progresión de diferentes tipos de cáncer como mama, pulmón, intestino y colon, así como un prometedor blanco terapéutico [13,14]. Aunque hay evidencia de que ERMP1 en humanos podría desempeñar un papel importante en las vías de señalización anteriormente mencionadas, el mecanismo molecular sigue sin estar claro. En la levadura de fisión *Schizosaccharomyces pombe*, el gen *erm1* ([SPCC1259.02c](#)) codifica la proteína Ermp1 (Metalopeptidasa Putativa de Retículo Endoplásmico). De acuerdo con la inferencia de homología, se considera una proteína homóloga de ERMP1 de humano y rata. Sin embargo, su función celular no se ha estudiado en este microorganismo.

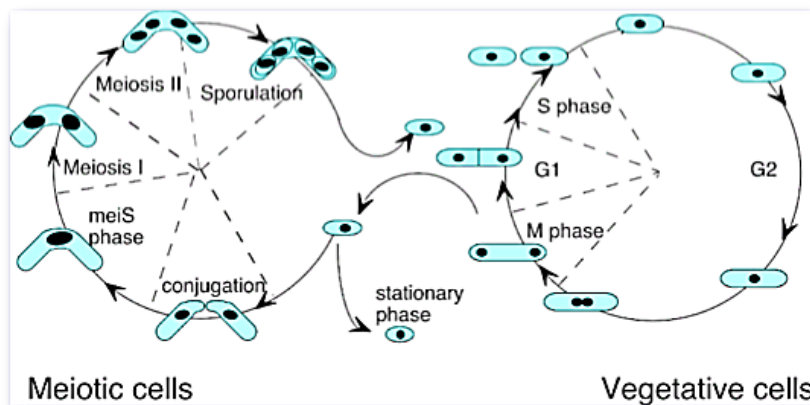
## 1.2. La levadura de fisión como organismo modelo en estudios de biología molecular

*S. pombe* es un ascomiceto evolutivamente lejano de *Saccharomyces cerevisiae* con una separación estimada de aproximadamente 420 millones de años [15]. Esta eucariota unicelular tiene una forma cilíndrica de 3-4  $\mu\text{m}$  de diámetro y 7-14  $\mu\text{m}$  de longitud. Se divide formando un septo en la zona media para dar lugar a dos células hijas iguales de tipo haploide o diploide [16] (Figura 2).



**Figura 2.** Microfotografías de *Schizosaccharomyces pombe*. (A) Células haploides que tienen un septo de división. (B) Células diploides. Imagen de Hoffman y colaboradores; 2015 [15].

Este patrón de división hace que *S. pombe* sea un organismo modelo de mamíferos en estudios de crecimiento y división celular, diferenciación, replicación, mecanismos de reparación del ADN, dinámica cromosómica, recombinación y segregación durante la mitosis y meiosis [17] (Figura 3).

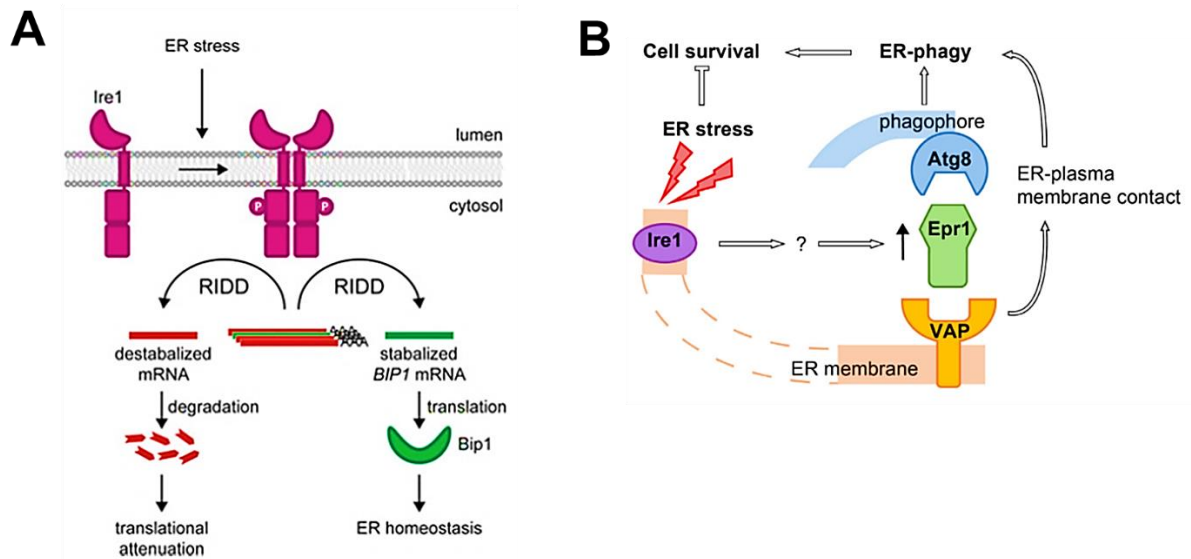


**Figura 3.** Ciclo celular de *S. pombe*. Imagen de USC Dornsife. PombeNet Forsburg Lab.

La levadura de fisión comparte muchas características con las células eucariotas a pesar de su divergencia evolutiva de alrededor de 1144 millones de años [16]. La conservación genética entre *S. pombe* y humanos se ha confirmado mediante la complementación funcional de mutantes de la levadura con genes humanos, demostrando una alta similitud entre ambas especies [16–19]. El genoma de *S. pombe* codifica alrededor de 5054 proteínas, de las cuales se ha establecido que al menos 1355 son ortólogas en humanos [17,20]. Los ortólogos se definen como genes homólogos que divergen después de un evento de especiación, pero mantienen su función principal conservada. Por lo tanto, *S. pombe* es un organismo modelo útil para el análisis funcional de genes eucariotas relacionados con el ciclo celular y la regulación de la expresión génica [21,22].

### **1.3. Vía UPR conservada en *S. pombe***

En *S. pombe*, la vía UPR opera sólo con Ire1, que es altamente conservada en eucariotas, ya que carece de PERK y ATF6 [23,24]. Por lo tanto, Ire1 es el principal regulador de la respuesta al estrés en el RE. Una de sus funciones principales es degradar los ARNm que ingresan al lumen del RE (Figura 4-A). Este proceso tiene como objetivo disminuir la carga proteica para disminuir el estrés. Además, Ire1 procesa ARNm específicos, como Bip1 (Figura 4-A), a través de un mecanismo conocido como Regulación de la Degradación de ARNm Dependiente de Ire1 (RIDD) y que se conserva en humanos [23,25]. Existen otros elementos que trabajan en sinergia con Ire1, como la UDP-glucosa-glicoprotein-glicosiltransferasa (UGT) [26], el ortólogo de la calnexina humana (*cnx1*) [27] que regulan el plegamiento de proteínas, y la identificación reciente de Epr1 [28] que promueve la autofagia en condiciones de estrés celular (Figura 4-B).



**Figura 4.** Mecanismos de respuesta al estrés de RE en *S. pombe*. (A) Vía de señalización UPR. Imagen de WU Haoxi y colaboradores; 2014 [24]. (B) *Ire1* promueve la autofagia en RE mediante la regulación positiva de *Epr1*. Imagen de Zhao Dan y colaboradores; 2020 [28].

Por lo que la vía UPR parece ser adaptable y se remodela de manera diferencial de acuerdo con las necesidades de las células. Esto sugiere que existirían más factores de regulación que aún no se han identificado, y abre una puerta para el estudio de otros elementos de la vía en levaduras y humanos.

#### 1.4. Agentes químicos que inducen estrés en RE

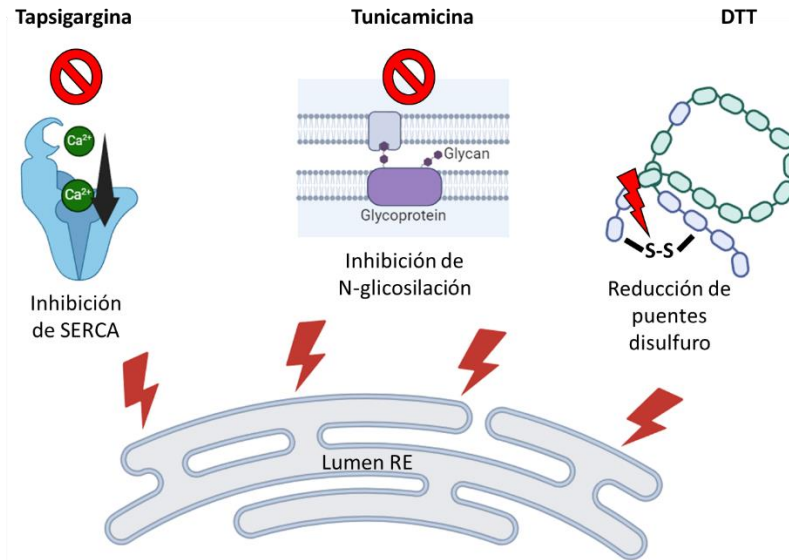
Como este proyecto aborda la inducción de estrés reticular en *S. pombe*, fue necesario abordar el fundamento de inducción en modelos celulares. Durante varios años, el estrés en el RE ha surgido como un objetivo potencial para diferentes drogas terapéuticas, siendo crucial para el estudio de mecanismos importantes como la disfunción mitocondrial y el estrés oxidativo [29].

El RE desempeña un papel crucial en la síntesis de todas las proteínas que son secretadas por las células o insertadas en las membranas de otros compartimentos celulares [30,31]. El plegamiento eficiente de las proteínas en el RE depende de un estrecho acoplamiento entre la llegada de nuevas proteínas al lumen del RE y la

capacidad de plegamiento del organelo. Para lograr un plegamiento eficiente, son necesarias proteínas residentes en el RE, como chaperonas y foldasas dependientes de  $\text{Ca}^{+2}$  [31]. Numerosas situaciones fisiológicas o patológicas pueden interferir con el plegamiento de proteínas y, por ende, afectar la homeostasis del RE. Estas incluyen alteraciones en las reservas lumbales de calcio en el RE, agotamiento de energía, cambios en el potencial redox, deficiencia de glucosa, acumulación de lípidos, infecciones virales, intoxicación por etanol y exposición a xenobióticos [32–35]. Como se compromete la viabilidad celular, el estrés en el RE desencadena la activación de la respuesta a proteínas desplegadas (UPR), cuyo objetivo es mantener la homeostasis de las proteínas. Esto se logra reduciendo la carga de proteínas desplegadas y aumentando el plegamiento eficiente de las mismas.

Los medicamentos pueden inducir estrés en el RE a través de diferentes mecanismos, incluidos la inhibición del proteosoma, la disfunción mitocondrial y la alteración de componentes clave del RE [29]. Los agentes químicos más utilizados en biología celular y molecular han sido Tapsigargina, Tunicamicina y DTT, los cuales se han empleado en distintas células eucariotas (Figura 5).

La Tapsigargina es un potente inductor del estrés reticular que se obtiene de la planta mediterránea *Thapsia garganica*. Actúa inhibiendo las ATPasas de  $\text{Ca}^{+2}$  (Figura 5) del retículo sarco-endoplásmico (SERCA), lo que conduce a un agotamiento severo del  $\text{Ca}^{+2}$  en el RE [36]. Esta disminución activa efectores que pueden desencadenar la muerte celular, además del aumento concomitante del  $\text{Ca}^{+2}$  citosólico libre, y que también funciona como una señal pro-apoptótica potente en diversos tipos de células [37].



**Figura 5.** Mecanismos potenciales de agentes químicos que inducen estrés en RE. La figura indica los respectivos blancos de inhibición de Tapsigargina, Tunicamicina y DTT en las células. Imagen creada en BioRender.com.

La Tunicamicina es un antibiótico que contiene glucosamina producida por *Streptomyces lysosuperificus*. Este fármaco actúa contra diferentes tipos de microorganismos, incluidas las bacterias grampositivas, hongos, levaduras y virus [29]. Se ha demostrado que este antibiótico es capaz de inhibir la síntesis de N-glicoproteínas (Figura 5), específicamente, impidiendo la transferencia de la N-glucosamina al lípido dolicol fosfato poliisoprenoide, en el primer paso de síntesis de oligosacáridos precursores de N-glicoproteínas [38]. En particular, este proceso biosintético tiene lugar dentro del RE en células eucariotas. De manera que, la alteración del proceso de glicosilación de proteínas recién sintetizadas provoca defectos en su plegamiento [8].

Respecto al DTT, se trata de un potente agente reductor capaz de atravesar las membranas celulares y modificar el potencial redox del RE, lo que afecta la formación de enlaces disulfuro (Figura 5) y, en consecuencia, impacta negativamente en el plegamiento de proteínas [39,40].

Dado que los tres agentes inductores tienen como objetivo la alteración del plegamiento de proteínas y, por ende, la activación de la vía UPR, la selección del agente químico dependerá del impacto fenotípico que se desee estudiar, así como del modelo celular utilizado.

### **1.5. Interacción proteína-proteína: una estrategia comparativa de interólogos entre especies**

En los últimos 20 años se ha incrementado el número de publicaciones científicas enfocadas a la identificación de redes de interacción proteína-proteína (PPIs) para la caracterización de vías de señalización, complejos de interacción y la investigación de funciones celulares de proteínas putativas [41–43].

Por lo tanto, estas limitaciones han motivado a la comunidad científica al desarrollo de herramientas computacionales para la predicción de PPIs a gran escala como STRING, PEPPi y Deep Neural Networks [44–46]. Aun así, su precisión y fiabilidad dependen en gran medida del conocimiento previo de las proteínas analizadas. Por otro lado, existen bases de datos que recopilan las interacciones reportadas en publicaciones basadas en evidencia experimental como BIND, DIP, INTACT, MINT y BioGRID [47–52].

Además de la detección empírica de PPIs, la estrategia comparativa de interacciones de proteínas conservadas en diferentes especies, también denominados interólogos, ha contribuido a la anotación funcional de proteínas no caracterizadas [53]. Aunque la predicción de interólogos humanos inferidos a partir de organismos modelo es menos abundante de lo esperado, la alta conservación de pequeños grupos de ortólogos se ha podido relacionar con procesos celulares altamente conservados evolutivamente [42,53–55].

En los últimos años, *S. pombe* también ha sido útil para el estudio de aspectos bioquímicos de los productos genéticos, tales como la identificación de dominios relacionados con la actividad catalítica y la interacción con otras proteínas [20–22,56].

Por otro lado, la determinación estructural de las proteínas es fundamental para entender su función celular, sin embargo, existe un número limitado de estructuras tridimensionales de proteínas procedentes de distintos organismos de interés biológico. Las dificultades que implica la determinación experimental de las estructuras atómicas de proteínas hacen que los métodos predictivos de modelado 3D sean herramientas invaluable [57]. Además, el *docking* proteína-proteína ha sido otro importante método computacional para delinear características específicas de las interacciones, como el papel de las mutaciones de residuos cruciales en las interacciones de unión y las predicciones de afinidad [58–60].

Un campo poco explorado ha sido la interacción proteolítica de metaloenzimas y proteínas diana [61–63]. La predicción de la susceptibilidad proteolítica ha sido una tarea difícil, debido a que es un mecanismo que no depende solamente de la secuencia de aminoácidos para la búsqueda de sitios potenciales de escisión [64], sino que debe considerarse el orden estructural de las proteínas, la co-expresión proteasa-sustrato y las condiciones fisiológicas [64,65]. El conocimiento de los sitios específicos de hidrólisis por proteasas no es sólo fundamental para entender la interacción dinámica entre las enzimas y sus sustratos, sino que es un prerrequisito para el diseño de sensibilidad y actividad específica de inhibidores [66–68].

Actualmente existen herramientas bioinformáticas específicas para la predicción de sitios potenciales de escisión proteolítica a partir de la secuencia de aminoácidos [68,69]. Por ejemplo, el servidor web PROSPER es una herramienta que predice sitios escindibles de las proteínas con buena especificidad para 4 grupo de proteasas: aspártico-, cistein-, serin-, y metalo-proteasas [70–72]. Los resultados de predicción han sido comparables con las determinaciones experimentales, por lo que, se considera una

herramienta predictiva confiable [72,73]. Por lo tanto, los métodos computacionales de determinación estructural de proteínas y análisis de interacción no sólo aportan información sobre la termodinámica de las moléculas, sino también son potencialmente útiles en la comprensión de redes de interacción de proteínas.

## 2. ANTECEDENTES DIRECTOS

En el año 2012, nuestro grupo de investigación reportó en un trabajo de tesis que la expresión de Ermp1 en *S. pombe* se mantiene constante a lo largo de la cinética de crecimiento celular (Figura 5). Esto fue realizado mediante la semi-cuantificación de productos de RT-PCR observados en gel de agarosa [74], sin embargo, a nivel de proteína no se ha podido caracterizar.

Debido a que no existen anticuerpos comerciales para la identificación de un gran número de proteínas de la levadura, en 2019 se continuó con la producción de anticuerpos policlonales [75]. La estrategia consistió en la expresión de la región C-terminal citosólica de Ermp1 en células de *E. coli* y su posterior purificación mediante cromatografía de afinidad. El purificado se utilizó como antígeno para la inmunización en gallinas como método no invasivo para la recuperación de los anticuerpos. El proceso de obtención de anticuerpos se basó en la deslipidación de las yemas de huevo y su posterior purificación, obteniendo altos rendimientos de recuperación. Estos anticuerpos fueron específicos para la identificación de la región C-terminal recombinante de Ermp1 en *E. coli*. Actualmente, la evaluación de especificidad de estos anticuerpos continúa en estudio. Se ha estado trabajando en la optimización de técnicas de extracción de proteínas de membrana en *S. pombe* para la identificación de Ermp1 mediante western-blot, sin embargo, dichos estudios aún no han concluido.

### 3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La dificultad metodológica para purificar proteínas de membrana ha sido una de las principales razones para la falta de información sobre la caracterización estructural y funcional de las Fxna peptidasas, como Ermp1 de *S. pombe*. Aunque algunas proteínas de membrana son abundantes en las células, aquellas que están implicadas en la comunicación intracelular, regulación del transporte de iones y metabolitos generalmente se encuentran en niveles muy bajos. Aunque la expresión heteróloga es una buena estrategia de sobre-expresión, enfrenta desafíos significativos. Además, la purificación de las proteínas de membrana requiere de experimentos de extracción y solubilización que demandan tiempo y recursos, ya que se deben optimizar parámetros como el uso de detergentes, pH, concentración salina y aditivos que no afecten su estructura.

### 4. JUSTIFICACIÓN

Debido a la falta de precedentes sobre la interacción de Ermp1 con otras proteínas en *S. pombe*, así como la ausencia de su caracterización estructural, fue necesario recurrir a estrategias bioinformáticas para ayudar en la elucidación de su papel funcional.

*S. pombe* conserva la vía de señalización UPR, lo que nos permite estudiar el estrés proteo-tóxico en el RE y su posible relación con Ermp1. Además, *S. pombe* se ha consolidado como un organismo modelo para el análisis funcional de genes eucariotas debido a su fácil manipulación en el laboratorio. El interés en el estudio de ERMP1/Fxna ha aumentado significativamente desde su descubrimiento en ovario de rata, siendo objeto de estudio en numerosos centros de investigación de todo el mundo en los últimos 8 años. Algunos grupos de investigación han tenido cierto interés en el estudio del posible rol de ERMP1 en la biología molecular del cáncer.

Por lo tanto, nuestro proyecto busca contribuir a la investigación del papel funcional de las Fxna peptidasas, mediante la identificación de procesos celulares altamente conservados entre *S. pombe* y humanos.

## 5. HIPÓTESIS

Al comparar interólogos entre el ser humano y la levadura de fisión *S. pombe*, se podría obtener una comprensión más profunda del papel funcional de la proteína Ermp1 en la levadura de fisión. Además, es posible que la expresión génica de Ermp1 en *S. pombe* sea sensible al estrés en el RE, de manera similar a lo observado con ERMP1 en humanos.

## 6. OBJETIVOS

### 6.1. OBJETIVO GENERAL

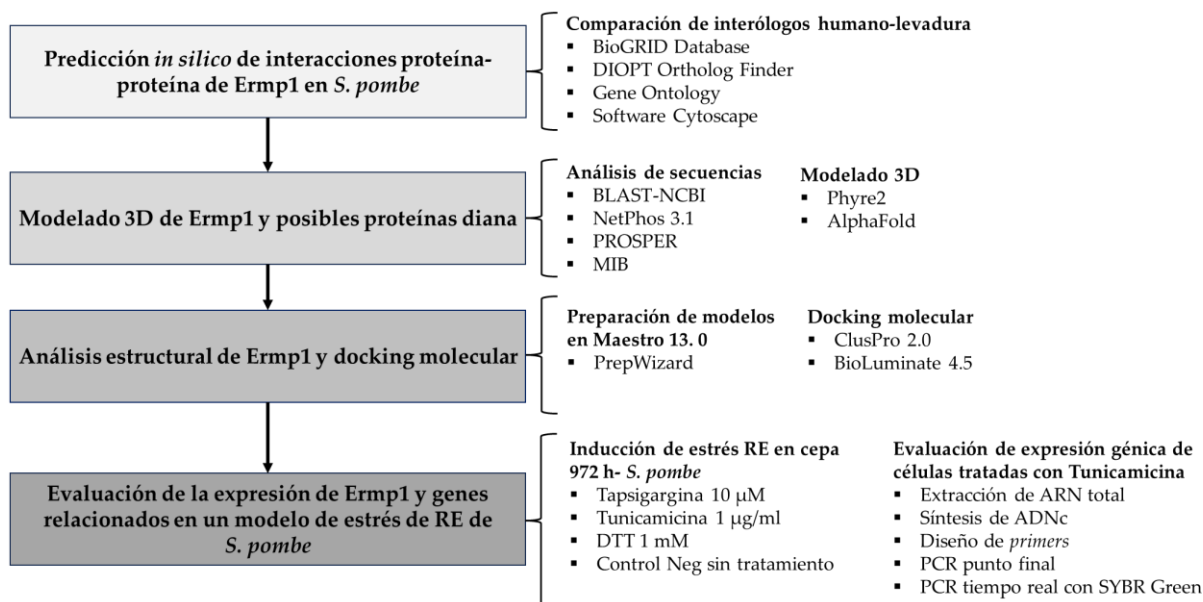
Determinar el papel funcional de Ermp1 en *S. pombe* mediante un enfoque *in silico* y análisis de expresión génica, con el propósito de explorar su posible relación con la respuesta al estrés en el RE.

### 6.2. OBJETIVOS PARTICULARES

1. Predicción *in silico* de una red de interacción proteína-proteína de Ermp1 en *S. pombe* mediante la comparación de interólogos levadura-humano.
2. Modelado 3D de Ermp1 y posibles proteínas diana empleando las herramientas Phyre2 y AlphaFold.
3. Análisis estructural de Ermp1 y *docking* molecular con posibles proteínas diana en los programas ClusPro y BioLuminate.
4. Evaluación de la expresión de Ermp1 y genes relacionados con la vía UPR en un modelo de estrés reticular de *S. pombe* mediante qRT-PCR.

## 7. METODOLOGÍA

### 7.1. Esquema metodológico



### 7.2. Predicción de interacciones proteína-proteína

La red de PPI de ERMP1 humano se obtuvo del repositorio BioGRID [52]. Las consultas se realizaron en la plataforma entre 2020 y 2023, teniendo en cuenta las últimas actualizaciones de la base de datos. El servidor DIOPT Ortholog Finder [76] se utilizó para la búsqueda de proteínas ortólogas en *S. pombe* utilizando la red PPI de ERMP1 humano como referencia. DIOPT emplea un conjunto de herramientas y algoritmos, incluidos En-sembl Compara, HomoloGene, Inparanoid, Isobase, OMA, orthoMCL, Phylome, RoundUp y TreeFam, para predecir ortólogos en una variedad de especies, incluidos humano, ratón, mosca de la fruta, gusano, pez cebra y levaduras [76]. Estas herramientas proporcionan un método simplificado para integrar, comparar y acceder a predicciones ortológicas basadas en la homología de secuencias, árboles filogenéticos y similitud funcional. DIOPT calcula una puntuación simple que indica la cantidad de herramientas que respaldan la relación del par de genes ortólogos.

Posteriormente se utilizó Gene Ontology para la asignación de la localización subcelular y los procesos biológicos de las proteínas ortólogas identificadas en *S. pombe*. Para la distribución de la red binaria de interacciones proteína-proteína de Ermp1 se utilizó como criterio de distribución la puntuación de relación ortológica asignada por DIOPT. La edición de las redes de PPI se realizó en el software Cytoscape 3.10.

### **7.3. Selección de proteínas diana: predicción de secuencias de escisión proteolítica**

Del grupo de proteínas que conforman la red de PPI que se predijo para Ermp1 en *S. pombe*, se seleccionaron aquellas con puntuaciones DIOPT superiores a 9 para la predicción de secuencias de escisión proteolítica y el análisis posterior de *docking* molecular con el dominio proteolítico M28 de Ermp1. Además de la puntuación de DIOPT, también se consideró para la selección de las proteínas su localización en el compartimento citosólico, incluidas proteínas de membrana con regiones citosólicas. Las proteínas diana seleccionadas en este estudio fueron las primeras en ser identificadas como verdaderos homólogos humanos en la levadura de fisión desde que se consultó el repositorio BioGRID en 2020.

Las secuencias de aminoácidos de las proteínas Amk2, Ypt5, Pex12, Oca8, Fis1 y Pmc1 fueron analizadas en PROSPER [77]. Esta herramienta utiliza un sistema de aprendizaje autónomo (*machine learning*) para predecir secuencias consenso de escisión proteolítica a partir de la determinación de estructuras secundarias y accesibilidad proteolítica de las secuencias [77]. PROSPER tiene información específica sobre cuatro grupos de proteasas (aspártico, cisteína, metalo- y serin-proteasas) derivadas de la base de datos MEROPS. En este estudio, la predicción se realizó con el grupo de metaloproteasas. Las secuencias consenso de escisión de cada una de las proteínas diana fueron seleccionadas bajo dos criterios: la puntuación de probabilidad superior a 0,8 calculada por el programa [78], y la estructura secundaria de las secuencias consenso. Se dio prioridad a las asas para aumentar la probabilidad de accesibilidad proteolítica.

A pesar de que PROSPER ha demostrado una buena especificidad, con predicciones comparables a los resultados experimentales [70–73], decidimos validar el programa utilizando las secuencias de aminoácidos de sustratos conocidos de las Matriz Metaloproteinasas MMP8 y MMP12, un grupo de metaloenzimas de  $Zn^{+2}$  ampliamente estudiadas. Los sustratos seleccionados fueron Fibronectina 1 y el Factor XII de Coagulación.

#### 7.4. Modelado 3D de Ermp1 y proteínas diana

El dominio M28 de Ermp1 y las proteínas diana Ypt5, Pex12, Oca8, Fis1 y Pmc1 se modelaron por homología en Phyre2 [79]. Las plantillas se seleccionaron en función del porcentaje de homología de las secuencias, conservación de dominios y función celular. Además, se revisaron los informes de validación de las plantillas propuestas por Phyre2 en el Protein Data Bank para seleccionar aquellas que cumplieran con los criterios de aceptación de calidad, como el método experimental, la resolución de las estructuras y las puntuaciones de los percentiles (que van de 0 a 100) de las métricas de validación globales: R- Value Free, R-Value Work y R-Value Observed; y los valores atípicos de los gráficos de Ramachandran. Los modelos fueron validados en PDBeFold [80] y PROCHECK-SAVES v6.0 Structure Validation Server [81]. Se consideraron como los principales parámetros de validación el valor de RMSD  $<1 \text{ \AA}$  y un Q-score aproximadamente a 1, debido a la calidad del alineamiento de las estructuras secundarias con respecto a la plantilla y su asociación con el porcentaje de residuos alineados [80,82,83].

Dado que un segmento N-terminal de la proteína Amk2 no podía ser modelado mediante homología y era esencial para el análisis de *docking* molecular, se obtuvo el modelo 3D de la base de datos AlphaFold [84]. Asimismo, se descargaron los modelos 3D de Ermp1 y las proteínas diana transmembranales Sei1, Yos1, C630.12 y Emp70 de misma base de datos para el posterior análisis de *docking* molecular.

## 7.5. Análisis del dominio M28 de Ermp1 y región transmembranal

Se realizó un análisis de alineamiento de secuencias del dominio M28 de las proteínas ERMP1 humana ([Q7Z2K6](#)) y Ermp1 de *S. pombe* ([O94702](#)) en NCBI-BLAST para la determinación del porcentaje de homología. También se recuperó información complementaria de la base de datos PhosphositePlus [85] para la búsqueda de modificaciones postraduccionales reportadas en ERMP1 humana. Además, se utilizó el servidor NetPhos 3.1 [86] para realizar un análisis predictivo de posibles sitios de fosforilación de serina en ambas proteasas. Las puntuaciones  $>0.9$  calculadas por el programa fueron consideradas como una medida de precisión de las predicciones [87]. Por otro lado, el modelo de AlphaFold de Ermp1 se analizó en el servidor MIB (*Metal Ion-Binding Site Prediction and Docking Server*) [88] para la predicción de sitios potenciales de unión a  $\text{Ca}^{+2}$  de la región transmembranal.

MIB proporciona información precisa para la búsqueda de residuos de unión a iones metálicos utilizando el método de transformación de fragmentos. El método de transformación realiza una comparación estructural entre las proteínas de consulta y las plantillas de su base de datos [88]. De acuerdo con la similitud de las estructuras analizadas, el programa calcula una puntuación de los posibles residuos de unión para 12 iones metálicos ( $\text{Ca}^{+2}$ ,  $\text{Cu}^{+2}$ ,  $\text{Fe}^{+3}$ ,  $\text{Mg}^{+2}$ ,  $\text{Mn}^{+2}$ ,  $\text{Zn}^{+2}$ ,  $\text{Cd}^{+2}$ ,  $\text{Fe}^{+2}$ ,  $\text{Ni}^{+2}$ ,  $\text{Hg}^{+2}$ ,  $\text{Co}^{+2}$  y  $\text{Cu}^{+}$ ) con una distancia de 3,5 Å. Al final, MIB proporciona el acoplamiento de los iones metálicos después de la predicción.

## 7.6. Optimización de la estabilidad conformacional y minimización de energía de los modelos 3D

Los archivos PDB de las proteínas se prepararon para la optimización de su estabilidad estructural y se minimizó la energía a pH 7.4 utilizando la herramienta Protein Preparation Wizard (PrepWizard) de Maestro 13.0 [89] previo al *docking* molecular. Se revisó y ajustó la integridad de cada una de las estructuras. Se agregaron

átomos de hidrógeno para cada proteína y se verificaron las conformaciones de los rotámeros de residuos polares. Además, los estados tautoméricos y de protonación de Asp, Glu, Arg, Lys e His se ajustaron a pH 7.4. La orientación de los enlaces de hidrógeno se ajustó utilizando PROPKA a pH 7.4 y las proteínas se minimizaron utilizando el campo de fuerza OPLS4 con un RMSD de 0.3 Å [90]. Los modelos fueron editados en UCSF Chimera 1.17.1 [91] y Maestro 13.0.

### 7.7. *Docking* proteína-proteína

Se realizó *docking* molecular rígido y ciego en ClusPro 2.0 [92] y Bio-Luminate 4.5 [93]. Dado que ClusPro y BioLuminate utilizan el método de Transformación Rápida de Fourier de PIPER para el muestreo de miles de orientaciones de complejos proteína-proteína en múltiples etapas, la cantidad de conformaciones que predicen podrían ser cercanas a las nativas. Por lo tanto, para validar la capacidad predictiva de interacciones metaloenzima-proteína diana de los programas, se utilizaron las estructuras cristalográficas de MMP8 (PDB ID: 2OY2) y MMP12 (PDB ID: 3EHX) y sus respectivos sustratos Fibronectina 1 (PDB ID: 2HA1) y Factor XII de Coagulación (PDB ID: 6GT6). Por otro lado, los modelos de Ermp1 fueron designados como receptores rígidos y las proteínas diana como los ligandos en ambos programas.

Los archivos PDB fueron importados a ClusPro 2.0, y el *docking* proteína-proteína se inició automáticamente con un RMSD < 10 Å entre el receptor y el ligando. ClusPro utiliza el método de correlación de la Transformada Rápida de Fourier (FFT) y el modelo computacional PIPER para la predicción de los acoplamientos [92,94]. Los mejores 1000 modelos de interacción son procesados para ser agrupados de acuerdo con las puntuaciones de contribución energéticas que se derivan en 4 categorías: electrostáticas-favorecidas, hidrofóbicas-favorecidas, van der Waals-electrostáticas y contribuciones de energía equilibradas [92]. En este estudio se utilizó la configuración predeterminada por el programa, por lo que los resultados de los acoplamientos se

seleccionaron de la categoría de energía equilibrada. Debido a que ClusPro elimina los iones metálicos durante el procesamiento de los archivos PDB, los iones  $Zn^{+2}$  del dominio M28 de Ermp1 fueron agregados a los complejos de interacción de acuerdo con las coordenadas del modelo.

En el software BioLuminate 4.5, los ensayos de *docking* proteína-proteína se realizaron con un límite de 70 000 rotaciones para cada ligando evaluado. De manera particular, el potencial electrostático de los átomos de  $Zn^{+2}$  del dominio M28 de Ermp1 se asignó para cada complejo de interacción usando PIPER y Prime. Finalmente, los mejores 30 modelos fueron analizados en Maestro 13.0. Las interacciones moleculares del dominio M28 y proteínas diana fueron analizadas en la herramienta DIMPLOT del programa LigPlus [95].

#### **7.8. Solvatación de modelos de interacción: dominio M28 de Ermp1 y proteínas diana**

Los modelos de interacción del dominio M28 de Ermp1 con las proteínas diana fueron solvatados en la herramienta WaterMap [96]. Se llevó a cabo una simulación de dinámica molecular en presencia del disolvente y también se realizó un análisis termodinámico del agua en el sitio de unión de la proteína [97]. Los cálculos de WaterMap se ejecutaron con los parámetros de simulación predeterminados: modelo de solvente TIP4P a 300 K, 1 atm y 2 ns de simulación. Posteriormente, se realizó un análisis de los *clusters* para identificar los principales sitios de hidratación, mediante la partición de la distribución de densidad del solvente dentro de la cavidad de unión [96,98].

#### **7.9. Dinámica molecular: dominio M28 de Ermp1 y proteínas diana**

Los modelos de interacción obtenidos del *docking* molecular fueron analizados para identificar aquellos que exhibían una mayor proximidad entre la cavidad catalítica de la metaloproteasa y las secuencias consenso de las proteínas diana. Por lo tanto, se

realizó una simulación de dinámica molecular en Desmond [99,100] de los complejos de interacción Ermp1-Amk2, Ermp1-Ypt5 y Ermp1-Pex12 para evaluar su estabilidad. La simulación se realizó dentro de una caja ortorrómbica, con el complejo receptor-ligando situado en el centro a una distancia de 10 Å. Se utilizaron moléculas de agua para solvatar la caja, y se utilizó una concentración de 150 nM de cloruro de sodio para simular las condiciones fisiológicas. El sistema energético se minimizó utilizando el campo de fuerza OPLS4 con 2000 iteraciones, con un criterio de convergencia de 1 kcal/mol/Å [101]. Finalmente, se realizó una simulación de 120 ns a 300 K y 1 bar de presión. La desviación cuadrática media (RMSD) y la fluctuación cuadrática media (RMSF) fueron reportadas para cada complejo de interacción.

#### **7.10. Inducción de estrés reticular en células de *S. pombe***

Se incubaron células de la cepa 972 h- *wilde type* de *S. pombe* en 15 mL de medio YES durante 24 horas a 30 °C en agitación constante. Posteriormente, las células se cultivaron en matraces de 15 mL de medio mínimo YNB con una densidad óptica inicial de 0.4 a 600 nm. Las células fueron sometidas a cuatro condiciones independientes: tratamiento con 10 µM de Tapsigargina, 1 µg/mL de Tunicamicina, 1 mM de DTT, y agua estéril para el control sin tratamiento. Las células se incubaron a 30°C en agitación constante. Se monitoreó el crecimiento midiendo la densidad óptica cada 4 horas durante 24 horas. Se graficaron las absorbancias en función del tiempo para construir las cinéticas de crecimiento, utilizando el modelo de crecimiento microbiano de Monod. Para la determinación de la viabilidad se tomaron alícuotas de 20 µL de células (equivalente a 2 U.A.) cada 4 horas y se mezclaron con un volumen igual de azul de tripano. La mezcla se incubó durante 5 minutos y se depositó una alícuota de 20 µL en una cámara de Neubauer de 0.01 mm por capilaridad. Una vez que la muestra se distribuyó en toda la cámara de Neubauer, se realizó el conteo de las células de 5 cuadrantes en microscopio óptico a 40X.

El porcentaje de viabilidad se calculó con la siguiente fórmula:

$$\% \text{ viabilidad} = \frac{\text{No. células vivas}}{\text{No. células muertas}} \times 100$$

### **7.11. Extracción de ARN total**

Se tomaron muestras de 1 a 4 mL (equivalente a 2 U.A.) de los cultivos celulares tratados con 1 µg/mL de Tunicamicina a las 4, 8 y 12 horas de incubación. Las muestras se centrifugaron a 8000 rpm durante 10 minutos a 4°C para separar las células del medio de cultivo. Las células se lavaron 2 veces con agua estéril fría entre cada centrifugación. Después las células se resuspendieron en 30 µL de buffer de zimoliasa con 0.1 mg de zimoliasa y se incubaron a 37°C durante 30 minutos. Posteriormente, las suspensiones celulares se centrifugaron a 3000 rpm durante 5 minutos a 4°C y se descartaron los sobrenadantes. Las células se resuspendieron en 500 µL de TriZol Reagent de Invitrogen y se homogeneizó por pipeteo hasta obtener una suspensión homogénea sin restos celulares visibles. Las suspensiones se incubaron durante 5 minutos a temperatura ambiente y en seguida se agregaron 100 µL de cloroformo. Se agitó vigorosamente en vórtex por 30 segundos aproximadamente hasta homogeneizar. Se incubó nuevamente 5 minutos a temperatura ambiente y se centrifugó a 12000 rpm durante 15 minutos a 4°C. Se recuperó la fase acuosa en un tubo eppendorf nuevo y se adicionaron 250 µL de isopropanol frío sobre las paredes del tubo y se mezcló suavemente por inversión hasta homogeneizar. Se incubó durante 10 minutos a temperatura ambiente, se centrifugó a 12000 rpm por 10 minutos a 4°C y se eliminó el sobrenadante. La pastilla de ARN total se lavó con 1 mL de etanol frío al 75% en vórtex durante 30 segundos y se centrifugó a 12000 rpm por 5 minutos. Se decantó el sobrenadante y las pastillas de ARN total se secaron a temperatura ambiente con los tubos invertidos por 5 minutos. El ARN total se resuspendió en 20-30 µL de agua de DEPC al 0.1%. Se cuantificó a 260 nm y se

determinó su pureza mediante la relación 260/280 nm. Se verificó la integridad del ARN por electroforesis en gel de agarosa al 1%. El ARN se almacenó a -20°C hasta su uso.

### 7.12. Síntesis de ADNc (RT-PCR)

Para la síntesis de ADNc, previamente se trató 1 µg de ARN total con *Thermo Scientific DNasa I* (1 U/µL) en un volumen de reacción de 10 de acuerdo con el protocolo del kit. Se utilizó el kit *ProtoScript® II First Strand cDNA Synthesis* de *New England BioLabs* para la transcripción reversa de 200 ng de ARN total tratado con *DNasa I* en un volumen de reacción de 10 µL de acuerdo con la Tabla 1.

**Tabla 1.** Preparación de reacciones para síntesis de ADNc con *ProtoScript® II First Strand cDNA Synthesis Kit*.

Reactivo	Volumen µL
Agua libre de nucleasas	1
ProtoScript II Reaction Mix (2X)	5
ProtoScript II Enzyme Mix (10X)	1
Oligo d(T) <sub>23</sub> VN	1
ADNc (200 ng)	2
<b>Volumen total</b>	<b>10</b>

En el termociclador se programó un ciclo a 42°C/ 60 minutos y un ciclo a 70°C/ 10 minutos. El ADNc se almacenó a -20°C hasta su uso.

### 7.13. Diseño de primers

Se utilizó Primer designing tool de NCBI para el diseño de *primers* de los genes *erm1*, *amk2*, *gsk3*, *ire1*, *bip1* y el gen endógeno *sdh1* para la amplificación de regiones de 70-102 pb. El análisis de las propiedades de los *primers* se realizó en OligoAnalyzer Tool y SnapGene Viewer 7.1.2. Los *primers* se sintetizaron en el Instituto de Biotecnología de

la UNAM, en la Unidad de síntesis y Secuenciación de ADN. En la Tabla 2 se muestran las secuencias de los *primers* y sus propiedades.

**Tabla 2.** Propiedades de primers diseñados para qRT-PCR.

Amplicon	Primer	Secuencias	pb	Tm (°C)	GC (%)
71 pb	<i>erm1-F</i>	5'-AAGCCGTTCTCATCAATGCT-3'	20	62.4	45.0
	<i>erm1-R</i>	5'-AGCAAGAGCATCATCAGTGG-3'	20	62.2	50.0
70 pb	<i>amk2-F</i>	5'-CGGAACTTCAGGATCGAGTG-3'	20	61.9	55.0
	<i>amk2-R</i>	5'-AGGCTGATGTGTCTTCTTGC-3'	20	62.4	50.0
76 pb	<i>gsk3-F</i>	5'-GAACTATCCATTCGTCCTGACC-3'	22	62.0	50.0
	<i>gsk3-R</i>	5'-CAAGTTTCACGGGTAAAGCATC-3'	22	61.9	45.5
102 pb	<i>ire1-F</i>	5'-TGCTGCCACAGTGTTTGATA-3'	20	62.3	45.0
	<i>ire1-R</i>	5'-GGTTGTCGAAGCAGAACAGA-3'	20	62.2	50.0
81 pb	<i>bi1-F</i>	5'-GGTATCAATCCCGATGAGGC-3'	20	61.9	55.0
	<i>bip1-R</i>	5'-GTTATCACTTCCTTCCTCGC-3'	20	60.0	50.0
100 pb	<i>sdh1-F</i>	5'-TCTTGACACTCTTTACGGGCAATCTC-3'	27	68.2	48.1
	<i>sdh1-R</i>	5'-CCACGACATTCACCACCTTCCATGAT-3'	26	68.2	50.0

#### 7.14. PCR de punto final

Para determinar la temperatura óptima de alineamiento para la amplificación de los fragmentos de ADN de cada gen, se realizaron evaluaciones a 60, 61 y 63 °C. Se realizaron reacciones de PCR de punto final en un volumen de reacción de 10 µL, de acuerdo con el protocolo del kit *PCR Master Mix 2X de Thermo Scientific* (Tablas 3 y 4). Los productos de PCR se observaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 2 % y se determinó que la temperatura de alineamiento óptima fue a 61 °C.

**Tabla 3.** Preparación de reacciones de PCR de punto final con Kit PCR Master Mix 2X de Thermo Scientific.

Reactivo	Volumen $\mu\text{L}$
Agua libre de nucleasas	2
Master Mix 2x	5
Primer-F (1 $\mu\text{M}$ )	1
Primer-R (1 $\mu\text{M}$ )	1
ADNc (20 ng)	1
<b>Volumen total</b>	<b>10</b>

**Tabla 4.** Condiciones de termociclador para PCR de punto final.

Etapa de PCR	Temperatura	Tiempo
Pre-desnaturalización	95°C	3 min
Desnaturalización	95°C	30 seg
Alineamiento	60, 61, 63°C	30 seg
Extensión	72°C	45 seg
<b>40 ciclos</b>		
Extensión final	72°C	10 min

### 7.15. PCR en tiempo real

Se utilizó el equipo StepOne™ Real Time PCR System de Applied Biosystems, Thermo Scientific para la detección cuantitativa de los productos de PCR y el *kit Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (Thermo Scientific)*. Las reacciones se realizaron en volúmenes de 10  $\mu\text{L}$  de acuerdo con el protocolo del kit. La concentración de los *primers* que se utilizaron para las reacciones de qPCR de validación, rango dinámico y comparación de niveles de expresión se muestran en la Tabla 5.

**Tabla 5.** Preparación de reacciones de PCR con kit Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (Thermo Scientific).

Primers	Concentración $\mu\text{M}$	Reactivo	Volumen ( $\mu\text{L}$ )
<i>erm1</i>	0.9	Agua libre de nucleasas	c.b.p.
<i>amk2</i>	0.8	SYBR Green/ROX qPCR Master Mix 2X	5
<i>gsk3</i>	0.9	Primer-F (0.3-0.9 $\mu\text{M}$ )	c.b.p.
<i>ire1</i>	0.6	Primer-R (0.3-0.9 $\mu\text{M}$ )	c.b.p.
<i>bip1</i>	0.9	ADNc (1-16 ng)	< 1
<i>sdh1</i>	0.3	<b>Volumen total</b>	<b>10</b>

La determinación del rango dinámico se realizó con 3 réplicas y 5 registros de concentración de ADNc (1, 2, 4, 8, y 16 ng). La eficiencia de amplificación de las reacciones de qPCR se calculó en función de la pendiente de la curva estándar, donde el log de la concentración de ADNc está en el eje X y los valores de  $C_t$  en el eje Y. Debido a que se utilizó el agente intercalador SYBR Green, también se determinaron las curvas de disociación o *Melting Curve* para evaluar la especificidad de los *primers*. Los valores de  $C_t$  y las curvas de disociación se obtuvieron del software StepOne v2.3. Las condiciones de amplificación que se utilizaron en el equipo StepOne™ se muestran en la Tabla 6.

**Tabla 6.** Condiciones de amplificación en el equipo StepOne™ Real Time PCR System de Applied Biosystems, Thermo Scientific para la detección cuantitativa de los productos de PCR.

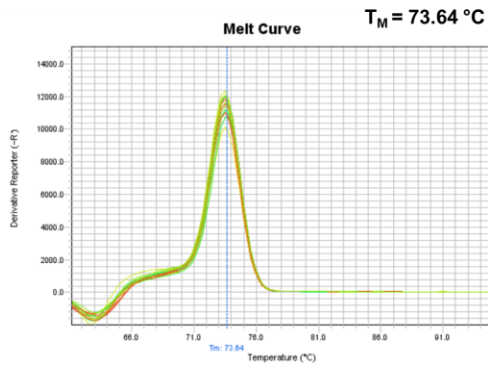
Etapa del termociclador	Temperatura (°C)	Tiempo
<b>Etapa inicial</b>		
Desnaturalización inicial	95	10 min
<b>Etapa de amplificación No. ciclos: 40</b>		
Desnaturalización	95	30 seg
Alineamiento	61	30 seg
Extensión	72	30 seg
<b>Etapa de curva de disociación</b>		
	95	15 seg
	61 + 0.3 hasta 95	1 min
	95	15 seg

#### 7.16. Determinación de la eficiencia de reacción q-PCR de *primers*

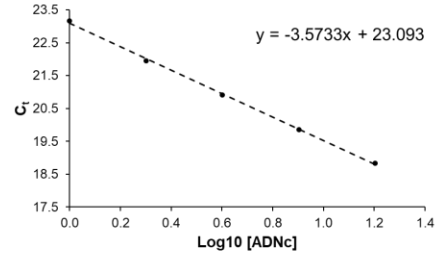
Se evaluó la eficiencia de reacción de PCR en tiempo real (q-PCR) tomando en cuenta el rango dinámico, el valor de  $R^2$ , la precisión y la sensibilidad del método.

Para la validación de las corridas de q-PCR se utilizó como plantilla ADNc de la cepa 972 h de *S. pombe* sin tratamiento y *primers* diseñados para la amplificación del gen endógeno *sdh1* y los genes *erm1*, *amk2*, *gsk3*, *ire1* y *bip1*. En la Figura 6 se presentan las curvas de disociación y los gráficos de curva estándar de cada gen en función del log<sub>10</sub> de las concentraciones de ADNc (eje X) y los valores de  $C_t$  (eje Y). Se puede observar que cada curva de disociación mostró la formación de un solo pico, que representa la amplificación de un único producto de PCR y, por ende, denota la especificidad de la reacción.

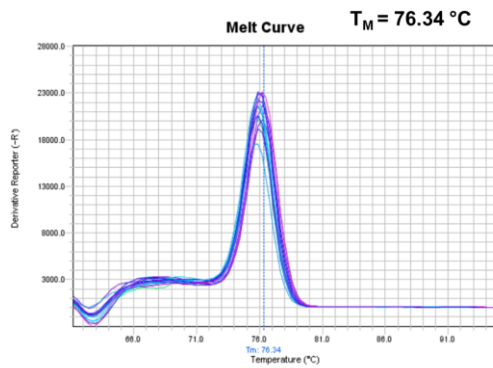
## A. *sdh1*



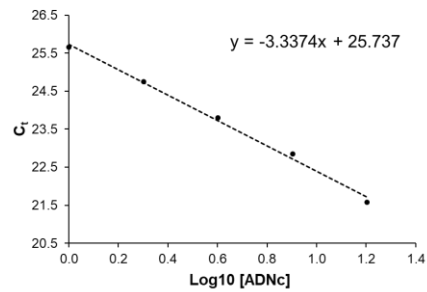
[ADNc] ng	log10 [ADNc]	$C_t$
1	0.00	23.16
2	0.30	21.95
4	0.60	20.91
8	0.90	19.85
16	1.20	18.84



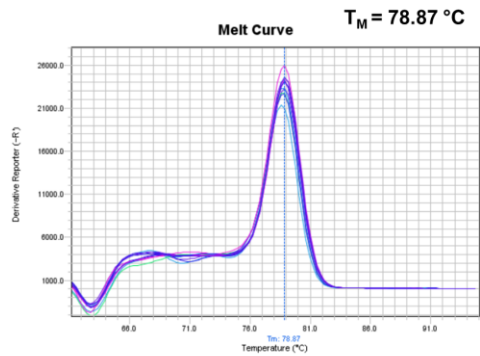
## B. *ire1*



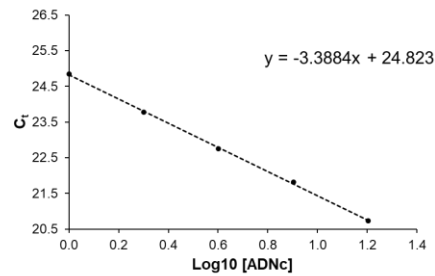
[ADNc] ng	log10 [ADNc]	$C_t$
1	0.00	25.65
2	0.30	24.75
4	0.60	23.80
8	0.90	22.85
16	1.20	21.58



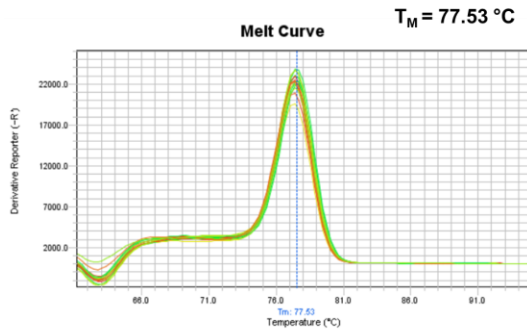
## C. *bip1*



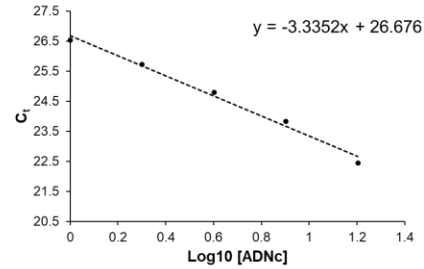
[ADNc] ng	log10 [ADNc]	$C_t$
1	0.00	24.85
2	0.30	23.78
4	0.60	22.75
8	0.90	21.81
16	1.20	20.73



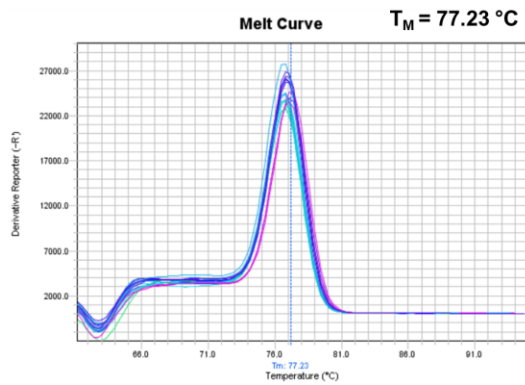
## D. erm1



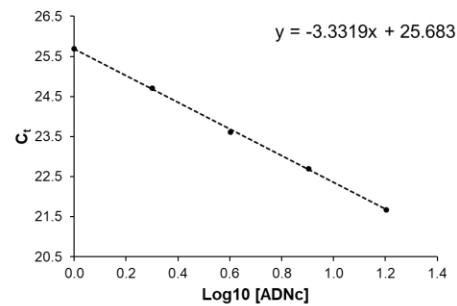
[ADNc] ng	log10 [ADNc]	$C_t$
1	0.00	26.53
2	0.30	25.72
4	0.60	24.80
8	0.90	23.84
16	1.20	22.45



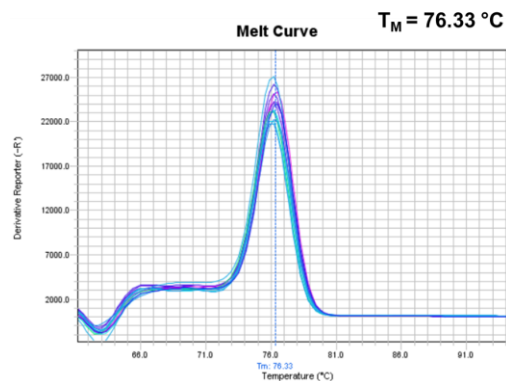
## E. amk2



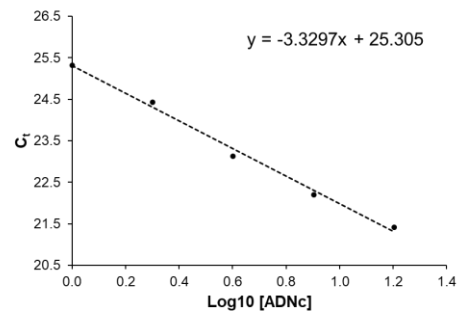
[ADNc] ng	log10 [ADNc]	$C_t$
1	0.00	25.69
2	0.30	24.71
4	0.60	23.61
8	0.90	22.70
16	1.20	21.68



## F. gsk3



[ADNc] ng	log10 [ADNc]	$C_t$
1	0.00	25.32
2	0.30	24.43
4	0.60	23.13
8	0.90	22.20
16	1.20	21.42



**Figura 6.** Validación de la eficiencia de reacción q-PCR mediante la determinación del rango dinámico. (A-F) Curvas de disociación y curvas estándar de los genes de interés de *S. pombe*. El valor de  $T_M$  representa la temperatura de disociación. Las curvas estándar representan el 95% de confianza de una serie de 5 log de la [ADNc] con un mínimo de 3 réplicas. Desviación estándar  $\leq 0.250$ .

En la Tabla 7, se muestran los parámetros de validación de la eficiencia de reacción q-PCR calculados de cada uno de los genes de *S. pombe*.

**Tabla 7.** Parámetros de validación de la eficiencia de reacción de q-PCR de genes de *S. pombe* a una temperatura de alineamiento de 61°C.

Gen	[primers] $\mu$ M	Pendiente	Eficiencia (%)	R <sup>2</sup>
<i>sdh1</i>	0.3	-3.573	90.49	0.998
<i>ire1</i>	0.6	-3.337	99.37	0.995
<i>bip1</i>	0.9	-3.388	97.31	0.999
<i>erm1</i>	0.9	-3.335	99.46	0.988
<i>amk2</i>	0.8	-3.331	99.62	0.999
<i>gsk3</i>	0.9	-3.329	99.71	0.993

Para determinar con precisión la eficacia de una reacción de PCR, el valor de la pendiente debe oscilar en  $-3.3 \pm 10\%$  para que refleje una eficiencia del  $100\% \pm 10\%$ . La eficiencia calculada en la mayoría de los genes se obtuvo en un rango de 97.31 al 99.71%, a excepción del gen endógeno *sdh1* que tuvo una eficiencia de 90.49%. Esto demuestra que la eficiencia calculada se encontró dentro del rango aceptable, lo que indicaría que el sistema es capaz de amplificar y detectar eficazmente un mínimo de copias de la plantilla inicial, alcanzando así el máximo nivel de sensibilidad. Otro parámetro crítico para evaluar la eficiencia es el coeficiente de determinación (R<sup>2</sup>), que es un término estadístico que supone que tan cerca están los datos de la línea de regresión ajustada. Los valores de R<sup>2</sup> calculados para todos los genes oscilaron alrededor de 0.99 (Tabla 7), lo que significa que el modelo lineal proporciona un alto nivel de confianza en cuanto a la correlación de los datos.

### 7.17. Cuantificación relativa por el método de la curva estándar

El método de la curva estándar se considera cuando se evalúa un número reducido de muestras, se buscan cambios de expresión muy discretos y las eficiencias de PCR de los genes no son equivalentes. Este método proporciona resultados cuantitativos muy precisos porque los valores se interpolan a partir de curvas estándar, donde la cuantificación relativa de la muestra problema se expresa en relación con un calibrador (control sin tratamiento). Es decir, el calibrador se convierte en el valor de referencia 1X, y todos los demás valores cuantificados de las muestras problema se expresan como  $n$  veces de la diferencia relativa con respecto al calibrador. Para todas las muestras experimentales, el valor de la concentración de cada gen de interés fue normalizado con el valor del control endógeno *sdh1* para la condición tratada con 1  $\mu\text{g/mL}$  de Tunicamicina y la condición sin tratamiento, de acuerdo con las siguientes fórmulas:

$$\text{Target normalizado (Test)} = \frac{[\text{Target}]}{[\text{Control endógeno}]}$$

$$\text{Target normalizado (calibrador)} = \frac{[\text{Target}]}{[\text{Control endógeno}]}$$

Posteriormente, cada uno de los valores de las muestras problema normalizadas se dividió por el valor normalizado del calibrador para generar los niveles de expresión relativas:

$$\text{Fold difference in target} = \frac{\text{Target normalizado (Test)}}{\text{Target normalizado (calibrador)}}$$

Para el análisis, se utilizó ADNc de muestras de ARN total que se obtuvieron a las 4, 8 y 12 horas de la cinética de crecimiento de células de *S. pombe* con y sin tratamiento inductor de estrés de RE. Se realizaron 3 experimentos independientes de qPCR, cada uno con triplicados para cada gen en ambas condiciones. El análisis estadístico de los datos de cuantificación se realizó con una prueba *t student* para dos muestras independientes.

## 8. RESULTADOS

### 8.1. Predicción de interacciones proteína-proteína de Ermp1 en *S. pombe*

Durante el periodo de consulta entre 2020 y 2023 en BioGRID, se obtuvo un registro de 190 proteínas con evidencia experimental de interacción con ERMP1 en *H. sapiens* ([Q7Z2K6](#)), incluidas ocho proteínas virales del SARS-CoV-2 y una del SARS-CoV (Figura 7). A pesar de esto, no se observó evidencia de interacción con las principales proteínas de la vía UPR, como IRE1, PERK, ATF6 y GRP78. Sin embargo, el análisis de la red reveló la presencia de proteínas que están relacionadas con la activación de la vía en el RE de manera no canónica, como TM9SF4 [102], IER3IP1 [103] y BSL2 [104] (Figura 7), aunque el mecanismo exacto aún no está claro.

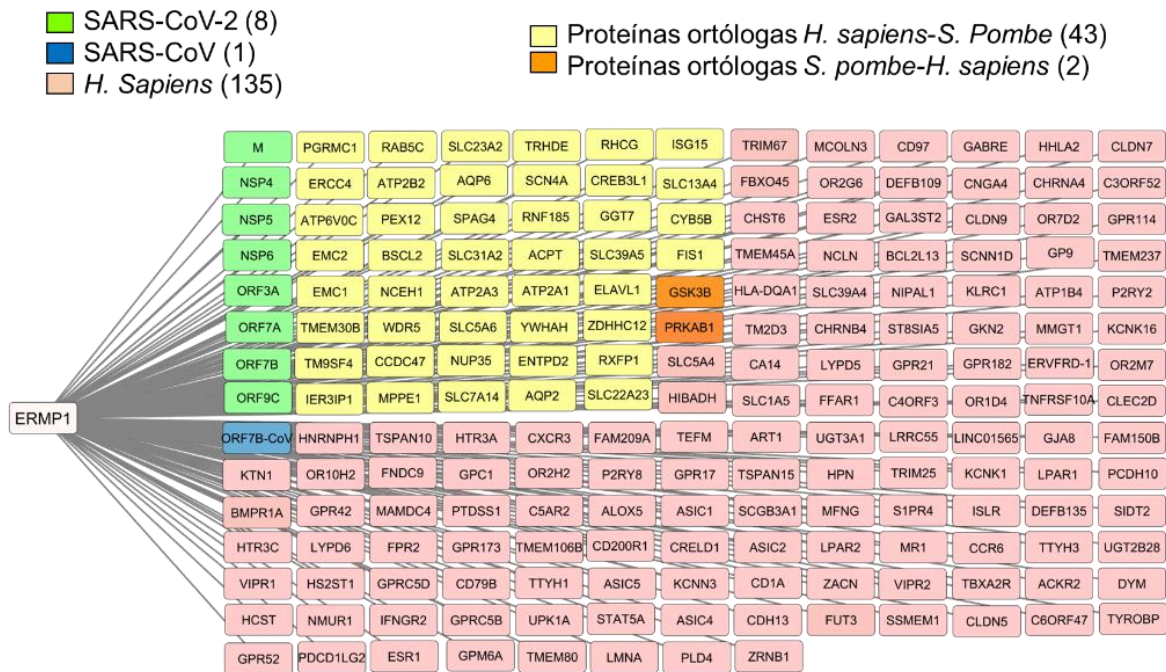


Figura 7. Red PPI de ERMP1 humana. Información obtenida de la base de datos BioGRID. La red fue editada en Cytoscape 3.10.

De acuerdo con el repositorio de BioGRID, actualmente no existe una red de PPI de Ermp1 en *S. pombe* ([O94702](#)), pero hay un registro de interacciones genéticas (GI)

positivas con los genes *amk2* y *gsk3*. Estas interacciones se reportaron en un estudio de matrices genéticas y sintéticas (SGA) de simples y dobles mutantes de la levadura de fisión, donde se identificaron genes relacionados con procesos dependiente de la vía de señalización TORC1 (Complejo de Rapamicina) [105].

Por lo tanto, se sugiere que Ermp1 interactúe físicamente con Amk2 y Gsk3, ya que puede haber una sinergia entre las interacciones genéticas y las interacciones proteína-proteína. Estas proteínas se incluyeron en la red PPI de Ermp1, y las proteínas ortólogas humanas, PRKAB1 y GSK3B, también fueron agregadas a la red de interacción de ERMP1 humana (Figura 7, resaltadas en naranja).

En DIOPT se identificaron 45 proteínas ortólogas humanas en *S. pombe* (Figura 7, resaltadas en amarillo y naranja). Estas proteínas se distribuyeron en una red de interacción de acuerdo con la puntuación asignada por DIOPT. Aquellas proteínas con puntuaciones superiores a 9 (Figura 8, resaltadas en verde) se consideraron verdaderos homólogos, debido a sus características topológicas y funcionales conservadas entre *S. pombe* y humanos.

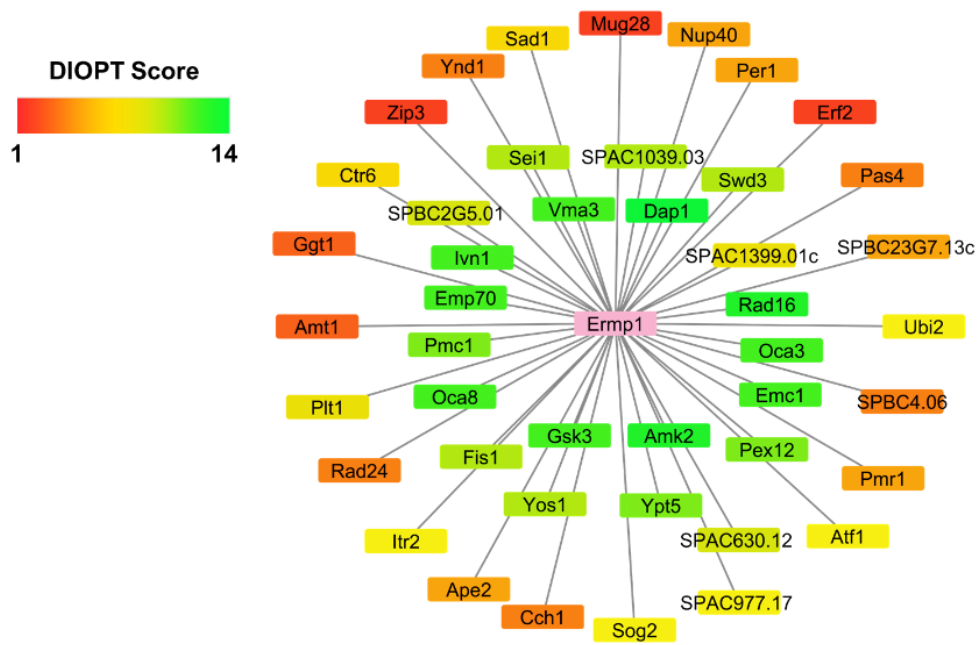


Figura 8. Predicción de red PPI para Ermp1 en *S. pombe*. La red fue editada en Cytoscape 3.10.

**Tabla 8.** Comparación de proteínas ortólogas que interactúan con ERMP1/Ermp1 en humano y *S. pombe*. Categorías GO: componente celular y proceso biológico. Score DIOPT, porcentajes de similitud e identidad. Las proteínas resaltadas en gris se usaron en el análisis de propensión proteolítica y docking molecular.

Proteína humana	Componente celular GO	Proceso biológico GO	Ortólogos <i>S. pombe</i>	Componente celular GO	Proceso biológico GO	Score DIOPT	% similitud	% identidad
PGRMC1	RE, Mitochondria	Síntesis del grupo hemo	SPAC25B8.01 (Dap1)	RE	Metabolismo de lípidos	14	61	44
ERCC4	Núcleo	Reparación de ADN	SPCC970.01 (Rad16)	Núcleo	Reparación de ADN	13	54	32
PRKAB1	Citosol, Núcleo	Transducción de señales	SPCC1919.03c (Amk2)	Citosol, Núcleo	Adhesión celular, señalización	13	55	38
EMC2	RE	Inserción de proteínas en la membrana del RE	SPBC15C4.01c (Oca3)	RE	Inserción de proteínas en la membrana del RE	12	47	28
ATP6V0C	Membrana plasmática	Transporte transmembranal de protones	SPAC1B3.14 (Vma3)	RE, Vacuola	Transporte transmembranal de portones	12	89	76
GSK3B	Citosol, Núcleo	Transducción de señales	SPAC1687.15 (Gsk3)	Citosol, Núcleo	Señalización	12	40	22
EMC1	RE	Inserción de proteínas en la membrana del RE	SPAC25H1.07 (Emc1)	RE	Inserción de proteínas en la membrana del RE	12	54	34
TM9SF4	Golgi, Endosomas	Colocación de proteínas en la membrana	SPBC1105.08 (Emp70)	Golgi, Endosomas	Localización de proteínas hacia la membrana celular	12	47	36
TMEM30B	Membrana plasmática	Transporte de lípidos	SPBC11B10.07c (Ivn1)	RE	Organización de membrana celular, traslocación de complejos de ATPasas	12	76	62
CYB5B	RE, Mitochondria	Transportes de electrones	SPCC16A11.10c (Oca8)	RE	Metabolismo de lípidos, transporte de electrones	12	61	38

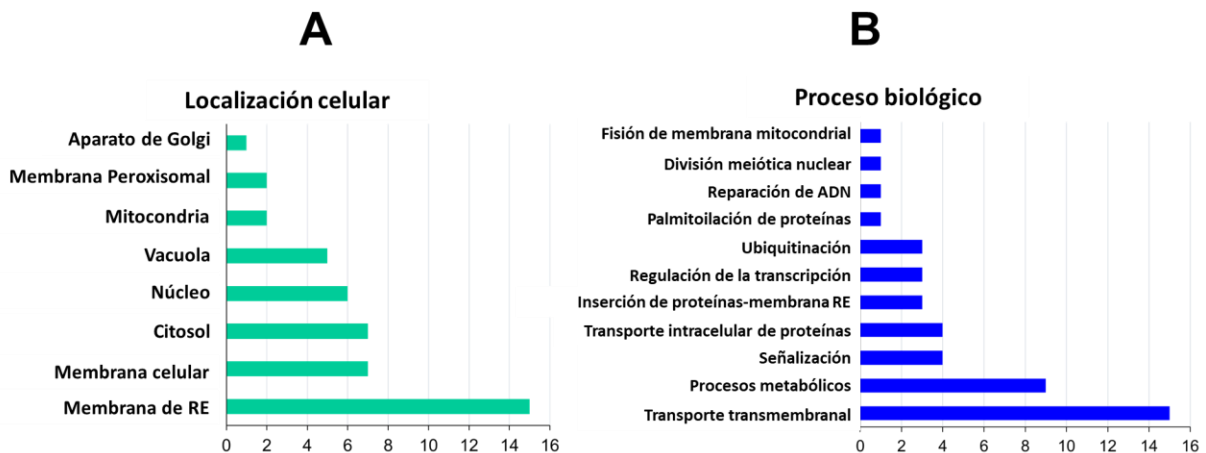
PEX12	Peroxisoma	Organización del peroxisoma, actividad de transferasa en la ubiquitinación de proteínas	SPAPB17E12.03 (Pex12)	Peroxisoma	Organización del peroxisoma, ubiquitinación de proteínas	11	40	21
RAB5C	Endosomas	Transporte intracelular de proteínas	SPAC6F6.15 (Ypt5)	Citosol, Endosomas	Transporte intracelular de proteínas	11	78	68
ATP2B2	Membrana plasmática	Transporte de calcio	SPAPB2B4.04c (Pmc1)	Vacuola	Transporte de calcio	11	49	34
IRE3IP1	RE	Mediación de transporte vesicular de RE al Golgi	SPAC19A8.09 (Yos1)	RE, Golgi	Regulación del transporte vesicular RE a Golgi	10	67	45
WDR5	Núcleo	Regulación de transcripción, conformación de histonas	SPBC354.03 (Swd3)	Núcleo, Citosol	Regulación de transcripción, unión de histonas	10	45	27
BACL2	RE	Formación de esferas lipídicas, metabolismo de lípidos	SPAC3A11.04 (Sei1)	RE	Formación de esferas lipídicas, metabolismo de lípidos	10	34	24
NCEH1	Membrana plasmática, RE	Catabolismo de lípidos	SPAC1039.03	Citosol, Núcleo	Catabolismo de lípidos	10	58	38
FIS1	Mitocondria	Fisión de la membrana mitocondrial	SPBC11G11.01 (Fis1)	Mitocondria	Fisión de la membrana mitocondrial	10	62	29
MPPE1	Golgi, RE	Transporte RE a Golgi, biosíntesis del ancla GPI	SPAC630.12	RE	Síntesis del ancla GPI	9	40	23
CCDC47	RE	Inserción de proteínas en la membrana del RE, chaperonas	SPBC2G5.01	RE	Inserción de proteínas en la membrana del RE, chaperona	9	41	22
SLC23A2	Membrana plasmática	Transporte transmembranal	SPAC1399.01c	Vacuola, Membrana plasmática	Transporte transmembranal de nucleótidos	8	39	21
SLC13A4	Membrana plasmática	Transporte transmembranal	SPBC3B8.04c (Plt1)	RE, Membrana plasmática	Transporte transmembranal de fosfatos	8	37	21

SLC31A2	Membrana plasmática	Trasporte transmembranal	SPBC23G7.16 (Ctr6)	Vacuola, Membrana plasmática	Transporte transmembranal de cobre	7	45	25
SPAG4	Núcleo	Diferenciación celular	SPBC12D12.01 (Sad1)	Núcleo	División nuclear	7	48	28
SLC5A6	Membrana plasmática	Transporte transmembranal	SPBC23G7.13c	Membrana plasmática	Transporte transmembranal de urea	5	41	19
SLC7A14	Membrana plasmática, Lisosoma	Transporte de aminoácidos	SPAP7G5.06 (PRE1)	Golgi, Membrana plasmática	Transporte transmembranal de aminoácidos	5	36	21
ATP2A1	RE	Transporte transmembranal de calcio	SPBC31E1.02c (Pmr1)	RE, Golgi, Membrana plasmática	Transporte transmembranal de calcio	5	51	35
NUP35	Núcleo	Transporte núcleo a citoplasma	SPAC19E9.01c (Nup40)	Núcleo	Transporte núcleo a citoplasma, exportación de ARNr	5	38	24
TRHDE	Membrana plasmática	Catabolismo de péptidos	SPBC1921.05 (ape2)	Vacuola, Citosol	Catabolismo de péptidos	5	49	28
ATP2A3	RE	Transporte transmembranal de calcio	SPBC31E1.02c (Pmr1)	RE, Golgi, Membrana plasmática	Transporte transmembranal de calcio	5	51	34
YWHAH	Citosol	Transducción de señales	SPAC8E11.02c (Rad24)	Citosol, Núcleo	Señalización de mitosis	4	78	62
SCN4A	Membrana plasmática	Transporte transmembranal de sodio	SPAC6F6.01 (Cch1)	Membrana plasmática	Importación de calcio al citosol	4	38	21
ENTPD2	Membrana plasmática, RE	Catabolismo de nucleósidos difosfatados	SPCC11E10.05c (Ynd1)	RE, Golgi, Membrana plasmática	Metabolismo de nucleótidos	4	40	26
RNF185	RE, Mitochondria	Catabolismo de proteínas dependiente de ubiquitinación	SPBC17A3.10 (Pas4)	Peroxisoma, RE	Ubiquitinación	4	48	31
ACPT	Membrana plasmática	Actividad de fosfatasa acida	SPBC4.06	Mitochondria	Metabolismo de lípidos, metabolismo de fosfolípidos	4	33	23
GGT7	Membrana plasmática	Síntesis de glutatión	SPAC664.09 (Ggt1)	Vacuola, RE	Catabolismo de glutatión	3	46	27

AQP2	Golgi, Membrana plasmática	Transporte de agua	SPAC977.17	Membrana plasmática	Transporte de agua	3	42	30
RHCG	Membrana plasmática	Transporte de amonio	SPCPB1C11.01 (Amt1)	Golgi, Membrana plasmática	Transporte transmembranal de amonio	3	37	22
SLC39A5	Membrana plasmática	Transporte transmembranal de Zinc	SPAP8A3.03 (Zip3)	RE	Transporte transmembranal de zinc	2	48	28
ELAVL1	Núcleo	Estabilización del ARNm vía 3'-UTR	SPAC343.07 (Mug28)	Núcleo	Unión a ARN	2	39	22
ZDHHC12	RE, Golgi	Adición de ácido palmítico a proteínas	SPBC3H7.09 (Erf2)	RE, Golgi	Adición de ácido palmítico a proteínas	2	41	26
AQP6	Membrana plasmática	Transporte de agua	SPAC977.17	Membrana plasmática	Transporte de agua	1	42	27
ISG15	Citosol	Ubiquitinación	SPAC1805.12c (Ubi2)	Citosol, Núcleo	Ubiquitinación	1	57	37
CREB3L1	Núcleo, RE	Regulación de transcripción por la ARN polimerasa II	SPBC29B5.01 (Atf1)	Núcleo	Regulación de la transcripción	1	32	20
RXFP1	Membrana plasmática	Regulación de vías de señalización hormonales, organización de la matriz extracelular	SPBC887.09c (Sog2)	Citosol, Núcleo	Polarización de las células	1	40	26
SLC22A23	Membrana plasmática	Transporte transmembranal	SPAC20G8.03 (Itr2)	Membrana plasmática, RE	Transporte transmembranal de inositol	1	38	21

Las proteínas se clasificaron en categorías GO de acuerdo con Gene Ontology: componente celular y proceso biológico (Tabla 8).

Se identificaron 29 proteínas ubicadas abundantemente en la membrana del RE, la membrana celular y el citosol, mientras que las proteínas restantes se clasificaron en otros compartimentos celulares como núcleo, vacuola, mitocondria, peroxisoma y aparato de Golgi (Tabla 8, Figura 9-A). En cuanto a la clasificación de los procesos biológicos, 15 proteínas se asociaron con el transporte transmembranal (Figura 9-B). La función principal de estas proteínas es transportar iones, incluidos,  $\text{Ca}^{+2}$ ,  $\text{Cu}^{+2}$ ,  $\text{Zn}^{+2}$  y  $\text{H}^{+}$ . Se pueden encontrar los detalles adicionales en la Tabla 8.



**Figura 9.** Agrupación de proteínas que interactúan con Ermp1 en *S. pombe*. (A) Localización celular y (B) anotación del proceso biológico en categorías GO.

Por otro lado, se identificaron 9 proteínas asociadas con el metabolismo de lípidos y péptidos (Figura 9-B). Como se señaló anteriormente, el RE desempeña un papel crucial en diversos procesos celulares, como la síntesis de proteínas, el almacenamiento de  $\text{Ca}^{+2}$ , la desintoxicación de compuestos químicos, la síntesis de lípidos y el ensamblaje de membranas lipídicas [8]. Además, se identificaron proteínas relacionadas con el transporte de proteínas, la regulación transcripcional, ubiquitinación la palmitoilación, todas ellas implicadas en mecanismos de procesamiento de proteínas.

## 8.2. Comparación del dominio M28 de Ermp1 entre humanos y *S. pombe*

Dado que las Fxna peptidasas como Ermp1 aún no han sido clasificadas a una subfamilia en MEROPS debido a su estado putativo, no existen referencias sobre su caracterización estructural o enzimática.

Por consiguiente, este estudio llevó a cabo un análisis de secuencias comparativas entre el dominio M28 de ERMP1 humano y su homólogo en *S. pombe*, con el fin de determinar su grado de similitud. Ambas proteínas comparten un 37% de identidad y conservan los residuos del centro activo: His, Asp y Glu, que se unen al Zn<sup>+2</sup> (Figura 10, resaltados en naranja). También se identificaron otros residuos Glu y Tyr que desempeñarían papeles importantes en el proceso catalítico (Figura 10, resaltados en morado y magenta respectivamente).



Figura 10. Alineamiento de secuencias del dominio M28 de Ermp1 en humanos y *S. pombe*.

De acuerdo con la evidencia experimental proporcionada por PhosphoSitePlus [106], está demostrado que el residuo Ser326 de ERMP1 humana es susceptible a la fosforilación [107]. Dada esta información, decidimos investigar si Ermp1 de *S. pombe*

también podría conservar este sitio. Como se muestra en la Figura 10, se identificó el alineamiento de Ser326 con Ser279 de Ermp1 de *S. pombe*, cuyo sitio se encuentra dentro de una secuencia consenso conservada (Figura 10, resaltado en cian y gris, respectivamente). Las secuencias de ambas metaloproteasas también fueron analizadas en NetPhos 3.1, y se observó que los sitios de fosforilación que predijo el programa coincidieron con las referencias y el alineamiento de secuencias.

Además, en NetPhos 3.1 se predijeron otros sitios de fosforilación que coincidieron en el alineamiento de secuencias, correspondientes a Ser212 de ERMP1 humana y Ser168 de Ermp1 de *S. pombe* (Figura 10, resaltada en gris y cian respectivamente).

En la red PPI de Ermp1, se identificó a Ubi2, una ubiquitina-ligasa (Figura 8 y Tabla 8). Por lo tanto, se realizó la búsqueda de secuencias consenso de ubiquitinación para Ermp1. Vale la pena señalar que, según la referencia experimental en PhosphoSitePlus, el residuo Lys356 de ERMP1 humano se puede ubiquitinar [108,109]. Además, en el análisis de las secuencias, se observó el alineamiento de Lys356 con Lys309 de Ermp1 de *S. pombe* (Figura 10, resaltada en verde). Es posible que Ubi2 participe en la degradación proteasómica de Ermp1, tal como lo sugieren las predicciones.

### 8.3. Modelado 3D del dominio M28 de Ermp1 de *S. pombe*

Ermp1 conserva el dominio M28 de las metaloproteasas dependientes de  $Zn^{+2}$  en su región N-terminal citosólica. Para continuar con el análisis funcional de Ermp1 fue necesario obtener una estructura tridimensional de la proteína. Desafortunadamente, no existen estructuras cristalográficas de Fxna peptidasas en el Protein Data Bank. Por lo tanto, optamos por el modelado *in silico*.

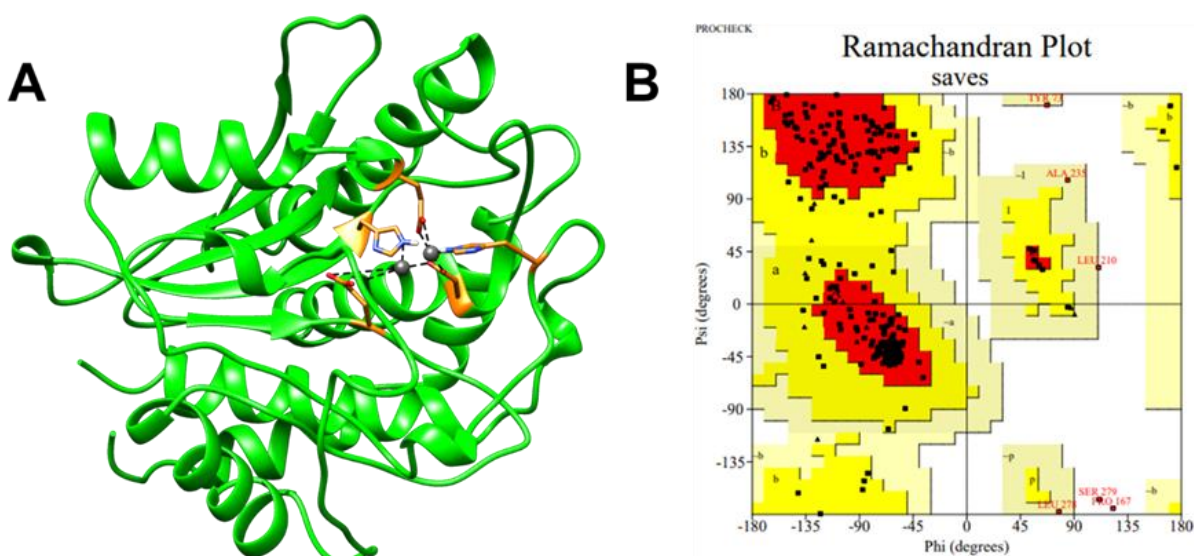
La inteligencia artificial AlphaFold ha sido ampliamente reconocida por su capacidad para predecir con precisión estructuras 3D completas utilizando un sistema de redes neuronales de aprendizaje profundo [110]. Sin embargo, se observó que el

modelo 3D de Ermp1 ([O94702](#)) obtenido de la base de datos AlphaFold no era el adecuado para analizar el dominio M28 debido a su conformación estructural, ya que impediría la interacción del centro activo de la enzima con otras proteínas.

Por otro lado, debido a la escasez de plantillas que exhibieran altos porcentajes de homología, una cobertura de modelado adecuada y métricas de validación esenciales para la generación de un modelo tridimensional del dominio M28 de Ermp1 de *S. pombe*, las plantillas disponibles fueron evaluadas minuciosamente. En el proceso de selección se dio prioridad a las plantillas que pudieran generar parámetros de validación cercanos a los valores ideales en PDBe-Fold y PROCHECK. En consecuencia, la aminopeptidasa Ap1 de *V. proteolyticus* (PDB ID: 1RTQ) se determinó como la plantilla óptima para el modelado por homología en Phyre2.

La secuencia modelada abarcó las posiciones 39-339 del dominio M28 de Ermp1, con un porcentaje de identidad del 20% respecto a la plantilla y se obtuvo un modelo con un Q-score de 0,76 y un RMSD de 0,72 Å. Estos parámetros se relacionan con el porcentaje de residuos alineados y la calidad del alineamiento de las estructuras secundarias con respecto a la plantilla.

La Figura 11-A muestra la estructura 3D del dominio M28 de Ermp1. La estructura se caracteriza de láminas  $\beta$  rodeadas por hélices  $\alpha$ , donde el centro activo se ubica en un conjunto de asas (Figura 11-A, representado por los residuos de unión de  $Zn^{+2}$ , resaltados en naranja). Esta topología es similar a la aminopeptidasa Y de *S. cerevisiae*, la aminopetidasa S de *Streptomyces griseus*, la aminopeptidasa IAP de *E. coli* y la aminopeptidasa Ap1 de *Vibrio proteolyticus* [111–113].

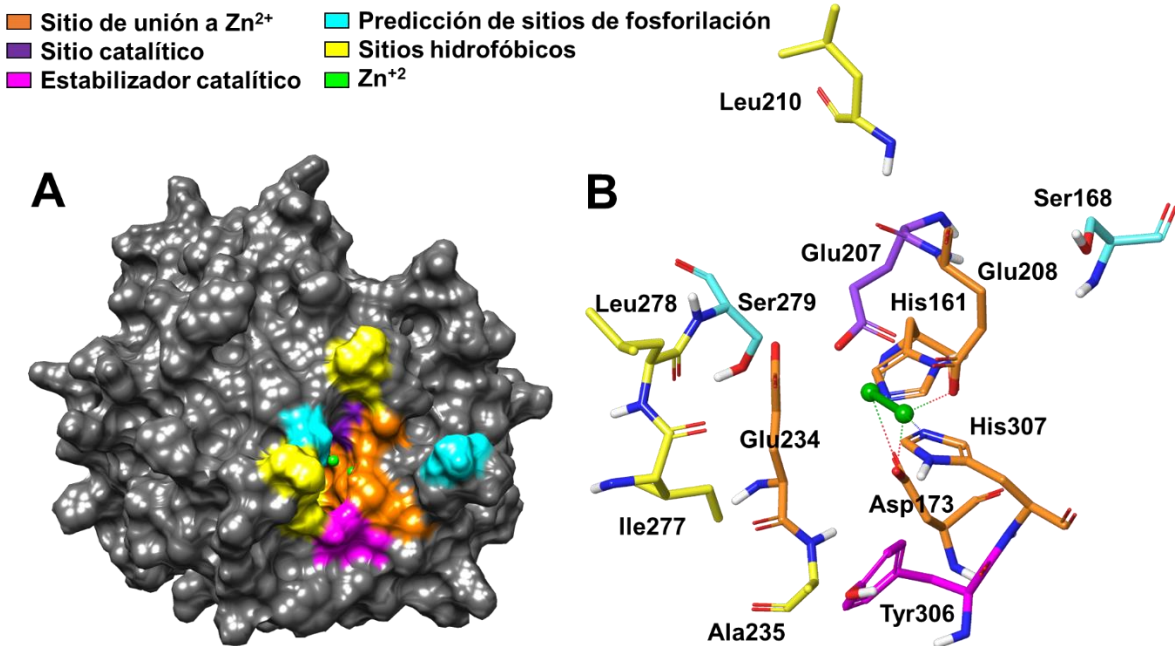


**Figura 11.** Estructura 3D del dominio M28 de Ermp1 de *S. pombe*. (A) Modelado por homología en Phyre2. El sitio de unión  $Zn^{+2}$  se muestra en naranja. (B) Validación del modelo en PROCHECK-SAVES v6.0. El gráfico de Ramachandran muestra que el 85,4 % de los residuos se encuentran en las regiones más favorecidas. Edición del modelo en UCSF Chimera 1.17.1.

De acuerdo con la bibliografía, para validar la estructura tridimensional de las proteínas, se recomienda que más del 85-90 % de los residuos se encuentren en las regiones favorecidas de cada estructura secundaria modelada (láminas  $\beta$ , hélices  $\alpha$  y bucles) en un gráfico de Ramachandran [114]. El modelo del dominio M28 de Ermp1 obtenido en Phyre2 representa el 85,4% de los residuos en las regiones favorecidas en el gráfico de Ramachandran (Figura 11-B). Por lo tanto, el modelo fue considerado adecuado para los propósitos de este estudio.

La Figura 12-A muestra la representación de superficie del dominio M28 de Ermp1, destacando su conformación globular y la exposición del centro activo, el cual sería crucial para la interacción con proteínas y péptidos diana. La cavidad catalítica está conformada por los residuos de unión de  $Zn^{+2}$ , incluidos His161, Asp173, Glu208, Glu234 e His307, así como los residuos responsables del proceso catalítico Glu207 y

Tyr306 (Figura 12-A residuos resaltados en naranja, morado y magenta respectivamente).



**Figura 12.** Representación de la cavidad catalítica del dominio M28 de Ermp1 de *S. pombe*. (A) Modelo de superficie y (B) residuos que comprenden la cavidad catalítica. Edición del modelo en Maestro 13.0.

Como se puede observar en la Figura 12-A, la cavidad catalítica se restringe al acceso de pequeños péptidos y estructuras secundarias flexibles, como las asas de las proteínas. En la Figura 12-B se muestran los aminoácidos que se identificaron en la cavidad catalítica. Tomando de referencia a la metaloproteasa Ap1 de *V. proteolyticus* [115], los residuos Asp173, Glu208 e His307 forman enlaces de coordinación con un ion Zn<sup>2+</sup> para la activación de una molécula de H<sub>2</sub>O a OH<sup>-</sup>. Además, se sugiere que Glu207 desempeña un papel crucial en la aceptación del protón, un mecanismo necesario para aumentar la polaridad del ataque nucleofílico del Zn<sup>2+</sup> sobre el enlace peptídico del sustrato. Es importante señalar que estos hallazgos estarían sujetos a una mayor investigación e interpretación.

El ion  $Zn^{+2}$  adicional se coordinaría con His161, Asp173 y Glu234, posiblemente para reducir el pKa de la molécula de  $H_2O$ , promoviendo una mayor especificidad y estabilización de la reacción catalítica [111]. El residuo Tyr306 (Figuras 12-A y 12-B, resaltado en magenta) desempeñaría un papel en la estabilización del estado de transición del intermediario del sustrato en el paso final de la catálisis. Los aminoácidos hidrofóbicos correspondientes a los residuos Leu210, Ala235, Ile277 y Leu278 (Figuras 12-A y 12-B, resaltados en amarillo) podrían desempeñar un papel crucial en el mantenimiento de la conformación estructural de la cavidad catalítica. Además, como se muestra en las Figuras 12-A y 12-B, los sitios potenciales de fosforilación que se predijeron anteriormente se localizan cerca del centro activo de Ermp1 (resaltados en azul cian), específicamente Ser168 y Ser279. Por lo que, no se descartaría la posibilidad de que la actividad proteolítica de Ermp1 sea regulada por algún tipo de cinasa.

#### **8.4. Validación de herramientas computacionales para la predicción de interacciones metaloenzima-proteína diana**

En ausencia de referencias metodológicas para investigar las interacciones proteína-proteína que involucran metaloproteasas de  $Zn^{+2}$  y proteínas diana, realizamos un estudio previo enfocado en la predicción de secuencias consenso con susceptibilidad proteolítica de metaloproteasas y sustratos conocidos. De acuerdo con la bibliografía, la Metaloproteinasa 8 (MMP8) exhibe una preferencia proteolítica por el residuo P1'-Leu721 de la Fibronectina-1 humana [116]. Por otro lado, la Metaloproteinasa 12 (MMP12) tiene preferencia por la escisión del Factor XII en los residuos Leu377 y Leu380 [117]. En consecuencia, se empleó el servidor web PROSPER para la predicción de sitios de escisión por el grupo de metaloproteasas. En la Tabla 9 se muestran los resultados de las predicciones realizadas en el programa. Efectivamente, se identificó en la secuencia de Fibronectina-1 el sitio de escisión Leu721 en la secuencia PFSPLVAT con

una puntuación de 0,98 para MMP9. Mientras que en la secuencia del Factor XII se identificó el sitio escindible Leu377 en la secuencia VVGGLVAL con puntuaciones de 1,06 para MMP2 y MMP9, y 0,97 para MMP3. Aunque, el programa no identificó a Leu380 como sitio de escisión del Factor XII, este residuo se localizó dentro de la secuencia consenso de Leu 377.

**Tabla 9.** Predicción de sitios de escisión de Fibronectina-1 y Factor XII humanas por el grupo de metaloproteasas en PROSPER.

Proteína ligando	UniProt ID	Predicción MMP <sup>1</sup>	Sitio de escisión	Secuencia escindible	Score
Fibronectina-1 humana	<a href="#">P02751</a>	MMP9	720-721	PFSP↓LVAT	0.98
Factor XII humana	<a href="#">P00748</a>	MMP2	376-377	VVG↓GGLVAL	1.06
		MMP3			0.97
		MMP9			1.06

<sup>1</sup> Metaloproteinasas.

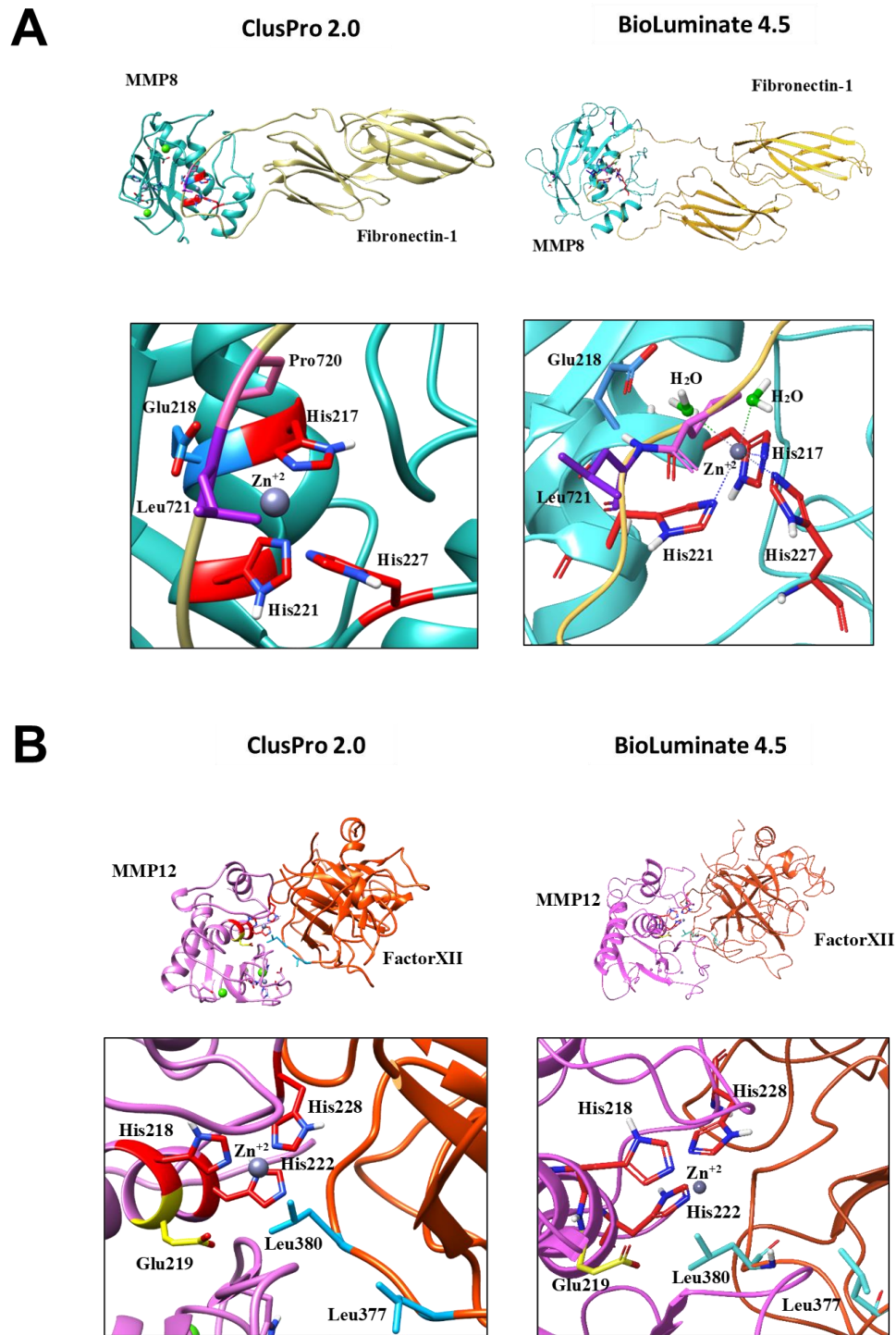
↓ Sitio de escisión.

Una vez evaluada la capacidad predictiva de PROSPER, se realizó un *docking* rígido y ciego de las proteínas. Afortunadamente, se dispone de estructuras cristalográficas en el Protein Data Bank tanto de las MMPs (MMP8, PDB ID: 2OY2; MMP12, PDB ID: 3EHX) como de sus respectivos ligandos (Fibronectina 1, PDB ID: 2HA1; Factor XII, PDB ID: 6GT6). El *docking* se realizó en ClusPro 2.0, BioLuminate 4.5 y PathDock para evaluar su capacidad predictiva de complejos de interacción metaloenzima-proteína diana. En la Tabla 10 se muestran los resultados de predicción de ambos programas, el ranking y la puntuación de energía de interacción global.

**Tabla 10.** Resultados del docking proteína-proteína de MMP8-Fibronectina 1 y MMP12-Factor XII en ClusPro 2.0, BioLuminate 4.5. y PatchDock.

Programa	Docking MMP8-Fibronectina 1 (Leu 721)	Score Energía Global	Docking MMP12-Factor XII (Leu 380)	Score Energía Global
ClusPro 2.0	Positivo	-710.50	Positivo	-671.60
BioLuminate 4.5	Positivo	-732.27	Positivo	-668.06
PatchDock-FireDock	Negativo	---	Negativo	---

Con respecto a los resultados del *docking* proteína-proteína en PatchDock, cualquier predicción del TOP10 no se consideró favorecida porque no se identificó ninguna interacción entre el bolsillo catalítico de las MMPs y las secuencias escindibles de sus respectivos ligandos. Debido a que PatchDock utiliza un algoritmo de complementación geométrica para determinar la interacción entre dos proteínas, este programa no sería el adecuado en la predicción de complejos de interacción enzima-sustrato, ya que la tasa de éxito reportada es inferior al 25% [118]. No obstante, este porcentaje aumenta al 60% para la predicción de otro tipo de complejos de interacción [60,118]. La capacidad predictiva tanto de ClusPro como de BioLuminate fue similar, ya que los complejos obtenidos fueron coherentes con las interacciones entre la cavidad catalítica de las MMPs y los sitios escindibles de sus respectivas proteínas diana (Figuras 13 A-B).



**Figura 13.** Docking molecular de MMP8 y MMP12 con sus respectivas proteínas diana Fibronectina 1 y Factor XII de Coagulación en ClusPro y BioLuminate. (A) Interacción del bolsillo catalítico de MMP8 con el sitio de escisión de Leu721 de Fibronectina 1. (B) Interacción del bolsillo catalítico MMP12 con el sitio de escisión de Leu380 del Factor XII. Edición de los modelos en UCSF Chimera 1.17.1 y Maestro 13.0.

En el ranking del TOP10 de ambos programas, se logró una tasa de positividad de hasta el 50%. No obstante, es importante señalar que las puntuaciones de energía global calculadas por ClusPro y BioLuminate no pueden considerarse medidas de afinidad de unión, ya que se necesitarían de la aplicación de métodos de refinamiento para la minimización de energía. Por lo tanto, el ranking y el tamaño de los *clusters* podrían considerarse como criterios de selección inicial para reducir la cantidad de falsos positivos. Este estudio evidenció que las herramientas PROSPER, ClusPro y BioLuminate poseen una aceptable capacidad predictiva, dado que los resultados de interacción de las MMPs con sus respectivas proteínas diana coincidieron con las publicaciones experimentales previamente reportadas. Es importante destacar que este estudio fue publicado en julio de 2023 en la revista *Life in Silico* como uno de los productos derivados de este proyecto [119].

### **8.5. Identificación de secuencias consenso de escisión y generación de modelos 3D de proteínas diana de Ermp1**

Tomando en cuenta la validación realizada de los programas, se continuó con el análisis de propensión proteolítica de algunas de las proteínas de la red PPI de Ermp1 que se propone en *S. pombe*. Dado a que la cavidad catalítica del dominio M28 de Ermp1 es angosta, es probable que la interacción con proteínas diana sea en los motivos donde se ubican las asas, ya que estas estructuras tienen una mayor probabilidad de ser escindidas debido a su accesibilidad y flexibilidad [65].

La Tabla 11 muestra los resultados de predicción de propensión proteolítica de PROSPER realizadas para las proteínas Amk2, Ypt5, Pex12, Oca8, Fis1 y Pmc1. Cabe mencionar que estas proteínas fueron seleccionadas para el estudio debido a que fueron las primeras en ser identificadas en el análisis comparativo de interólogos humano-levadura realizado en 2020.

**Tabla 11.** Predicción de segmentos escindibles de posibles proteínas diana de Ermp1 en *S. pombe* realizada en PROSPER.

Proteína humana	UniProt ID	Ortólogo SCHPO <sup>1</sup>	UniProt ID	Predicción MMP <sup>2</sup>	Segmento escindible	Posición	Score <sup>3</sup>
PRKAB1	<a href="#">Q9Y478</a>	Amk2	<a href="#">P78789</a>	MMP9	RAQS↓MISI	Met40	1.16
RAB5C	<a href="#">P51148</a>	Ypt5	<a href="#">P36586</a>	MMP9	SLAP↓MYR	Met83	1.08
PEX12	<a href="#">O00623</a>	Pex12	<a href="#">Q8TFH8</a>	MMP9	FWRL↓MI	Met342	1.22
CYB5B	<a href="#">O43169</a>	Oca8	<a href="#">Q9USM6</a>	MMP9	GEEV↓LVDL	Leu45	0.98
FIS1	<a href="#">Q9Y3D6</a>	Fis1	<a href="#">Q9USZ8</a>	MMP9	EALK↓LKNR	Leu117	1.05
ATP2B2	<a href="#">Q01814</a>	Pmc1	<a href="#">Q9HDW7</a>	MMP9	TTMA↓MRTE	Met429	1.23

<sup>1</sup> *Schizosaccharomyces pombe*.

<sup>2</sup> Metaloproteínasa.

<sup>3</sup> Valores superiores a 0.8 aumentan la confianza de la predicción.

↓ Sitio de escisión.

En la Tabla 11 se observa que la predicción de los segmentos escindibles de cada una de las proteínas mostró puntuaciones superiores a 0.8 con la Matriz Metaloproteínasa 9 (MMP9), donde la mayoría de las escisiones proteolíticas se localizaron en el extremo N-terminal de los residuos de Met y Leu.

Para determinar la posible interacción entre el dominio M28 de Ermp1 y las secuencias consenso de escisión proteolítica, fue necesario modelar cada una de las proteínas para el análisis posterior de *docking* molecular. En la Tabla 12 se muestran las plantillas que se utilizaron para el modelado por homología en Phyre2 de las posibles proteínas diana de Ermp1, con la excepción de Amk2.

**Tabla 12.** Plantillas utilizadas para el modelado por homología en Phyre2 de proteínas diana. Parámetros de validación obtenidos de PDBeFold y PROCHECK-SAVES v6.0.

Proteína SCHPO <sup>1</sup>	Plantilla	Organismo	PDB ID	Porcentaje de identidad	Q-score <sup>2</sup>	RMSD <sup>3</sup> (Å)	Ramachandran Plot <sup>4</sup>
Ypt5	Rab11	<i>H. sapiens</i>	2D7C [120]	43 %	0.95	0.33	87.1 %
Pex12	Ring 3 ligase	<i>S. cerevisiae</i>	4R7E [121]	28 %	0.71	0.71	85.1 %
Oca8	Cytochrome b5	<i>B. taurus</i>	1M2I [122]	50 %	1.00	0.00	90.3 %
Fis1	Fis1	<i>H. sapiens</i>	1NZN [123]	25 %	0.90	0.49	90.0 %
Pmc1	SERCA2b	<i>H. sapiens</i>	6LLE [124]	28 %	0.80	0.47	87.5 %

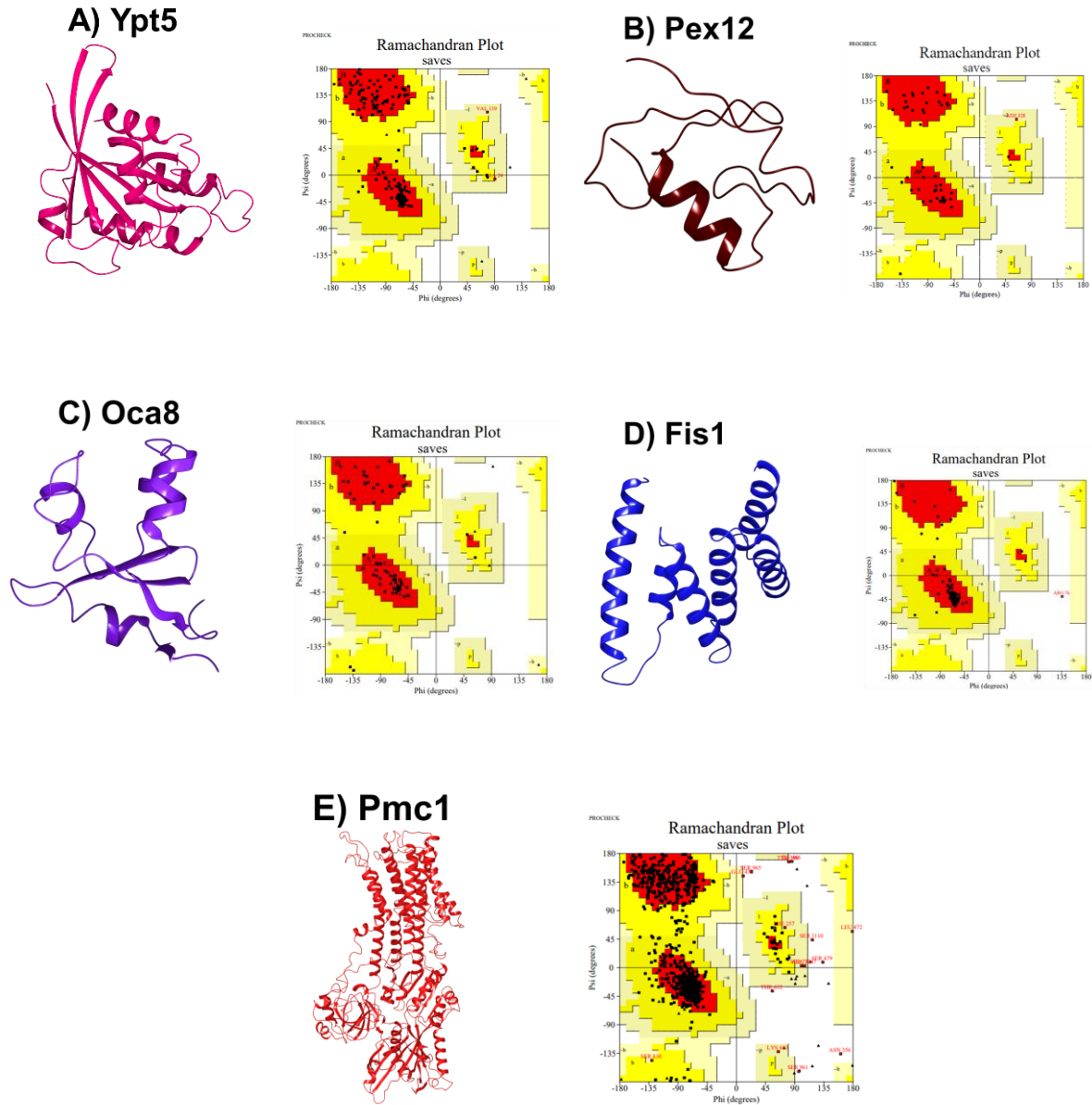
<sup>1</sup> *Schizosaccharomyces pombe*.

<sup>2</sup> Q-score: calidad del alineamiento, la puntuación más alta = 1.

<sup>3</sup> RMSD: cuanto menor sea el RMSD, mejor será el modelo en comparación con la plantilla.

<sup>4</sup> Ramachandran Plot: se esperaría que un modelo de buena calidad tenga más del 85-90% de los residuos en las regiones más favorecidas del gráfico.

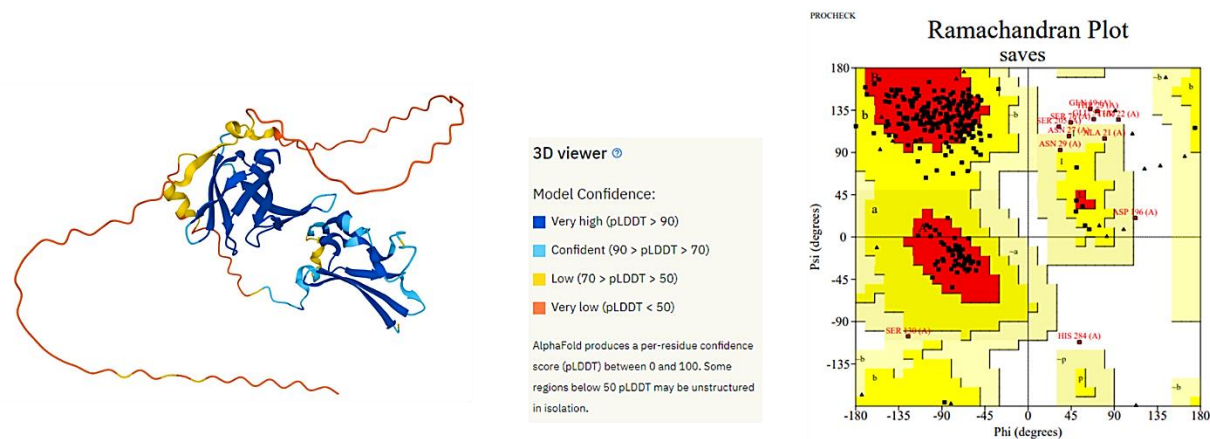
La selección de las plantillas se realizó en función del criterio de Phyre2 para calcular el porcentaje de confiabilidad del modelado. El porcentaje de confiabilidad calculado por Phyre2 considera la homología de secuencias entre la plantilla y la proteína a ser modelada, por lo tanto, este porcentaje es distinto de la calidad del modelo. Es importante destacar que la disponibilidad limitada de plantillas para modelar proteínas de *S. pombe* con altos porcentajes de homología comprometió la calidad de los modelos de las proteínas diana. Sin embargo, los valores de los parámetros de validación se aproximaron a los ideales. Además, en los diagramas de Ramachandran, más del 85% de los residuos modelados de cada proteína se encontraron en las regiones favorecidas para cada estructura secundaria (Figura 14).



**Figura 14.** Estructuras 3D de posibles proteínas diana de Ermp1 de *S. pombe*. (A-E) Representación de los modelos y diagramas de Ramachandran. Modelado por homología en Phyre2 y validación de los modelos en PROCHECK-SAVES v6.0. Edición de los modelos en UCSF Chimera 1.17.1.

En el caso particular de Amk2, el modelo 3D se obtuvo de AlphaFold ([P78789](#)). Aunque existen estructuras cristalográficas de Amk2 de *S. pombe* depositadas en el Protein Data Bank (PDBs ID: 2OOX, 2OOY, 2QR1, 2QRC, 2QRD y 2QRE), cabe señalar que no tienen el segmento escindible de interés. Esto se debe a que la secuencia está

ubicada en una región intrínsecamente desordenada (IDR), la cual exhibe una transición estructural que varía entre el orden y el desorden. Este tipo de regiones no pueden ser resueltas mediante cristalografía [125,126]. Como resultado, el modelado por homología también se consideró inadecuado para incluir IDRs. A pesar de que el diagrama de Ramachandran del modelo de AlphaFold muestra el 81,1% de los residuos en las regiones más favorecidas, se puede atribuir que los residuos que se encuentran fuera son IDRs. Como estas regiones se consideran dinámicas, carecen de una estructura secundaria definida (Figura 15). Esto es consistente con la puntuación pLDDT < 50 calculada en AlphaFold para esa región, que, de acuerdo con el programa, correspondería a una región no estructurada o IDR. Por lo tanto, es importante destacar que AlphaFold se ha convertido en una valiosa herramienta bioinformática para la predicción y modelado de IDRs.



**Figura 15.** Predicción la estructura 3D de Amk2 de *S. pombe*. Modelo de AlphaFold y diagrama de Ramachandran donde se muestra que el 81.1 % de los residuos se encuentran en las regiones más favorecidas.

## 8.6. Docking proteína-proteína del dominio M28 de Ermp1 y candidatos proteolíticos

Para determinar si se favorece la interacción del dominio M28 DE Ermp1 con los segmentos escindibles de posibles proteínas diana que se predicen en PROSPER, se

realizó el *docking* proteína-proteína en los programas ClusPro 2.0 y BioLuminate. En la Tabla 13 se muestran los resultados de las predicciones que se favorecieron en el ranking TOP30 y el tamaño de los *clusters* correspondientes.

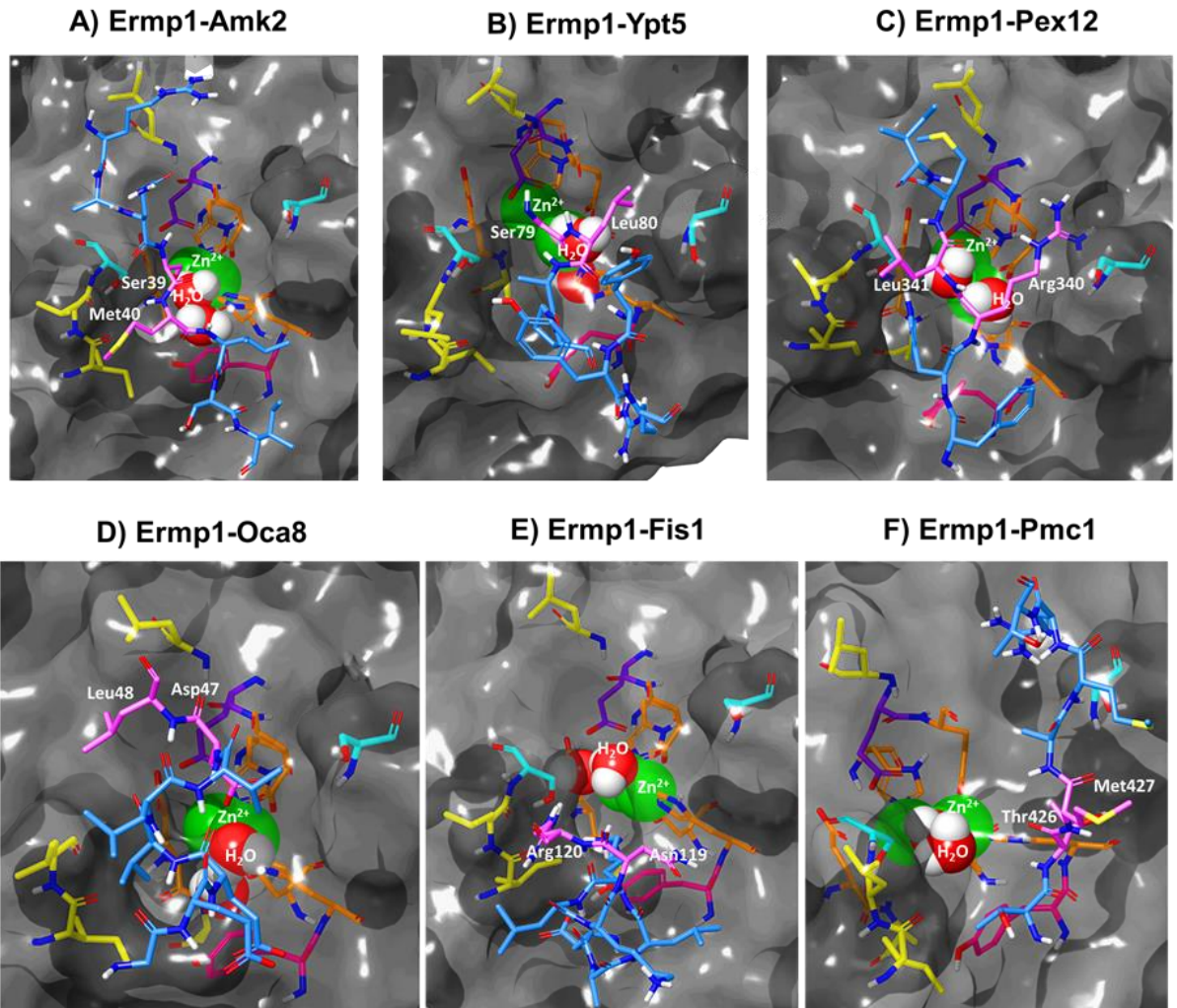
**Tabla 13.** Predicción de la interacción del dominio M28 con las secuencias consenso de escisión de posibles proteínas diana de *S. pombe*. Comparación de resultados del *docking* molecular en ClusPro y BioLuminate.

Ligando SCHPO <sup>1</sup>	Predicción Docking	Software Docking	Score de energía global PIPER	Tamaño del cluster
Amk2	RAQS↓MISI	ClusPro	-923.2	28
		BioLuminate	-951.3	57
Ypt5	S↓LAPMYR	ClusPro	-645.5	31
		BioLuminate	-638.4	28
Pex12	FWR↓LMI	ClusPro	-680.8	124
		BioLuminate	-667.4	78
Oca8	GEEVLVD↓L	ClusPro	-500.6	62
		BioLuminate	-542.6	54
Fis1	EALKLKN↓R	ClusPro	-607.1	92
		BioLuminate	-633.0	74
Pmc1	TT↓MAMRTE	ClusPro	-1137.7	35
		BioLuminate	-1212.5	20

<sup>1</sup> *Schizosaccharomyces pombe*.

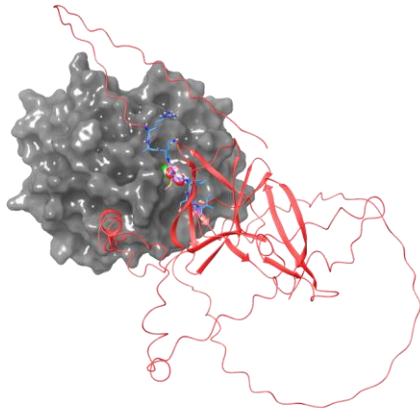
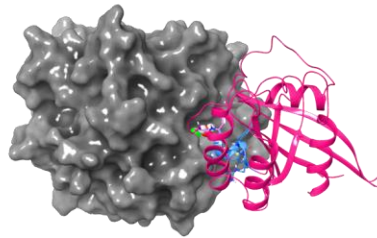
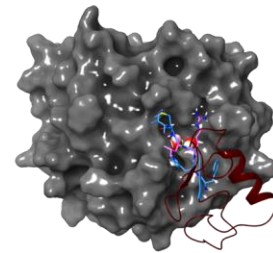
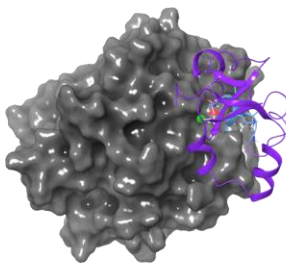
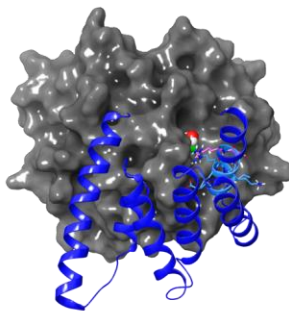
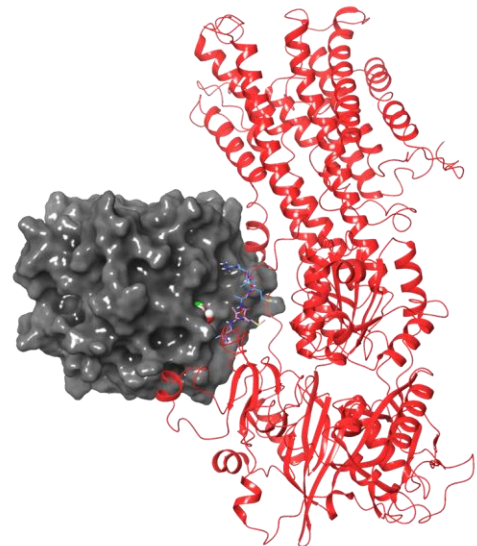
↓ Sitio de escisión.

Debido a que en ambos programas se obtuvieron modelos de interacción similares, los *scores* de energía global no fueron muy diferentes. Además, si bien los programas de *docking* mostraron desplazamientos en los sitios de escisión que predijo PROSPER de las proteínas diana (indicados por flechas rojas en la Tabla 13), cabe señalar que se favoreció la interacción del dominio M28 de Ermp1 con las secuencias de consenso escindibles (Figuras 16 A-F).



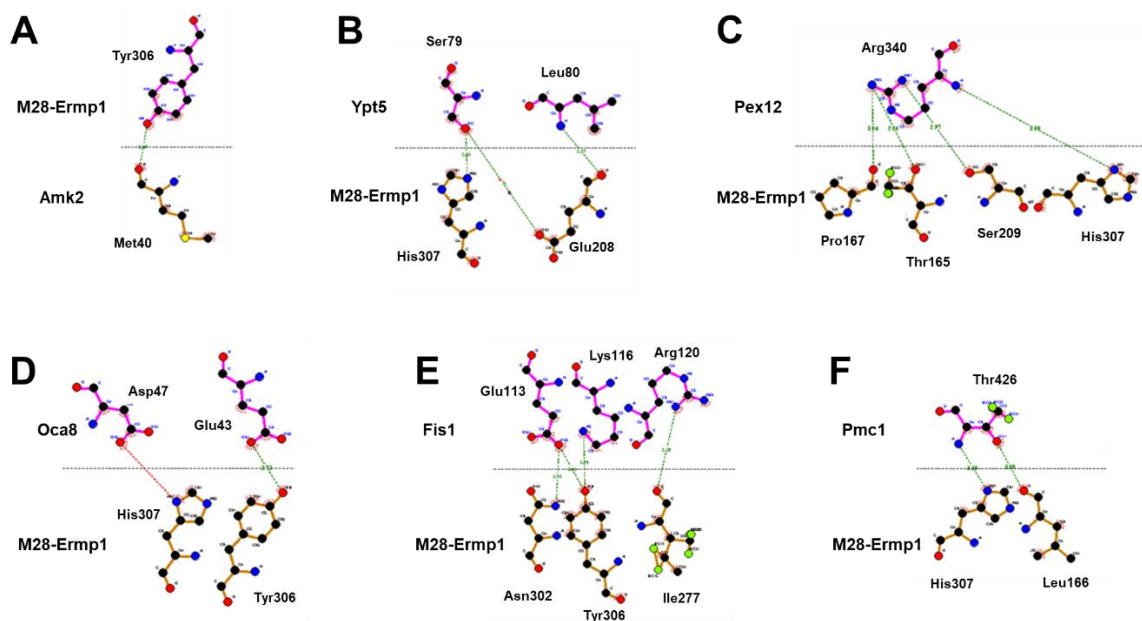
**Figura 16.** Docking molecular del dominio M28 de Ermp1 con posibles dianas proteicas en BioLuminate (A-F). Los sitios de unión para  $Zn^{2+}$  se resaltan en naranja, el sitio catalítico en violeta y el estabilizador catalítico en magenta. La predicción de los sitios de fosforilación se resalta en azul cian. Los residuos hidrofóbicos se resaltan en amarillo. Los segmentos escindibles de las dianas proteicas están representados en azul y los sitios de escisión se resaltan en rosa. Solvatación de los complejos en WaterMap. Edición en Maestro 13.0.

Las secuencias consenso escindibles fueron identificadas principalmente en las asas de las proteínas, con la excepción de Oca8 y Fis1, que se localizaron en proximidad de las cadenas cortas de las  $\alpha$  hélices (Figuras 17 A-F).

**A) Ermp1-Amk2****B) Ermp1-Ypt5****C) Ermp1-Pex12****D) Ermp1-Oca8****E) Ermp1-Fis1****F) Ermp1-Pmc1**

**Figura 17.** Representación del docking molecular del dominio M28 de Ermp1 con posibles dianas proteicas en BioLuminate (A-F). El segmento escindible de las dianas proteicas se muestra en azul y los residuos de escisión se muestran en rosa. Edición de los modelos en Maestro 13.0.

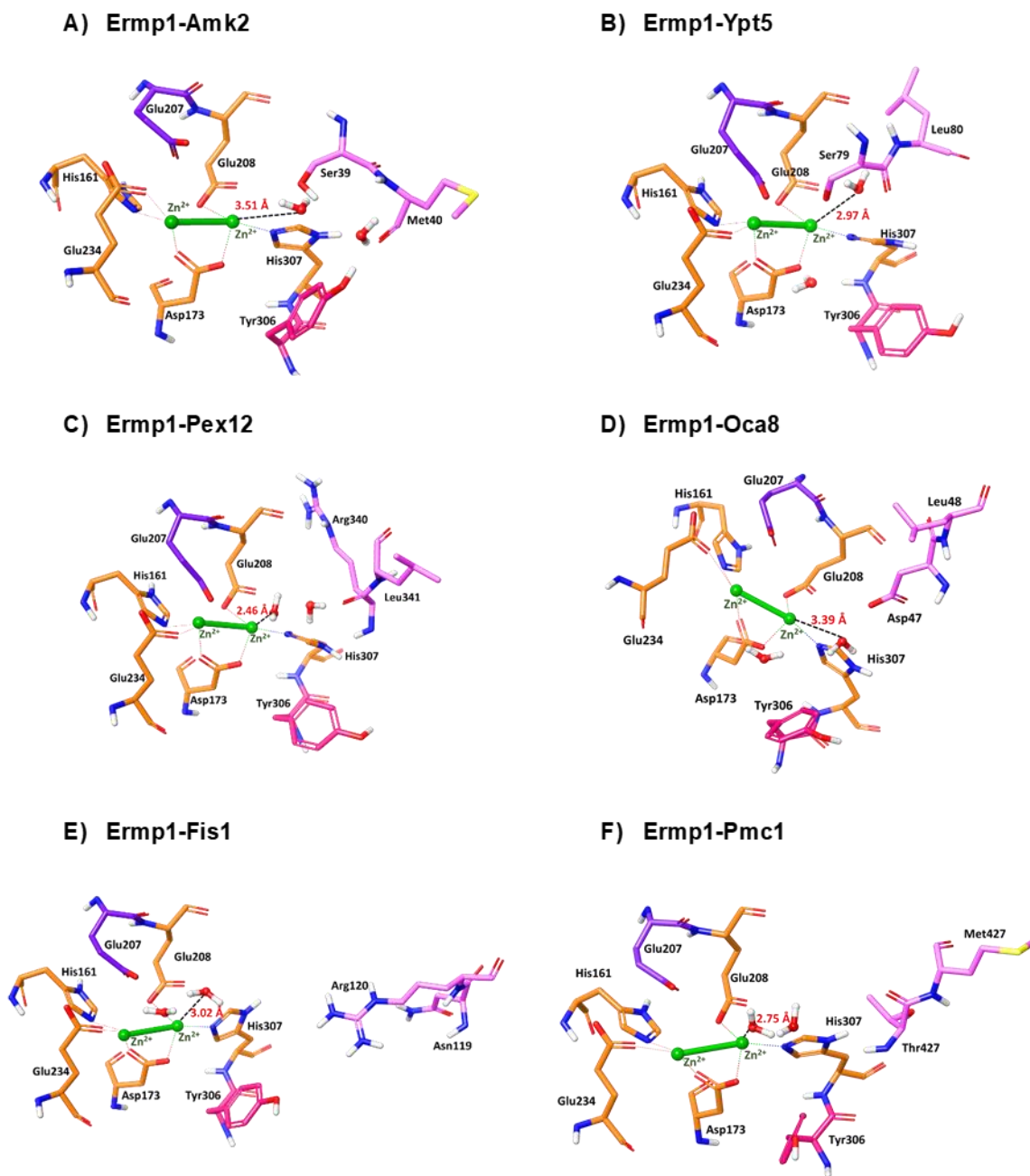
El análisis en DimPlot mostró que en el *docking* molecular se favoreció la interacción de algunos residuos de la cavidad catalítica de Ermp1 con residuos de las secuencias consenso de las proteínas mediante puentes de hidrógeno, principalmente Leu, Met y Arg (Figura 18).



**Figura 18.** Representación de Interacción 2D de DIMPLOT. Interacciones identificadas entre los residuos de la cavidad catalítica del dominio M28 de Ermp1 y los posibles residuos de escisión de las proteínas diana evaluadas (A-F). La línea discontinua horizontal representa la interfaz. La línea de puntos verde representa la longitud del enlace de hidrógeno.

De acuerdo con las predicciones, es posible que el dominio M28 de Ermp1 pudiera tener una preferencia de interacción con segmentos de proteínas que incluyen estos aminoácidos como la aminopeptidasa Ap1 de *V. proteolyticus*.

En el mecanismo de acción de las metaloproteasas se describe que es necesaria la interacción de una molécula de agua con el  $Zn^{+2}$  del centro activo. Por lo tanto, también se realizó una simulación de hidratación de los complejos de interacción en WaterMap (Figuras 16 A-F). De acuerdo con el mecanismo de hidratación e intercambio entre el agua y el  $Zn^{+2}$ , la distancia de enlace entre el  $Zn^{+2}$  y el oxígeno del  $H_2O$  debería oscilar entre 2,0 y 2,1 Å en la primera esfera de coordinación del metal, 3,6 Å en la segunda esfera, y longitudes entre 2,7 y 3,0 Å en los estados de transición entre ambas esferas [127].

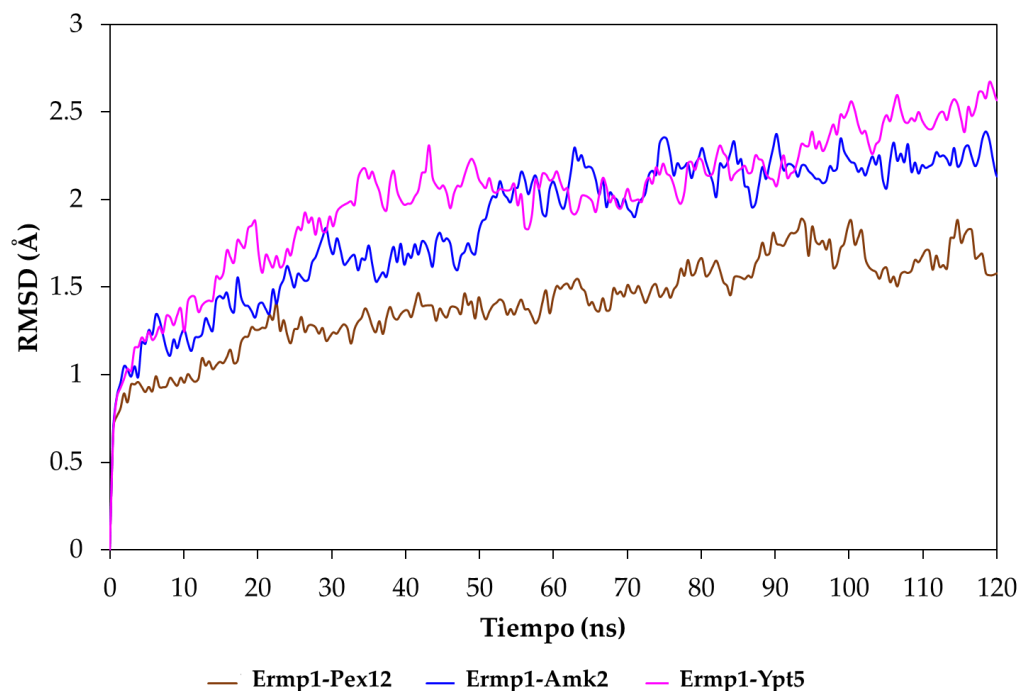


**Figura 19.** Representación de la solvatación de los complejos de interacción del dominio M28 de Ermp1 y dianas proteicas (A-F). Los sitios de unión de  $Zn^{2+}$  se muestran en naranja. El sitio catalítico se muestra en violeta. El estabilizador catalítico se muestra en magenta. Los sitios de escisión de las posibles dianas proteicas se muestran en rosa. Solvatación realizada en WaterMap. Edición de los modelos en Maestro 13.0.

En las simulaciones de WaterMap, se observó que la hidratación de los complejos se favoreció principalmente en la cavidad catalítica del dominio M28 de Ermp1, por lo que, las distancias entre el  $Zn^{+2}$  y el oxígeno del agua se midieron en cada uno de los complejos. En la Figura 19 se muestran las variaciones en la longitud de los enlaces Zn-O que oscilaron entre 2.46-3.51 Å, de tal manera que las interacciones se encontrarían entre la primera y segunda esfera de coordinación del  $Zn^{+2}$ . Estas predicciones coinciden con otros estudios de química computacional, donde el intercambio de ligandos y los mecanismos catalíticos se ven favorecidos en los estados de transición de ambas esferas de coordinación del  $Zn^{+2}$  [128,129].

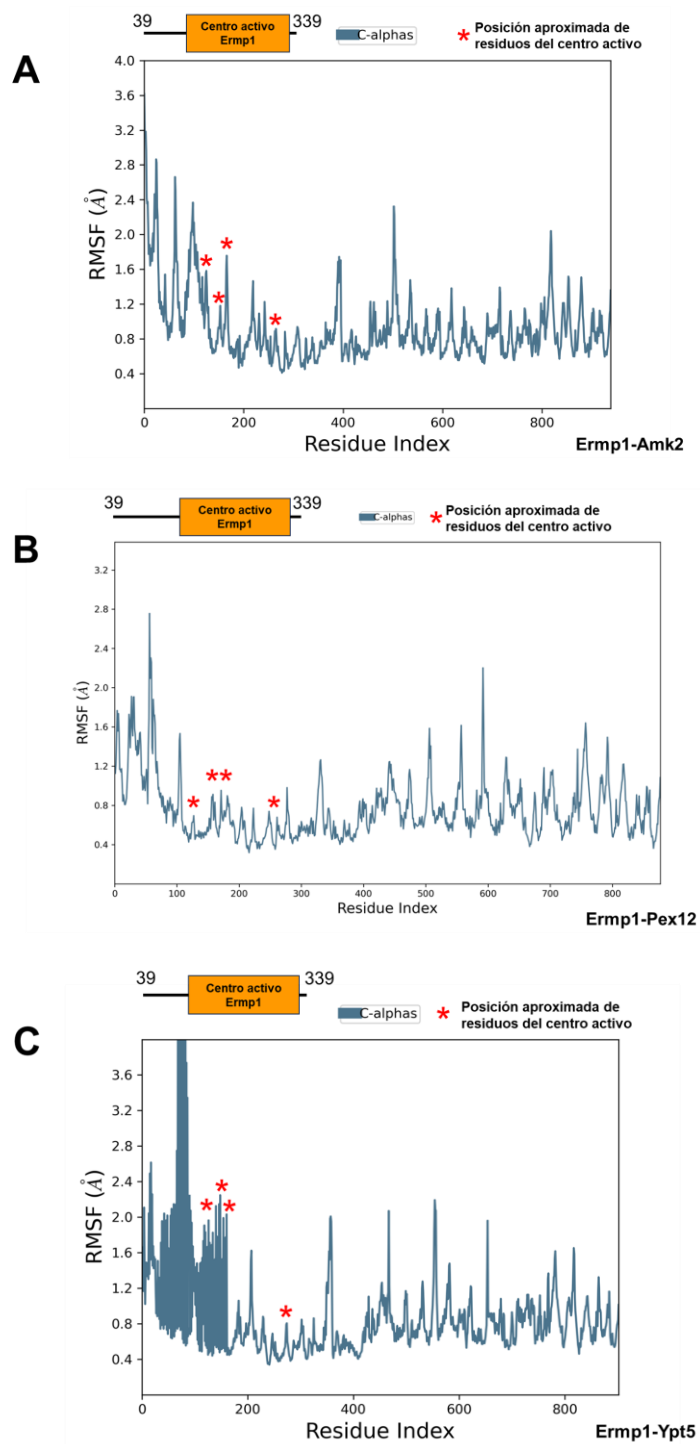
## 8.7. Dinámica molecular

Para determinar si las predicciones de las interacciones proteína-proteína pueden ser estables, se analizaron tres complejos de interacción del dominio M28 de Ermp1 que resultaron interesantes para observar su comportamiento a través de estudios de dinámica molecular. Los complejos Ermp1-Amk2, Ermp1-Ypt5 y Ermp1-Pex12 fueron seleccionados para la simulación debido a que las interacciones entre la cavidad catalítica del dominio M28 de Ermp1 y las secuencias consenso de escisión de las proteínas resultaron más favorecidas. La desviación cuadrática media (RMSD) de cada *snapshot* relativo a la estructura inicial minimizada en energía se calculó luego del alineamiento basado en los C $\alpha$  para cada trayectoria. Como se muestra en la Figura 20, los valores de RMSD para todos los sistemas exhibieron fluctuaciones razonables, que oscilaron entre 0,8 y 2,6 Å a lo largo de la simulación. Se observó que después de los 120 ns de simulación la conformación del complejo proteína-proteína no tuvo cambios importantes.



**Figura 20.** Simulación de dinámica molecular. Variación en la desviación cuadrática media (RMSD) de los complejos Ermp1-Pex12, Ermp1-Amk2 y Ermp1-Ypt5. Cada simulación tuvo una duración de 120 ns en Desmond Molecular Dynamics System para evaluar la estabilidad de las interacciones.

Por otro lado, los datos de la trayectoria de RMSF mostraron que las fluctuaciones de la mayoría de los aminoácidos oscilaron entre 0,4 y 3,2 Å (Figura 21). Se puede observar que en los tres complejos simulados los residuos iniciales mostraron más variaciones con respecto al resto. Estos residuos corresponderían a los motivos conformados por asas del dominio M28 de Ermp1, lo que le otorgaría una mayor flexibilidad de movimiento. Los residuos ubicados en la región donde se encontraría el centro activo mostraron una menor flexibilidad, a excepción del análisis de fluctuación del complejo Ermp1-Ypt5. Por lo tanto, es posible que las fluctuaciones de los residuos del centro activo sean críticas para favorecer o no la interacción con otras proteínas.

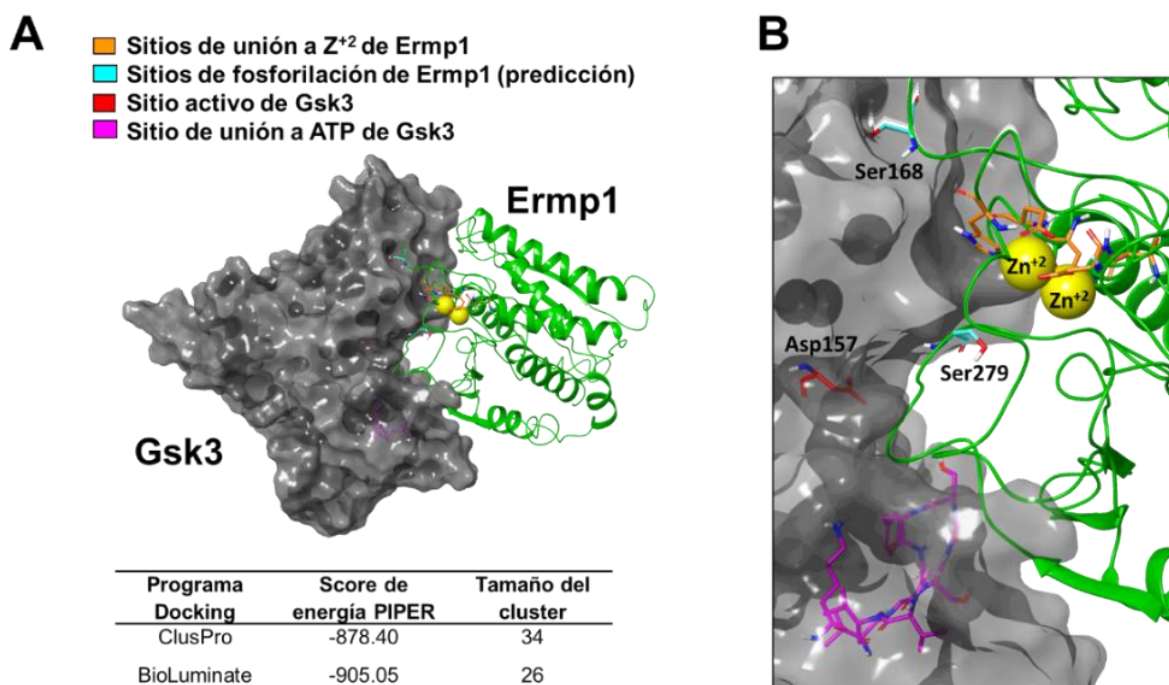


**Figura 21.** Análisis de trayectorias RMSF de residuos de los complejos de interacción del dominio M28 de Ermp1 de *S. pombe*. Fluctuaciones residuales a lo largo del tiempo de simulación para Ermp1-Amk2, Ermp1-Pex12 y Ermp1-Ypt5 (A-C respectivamente).

Los resultados de las predicciones *in silico* reportadas hasta este apartado serán publicados en la revista *current issues in molecular biology* de MDPI próximamente como producto derivado del proyecto de tesis.

### 8.8. Docking molecular entre la cinasa Gsk3 y el dominio M28 de Ermp1

Dentro del grupo de proteínas con las que pudiera interactuar Ermp1 en *S. pombe*, se incluye la serina-cinasa Gsk3, lo que motivó la evaluación de su interacción con el dominio M28 de Ermp1. Dado que este dominio presenta dos posibles residuos de serina susceptibles a la fosforilación, los cuales se encuentran alrededor de la cavidad catalítica, se consideró relevante explorar la interacción entre ambas proteínas. En la Figura 22-A se presentan los resultados de las predicciones de *docking* en ClusPro 2.0 y BioLuminate 4.5.



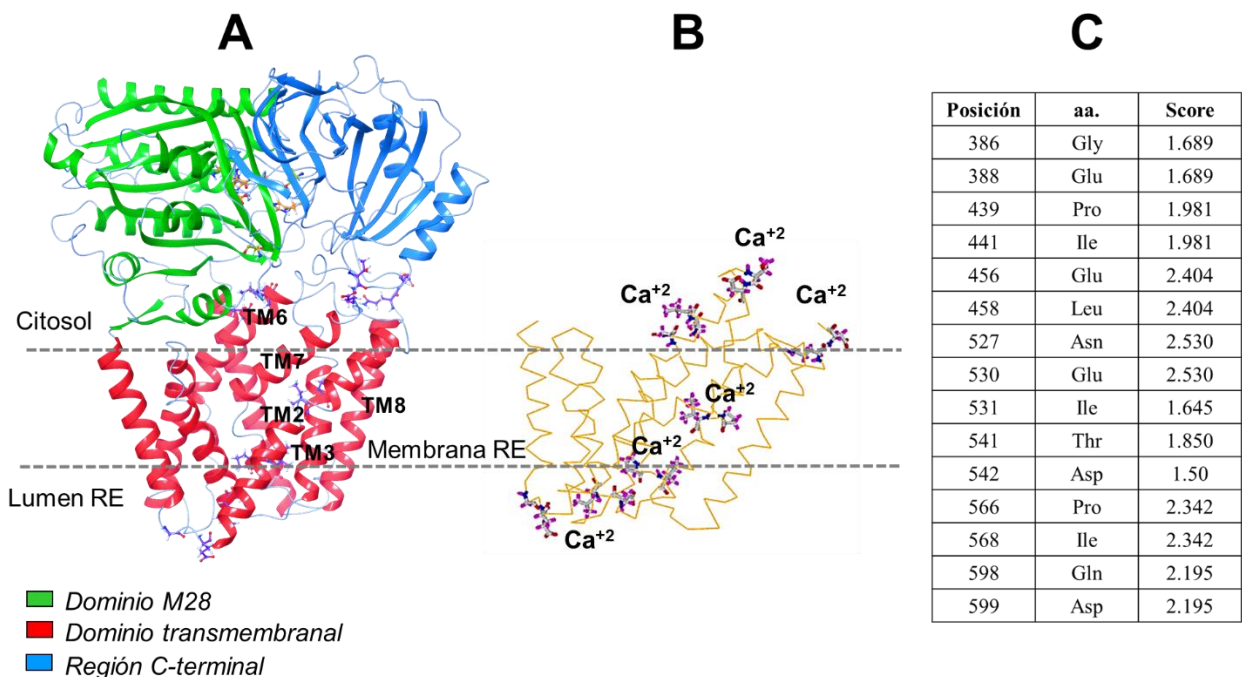
**Figura 22.** Docking molecular Gsk3-Ermp1. (A) Representación 3D de la interacción proteína-proteína y Comparación de resultados de docking en ClusPro y BioLuminate. (B) Interacción del dominio cinasa de Gsk3 y el dominio M28 de Ermp1. Los modelos se editaron en Maestro 13.0.

En ambos programas los complejos que se favorecieron fueron similares y mostraron la posible interacción entre el sitio activo de Gsk3 (Asp157) y una región próxima a Ser279 del dominio M28 de Ermp1 (Figura 22-B).

También se observó que en la estructura del dominio M28, se favoreció la interacción de un asa (donde se encuentra Ser279) en las proximidades del sitio de unión a ATP de Gsk3.

### 8.9. Análisis del dominio transmembranal de Ermp1 y *docking* molecular

Para esclarecer la topología del dominio transmembranal de Ermp1, se utilizó el modelo de AlphaFold. Ermp1 presenta una topología transmembranal compuesta por 8 hélices  $\alpha$ , que se asemeja a la de un poro o canal, tal como se muestra en la Figura 23-A (resaltado en rojo).



**Figura 63.** Estructura 3D de Ermp1 de *S. pombe* y predicción de sitios de unión a  $Ca^{+2}$ . (A) Modelo de Ermp1 generado en AlphaFold. (B) Representación 2D de la predicción de MIB server. (C) Predicción de sitios de unión a  $Ca^{+2}$  del dominio transmembranal de Ermp1.

El dominio M28 se localiza en la región N-terminal de Ermp1 (resaltado en verde en la Figura 23-A), mientras que la región C-terminal citosólica se destaca en azul cian. Resultó interesante observar que la topología de la región C-terminal de Ermp1 se caracteriza por motivos estructurales conformados por asas, lo que sugiere que estas estructuras secundarias le podrían conferir flexibilidad.

Dado que el dominio transmembranal tiene una topología de canal, es posible que funcione como un canal iónico, especialmente considerando su ubicación en el RE. Es importante destacar que este organelo requiere de un flujo constante de iones, principalmente de  $\text{Ca}^{+2}$ , para el funcionamiento adecuado de chaperonas moleculares, óxido reductasas y disulfuro isomerasas que participan en el plegamiento de proteínas.

El análisis de la región transmembranal de Ermp1 en el servidor MIB resultó en la predicción de sitios potenciales de unión a  $\text{Ca}^{+2}$ , los cuales forman un patrón de difusión entre las  $\alpha$  hélices transmembranales TM2, TM3, TM6, TM7 y TM8 (Figura 23 A-B). De los aminoácidos que podrían interactúan con este ion, destacan los residuos de carga negativa como Glu y Asp, así como los residuos polares como Asn, Gln y Thr (Tabla de la Figura 23-C).

En consecuencia, se investigó la posible interacción de Ermp1 con proteínas de membrana del RE identificadas en la red de PPI que se propone. Los ensayos de *docking* molecular se realizaron con las proteínas Sei1, Yos1, C630.12 y Emp70 debido que se localizan en RE, de acuerdo con Gene Ontology y la comparación con sus respectivos ortólogos en humanos. Las estructuras tridimensionales de las proteínas fueron obtenidas de AlphaFold, dado que era esencial modelar las regiones transmembranales para el análisis de interacción. En este caso, no fue apropiado utilizar un modelo por homología debido a la escasez de plantillas disponibles para el modelado.

Los resultados del *docking* molecular fueron seleccionados considerando la topología de las proteínas para que fueran biológicamente posibles. En la Tabla 14 se

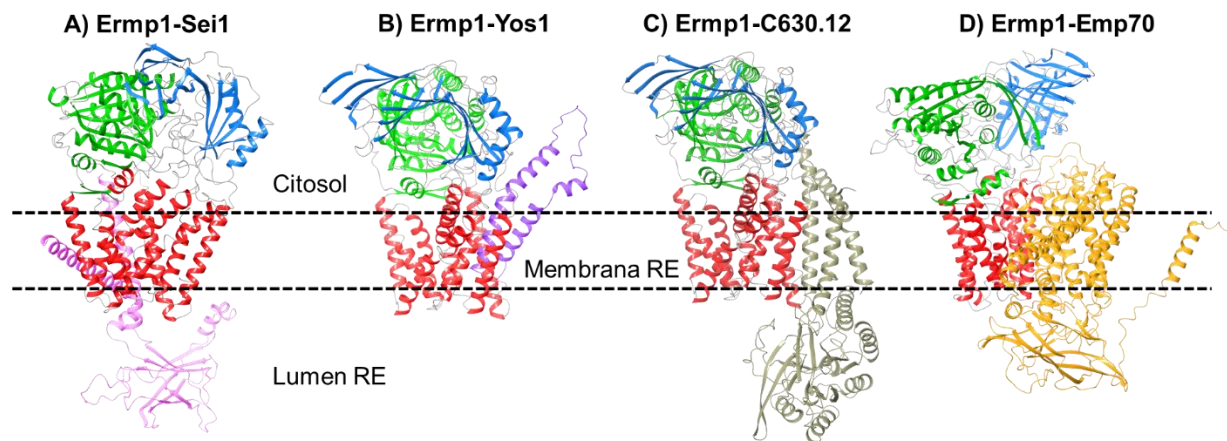
puede observar nuevamente que en ambos programas el score de energía global es similar. Sin embargo, se observaron variaciones en el ranking y el tamaño de los *clusters*.

**Tabla 14.** Comparación de los resultados del docking molecular en ClusPro y BioLuminate utilizando modelos de AlphaFold de Ermp1 y dianas proteicas de membrana.

Proteína SCHPO <sup>1</sup>	UniProt ID	Programa	Score de energía PIPER	Ranking TOP30	Tamaño del cluster
Sei1	O14119	ClusPro	-1547.9	13	23
		BioLuminate	-1495.1	15	20
Yos1	O13825	ClusPro	-1265.6	13	42
		BioLuminate	-1269.91	5	43
Emp70	Q9Y819	ClusPro	-1608.2	9	26
		BioLuminate	-1159.2	23	17
C630.12	Q9UUH0	ClusPro	-1809.6	13	20
		BioLuminate	-1790.8	16	20

<sup>1</sup>*Schizosaccharomyces pombe*.

Las predicciones de interacción se observaron entre las  $\alpha$  hélices transmembranales de las proteínas, por lo que, simularía la formación de complejos transmembranales de Ermp1 con cada una de las posibles dianas proteicas (Figura 24 A-D).



**Figura 24.** Docking molecular de Ermp1 y dianas proteicas de membrana en BioLuminate 4.5. Los modelos 3D se obtuvieron en AlphaFold Data Base y la edición se realizó en Maestro 13.0.

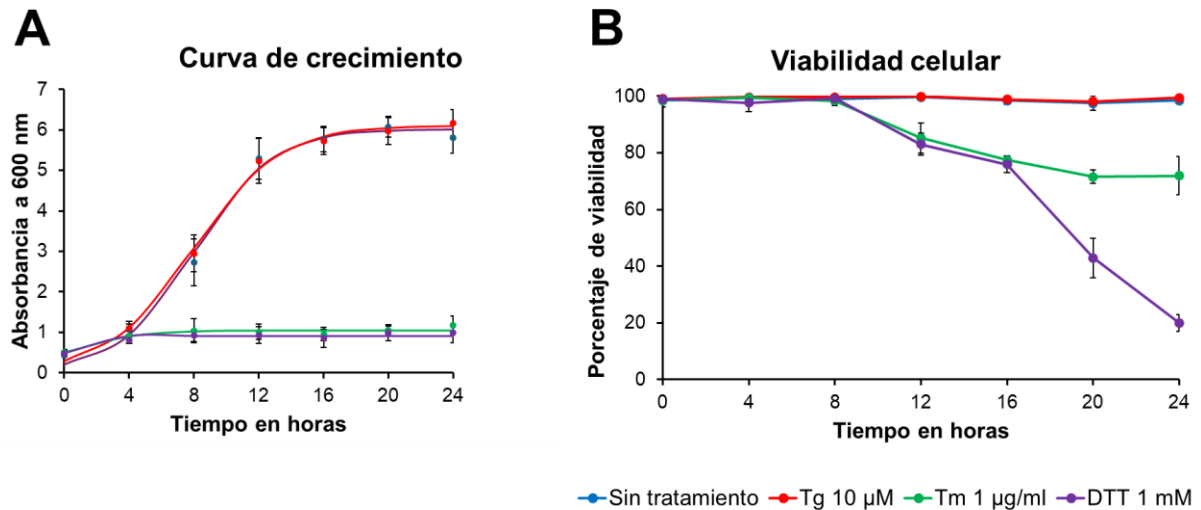
Por inferencia Sei1 parece ser una proteína de membrana asociada a la biogénesis de gotas lipídicas en el RE, mientras que Yos1 actúa como un transportador vesicular RE-Golgi. En cuanto a C630.12, se identifica como una fosfodiesterasa putativa de manosa-etanolamina fosfato remodeladora de GPI (glicosilfosfatidilinositol) [130], cuya función, de acuerdo con la inferencia por homología con MPPEI humana, estaría relacionada con la modificación postraduccional de proteínas que requieren la adición del glucolípidio GPI en el extremo carboxilo terminal para su anclaje a las membranas [131]. Por último, Emp70 parece ser una proteína de transporte endosomal RE-Golgi [132]. En humanos, la proteína homóloga TM9SF4 se ha asociado con la regulación del estrés en el RE, contribuyendo al mantenimiento del  $\text{Ca}^{+2}$  luminal, aunque aún no se comprende completamente cómo podría modular la concentración de este ion [102,133].

Tomando como referencia La comparación funcional de Sei1, Yos1, C630.12 y Emp70 con sus respectivos homólogos humanos, es posible que la interacción de Ermp1 con proteínas transmembranales del RE se relacione con procesos de transporte iónico y el mantenimiento funcional de la membrana.

#### **8.10. Inducción de estrés reticular en *S. pombe***

Para continuar con el análisis funcional de Ermp1 en *S. pombe*, fue importante evaluar su expresión en condiciones de estrés de RE. Esto se consideró crucial debido a que se tiene el precedente de que la expresión de ERMP1 en humanos se altera en procesos patológicos relacionados con el estrés reticular [2,3,134]. Por lo tanto, las células de *S. pombe* fueron tratadas con Tapsigargina, Tunicamicina y DTT con el propósito de seleccionar y estandarizar el mejor modelo de estrés de RE en la levadura. Para esto, se consultaron diversas referencias bibliográficas para definir la concentración mínima de inducción con cada uno de los agentes químicos y tiempo necesarios para la observación del fenotipo celular.

Los resultados de los diferentes tratamientos se muestran en las Figuras 25 A-B. La inducción de estrés del RE en *S. pombe* con 10  $\mu$ M de Tapsigargina no mostró efectos en el crecimiento ni la viabilidad celular durante las 24 horas de tratamiento (Figuras 25 A-B).



**Figura 25.** Inducción de estrés de RE en la cepa 972 h- de *S. pombe* crecidas en medio YNB. (A) Curva de crecimiento de células tratadas con Tapsigargina (Tg), Tunicamicina (Tm) y DTT durante 24 horas. Modelo de Monod ajustado,  $n=5$ . (B) Gráfica de viabilidad con azul de tripano de las mismas células.

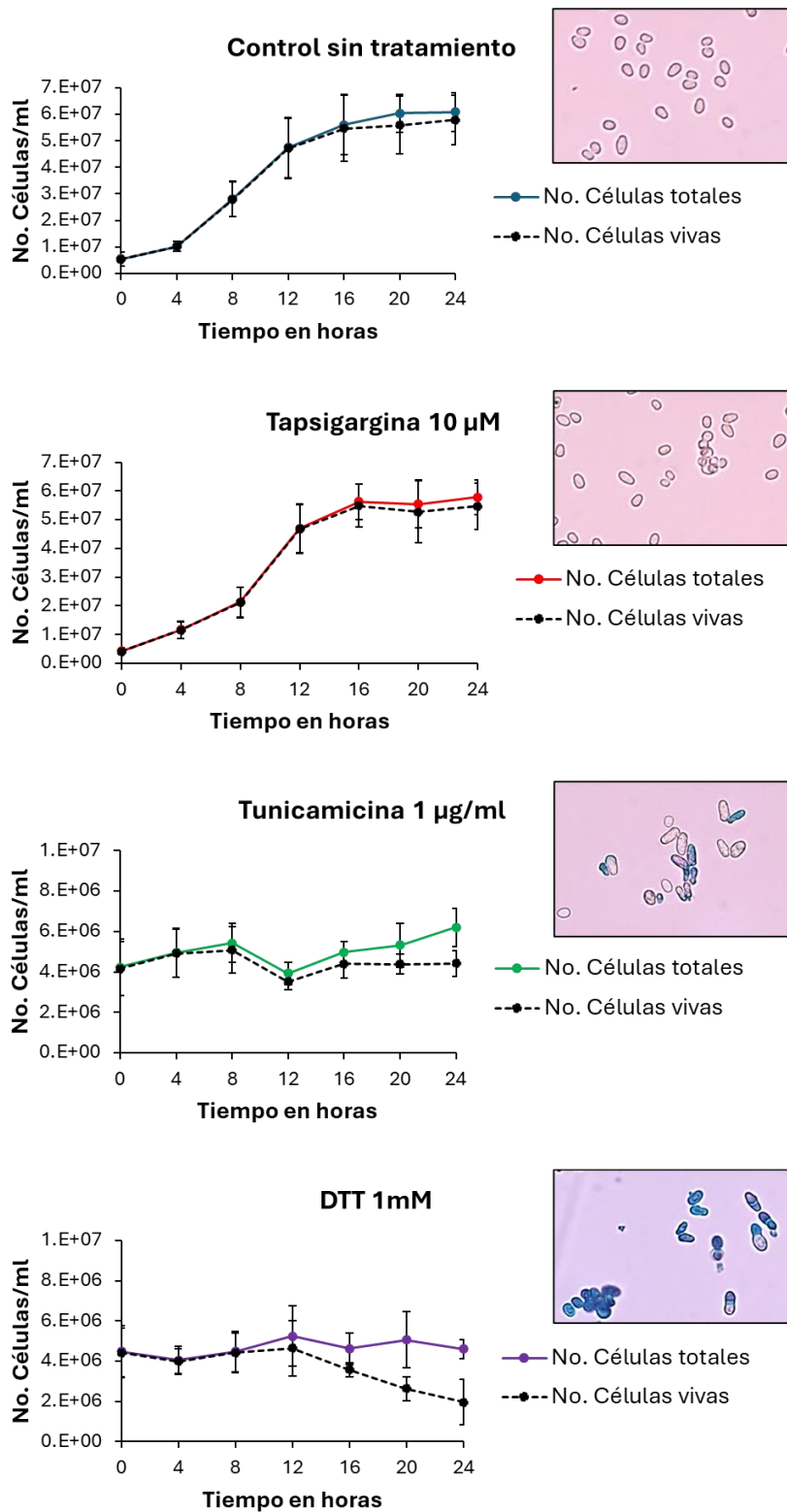
Por otro lado, el tratamiento con 1 $\mu$ g/mL de Tunicamicina y 1 mM de DTT mostró efectos adversos significativos en el crecimiento y la viabilidad celular después de 8 horas de incubación (Figuras 25 A-B). Aunque el comportamiento de la curva de crecimiento de la levadura fue similar en ambos tratamientos (Figura 25-A), manteniéndose en aproximadamente 1 U.A. desde las 4 horas hasta las 24 horas de incubación, el impacto en la viabilidad fue más severo con DTT.

En la Figura 25-B, se observa que tanto la Tunicamicina como el DTT disminuyeron la viabilidad celular en un 20% a las 12 horas del tratamiento. No obstante, a diferencia de la Tunicamicina, el tratamiento con DTT provocó una drástica

reducción del 80% de la viabilidad celular a las 24 horas, mientras que con Tunicamicina se mantuvo en un rango del 20%.

La observación microscópica de las células control y las tratadas con Tapsigargina, no reveló defectos morfológicos ni evidencia del compromiso de la viabilidad celular, de acuerdo con la cuantificación de número de células por mL de cultivo (Figura 26). En contraste, las células tratadas con Tunicamicina y DTT mostraron aglomeraciones y defectos morfológicos, como células grandes y redondeadas, así como evidencia de la muerte celular (células teñidas en azul). Estas características fueron más evidentes y frecuentes a las 24 horas del tratamiento (Figura 26).

De acuerdo con los resultados anteriores, el tratamiento con Tunicamicina demostró una menor toxicidad celular que el DTT. Por lo tanto, si se necesita realizar una evaluación prolongada del estrés reticular sin comprometer significativamente la viabilidad celular, Tunicamicina sería el mejor agente inhibidor para el estudio del estrés de RE en *S. pombe*.

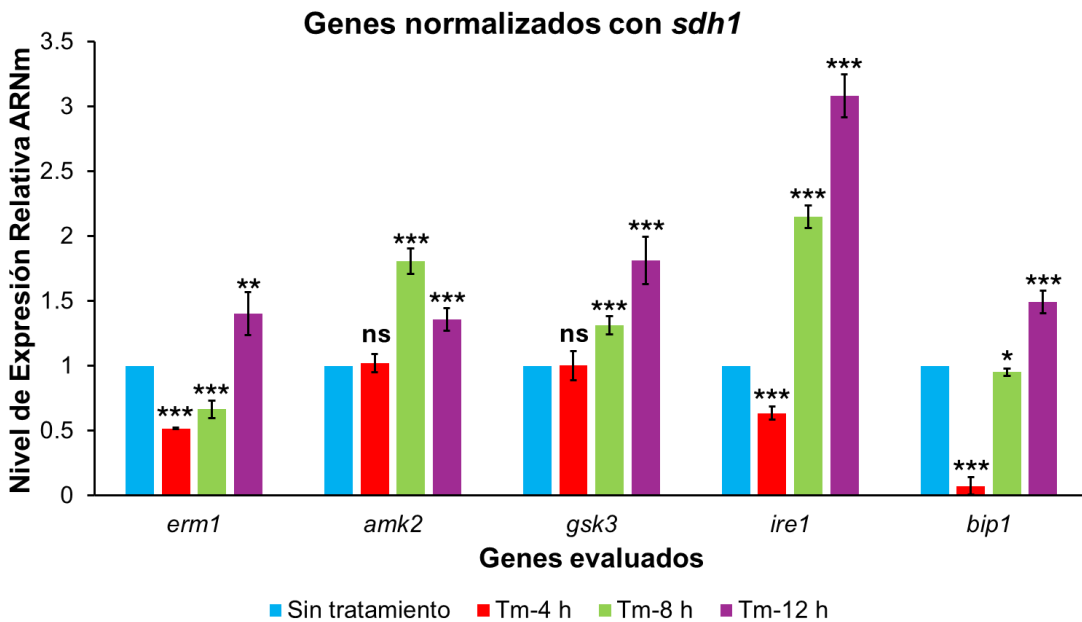


**Figura 26.** Determinación del número de células/mL viables de *S. pombe*. Tinción con azul de tripano de células sin tratamiento y tratadas con Tapsigargina (Tg), Tunicamicina (Tm) y DTT durante 24 horas, n=5. Observación de la morfología celular a 40x en microscopio óptico.

### 8.11. Expresión de Ermp1 en condiciones de estrés de RE

Para demostrar que la expresión de Ermp1 es sensible al estrés en RE como ERMP1 humana se trataron células *wilde type* de *S. pombe* con 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de Tunicamicina, considerando que es el mejor agente inductor de estrés en levaduras.

Durante la fase exponencial de crecimiento, entre las 4 y 12 horas de la cinética de crecimiento, el tratamiento con Tunicamicina reveló resultados interesantes. Se observó que la expresión de *erm1* es sensible al estrés de RE, disminuyendo hasta en un 50% durante las primeras 4 horas de inducción (Figura 27). Sin embargo, su expresión aumentó progresivamente en función del tiempo de incubación con el agente químico, llegando a ser 1.5 veces mayor a las 12 horas en comparación con el control sin tratamiento, lo que es un cambio significativo.



**Figura 7.** Nivel de expresión relativa de genes de interés en condiciones de estrés reticular de células de *S. pombe*. Cuantificación determinada por el método de la curva estándar. Tratamiento con Tm 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Prueba *t* student de dos variables (con y sin tratamiento). Los asteriscos muestran las diferencias estadísticamente significativas (\*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ ; \*\*\*  $p < 0.001$ , ns  $\rightarrow$  no significativo). Resultados de triplicados de 3 experimentos independientes.

En el caso del gen *amk2*, se observó un patrón de expresión diferente. Durante las primeras 4 horas de inducción, su expresión se mantuvo sin cambios en comparación con el control. Sin embargo, a las 8 horas de inducción alcanzó su máximo nivel de expresión, siendo aproximadamente dos veces mayor al control. Posteriormente, al prolongar la incubación hasta las 12 horas, se observó que el nivel de expresión disminuyó, aunque no llegó al nivel basal (Figura 27).

La expresión de *gsk3* también se mantuvo estable durante las primeras 4 horas de inducción. Pero, contrario a lo observado con el gen *amk2*, la expresión de *gsk3* aumentó de forma progresiva y significativa en función del tiempo, llegando a ser aproximadamente dos veces mayor a las 12 horas en comparación con el control sin tratamiento (Figura 27).

Para determinar qué tan sensibles son los genes *erm1*, *amk2* y *gsk3* al estrés de RE, también se cuantificó el nivel de expresión de los genes canónicos de la vía UPR, los cuales regulan la respuesta al estrés en RE. En la Figura 27 se puede observar que el nivel de expresión de *ire1* disminuyó aproximadamente un 50% durante las 4 horas del tratamiento con Tunicamicina, un compartimiento de expresión similar al del gen *erm1*. Sin embargo, su nivel de expresión incrementó significativamente a las 8 y 12 horas, registrándose un aumento de 2.5 a 3.2 veces mayor en comparación con el control, respectivamente. Por otro lado, *bip1* experimentó una disminución en su expresión de casi el 90% en las primeras 4 horas del tratamiento, recuperándose a las 8 horas, donde alcanzó niveles de expresión similares al control (Figura 27). Aunque, fue hasta las 12 horas de inducción del estrés que la expresión de *bip1* aumentó significativamente, siendo 1.5 veces mayor en comparación con el control sin tratamiento.

Estos resultados demuestran la alta sensibilidad de los genes de interés al estrés prolongado en RE, sugiriendo una posible asociación con mecanismos de supervivencia celular. Esto se puede correlacionar con la disminución progresiva de la viabilidad celular en función del tiempo que se observó en las Figuras 25 y 26.

## 9. DISCUSIÓN

### 9.1. Comparación de interólogos: interacción de Ermp1 con 45 proteínas en *S. pombe*

Ermp1 es una proteína putativa de la levadura de fisión *S. pombe*. Para elucidar su función celular y su relación con el estrés en RE, este estudio reporta las primeras predicciones *in silico* de interacciones proteína-proteína de la metaloproteasa. Para lograrlo, se emplearon herramientas bioinformáticas para predecir interacciones proteína-proteína mediante comparación de interólogos humano-levadura y *docking* molecular.

BioGRID es una base de datos de acceso abierto que alberga interacciones de genes y proteínas de múltiples especies, incluidas levaduras, gusano, mosca y humano. Todo el contenido se selecciona a partir de evidencia experimental reportada en publicaciones científicas, lo que lo convierte en el repositorio más completo de su tipo [52].

Aproximadamente 1.93 millones de las interacciones reportadas pueden usarse para construir redes de interacción que faciliten la investigación biomédica, particularmente en el contexto de la salud y las enfermedades humanas [52]. La base de datos BioGRID contiene actualmente un registro de un interactoma que consta de 19 229 interacciones entre 3 844 proteínas codificadas en el genoma de la levadura. Además, se ha observado que al menos 1 355 proteínas del proteoma de *S. pombe* corresponden a ortólogos humanos que están relacionados con enfermedades como diabetes, hipertensión y cáncer [17,21]. Por ejemplo, el estudio molecular en *S. pombe* ha resultado invaluable para el análisis funcional de genes relacionados con enfermedades humanas, como *RAD1*, *RAD9* y *HUS1* [135,136]. Estos genes humanos desempeñan un papel crucial en la respuesta al daño del ADN, y su expresión aberrante se ha relacionado con varios tipos de cáncer, incluidos los de próstata, mama, intestino, tiroides y gástrico.

Por lo tanto, gracias a la comparación de interólogos, se propone que Ermp1 pudiera interactuar con 45 proteínas altamente conservadas en humanos y levaduras. Dentro de este grupo de proteínas se incluyeron a Gsk3 y Amk2, debido a que previamente en *S. pombe* se reportaron GI positivas con Ermp1 [105]. Las GI se clasifican en negativas (de letalidad) o positivas (de supresión). En el caso de las IG negativas, una doble mutante exhibe un fenotipo más severo que el observado en mutantes simples, lo que indica que los productos genéticos funcionan de manera redundante en paralelo en una vía de señalización. En los casos de GI positivas, el fenotipo de los mutantes dobles es menos grave que el observado en los mutantes simples. Esto puede sugerir que los productos genéticos podrían interactuar dentro de una misma vía de señalización [137–139].

La clasificación de las 45 proteínas en GO sugieren que Ermp1 podría desempeñar un papel importante en el mantenimiento de la homeostasis de  $\text{Ca}^{2+}$ , aminoácidos y proteínas en el RE, un organelo con alta actividad de síntesis y degradación de proteínas. En las células de mamíferos el RE es el organelo principal de almacenamiento de  $\text{Ca}^{2+}$ , debido al alto potencial oxidante que tiene, el cual es necesario para la actividad de numerosas enzimas responsables del plegamiento, el procesamiento postraducciona l y el tráfico de proteínas [140]. De manera similar, en *S. pombe*, las ATPasas dependientes de calcio como Pmr1 y Pmc1 son responsables de regular la homeostasis del  $\text{Ca}^{2+}$  tanto en el RE como en la vacuola [141]. Ambos transportadores fueron identificados en la red PPI de Ermp1 en *S. pombe*, lo que sugiere una relación potencial entre Ermp1 y la homeostasis de  $\text{Ca}^{2+}$ . De acuerdo con la clasificación de los procesos biológicos de las demás proteínas, es posible que la interacción de Ermp1 con proteínas metabólicas como Dap1, Oca8 y Sei1 esté relacionada con el mantenimiento de la homeostasis de lípidos y proteínas de membranas de RE. Además, considerando que Ermp1 es una proteína transmembranal, es probable su interacción con proteínas involucradas en la inserción de proteínas en la membrana del RE y el tráfico vesicular,

como Oca3, Emc1 y Emp70. Por otro lado, Ermp1 podría ser regulada tanto a nivel de ARNm como de proteína mediante la interacción con proteínas responsables de la regulación transcripcional, ubiquitinación y palmitoilación como Atf1, Ubi2 y Erf2 respectivamente. Las proteínas que fueron clasificadas en proporción reducida en otros procesos biológicos, como la reparación del ADN, la división nuclear y la fisión mitocondrial, podrían interactuar con Ermp1 en el RE antes de ser dirigidas a sus respectivos compartimentos celulares.

## 9.2. Interacción del dominio M28 de Ermp1 con posibles proteínas diana

Las Fxna peptidasas se clasifican como miembros de la familia de metaloproteasas M28 debido a su conservación del motivo His-Xaa-Asp y Glu-Glu [112,142]. Esta familia incluye miembros representativos como la aminopeptidasa Y de *S. cerevisiae*, la aminopeptidasa S de *Streptomyces griseus*, la aminopeptidasa IAP de *E. coli* y la aminopeptidasa Ap1 de *Vibrio proteolyticus*. Este tipo de metaloproteasas se caracterizan por la presencia de dos iones  $Zn^{+2}$  en su centro activo. Estos iones se encuentran coordinados tetraédricamente con tres aminoácidos (His, Asp y Glu) y una molécula de agua. Además, un aspartato o glutamato puede estar coordinado con ambos iones metálicos [113,142].

El análisis de secuencia y estructural del dominio M28 de Ermp1 fue interesante porque además de identificar los residuos que conforman su cavidad catalítica, se predijeron dos sitios de serina que podrían ser potencialmente fosforilados en las proximidades del centro activo. En la red de PPI se incluye la proteína Gsk3, una cinasa de serina/treonina. En todas las células eucariotas GSK3 se expresa de forma ubicua, y tiene la capacidad de fosforilar numerosos sustratos, aunque sólo una fracción pequeña de ellos ha podido ser validada en algunos sistemas celulares [143,144]. La fosforilación de los sustratos de Gsk3 generalmente conduce a su inactivación o degradación, con el

fin de mantener el equilibrio energético y metabólico de las células [145,146]. En humanos, la fosforilación de algunos sustratos de GSK3 se ha relacionado con el control de la proliferación o supervivencia celular. Las proteínas fosforiladas pueden ser reconocidas por ligasas de ubiquitina E3 específicas para su degradación por el proteosoma [147]. Por lo tanto, se plantea la hipótesis de que Ermp1 podría depender de la fosforilación de cinasas como Gsk3 para su degradación en respuesta a diferentes señales ambientales. Es importante destacar que estos mecanismos también son influenciados por la vía UPR, cuya activación varía dependiendo del grado de estrés en el RE [140]. Aunque el *docking* molecular entre Gsk3 y Ermp1 sugiere que el Asp157 de Gsk3 interactúa en la proximidad de la Ser279 de Ermp1, se requieren de ensayos experimentales para confirmar esta predicción.

Dado que Ermp1 conserva el dominio M28 en su región N-terminal citosólica, se evaluó la interacción metaloenzima-sustrato de 6 candidatos proteolíticos de la red de PPI. Sin embargo, debido a la escasez de referencias bibliográficas específicas sobre el *docking* proteína-proteína entre metaloenzimas de  $Zn^{+2}$  y proteínas diana, llevamos a cabo una validación preliminar de herramientas computacionales como PROSPER, ClusPro y BioLuminate [119]. De acuerdo con los resultados de propensión proteolítica y *docking* molecular, se sugiere que Ermp1 podría interactuar con secuencias consenso ubicadas preferentemente en las asas de las proteínas Amk2, Ypt5, Pex12 y Pmc1 con la excepción de Oca8 y Fis1 que se localizaron en las cadenas cortas de las  $\alpha$  hélices. Aunque la proteólisis en las  $\alpha$  hélices no es común, la interacción enzima-sustrato aún puede ocurrir porque estas estructuras secundarias en solución generalmente se encuentran en un equilibrio dinámico que fluctúa entre la  $\alpha$  hélice y las asas [148,149].

Algunas metaloproteasas de la familia M28 como la aminopeptidasa Y de *S. cerevisiae* y la aminopeptidasa Ap1 de *V. proteolyticus* escinden preferentemente el N-amino de residuos Leu, sin embargo, también son capaces de hidrolizar el N-amino de Lys, Arg, Met, Val e Ile [111,150]. Por lo tanto, la interacción del dominio M28 de Ermp1

en la proximidad del N-amino de residuos de Leu y Met ubicados dentro de las secuencias consenso analizadas, sugiere la posibilidad de que Ermp1 pueda actuar como una aminopeptidasa.

El *docking* molecular del dominio M28 de Ermp1 con Amk2 fue interesante, debido a que la secuencia consenso de escisión proteolítica se encontró en una IDR. En las últimas dos décadas se ha demostrado la existencia y abundancia de proteínas con IDRs similares a Amk2 [125]. El descubrimiento de estas proteínas desafió el concepto clásico de que una estructura bien definida era esencial para que una proteína desempeñara su función. Actualmente se sabe que las IDRs son funcionales, ya que se consideran estructuras dinámicas que suelen estar en los puntos de conexión de interacción con otras proteínas, principalmente en las vías de señalización celular [126].

Los resultados de la dinámica molecular de los complejos Ermp1-Amk2, Ermp1-Ypt5 y Ermp1-Pex12 mostraron que las interacciones proteína-proteína pueden mantenerse estables después de 120 ns de simulación. Sin embargo, para determinar la afinidad de unión de estos complejos, se requeriría del conocimiento de los parámetros cinéticos y enzimáticos de la metaloproteasa, así como de la caracterización estructural del dominio M28. No obstante, esta información podría ser útil para futuros estudios experimentales orientados a la identificación de posibles sustratos peptídicos.

Cabe mencionar que las aminopeptidasas están presentes en organelos intracelulares, citoplasma y membranas celulares [151]. Su papel es crucial en la degradación de proteínas, ya que escinden péptidos generados por el proteosoma o hidrolizan aminoácidos libres para el reciclaje y síntesis de nuevas proteínas [152]. Además, se sabe que el proteosoma libera péptidos que constan de 6 a 24 aminoácidos, los cuales pueden ser rápidamente degradados por peptidasas citosólicas [151,152].

Durante muchos años, las aminopeptidasas han sido ampliamente estudiadas debido a su relación con diversos procesos celulares y sus implicaciones en el desarrollo de diferentes patologías, como procesos inflamatorios, diabetes y cáncer [153]. De

acuerdo con algunas publicaciones, la sobreexpresión de aminopeptidasas en células con cáncer facilita el suministro exógeno de aminoácidos, necesario para su supervivencia y proliferación [151,154]. En otros estudios se ha enfatizado el papel del microambiente tumoral en la regulación de la expresión de aminopeptidasas, lo que, a su vez, se relacionaría con el incremento en la demanda de síntesis de proteínas [152,155,156].

### **9.3. Interacción del dominio transmembranal de Ermp1 con posibles proteínas diana**

Además del dominio M28, Ermp1 tiene dos regiones importantes: un dominio transmembranal de 9  $\alpha$  hélices y una región C-terminal citosólica de aproximadamente 226 aa. La topología del C-terminal muestra un conjunto de motivos estructurales conformados por asas, lo que sugiere que podría conferirle flexibilidad. Esta flexibilidad podría permitirle adquirir diferentes conformaciones tridimensionales, lo que facilitaría la interacción con otras proteínas, como factores de transcripción y reguladores de transducción de señales [126].

El análisis de la conformación estructural del dominio transmembranal de Ermp1 y los resultados de interacción con proteínas del RE, plantea la hipótesis de que podría actuar como un canal iónico. Se identificaron aminoácidos con carga negativa (Glu y Asp) y polares (Asn, Gln y Thr) en las  $\alpha$  hélices transmembranales con cierto potencial de unión a  $\text{Ca}^{+2}$ , formando un patrón de difusión que podría conectar el citosol con el lumen del RE. Estos aminoácidos han sido descritos en la bibliografía como aquellos con mayor afinidad hacia el  $\text{Ca}^{+2}$  [157]. También se realizó el análisis con otros iones como  $\text{Zn}^{+2}$  y  $\text{H}^{+}$ , donde se observaron interacciones con los mismos aminoácidos de las  $\alpha$  hélices transmembranales.

Aunque aún no se comprende completamente el mecanismo exacto, existe evidencia de que no solo los transportadores SERCA son responsables del transporte

de  $\text{Ca}^{+2}$ , ya que se han identificado otras proteínas de la membrana del RE que responden a cambios en la concentración de este ion y actúan como canales pasivos [158]. Las fluctuaciones dinámicas en la concentración de  $\text{Ca}^{+2}$  regulan procesos esenciales para las células, como proliferación, secreción, migración, metabolismo, expresión genética e incluso la apoptosis [159]. De modo que, el  $\text{Ca}^{+2}$  se considera un mensajero universal y, por ende, sus concentraciones intracelulares deben ser reguladas [160]. Las concentraciones de  $\text{Ca}^{+2}$  citosólico pueden regularse mediante tres mecanismos: la entrada de  $\text{Ca}^{+2}$  externo a través de canales iónicos o intercambiadores de la membrana plasmática; la liberación de  $\text{Ca}^{+2}$  desde el interior de organelos como mitocondrias, sistema endolisosomal, Golgi, envoltura nuclear y especialmente el RE, a través de canales de liberación de  $\text{Ca}^{+2}$ ; o una combinación de ambos mecanismos mediante rutas de señalización positiva y negativa [161]. Por lo tanto, sería importante investigar a Ermp1 como un posible canal iónico en futuros estudios de caracterización estructural.

De acuerdo con las predicciones de *docking* molecular con Sei1, Yos1, C630.12 y Emp70 que residen en la membrana del RE, es posible que su interacción se relacione con el transporte de  $\text{Ca}^{+2}$ . Aunque la función celular de estas cuatro proteínas no ha sido caracterizada en *S. pombe*, se infiere que podrían actuar de manera similar a sus homólogas en humanos. En el caso de Sei1, la proteína homóloga BSCL2 humana interactúa con transportadores SERCA para regular la concentración de  $\text{Ca}^{+2}$  en el RE [162]. En condiciones de estrés reticular, BSCL2 resulta afectada debido a defectos en el plegamiento de su región luminal, lo que lleva a su aglomeración y la activación de la vía UPR [163,164]. Por otro lado, se ha reportado en la bibliografía que la proteína homóloga humana de Yos1 (IER3IP1) tiene un dominio de unión a ARNm en su región citosólica [103]. Durante el estrés en RE, se ha observado que IER3IP1 aumenta la actividad de la vía UPR a través de IRE1 $\alpha$  y XBP1. Estas proteínas, a su vez, incrementan la expresión de genes asociados con las vías secretoras y promueven la expansión de la

membrana reticular, lo que ayuda a mitigar el estrés causado por la acumulación de proteínas [103]. Por lo tanto, se cree que existe una relación entre la captación de ARNm por parte de IER3IP1 y la síntesis de proteínas.

C630.12 es una proteína homóloga de MPPEI humana necesaria para el transporte de proteínas de anclaje GPI desde el RE hacia el aparato de Golgi [130,131]. Ambas proteínas conservan un dominio fosfoesterasa similar a la Calcineurina, por lo que, estarían relacionadas con la regulación intracelular del  $Ca^{+2}$ . Además, la proteína homóloga humana de Emp70 (TM9SF4) también se ha relacionado con el mantenimiento de  $Ca^{+2}$  luminal [102,133].

De acuerdo con todas las predicciones *in silico* obtenidas hasta ahora, Ermp1 podría considerarse una proteína versátil, ya que no solo actuaría como enzima proteolítica, sino que también se relacionaría con el mantenimiento de la homeostasis del RE. Es importante destacar que estos procesos suelen ser los primeros en ser modificados en situaciones que afectan la integridad del RE.

#### **9.4. Cambios en la expresión de Ermp1 durante el estrés reticular en *S. pombe***

Como se ha mencionado anteriormente, *S. pombe* es un organismo modelo bien establecido para comprender los procesos celulares básicos debido a la facilidad con la que su genoma puede ser manipulado. Las mutaciones en su genoma han hecho que sea particularmente sencillo estudiar las consecuencias biológicas de la expresión aberrante de los genes [15]. Para analizar el patrón de expresión de Ermp1 en células silvestres de *S. pombe* en condiciones de estrés reticular, fue necesario estandarizar el modelo experimental, por lo que se evaluaron tres inductores químicos: Tapsigargina, Tunicamicina y DTT.

El tratamiento con Tapsigargina fue descartado debido a que no generó ningún efecto observable en las levaduras. Aunque es un agente químico comúnmente

utilizado para inhibir el transporte de  $\text{Ca}^{+2}$  en el RE de las células eucariotas [165], la ausencia del efecto se debería a la actividad compensatoria de las ATPasas vacuolares dependientes de  $\text{Ca}^{+2}$  en la levadura. Por lo tanto, su uso solo se limita a células eucariotas que tienen al RE como principal reservorio de este ion. Se demostró que una concentración de 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de Tunicamicina fue ideal para monitorear el estrés prolongado en cinéticas de crecimiento de la levadura, sin comprometer drásticamente la viabilidad celular, contrario a lo que se observó en el tratamiento con DTT. Estos resultados pueden atribuirse a que la alteración de la N-glicosilación con Tunicamicina resulta en un efecto menos tóxico [166] que la inhibición de los puentes disulfuro causada por el DTT [40].

La exposición al tratamiento con Tunicamicina en células silvestres de *S. pombe* durante la fase exponencial de la cinética de crecimiento puso en evidencia la sensibilidad al estrés de RE del gen *erm1*. Fue interesante observar que el nivel de expresión de *erm1* fluctúa en función del tiempo. Durante las primeras 8 horas de inducción, se observó una disminución aproximada del 50% en su expresión. Sin embargo, a las 12 horas, al final de la fase exponencial de la cinética de crecimiento, se registró un aumento significativo, alcanzando hasta 1.5 veces más la expresión que el control sin tratamiento.

En *S. pombe*, Ire1 mantiene la homeostasis del RE a través de dos mecanismos postranscripcionales: inicia la degradación selectiva de ARNm (RIDD) y procesa la estabilización del ARNm de Bip1 [23]. RIDD tiene como objetivo de degradación los ARNm de proteínas glicosiladas, de membrana y catabólicas que residen en el RE, esto con el fin de disminuir la carga de trabajo de la maquinaria encargada del plegamiento de proteínas [25]. Sin embargo, esta reducción no tiene un impacto significativo en la disminución total de proteínas. Se ha observado que en *S. pombe*, incluso en condiciones de estrés severo, la disminución total de proteínas es solo del 15% [23]. De acuerdo con nuestros resultados, es posible que el ARNm de Ermp1 sea un blanco de RIDD en una

fase temprana del estrés. No obstante, parece que la prolongación del estrés induciría el incremento de la expresión de *Ermp1*, independientemente de la actividad de *Ire1*. Cabe resaltar, que el incremento de la tasa de transcripción no siempre se correlaciona directamente con el incremento de síntesis de proteínas, ya que esto dependerá de las necesidades de las células. Por lo tanto, se plantea la hipótesis de que el aumento en la expresión de *Ermp1* durante el estrés prolongado esté relacionado con mecanismos de supervivencia celular, ya que se puede correlacionar con la disminución de la viabilidad celular al final de la fase exponencial de la cinética de crecimiento de las levaduras.

En condiciones de estrés en RE, se ha observado una relación de ERMP1 con la actividad de PERK/Nrf2 en humanos, una vía de señalización que regula la vía UPR y el estrés oxidativo causado por la acumulación de especies reactivas de oxígeno (ROS) [2,167]. En *S. pombe*, *Zip1* es un ortólogo de *Met4* de *S. cerevisiae*, y ambos factores de transcripción están funcionalmente relacionados con Nrf2 en mamíferos [168], de modo que sería interesante investigar si *Zip1* pudiera regular la expresión del gen *erm1* en condiciones de estrés reticular.

Para los genes *amk2* y *gsk3*, el patrón de expresión fue diferente. Durante las primeras 4 horas de inducción, su expresión se mantuvo sin cambios significativos. Sin embargo, se observó un incremento progresivo del nivel de expresión de ambos genes en función del tiempo de inducción de estrés reticular, a excepción de *amk2*, donde su pico más alto de expresión fue a las 8 horas.

*Amk2* y *Gsk3* son proteínas de señalización que se encargan de regular la actividad metabólica y transcripcional de las células mediante procesos dependientes de TOR y estrés ambiental [105,169–172]. *Amk2* es una proteína ortóloga de PRKAB1 humana y sirve como subunidad del complejo heterotrimérico AMPK, que actúa como andamio para el ensamblaje de las subunidades PRKAA1 y PRKAG1. El complejo AMPK desempeña un papel importante como supresor fisiológico de la vía UPR [173], debido a que la activación de AMPK inhibe los procesos celulares que consumen ATP,

como la síntesis de proteínas y el crecimiento celular [174]. Por otro lado, se ha demostrado que GSK3B en humanos se activa en condiciones de estrés de RE y se ha relacionado con la inducción de la autofagia, lo que permite que las células recuperen la homeostasis [175]. No obstante, la actividad de GSK3B también se ha correlacionado con CHOP y la viabilidad celular en la última etapa del estrés prolongado del RE, siendo una señal crítica para la activación de la apoptosis [175,176]. De acuerdo con nuestros resultados, el aumento en la expresión de los genes *amk2* y *gsk3* durante la fase temprana del estrés reticular en *S. pombe*, se relacionaría con los mecanismos de adaptación y rescate de la homeostasis celular, sin embargo, el estrés prolongado induciría el aumento significativo de la expresión de *gsk3*, lo que podría estar asociado con la muerte celular observada en los ensayos de viabilidad celular.

Se ha reportado que ERMP1 facilita la expresión de AKT tanto a nivel de ARNm como de proteína, y que su vez promueve la actividad de la vía PI3K/AKT/mTOR en células con cáncer de colon y hepático, aumentando la proliferación y la supervivencia celular. Debido a que el complejo AMPK y GSK3B se encargan de la modulación de AKT, un regulador clave en la modulación del crecimiento celular, proliferación, ciclo celular y apoptosis, sería interesante estudiar estos mecanismos en la levadura de fisión.

Elucidar la correlación entre *Ermp1*, *Amk2* y *Gsk3* en vías de señalización como TOR y UPR, ayudaría en la identificación de más procesos de regulación celular que aún no han sido descritas, los cuales se conservarían tanto en levaduras como en mamíferos.

Finalmente, la evidencia de la sensibilidad al estrés de RE de los genes *erm1*, *amk2* y *gsk3* se pudo comparar con el patrón de expresión de los activadores de la vía UPR, *ire1* y *bip1*. Resultó interesante observar que la expresión de *ire1* y *bip1* disminuyera drásticamente durante las primeras 4 horas de inducción de estrés reticular, ya que se esperaría que incrementara significativa, debido a que son los principales sensores del estrés en RE. En *S. pombe* está reportado que el ARNm de *bip1* experimenta una baja

regulación en la etapa inicial del estrés de RE. Esto se asoció con el rápido procesamiento de los ARNm de *bip1* a especies de ARN de transferencia (ARNt) a un mecanismo dependiente de Ire1 para su estabilización [25]. Eventualmente, si el estrés persiste, la expresión de *bip1* incrementa considerablemente. A diferencia de otras especies, en *S. pombe*, Bip1 es la única en tener un sitio de glicosilación, por lo que, el incremento de su expresión durante el estrés reticular compensa la pérdida de la proteína glicosilada [25]. Esta información coincide con lo observado en este estudio, donde hasta las 12 horas de inducción del estrés, la expresión de *bip1* incrementó significativamente. Aunque no existen reportes de que la expresión de *ire1* experimenta una baja regulación al inicio del estrés, es posible que se relacione con su actividad de endoribonucleasa para el mantenimiento de la homeostasis. Si el estrés se prolonga, es probable que la expresión de *ire1* se incremente considerablemente debido a que se vería rebasada su actividad de degradación de ARN mensajeros, tal y como se observó en nuestro análisis de expresión con Tunicamicina.

## 10. CONCLUSIONES

Este estudio proporciona una visión integral sobre el papel potencial de la metaloproteasa putativa Ermp1 en la levadura de fisión *S. pombe*. A través de enfoques bioinformáticos y experimentales, se propone que Ermp1 pudiera estar involucrada en procesos relacionados con la homeostasis del RE, como la degradación de aminoácidos y proteínas, y la respuesta al estrés en el RE.

Las predicciones *in silico* de interacciones proteína-proteína sugieren que el dominio M28 de Ermp1 podría interactuar con posibles proteínas dianas cuyos segmentos escindibles se localicen en los motivos estructurales conformados por las asas. Además, el análisis de la región transmembranal de Ermp1 sugiere que podría actuar como un canal debido a su topología y la posible interacción con proteínas de la membrana del RE que se relacionan con el mantenimiento del flujo de  $\text{Ca}^{+2}$  y la organización de la membrana en el organelo.

El análisis de la expresión génica en condiciones de estrés reticular con Tunicamicina en células *wilde type* de *S. pombe* reveló patrones dinámicos en la expresión del gen *erm1*. La disminución significativa de la expresión de *erm1* en una fase temprana del estrés, se relacionaría con la actividad de Ire1, un regulador de la vía UPR. Sin embargo, el incremento en su expresión en una fase prolongada de estrés podría asociarse con mecanismos de supervivencia celular.

La expresión de los genes *amk2* y *gsk3* incrementó en función del tiempo de inducción de estrés. Debido a que sus productos génicos se relacionan con la regulación del metabolismo y la respuesta al estrés ambiental a través de TOR, era de esperar que su expresión aumentara cuando se compromete la viabilidad celular en una fase prolongada del estrés.

Estos hallazgos no solo proporcionan una mejor comprensión de la función de Ermp1 en *S. pombe*, sino que también abren nuevas vías de investigación para explorar

sus implicaciones en la regulación celular y la respuesta al estrés. Futuros estudios podrían dirigirse a validar experimentalmente las predicciones *in silico* de interacciones proteína-proteína, así como a profundizar en los mecanismos moleculares de los patrones de expresión génica observados.

## 11. PERSPECTIVAS

- ❖ Comprobar las interacciones proteína-proteína de Ermp1 que se predicen en este trabajo mediante co-inmunoprecipitación o ensayo de doble híbrido en levadura.
- ❖ Expresión y purificación del dominio M28 de Ermp1 de *S pombe*.
- ❖ Caracterización estructural del dominio M28 de Ermp1 mediante cristalografía de rayos X, resonancia magnética nuclear o crio-microscopía electrónica.
- ❖ Realizar ensayos enzimáticos del dominio M28 de Ermp1 en presencia de péptidos, tomando como referencia las secuencias consenso de escisión que se predicen en este trabajo.
- ❖ Evaluar el impacto de Ermp1 en la fisiología de la levadura mediante la delección del gen y en condiciones de estrés reticular.
- ❖ Explorar la relevancia de Ermp1 en líneas celulares humanas mediante estudios de expresión génica a nivel transcriptómico con técnicas de RNA-seq en condiciones de estrés reticular.

## 12. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Garcia-Rudaz, C.; Luna, F.; Tapia, V.; Kerr, B.; Colgin, L.; Galimi, F.; Dissen, G.A.; Rawlings, N.D.; Ojeda, S.R. Fxna, a Novel Gene Differentially Expressed in the Rat Ovary at the Time of Folliculogenesis, Is Required for Normal Ovarian Histogenesis. *Development* **2007**, *134*, 945–957, doi:10.1242/dev.02795.
2. Grandi, A.; Santi, A.; Campagnoli, S.; Parri, M.; De Camilli, E.; Song, C.; Jin, B.; Lacombe, A.; Castori-Eppenberger, S.; Sarmientos, P.; et al. ERMP1, a Novel Potential Oncogene Involved in UPR and Oxidative Stress Defense, Is Highly Expressed in Human Cancer. *Oncotarget* **2016**, *7*, 63596–63610, doi:10.18632/oncotarget.11550.
3. Chi, L.; Jiao, D.; Nan, G.; Yuan, H.; Shen, J.; Gao, Y. MiR-9-5p Attenuates Ischemic Stroke through Targeting ERMP1-Mediated Endoplasmic Reticulum Stress. *Acta Histochem* **2019**, *121*, 151438, doi:10.1016/j.acthis.2019.08.005.
4. Qu, J.; Zhang, L.; Li, L.; Su, Y. MiR-148b Functions as a Tumor Suppressor by Targeting Endoplasmic Reticulum Metallo Protease 1 in Human Endometrial Cancer Cells. *Oncol Res* **2018**, *27*, 81–88, doi:10.3727/096504018X15202988139874.
5. Schröder, M.; Kaufman, R.J. The Mammalian Unfolded Protein Response. *Annu Rev Biochem* **2005**, *74*, 739–789, doi:10.1146/annurev.biochem.73.011303.074134.
6. Hsu, S.K.; Chiu, C.C.; Dahms, H.U.; Chou, C.K.; Cheng, C.M.; Chang, W.T.; Cheng, K.C.; Wang, H.M.D.; Lin, I.L. Unfolded Protein Response (UPR) in Survival, Dormancy, Immunosuppression, Metastasis, and Treatments of Cancer Cells. *Int J Mol Sci* **2019**, *20*, 1–25, doi:10.3390/ijms20102518.
7. Kopp, M.C.; Larburu, N.; Durairaj, V.; Adams, C.J.; Ali, M.M.U. UPR Proteins IRE1 and PERK Switch BiP from Chaperone to ER Stress Sensor. *Nat Struct Mol Biol* **2019**, *26*, 1053–1062, doi:10.1038/s41594-019-0324-9.
8. Schönthal, A.H. Endoplasmic Reticulum Stress: Its Role in Disease and Novel Prospects for Therapy. *Scientifica (Cairo)* **2012**, *2012*, 1–26, doi:10.6064/2012/857516.
9. Zamani, M.; Dastghaib, S.; Erfani, M.; Vahid Hosseini, S.; Mokarram, P. The Role of Endoplasmic Reticulum Metallo Protease 1 on Autophagy Pathway in HCT-116 Colorectal Cancer Cell Line. *Ann Colorectal Res* **2021**, *9*, 63–68, doi:10.30476/ACRR.2021.91373.1102.Journal.
10. Fribley, A.; Zhang, K.; Kaufman, R.J. Regulation of Apoptosis by the Unfolded Protein Response. *Methods Mol Biol* **2009**, *559*, 191–204, doi:10.1007/978-1-60327-017-5\_14.
11. Li, X.; Zhang, K.; Li, Z. Unfolded Protein Response in Cancer: The Physician's Perspective. *J Hematol Oncol* **2011**, *4*, 1–10, doi:10.1186/1756-8722-4-8.
12. Cao, S.S.; Kaufman, R.J. Endoplasmic Reticulum Stress and Oxidative Stress in Cell Fate Decision and Human Disease. *Antioxid Redox Signal* **2014**, *21*, 396–413, doi:10.1089/ars.2014.5851.
13. Lu, H.; Hu, J.; Li, J.; Lu, W.; Deng, X.; Wang, X. MiR-328-3p Overexpression Attenuates the Malignant Proliferation and Invasion of Liver Cancer via Targeting Endoplasmic Reticulum Metallo Protease 1 to Inhibit AKT Phosphorylation. *Ann Transl Med* **2020**, *8*, 754–754, doi:10.21037/atm-20-3749.
14. Rahmani-Kukia, N.; Zamani, M.; Mokarram, P. ERMP1 Facilitates The Malignant Characteristics of Colorectal Cancer Cells through Modulating PI3K/AKT/ $\beta$ -Catenin

- Pathway and Localization of GRP78. *Cell J* **2023**, *25*, 470–482, doi:10.22074/CELLJ.2023.1982707.1188.
15. Hoffman, C.S.; Wood, V.; Fantes, P.A. An Ancient Yeast for Young Geneticists: A Primer on the Schizosaccharomyces Pombe Model System. *Genetics* **2015**, *201*, 403–423, doi:10.1534/genetics.115.181503.
  16. Wood, V.; Gwilliam, R.; Rajandream, M.-A.; Lyne, M.; Lyne, R.; Stewart, A.; Sgouros, J.; Peat, N.; Hayles, J.; Baker, S.; et al. The Genome Sequence of Schizosaccharomyces Pombe. *W. R. McCombie* **2002**, *415*, doi:10.1038/nature724.
  17. Harris, M.A.; Rutherford, K.M.; Hayles, J.; Lock, A.; Bähler, J.; Oliver, S.G.; Mata, J.; Wood, V. Fission Stories: Using PomBase to Understand Schizosaccharomyces Pombe Biology. *Genetics* **2022**, *220*, doi:10.1093/GENETICS/IYAB222.
  18. Owen, N.; Doe, C.L.; Mellor, J.; Davies, K.E. Characterization of the Schizosaccharomyces Pombe Orthologue of the Human Survival Motor Neuron (SMN) Protein. *Hum Mol Genet* **2000**, *9*, 675–684, doi:10.1093/hmg/9.5.675.
  19. Zhao1, Y.; Lieberman, H.B. Schizosaccharomyces Pombe: A Model for Molecular Studies of Eukaryotic Genes. *DNA Cell Biol* **1995**, *14*, 359–371, doi:10.1089/dna.1995.14.359.
  20. Vo, T. V.; Das, J.; Meyer, M.J.; Cordero, N.A.; Akturk, N.; Wei, X.; Fair, B.J.; Degatano, A.G.; Fragoza, R.; Liu, L.G.; et al. A Proteome-Wide Fission Yeast Interactome Reveals Network Evolution Principles from Yeasts to Human. *Cell* **2016**, *164*, 310–323, doi:10.1016/j.cell.2015.11.037.
  21. Wang, Z. Big Data Mining Powers Fungal Research: Recent Advances in Fission Yeast Systems Biology Approaches. *Curr Genet* **2017**, *63*, 427–433, doi:10.1007/s00294-016-0657-4.
  22. Vyas, A.; Freitas, A. V.; Ralston, Z.A.; Tang, Z. Fission Yeast Schizosaccharomyces Pombe: A Unicellular “Micromammal” Model Organism. *Curr Protoc* **2021**, *1*, doi:10.1002/cpz1.151.
  23. Kimmig, P.; Diaz, M.; Zheng, J.; Williams, C.C.; Lang, A.; Aragón, T.; Li, H.; Walter, P. The Unfolded Protein Response in Fission Yeast Modulates Stability of Select MRNAs to Maintain Protein Homeostasis. *Elife* **2012**, *2012*, 1–20, doi:10.7554/eLife.00048.
  24. Wu, H.; Ng, B.S.H.; Thibault, G. Endoplasmic Reticulum Stress Response in Yeast and Humans. *Biosci Rep* **2014**, *34*, 321–330, doi:10.1042/BSR20140058.
  25. Guydosh, N.R.; Kimmig, P.; Walter, P.; Green, R. Regulated Ire1-Dependent mRNA Decay Requires No-Go mRNA Degradation to Maintain Endoplasmic Reticulum Homeostasis in S. Pombe. *Elife* **2017**, *6*, doi:10.7554/eLife.29216.
  26. Frost, A.; Elgort, M.G.; Brandman, O.; Ives, C.; Collins, S.R.; Miller-Vedam, L.; Weibezahn, J.; Hein, M.Y.; Poser, I.; Mann, M.; et al. Comparing S. Pombe and S. Cerevisiae Genetic Interactions Reveals Functional Repurposing and Identifies New Organelle Homeostasis and Mitosis Control Genes. *Cell* **2012**, *149*, 1339–1352, doi:10.1016/j.cell.2012.04.028.
  27. Guérin, R.; Ve Arseneault, G.; Dumont, S.; Rokeach, L.A. Calnexin Is Involved in Apoptosis Induced by Endoplasmic Reticulum Stress in the Fission Yeast. *Mol Biol Cell* **2008**, *19*, 4404–4420, doi:10.1091/mbc.E08.
  28. Zhao, D.; Du, L.L. Epr1, a UPR-Upregulated Soluble Autophagy Receptor for Reticulophagy. *Autophagy* **2020**, *16*, 2112–2113, doi:10.1080/15548627.2020.1816665.

29. Foufelle, F.; Fromenty, B. Role of Endoplasmic Reticulum Stress in Drug-Induced Toxicity. *Pharmacol Res Perspect* **2016**, *4*, 1–28, doi:10.1002/prp2.211.
30. Coe, H.; Michalak, M. Calcium Binding Chaperones of the Endoplasmic Reticulum. *F96 Gen. Physiol. Biophys* **2009**, *28*, 96–103.
31. Halperin, L.; Jung, J.; Michalak, M. The Many Functions of the Endoplasmic Reticulum Chaperones and Folding Enzymes. *IUBMB Life* **2014**, *66*, 318–326, doi:10.1002/iub.1272.
32. Chen, S.; Melchior, W.B.; Guo, L. Endoplasmic Reticulum Stress in Drug-and Environmental Toxicant-Induced Liver Toxicity. *J Environ Sci Health C Environ Carcinog Ecotoxicol Rev* **2014**, *32*, 83–104, doi:10.1080/10590501.2014.881648.
33. Malhi, H.; Kaufman, R.J. Endoplasmic Reticulum Stress in Liver Disease. *J Hepatol* **2011**, *54*, 795–809, doi:10.1016/j.jhep.2010.11.005.
34. Cnop, M.; Foufelle, F.; Velloso, L.A. Endoplasmic Reticulum Stress, Obesity and Diabetes. *Trends Mol Med* **2012**, *18*, 59–68, doi:10.1016/j.molmed.2011.07.010.
35. Cheng, B.; Gong, H.; Xiao, H.; Petersen, R.B.; Zheng, L.; Huang, K. Inhibiting Toxic Aggregation of Amyloidogenic Proteins: A Therapeutic Strategy for Protein Misfolding Diseases. *Biochim Biophys Acta Gen Subj* **2013**, *1830*, 4860–4871, doi:10.1016/j.bbagen.2013.06.029.
36. Denmeade, S.R.; Isaacs, J.T. The SERCA Pump as a Therapeutic Target: Making a “Smart Bomb” for Prostate Cancer. *Cancer Biol Ther* **2005**, *4*, 21–29, doi:10.4161/cbt.4.1.1505.
37. Kim, I.; Xu, W.; Reed, J.C. Cell Death and Endoplasmic Reticulum Stress: Disease Relevance and Therapeutic Opportunities. *Nat Rev Drug Discov* **2008**, *7*, 1013–1030, doi:10.1038/nrd2755.
38. Bieberich, E. Synthesis, Processing, and Function of N-Glycans in N-Glycoproteins. In; 2014; pp. 47–70.
39. Yu, M.-S.; Ho, Y.-S.; So, K.-F.; Yuen, W.-H.; Chang, R.C.-C. Cytoprotective Effects of Lycium Barbarum against Reducing Stress on Endoplasmic Reticulum. *Int J Mol Med* **2006**, *17*, 1157–1161.
40. Li, B.; Yi, P.; Zhang, B.; Xu, C.; Liu, Q.; Pi, Z.; Xu, X.; Chevet, E.; Liu, J. Differences in Endoplasmic Reticulum Stress Signalling Kinetics Determine Cell Survival Outcome through Activation of MKP-1. *Cell Signal* **2011**, *23*, 35–45, doi:10.1016/j.cellsig.2010.07.019.
41. Raman, K. Construction and Analysis of Protein – Protein Interaction Networks. *Autom Exp* **2010**, *2*, 1–11, doi:10.1186/1759-4499-2-2.
42. Zainal-Abidin, R.-A.; Afiqah-Alen, N.; Abdullah-Zawawi, M.-R.; Harun, S.; Mohamed-Hussein, Z.-A. Protein – Protein Interaction (PPI) Network of Zebrafish Oestrogen Receptors : A Bioinformatics Workflow. *Life* **2022**, *12*, 1–19, doi:10.3390/life12050650.
43. Johnson, K.L.; Qi, Z.; Yan, Z.; Wen, X.; Nguyen, T.C.; Zaleta-Rivera, K.; Chen, C.J.; Fan, X.; Sriram, K.; Wan, X.; et al. Revealing Protein-Protein Interactions at the Transcriptome Scale by Sequencing. *Mol Cell* **2021**, *81*, 4091–4103, doi:10.1016/j.molcel.2021.07.006.
44. Franceschini, A.; Szklarczyk, D.; Frankild, S.; Kuhn, M.; Simonovic, M.; Roth, A.; Lin, J.; Minguez, P.; Bork, P.; Von Mering, C.; et al. STRING v9.1: Protein-Protein Interaction

- Networks, with Increased Coverage and Integration. *Nucleic Acids Res* **2013**, *41*, doi:10.1093/nar/gks1094.
45. Bell, E.W.; Schwartz, J.H.; Freddolino, P.L.; Zhang, Y. PEPPI: Whole-Proteome Protein-Protein Interaction Prediction through Structure and Sequence Similarity, Functional Association, and Machine Learning. *J Mol Biol* **2022**, *434*, doi:10.1016/j.jmb.2022.167530.
  46. Zhang, L.; Yu, G.; Xia, D.; Wang, J. Protein-Protein Interactions Prediction Based on Ensemble Deep Neural Networks. *Neurocomputing* **2019**, *324*, 10–19, doi:10.1016/j.neucom.2018.02.097.
  47. Skrabanek, L.; Saini, H.K.; Bader, G.D.; Enright, A.J. Computational Prediction of Protein-Protein Interactions. *Mol Biotechnol* **2008**, *38*, 1–17, doi:10.1007/s12033-007-0069-2.
  48. Bader, G.D.; Donaldson, I.; Wolting, C.; Ouellette, B.F.F.; Pawson, T.; Hogue, C.W. V BIND-The Biomolecular Interaction Network Database. *Nucleic Acids Res* **2001**, *29*, doi:10.1093/nar/29.1.242.
  49. Xenarios, I.; Salwinski, D.; Duan, J.; Higney, P.; Kim, S.-M.; Eisenberg, D. DIP, the Database of Interacting Proteins: A Research Tool for Studying Cellular Networks of Protein Interactions. *Nucleic Acids Res* **2002**, *30*, 303–305, doi:10.1093/nar/30.1.303.
  50. del Toro, N.; Shrivastava, A.; Ragueneau, E.; Meldal, B.; Combe, C.; Barrera, E.; Perfetto, L.; How, K.; Ratan, P.; Shirodkar, G.; et al. The IntAct Database: Efficient Access to Fine-Grained Molecular Interaction Data. *Nucleic Acids Res* **2022**, *50*, D648–D653, doi:10.1093/nar/gkab1006.
  51. Zanzoni, A.; Montecchi-Palazzi, L.; Quondam, M.; Ausiello, G.; Helmer-Citterich, M.; Cesareni, G. MINT: A Molecular INTERaction Database. *FEBS Lett* **2002**, *513*, 135–140, doi:10.1016/S0014-5793(01)03293-8.
  52. Oughtred, R.; Rust, J.; Chang, C.; Breitkreutz, B.J.; Stark, C.; Willems, A.; Boucher, L.; Leung, G.; Kolas, N.; Zhang, F.; et al. The BioGRID Database: A Comprehensive Biomedical Resource of Curated Protein, Genetic, and Chemical Interactions. *Protein Science* **2021**, *30*, 187–200, doi:10.1002/pro.3978.
  53. Lee, S.A.; Chan, C.H.; Tsai, C.H.; Lai, J.M.; Wang, F.S.; Kao, C.Y.; Huang, C.Y.F. Ortholog-Based Protein-Protein Interaction Prediction and Its Application to Inter-Species Interactions. *BMC Bioinformatics* **2008**, *9*, doi:10.1186/1471-2105-9-S12-S11.
  54. Breitkopf, S.B.; Yang, X.; Begley, M.J.; Kulkarni, M.; Chiu, Y.H.; Turke, A.B.; Lauriol, J.; Yuan, M.; Qi, J.; Engelman, J.A.; et al. A Cross-Species Study of PI3K Protein-Protein Interactions Reveals the Direct Interaction of P85 and SHP2. *Sci Rep* **2016**, *6*, doi:10.1038/srep20471.
  55. Wiles, A.M.; Doderer, M.; Ruan, J.; Gu, T.T.; Ravi, D.; Blackman, B.; Bishop, A.J.R. Building and Analyzing Protein Interactome Networks by Cross-Species Comparisons. *BMC Syst Biol* **2010**, *4*, 1–16, doi:10.1186/1752-0509-4-36.
  56. Deshpande, G.P.; Hayles, J.; Hoe, K.L.; Kim, D.U.; Park, H.O.; Hartsuiker, E. Screening a Genome-Wide *S. Pombe* Deletion Library Identifies Novel Genes and Pathways Involved in Genome Stability Maintenance. *DNA Repair (Amst)* **2009**, *8*, 672–679, doi:10.1016/j.dnarep.2009.01.016.
  57. Aloy, P.; Russell, R.B. Structural Systems Biology: Modelling Protein Interactions. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2006**, *7*, 188–197, doi:10.1038/nrm1859.

58. Porter, K.A.; Desta, I.; Kozakov, D.; Vajda, S. What Method to Use for Protein–Protein Docking? *Curr Opin Struct Biol* **2019**, *55*, 1–7, doi:10.1016/j.sbi.2018.12.010.
59. Sunny, S.; Jayaraj, P.B. Protein–Protein Docking: Past, Present, and Future. *Protein Journal* **2022**, *41*, 1–26, doi:10.1007/s10930-021-10031-8.
60. Huang, S.Y. Exploring the Potential of Global Protein-Protein Docking: An Overview and Critical Assessment of Current Programs for Automatic Ab Initio Docking. *Drug Discov Today* **2015**, *20*, 969–977, doi:10.1016/j.drudis.2015.03.007.
61. Andreini, C.; Bertini, I.; Rosato, A. Metalloproteomes: A Bioinformatic Approach. *Acc Chem Res* **2009**, *42*, 1471–1479, doi:10.1021/ar900015x.
62. Iacobucci, I.; Monaco, V.; Cozzolino, F.; Monti, M. From Classical to New Generation Approaches: An Excursus of -Omics Methods for Investigation of Protein-Protein Interaction Networks. *J Proteomics* **2021**, *230*, 1–14, doi:10.1016/j.jprot.2020.103990.
63. López-Otín, C.; Bond, J.S. Proteases: Multifunctional Enzymes in Life and Disease. *Journal of Biological Chemistry* **2008**, *283*, 30433–30437, doi:10.1074/jbc.R800035200.
64. Verspurten, J.; Gevaert, K.; Declercq, W.; Vandenaabeele, P. SitePredicting the Cleavage of Proteinase Substrates. *Trends Biochem Sci* **2009**, *34*, 319–323, doi:10.1016/j.tibs.2009.04.001.
65. Kazanov, M.D.; Igarashi, Y.; Eroshkin, A.M.; Cieplak, P.; Ratnikov, B.; Zhang, Y.; Li, Z.; Godzik, A.; Osterman, A.L.; Smith, J.W. Structural Determinants of Limited Proteolysis. *J Proteome Res* **2011**, *10*, 3642–3651, doi:10.1021/pr200271w.
66. Eckhard, U.; Huesgen, P.F.; Schilling, O.; Bellac, C.L.; Butler, G.S.; Cox, J.H.; Dufour, A.; Goebeler, V.; Kappelhoff, R.; auf dem Keller, U.; et al. Active Site Specificity Profiling of the Matrix Metalloproteinase Family: Proteomic Identification of 4300 Cleavage Sites by Nine MMPs Explored with Structural and Synthetic Peptide Cleavage Analyses. *Matrix Biology* **2016**, *49*, 37–60, doi:10.1016/j.matbio.2015.09.003.
67. Kasperkiewicz, P.; Gajda, A.D.; Drag, M. Current and Prospective Applications of Non-Proteinogenic Amino Acids in Profiling of Proteases Substrate Specificity. *Biol Chem* **2012**, *393*, 843–851, doi:10.1515/hsz-2012-0167.
68. Ozols, M.; Eckersley, A.; Platt, C.I.; Stewart-Mcguinness, C.; Hibbert, S.A.; Revote, J.; Li, F.; Griffiths, C.E.M.; Watson, R.E.B.; Song, J.; et al. Predicting Proteolysis in Complex Proteomes Using Deep Learning. *Int J Mol Sci* **2021**, *22*, 1–20, doi:10.3390/ijms22063071.
69. Li, F.; Wang, Y.; Li, C.; Marquez-Lago, T.T.; Leier, A.; Rawlings, N.D.; Haffari, G.; Revote, J.; Akutsu, T.; Chou, K.C.; et al. Twenty Years of Bioinformatics Research for Protease-Specific Substrate and Cleavage Site Prediction: A Comprehensive Revisit and Benchmarking of Existing Methods. *Brief Bioinform* **2019**, *20*, 2150–2166, doi:10.1093/bib/bby077.
70. Hidayat, M.; Prahastuti, S.; Afifah, E.; Widowati, W.; Yusuf, M.; Hasan, K. The Role of Green Peas Protein Hydrolysate in TGF/SMAD Signaling to Prevent Renal Fibrosis. *J King Saud Univ Sci* **2022**, *34*, 101920, doi:10.1016/j.jksus.2022.101920.
71. Zolfaghari Emameh, R.; Kazokaitè, J.; Yakhchali, B. Bioinformatics Analysis of Extracellular Subtilisin E from *Bacillus Subtilis*. *J Biomol Struct Dyn* **2021**, *40*, 7183–7190, doi:10.1080/07391102.2021.1894979.

72. Ojha, R.; Gurjar, K.; Ratnakar, T.S.; Mishra, A.; Prajapati, V.K. Designing of a Bispecific Antibody against SARS-CoV-2 Spike Glycoprotein Targeting Human Entry Receptors DPP4 and ACE2. *Hum Immunol* **2022**, *83*, 346–355, doi:10.1016/j.humimm.2022.01.004.
73. Sohn, Y.S.; Iosub-Amir, A.; Cardenas, A.E.; Karmi, O.; Yahana, M.D.; Gruman, T.; Rowland, L.; Marjault, H.B.; Webb, L.J.; Mittler, R.; et al. A Peptide-Derived Strategy for Specifically Targeting the Mitochondria and ER of Cancer Cells: A New Approach in Fighting Cancer. *Chem Sci* **2022**, *13*, 6929–6941, doi:10.1039/d2sc01934e.
74. Paiz-Candia, B. Caracterización in Silico Del Gen Fxna de Schizosaccharomyces Pombe. Tesis de Maestría, BUAP: Puebla, México, 2012.
75. González-Esparragoza, D. Producción En E. Coli Del Fragmento C-Terminal de La Peptidasa Putativa Fxna de Schizosaccharomyces Pombe, Purificación, Obtención de Anticuerpos y Localización Subcelular. Tesis de Maestría, BUAP: Puebla, México, 2019.
76. Hu, Y.; Flockhart, I.; Vinayagam, A.; Bergwitz, C.; Berger, B.; Perrimon, N.; Mohr, S.E. An Integrative Approach to Ortholog Prediction for Disease-Focused and Other Functional Studies. *BMC Bioinformatics* **2011**, *12*, doi:10.1186/1471-2105-12-357.
77. Song, J.; Tan, H.; Perry, A.J.; Akutsu, T.; Webb, G.I.; Whisstock, J.C.; Pike, R.N. PROSPER: An Integrated Feature-Based Tool for Predicting Protease Substrate Cleavage Sites. *PLoS One* **2012**, *7*, 1–23, doi:10.1371/journal.pone.0050300.
78. Song, J.; Li, F.; Leier, A.; Marquez-Lago, T.T.; Akutsu, T.; Haffari, G.; Chou, K.C.; Webb, G.I.; Pike, R.N. PROSPERous: High-Throughput Prediction of Substrate Cleavage Sites for 90 Proteases with Improved Accuracy. *Bioinformatics* **2018**, *34*, 684–687, doi:10.1093/bioinformatics/btx670.
79. Kelley, L.A.; Mezulis, S.; Yates, C.M.; Wass, M.N.; Sternberg, M.J.E. The Phyre2 Web Portal for Protein Modeling, Prediction and Analysis. *Nat Protoc* **2015**, *10*, 845–858, doi:10.1038/nprot.2015.053.
80. Krissinel, E.; Henrick, K. Secondary-Structure Matching (SSM), a New Tool for Fast Protein Structure Alignment in Three Dimensions. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **2004**, *60*, 2256–2268, doi:10.1107/S09074444904026460.
81. Laskowski, R.A.; MacArthur, M.W.; Moss, D.S.; Thornton, J.M. Computer Programs PROCHECK: A Program to Check the Stereochemical Quality of Protein Structures. *J Appl Crystallogr* **1993**, *26*, 283–291, doi:10.1107/S0021889892009944.
82. Julian, A.T.; Mascarenhas Dos Santos, A.C.; Pombert, J.F. 3DFI: A Pipeline to Infer Protein Function Using Structural Homology. *Bioinformatics Advances* **2021**, *1*, doi:10.1093/bioadv/vbab030.
83. Read, R.J.; Adams, P.D.; Arendall, W.B.; Brunger, A.T.; Emsley, P.; Joosten, R.P.; Kleywegt, G.J.; Krissinel, E.B.; Lütke, T.; Otwinowski, Z.; et al. A New Generation of Crystallographic Validation Tools for the Protein Data Bank. *Structure* **2011**, *19*, 1395–1412, doi:10.1016/j.str.2011.08.006.
84. David, A.; Islam, S.; Tankhilevich, E.; Sternberg, M.J.E. The AlphaFold Database of Protein Structures: A Biologist’s Guide. *J Mol Biol* **2022**, *434*, 167336, doi:10.1016/j.jmb.2021.167336.
85. Hornbeck, P. V.; Kornhauser, J.M.; Tkachev, S.; Zhang, B.; Skrzypek, E.; Murray, B.; Latham, V.; Sullivan, M. PhosphoSitePlus: A Comprehensive Resource for Investigating the Structure and Function of Experimentally Determined Post-Translational

- Modifications in Man and Mouse. *Nucleic Acids Res* **2012**, *40*, D261–D270, doi:10.1093/nar/gkr1122.
86. Blom, N.; Sicheritz-Pontén, T.; Gupta, R.; Gammeltoft, S.; Brunak, S. Prediction of Post-Translational Glycosylation and Phosphorylation of Proteins from the Amino Acid Sequence. *Proteomics* **2004**, *4*, 1633–1649, doi:10.1002/pmic.200300771.
  87. Xu, Y.; Song, J.; Wilson, C.; Whisstock, J.C. PhosContext2vec: A Distributed Representation of Residue-Level Sequence Contexts and Its Application to General and Kinase-Specific Phosphorylation Site Prediction. *Sci Rep* **2018**, *8*, doi:10.1038/s41598-018-26392-7.
  88. Lin, Y.F.; Cheng, C.W.; Shih, C.S.; Hwang, J.K.; Yu, C.S.; Lu, C.H. MIB: Metal Ion-Binding Site Prediction and Docking Server. *J Chem Inf Model* **2016**, *56*, 2287–2291, doi:10.1021/acs.jcim.6b00407.
  89. Bhachoo, J.; Beuming, T. Investigating Protein–Peptide Interactions Using the Schrödinger Computational Suite. *Methods in Molecular Biology* **2017**, *1561*, 235–254, doi:10.1007/978-1-4939-6798-8\_14.
  90. Carrasco-Carballo, A.; Mendoza-Lara, D.F.; Rojas-Morales, J.A.; Alatrister, V.; Merino-Montiel, P.; Luna, F.; Sandoval-Ramirez, J. In Silico Study of Coumarins Derivatives With Potential Use in Systemic Diseases. *Biointerface Res Appl Chem* **2023**, *13*, 1–21, doi:10.33263/BRIAC133.240.
  91. Pettersen, E.F.; Goddard, T.D.; Huang, C.C.; Couch, G.S.; Greenblatt, D.M.; Meng, E.C.; Ferrin, T.E. UCSF Chimera - A Visualization System for Exploratory Research and Analysis. *J Comput Chem* **2004**, *25*, 1605–1612, doi:10.1002/jcc.20084.
  92. Kozakov, D.; Hall, D.R.; Xia, B.; Porter, K.A.; Padhorny, D.; Yueh, C.; Beglov, D.; Vajda, S. The ClusPro Web Server for Protein–Protein Docking. *Nat Protoc* **2017**, *12*, 255–278, doi:10.1038/nprot.2016.169.
  93. Schrödinger Release 2023-2b: BioLuminate, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2021.
  94. Jones, G.; Jindal, A.; Ghani, U.; Kotelnikov, S.; Egbert, M.; Hashemi, N.; Vajda, S.; Padhorny, D.; Kozakov, D. Elucidation of Protein Function Using Computational Docking and Hotspot Analysis by ClusPro and FTMap. *Acta Crystallogr D Struct Biol* **2022**, *78*, 690–697, doi:10.1107/S2059798322002741.
  95. Laskowski, R.A.; Swindells, M.B. LigPlot+: Multiple Ligand-Protein Interaction Diagrams for Drug Discovery. *J Chem Inf Model* **2011**, *51*, 2778–2786, doi:10.1021/ci200227u.
  96. Schrödinger Release 2023-2b: WaterMap, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2021.
  97. Biswal, J.; Jayaprakash, P.; Rayala, S.K.; Venkatraman, G.; Rangaswamy, R.; Jeyaraman, J. WaterMap and Molecular Dynamic Simulation-Guided Discovery of Potential PAK1 Inhibitors Using Repurposing Approaches. *ACS Omega* **2021**, *6*, 26829–26845, doi:10.1021/acsomega.1c02032.
  98. Sobhia, M.E.; Ghosh, K.; Sivangula, S.; Kumar, S.; Singh, H. Identification of Potential SARS-CoV-2 Mpro Inhibitors Integrating Molecular Docking and Water Thermodynamics. *J Biomol Struct Dyn* **2022**, *40*, 5079–5089, doi:10.1080/07391102.2020.1867642.
  99. Schrödinger Release 2024-1: Desmond Molecular Dynamics System, D. E. Shaw Research, New York, NY, 2024. Maestro-Desmond Interoperability Tools, Schrödinger, New York, NY, 2024.

100. Bowers, K.J.; Chow, E.; Xu, H.; Dror, R.O.; Eastwood, M.P.; Gregersen, B.A.; Klepeis, J.L.; Kolossvary, I.; Moraes, M.A.; Sacerdoti, F.D.; et al. Scalable Algorithms for Molecular Dynamics Simulations on Commodity Clusters. *Proceedings of the 2006 ACM/IEEE Conference on Supercomputing, SC'06, Tampa, Florida* **2006**, 11–17, doi:10.1145/1188455.1188544.
101. Iqbal, D.; Rehman, M.T.; Alajmi, M.F.; Alsaweed, M.; Jamal, Q.M.S.; Alasiry, S.M.; Albaker, A.B.; Hamed, M.; Kamal, M.; Albadrani, H.M. Multitargeted Virtual Screening and Molecular Simulation of Natural Product-like Compounds against GSK3 $\beta$ , NMDA-Receptor, and BACE-1 for the Management of Alzheimer's Disease. *Pharmaceuticals* **2023**, *16*, doi:10.3390/ph16040622.
102. Zhu, Y.; Xie, M.; Meng, Z.; Leung, L.K.; Chan, F.L.; Hu, X.; Chi, K.; Liu, C.; Yao, X. Knockdown of TM9SF4 Boosts ER Stress to Trigger Cell Death of Chemoresistant Breast Cancer Cells. *Oncogene* **2019**, *38*, 5778–5791, doi:10.1038/s41388-019-0846-y.
103. Sun, J.; Ren, D. IER3IP1 Deficiency Leads to Increased  $\beta$ -Cell Death and Decreased  $\beta$ -Cell Proliferation. *Oncotarget* **2017**, *8*, 56768–56779, doi:10.18632/oncotarget.18179.
104. Lounis, M.A.; Lalonde, S.; Rial, S.A.; Bergeron, K.F.; Ralston, J.C.; Mutch, D.M.; Mounier, C. Hepatic BSCL2 (Seipin) Deficiency Disrupts Lipid Droplet Homeostasis and Increases Lipid Metabolism via SCD1 Activity. *Lipids* **2017**, *52*, 129–150, doi:10.1007/s11745-016-4210-5.
105. Rallis, C.; Townsend, S.; Bähler, J. Genetic Interactions and Functional Analyses of the Fission Yeast Gsk3 and Amk2 Single and Double Mutants Defective in TORC1-Dependent Processes. *Sci Rep* **2017**, *7*, 1–10, doi:10.1038/srep44257.
106. Hornbeck, P. V.; Zhang, B.; Murray, B.; Kornhauser, J.M.; Latham, V.; Skrzypek, E. PhosphoSitePlus, 2014: Mutations, PTMs and Recalibrations. *Nucleic Acids Res* **2015**, *43*, D512–D520, doi:10.1093/nar/gku1267.
107. Tsai, C.-F.; Wang, Y.-T.; Yen, H.-Y.; Tsou, C.-C.; Ku, W.-C.; Lin, P.-Y.; Chen, H.-Y.; Nesvizhskii, A.I.; Ishihama, Y.; Chen, Y.-J. Large-Scale Determination of Absolute Phosphorylation Stoichiometries in Human Cells by Motif-Targeting Quantitative Proteomics. *Nat Commun* **2015**, *6*, 6622, doi:10.1038/ncomms7622.
108. Kim, W.; Bennett, E.J.; Huttlin, E.L.; Guo, A.; Li, J.; Possemato, A.; Sowa, M.E.; Rad, R.; Rush, J.; Comb, M.J.; et al. Systematic and Quantitative Assessment of the Ubiquitin-Modified Proteome. *Mol Cell* **2011**, *44*, 325–340, doi:10.1016/j.molcel.2011.08.025.
109. Lumpkin, R.J.; Gu, H.; Zhu, Y.; Leonard, M.; Ahmad, A.S.; Clauser, K.R.; Meyer, J.G.; Bennett, E.J.; Komives, E.A. Site-Specific Identification and Quantitation of Endogenous SUMO Modifications under Native Conditions. *Nat Commun* **2017**, *8*, doi:10.1038/s41467-017-01271-3.
110. Jumper, J.; Evans, R.; Pritzel, A.; Green, T.; Figurnov, M.; Ronneberger, O.; Tunyasuvunakool, K.; Bates, R.; Žídek, A.; Potapenko, A.; et al. Highly Accurate Protein Structure Prediction with AlphaFold. *Nature* **2021**, *596*, 583–589, doi:10.1038/s41586-021-03819-2.
111. Desmarais, W.; Bienvenue, D.L.; Bzymek, K.P.; Petsko, G.A.; Ringe, D.; Holz, R.C. The High-Resolution Structures of the Neutral and the Low PH Crystals of Aminopeptidase from *Aeromonas Proteolytica*. *Journal of Biological Inorganic Chemistry* **2006**, *11*, 398–408, doi:10.1007/s00775-006-0093-x.

112. Rawlings, N.D.; Barrett, A.J.; Thomas, P.D.; Huang, X.; Bateman, A.; Finn, R.D. The MEROPS Database of Proteolytic Enzymes, Their Substrates and Inhibitors in 2017 and a Comparison with Peptidases in the PANTHER Database. *Nucleic Acids Res* **2018**, *46*, D624–D632, doi:10.1093/nar/gkx1134.
113. Auld, D.S. Catalytic Mechanisms for Metallopeptidases. *Handbook of Proteolytic Enzymes* **2013**, *1*, 370–396, doi:10.1016/B978-0-12-382219-2.00078-8.
114. Laskowski, R.A.; Furnham, N.; Thornton, J.M. The Ramachandran Plot and Protein Structure Validation. *Biomolecular Forms and Functions* **2013**, 62–75, doi:10.1142/9789814449144\_0005.
115. Holz, R.C. The Aminopeptidase from *Aeromonas Proteolytica*: Structure and Mechanism of Co-Catalytic Metal Centers Involved in Peptide Hydrolysis. *Coord Chem Rev* **2002**, *232*, 5–26, doi:10.1016/S0010-8545(01)00470-2.
116. Richards, A.L.; Eckhardt, M.; Krogan, N.J. Mass Spectrometry-based Protein–Protein Interaction Networks for the Study of Human Diseases. *Mol Syst Biol* **2021**, *17*, 1–18, doi:10.15252/msb.20188792.
117. Hiller, O.; Lichte, A.; Oberpichler, A.; Kocourek, A.; Tschesche, H. Matrix Metalloproteinases Collagenase-2, Macrophage Elastase, Collagenase-3, and Membrane Type 1-Matrix Metalloproteinase Impair Clotting by Degradation of Fibrinogen and Factor XII. *Journal of Biological Chemistry* **2000**, *275*, 33008–33013, doi:10.1074/jbc.M001836200.
118. Zhang, W.; Meng, Q.; Tang, J.; Guo, F. Exploring Effectiveness of Ab-Initio Protein-Protein Docking Methods on a Novel Antibacterial Protein Complex Dataset. *Brief Bioinform* **2021**, *22*, 1–13, doi:10.1093/bib/bbab150.
119. González-Esparragoza, D.; Carrasco-Carballo, A.; Rosas-Murrieta, N.H.; Millán-Pérez-Peña, L.; Herrera-Camacho, I. In Silico Analysis for Metalloenzyme-Protein Interactions Applied to MMP8-Fibronectin 1 and MMP12-Factor XII. *Life in Silico* **2023**, *1*, 26–33.
120. Shiba, T.; Koga, H.; Shin, H.-W.; Kawasaki, M.; Kato, R.; Nakayama, K.; Wakatsuki, S. Structural Basis for Rab11-Dependent Membrane Recruitment of a Family of Rab11-Interacting Protein 3 (FIP3) Arfophilin-1. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2006**, *103*, 15416–15421, doi:10.1073/pnas.0605357103.
121. Kumar, P.; Wolberger, C. Structure of the Yeast Bre1 RING Domain. *Proteins: Structure, Function and Bioinformatics* **2015**, *83*, 1185–1190, doi:10.1002/prot.24812.
122. Wu, J.; Wang, Y.; Gan, J.; Wang, W.; Sun, B.; Huang, Z.X.; Xia, Z.X. Structures of Cytochrome B5 Mutated at the Charged Surface-Residues and Their Interactions with Cytochrome c. *Chin J Chem* **2002**, *2*, 1225–1234, doi:10.1002/cjoc.20020201114.
123. Dohm, J.A.; Lee, S.J.; Hardwick, J.M.; Hill, R.B.; Gittis, A.G. Cytosolic Domain of the Human Mitochondrial Fission Protein Fis1 Adopts a TPR Fold. *Proteins: Structure, Function and Genetics* **2004**, *54*, 153–156, doi:10.1002/prot.10524.
124. Zhang, Y.; Inoue, M.; Tsutsumi, A.; Watanabe, S.; Nishizawa, T.; Nagata, K.; Kikkawa, M.; Inaba, K. Cryo-EM Structures of SERCA2b Reveal the Mechanism of Regulation by the Luminal Extension Tail. *Sci Adv* **2020**, *6*, eabb0147, doi:10.1126/sciadv.abb0147.
125. Oldfield, C.J.; Dunker, A.K. Intrinsically Disordered Proteins and Intrinsically Disordered Protein Regions. *Annu Rev Biochem* **2014**, *83*, 553–584, doi:10.1146/annurev-biochem-072711-164947.

126. Ruff, K.M.; Pappu, R. V. AlphaFold and Implications for Intrinsically Disordered Proteins. *J Mol Biol* **2021**, *433*, 1–11, doi:10.1016/J.JMB.2021.167208.
127. Hartmann, M.; Clark, T.; Van Eldik, R. Hydration and Water Exchange of Zinc (II) Ions. Application of Density Functional Theory. *J Am Chem Soc* **1997**, *119*, 7843–7850, doi:10.1021/ja970483f.
128. Zhao, M.; Wang, H.B.; Ji, L.N.; Mao, Z.W. Insights into Metalloenzyme Microenvironments: Biomimetic Metal Complexes with a Functional Second Coordination Sphere. *Chem Soc Rev* **2013**, *42*, 8360–8375, doi:10.1039/c3cs60162e.
129. Zastrow, M.L.; Pecoraro, V.L. Designing Hydrolytic Zinc Metalloenzymes. *Biochemistry* **2014**, *53*, 957–978, doi:10.1021/bi4016617.
130. Vilella, A.J.; Severin, J.; Ureta-Vidal, A.; Heng, L.; Durbin, R.; Birney, E. EnsemblCompara GeneTrees: Complete, Duplication-Aware Phylogenetic Trees in Vertebrates. *Genome Res* **2009**, *19*, 327–335, doi:10.1101/gr.073585.107.
131. Fujita, M.; Maeda, Y.; Ra, M.; Yamaguchi, Y.; Taguchi, R.; Kinoshita, T. GPI Glycan Remodeling by PGAP5 Regulates Transport of GPI-Anchored Proteins from the ER to the Golgi. *Cell* **2009**, *139*, 352–365, doi:10.1016/j.cell.2009.08.040.
132. Rhind, N.; Chen, Z.; Yassour, M.; Thompson, D.A.; Haas, B.J.; Habib, N.; Wapinski, I.; Roy, S.; Lin, M.F.; Heiman, D.I.; et al. Comparative Functional Genomics of the Fission Yeasts. *Science (1979)* **2011**, *332*, 930–936, doi:10.1126/science.1203357.
133. Yu, L.; Xie, M.; Zhang, F.; Wan, C.; Yao, X. TM9SF4 Is a Novel Regulator in Lineage Commitment of Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells to Either Osteoblasts or Adipocytes. *Stem Cell Res Ther* **2021**, *12*, 1–16, doi:10.1186/s13287-021-02636-8.
134. Hooli, B. V.; Kovacs-Vajna, Z.M.; Mullin, K.; Blumenthal, M.A.; Mattheisen, M.; Zhang, C.; Lange, C.; Mohapatra, G.; Bertram, L.; Tanzi, R.E. Rare Autosomal Copy Number Variations in Early-Onset Familial Alzheimer’s Disease. *Mol Psychiatry* **2014**, *19*, 676–681, doi:10.1038/mp.2013.77.
135. Lieberman, H.B.; Hopkins, K.M.; Nass, M.; Demetrick, D.; Davey, S. A Human Homolog of the Schizosaccharomyces Pombe Rad9 Checkpoint Control Gene. *Genetics* **1996**, *93*, 13890–13895, doi:10.1073/pnas.93.24.13890.
136. Lieberman, H.B. Rad9, an Evolutionarily Conserved Gene with Multiple Functions for Preserving Genomic Integrity. *J Cell Biochem* **2006**, *97*, 690–697, doi:10.1002/jcb.20759.
137. Roguev, A.; Bandyopadhyay, S.; Zofall, M.; Zhang, K.; Fischer, T.; Collins, S.R.; Qu, H.; Shales, M.; Park, H.-O.; Hayles, J.; et al. Conservation and Rewiring of Functional Modules Revealed by an Epistasis Map in Fission Yeast. *Science (1979)* **2008**, *322*, 405–410, doi:10.1126/science.1162609.
138. VanderSluis, B.; Costanzo, M.; Billmann, M.; Ward, H.N.; Myers, C.L.; Andrews, B.J.; Boone, C. Integrating Genetic and Protein–Protein Interaction Networks Maps a Functional Wiring Diagram of a Cell. *Curr Opin Microbiol* **2018**, *45*, 170–179, doi:10.1016/j.mib.2018.06.004.
139. Bouhaddou, M.; Eckhardt, M.; Chi Naing, Z.Z.; Kim, M.; Ideker, T.; Krogan, N.J. Mapping the Protein–Protein and Genetic Interactions of Cancer to Guide Precision Medicine. *Curr Opin Genet Dev* **2019**, *54*, 110–117, doi:10.1016/j.gde.2019.04.005.
140. Corazzari, M.; Gagliardi, M.; Fimia, G.M.; Piacentini, M. Endoplasmic Reticulum Stress, Unfolded Protein Response, and Cancer Cell Fate. *Front Oncol* **2017**, *7*, 1–11, doi:10.3389/fonc.2017.00078.

141. Lustoza, A.C.D.M.; Palma, L.M.; Façanha, A.R.; Okorokov, L.A.; Okorokova-Façanha, A.L. P 5a-Type ATPase Cta4p Is Essential for Ca<sup>2+</sup> Transport in the Endoplasmic Reticulum of *Schizosaccharomyces Pombe*. *PLoS One* **2011**, *6*, doi:10.1371/journal.pone.0027843.
142. Chevrier, B.; D'Orchymont, H.; Schalk, C.; Tarnus, C.; Moras, D. The Structure of the *Aeromonas Proteolytica* Aminopeptidase Complexed with a Hydroxamate Inhibitor: Involvement in Catalysis of Glu151 and Two Zinc Ions of the Co-Catalytic Unit. *Eur J Biochem* **1996**, *237*, 393–398, doi:10.1111/j.1432-1033.1996.0393k.x.
143. Robertson, H.; Hayes, J.D.; Sutherland, C. A Partnership with the Proteasome; the Destructive Nature of GSK3. *Biochem Pharmacol* **2018**, *147*, 77–92, doi:10.1016/j.bcp.2017.10.016.
144. Hermida, M.A.; Dinesh Kumar, J.; Leslie, N.R. GSK3 and Its Interactions with the PI3K/AKT/MTOR Signalling Network. *Adv Biol Regul* **2017**, *65*, 5–15, doi:10.1016/j.jbior.2017.06.003.
145. Mancinelli, R.; Carpino, G.; Petrungraro, S.; Mammola, C.L.; Tomaipitınca, L.; Filippini, A.; Facchiano, A.; Ziparo, E.; Giampietri, C. Multifaceted Roles of GSK-3 in Cancer and Autophagy-Related Diseases. *Oxid Med Cell Longev* **2017**, *2017*, doi:10.1155/2017/4629495.
146. Plyte, S.E.; Feoktistova, A.; Burke, J.D.; Woodgett, J.R.; Gould, K.L. *Schizosaccharomyces Pombe* Skp1 Encodes a Protein Kinase Related to Mammalian Glycogen Synthase Kinase 3 and Complements a Cdc14 Cytokinesis Mutant. *Mol Cell Biol* **1996**, *16*, 179–191, doi:10.1128/MCB.16.1.179.
147. Manning, B.D.; Toker, A. AKT/PKB Signaling: Navigating the Network. *Cell* **2017**, *169*, 381–405, doi:10.1016/j.cell.2017.04.001.
148. Mahrus, S.; Trinidad, J.C.; Barkan, D.T.; Sali, A.; Burlingame, A.L.; Wells, J.A. Global Sequencing of Proteolytic Cleavage Sites in Apoptosis by Specific Labeling of Protein N Termini. *Cell* **2008**, *134*, 866–876, doi:10.1016/j.cell.2008.08.012.
149. Timmer, J.C.; Zhu, W.; Pop, C.; Regan, T.; Snipas, S.J.; Eroshkin, A.M.; Riedl, S.J.; Salvesen, G.S. Structural and Kinetic Determinants of Protease Substrates. *Nat Struct Mol Biol* **2009**, *16*, 1101–1108, doi:10.1038/nsmb.1668.
150. Yasuhara, T.; Nakai, T.; Ohashi, A. Aminopeptidase Y, a New Aminopeptidase from *Saccharomyces Cerevisiae*. Purification, Properties, Localization, and Processing by Protease B. *Journal of Biological Chemistry* **1994**, *269*, 13644–13650, doi:10.1016/s0021-9258(17)36878-3.
151. Hitzerd, S.M.; Verbrugge, S.E.; Ossenkoppele, G.; Jansen, G.; Peters, G.J. Positioning of Aminopeptidase Inhibitors in next Generation Cancer Therapy. *Amino Acids* **2014**, *46*, 793–808, doi:10.1007/s00726-013-1648-0.
152. Holstein, S.A.; Heckman, C.A.; Davies, F.E.; Morgan, G.J.; Gelius, S.S.; Lehmann, F. Aminopeptidases in Cancer, Biology and Prospects for Pharmacological Intervention. *Curr Cancer Drug Targets* **2022**, *23*, 25–46, doi:10.2174/1568009622666220623112605.
153. Polaina, Julio.; MacCabe, A.P. Industrial Enzymes: Structure, Function and Applications. In; Springer, 2007; pp. 243–260 ISBN 9781402053771.
154. Mina-Osorio, P. The Moonlighting Enzyme CD13: Old and New Functions to Target. *Trends Mol Med* **2008**, *14*, 361–371, doi:10.1016/j.molmed.2008.06.003.

155. Moore, H.E.; Davenport, E.L.; Smith, E.M.; Muralikrishnan, S.; Dunlop, A.S.; Walker, B.A.; Krige, D.; Drummond, A.H.; Hooftman, L.; Morgan, G.J.; et al. Aminopeptidase Inhibition as a Targeted Treatment Strategy in Myeloma. *Mol Cancer Ther* **2009**, *8*, 762–770, doi:10.1158/1535-7163.MCT-08-0735.
156. Qi, L.; Tsai, B.; Arvan, P. New Insights into the Physiological Role of Endoplasmic Reticulum-Associated Degradation. *Trends Cell Biol* **2017**, *27*, 430–440.
157. Clarke, D.M.; Loo, T.W.; Inesi, G.; MacLennan, D.H. Location of High Affinity Ca<sup>2+</sup> +-Binding Sites within the Predicted Transmembrane Domain of the Sarco-Plasmic Reticulum Ca<sup>2+</sup>-ATPase. *Nature* **1989**, *339*, 476–478, doi:10.1038/339476a0.
158. Carreras-Sureda, A.; Pihán, P.; Hetz, C. Calcium Signaling at the Endoplasmic Reticulum: Fine-Tuning Stress Responses. *Cell Calcium* **2018**, *70*, 24–31, doi:10.1016/j.ceca.2017.08.004.
159. Bootman, M.D.; Bultynck, G. Fundamentals of Cellular Calcium Signaling: A Primer. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **2020**, *12*, doi:10.1101/cshperspect.a038802.
160. Berridge, M.J.; Lipp, P.; Bootman, M.D. The Versatility and Universality of Calcium Signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2000**, *1*, 11–21, doi:10.1038/35036035.
161. Ulengin-Talkish, I.; Cyert, M.S. A Cellular Atlas of Calcineurin Signaling. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res* **2023**, *1870*, doi:10.1016/j.bbamcr.2022.119366.
162. Bi, J.; Wang, W.; Liu, Z.; Hueng, X.; Jiang, Q.; Liu, G.; Wang, Y.; Huang, X. Seipin Promotes Adipose Tissue Fat Storage through the ER Ca<sup>2+</sup>-ATPase SERCA. *Cell Metab* **2014**, *19*, 861–871, doi:10.1016/j.cmet.2014.03.028.
163. Ito, D.; Suzuki, N. Molecular Pathogenesis of Seipin/BSCL2-Related Motor Neuron Diseases. *Ann Neurol* **2007**, *61*, 237–250, doi:10.1002/ana.21070.
164. Ito, D.; Suzuki, N. Seipinopathy: A Novel Endoplasmic Reticulum Stress-Associated Disease. *Brain* **2009**, *132*, 8–15, doi:10.1093/brain/awn216.
165. Földi, I.; Tóth, A.M.; Szabó, Z.; Mózes, E.; Berkecz, R.; Datki, Z.L.; Penke, B.; Janáky, T. Proteome-Wide Study of Endoplasmic Reticulum Stress Induced by Thapsigargin in N2a Neuroblastoma Cells. *Neurochem Int* **2013**, *62*, 58–69, doi:10.1016/j.neuint.2012.11.003.
166. Bik, E.; Mielniczek, N.; Jarosz, M.; Denbigh, J.; Budzynska, R.; Baranska, M.; Majzner, K. Tunicamycin Induced Endoplasmic Reticulum Changes in Endothelial Cells Investigated: In Vitro by Confocal Raman Imaging. *Analyst* **2019**, *144*, 6561–6569, doi:10.1039/c9an01456j.
167. Ashrafizadeh, M.; Ahmadi, Z.; Samarghandian, S.; Mohammadinejad, R.; Yaribeygi, H.; Sathyapalan, T.; Sahebkar, A. MicroRNA-Mediated Regulation of Nrf2 Signaling Pathway: Implications in Disease Therapy and Protection against Oxidative Stress. *Life Sci* **2020**, *244*, doi:10.1016/j.lfs.2020.117329.
168. Guo, L.; Ghassemian, M.; Komives, E.A.; Russell, P. Cadmium-Induced Proteome Remodeling Regulated by Spc1/Sty1 and Zip1 in Fission Yeast. *Toxicological Sciences* **2012**, *129*, 200–212, doi:10.1093/toxsci/kfs179.
169. Suzuki, T.; Bridges, D.; Nakada, D.; Skiniotis, G.; Morrison, S.J.; Lin, J.D.; Saitel, A.R.; Inoki, K. Inhibition of AMPK Catabolic Action by GSK3. *Mol Cell* **2013**, *50*, 407–419, doi:10.1016/j.molcel.2013.03.022.Inhibition.

170. Xiao, B.; Sanders, M.J.; Carmena, D.; Bright, N.J.; Haire, L.F.; Underwood, E.; Patel, B.R.; Heath, R.B.; Walker, P.A.; Hallen, S.; et al. Structural Basis of AMPK Regulation by Small Molecule Activators. *Nat Commun* **2013**, *4*, doi:10.1038/ncomms4017.
171. Cetrullo, S.; D'Adamo, S.; Tantini, B.; Borzi, R.M.; Flamigni, F. MTOR, AMPK, and Sirt1: Key Players in Metabolic Stress Management. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* **2015**, *25*, 59–75, doi:10.1615/CritRevEukaryotGeneExpr.2015012975.
172. Evangelisti, C.; Chiarini, F.; Paganelli, F.; Marmioli, S.; Martelli, A.M. Crosstalks of GSK3 Signaling with the MTOR Network and Effects on Targeted Therapy of Cancer. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res* **2020**, *1867*, 118635, doi:10.1016/j.bbamcr.2019.118635.
173. Leclerc, G.M.; Leclerc, G.J.; Kuznetsov, J.N.; DeSalvo, J.; Barredo, J.C. Metformin Induces Apoptosis through AMPK-Dependent Inhibition of UPR Signaling in ALL Lymphoblasts. *PLoS One* **2013**, *8*, doi:10.1371/journal.pone.0074420.
174. Mihaylova, M.M.; Shaw, R.J. The AMPK Signalling Pathway Coordinates Cell Growth, Autophagy and Metabolism. *Nat Cell Biol* **2011**, *13*, 1016–1023, doi:10.1038/ncb2329.
175. Nie, T.; Yang, S.; Ma, H.; Zhang, L.; Lu, F.; Tao, K.; Wang, R.; Yang, R.; Huang, L.; Mao, Z.; et al. Regulation of ER Stress-Induced Autophagy by GSK3B-TIP60-ULK1 Pathway. *Cell Death Dis* **2016**, *7*, e2563, doi:10.1038/cddis.2016.423.
176. Meares, G.P.; Mines, M.A.; Beurel, E.; Eom, T.Y.; Song, L.; Zmijewska, A.A.; Jope, R.S. Glycogen Synthase Kinase-3 Regulates Endoplasmic Reticulum (ER) Stress-Induced CHOP Expression in Neuronal Cells. *Exp Cell Res* **2011**, *317*, 1621–1628, doi:10.1016/j.yexcr.2011.02.012.

### 13. ANEXOS (PREPARACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO Y SOLUCIONES)

#### Medio rico YE

- ❖ 5 g/L Extracto de levadura
- ❖ 2 % Glucosa

(Si se requiere medio sólido, agregar 2 % de agar bacteriológico). Esterilizar en autoclave a 15 psi durante 15 minutos).

#### Medio mínimo YNB

- ❖ 6.7 g/L YNB DIFCO sin aminoácidos
- ❖ 1 g/L Acetato de sodio
- ❖ 0.9 g/L Cloruro de potasio
- ❖ 2 % Glucosa
- ❖ Suplementos (vitaminas 1X y aminoácidos 1X)

(Si se requiere medio sólido, agregar 2 % de agar bacteriológico). Esterilizar en autoclave a 15 psi durante 15 minutos).

#### Vitaminas 1000X

- ❖ 0.1 % Ácido pantoténico
- ❖ 1 % Ácido nicótico
- ❖ 1 % Inositol
- ❖ 0.01 % Biotina

La solución es fotosensible por lo que se recomienda preparar en frasco ámbar. Esterilizar por filtración.

#### Aminoácidos 50X

Preparar 11.25 mg/mL de cada componente:

- ❖ Adenina
- ❖ Histidina
- ❖ Leucina
- ❖ Uracilo
- ❖ Lisina

Esterilizar por filtración.

### **Buffer de Zimoliasa**

- ❖ 50 mM a pH 5.6 Ácido cítrico
- ❖ 450 mM a pH 5.6 Na<sub>2</sub>HPO
- ❖ 40 mM a pH 8 EDTA
- ❖ 1.2 M Sorbitol

Esterilizar en autoclave a 15 psi /15 min y almacenar a 4 °C.

### **Tapsigargina (SIGMA-ALDRICH)**

Preparar stock 10 mM

- ❖ 1 mg de Tapsigargina
- ❖ Disolver en 153 µl de DMSO estéril

Mezclar y almacenar a -20°C.

### **Tunicamicina (SIGMA-ALDRICH)**

Preparar stock 1 mg/mL

- ❖ 1 mg de Tunicamicina
- ❖ Disolver en 1 mL de DMSO estéril

Mezclar y almacenar a -20°C.

### **DTT (SIGMA-ALDRICH)**

Preparar stock 1 M

- ❖ 0.1545 g de DTT
- ❖ Disolver en 1 mL de Agua estéril

Mezclar y almacenar a -20°C.

### **AGUA DEPC 0.1%**

Preparar 100 mL

- ❖ 0.1 % DEPC
- ❖ 100 mL Agua tridestilada

Esterilizar 3 veces en autoclave a 15 psi /15 min y almacenar a temperatura ambiente.

## 14. CONGRESOS NACIONALES Y PUBLICACIONES



**Sociedad Mexicana de  
Biotecnología y Bioingeniería**



**XIX CONGRESO NACIONAL  
DE BIOTECNOLOGÍA Y BIOINGENIERÍA**  
MODALIDAD  
VIRTUAL  
27 SEPTIEMBRE - 1º OCTUBRE, 2021

OTORGA LA PRESENTE

# CONSTANCIA

A:  
González Esparragoza Dalia, Rosas Murrieta Nora, Millán Pérez Peña Lourdes, Luna Morales Félix, Herrera  
Camacho Irma

Por la presentación del e-póster:  
Predicción de interacciones proteína-proteína de la metaloproteasa Ermp1 de Schizosaccharomyces pombe mediante  
herramientas bioinformáticas

en el XIX Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería,  
27 de septiembre - 1º de octubre, 2021

  
Dr. Jaime Ortega López  
PRESIDENTE SMBB

  
Dra. Romina Rodríguez Sanoja  
PRESIDENTA COMITÉ ORGANIZADOR

  
Dr. Alvaro R. Lara  
PRESIDENTE COMITÉ CIENTÍFICO



Sociedad Mexicana de  
Bioquímica A.C.



SACRAMENTO NO. 413  
COL. INSURGENTES BORJA  
DEL. BENITO JUÁREZ  
CP. 03100  
CDMX  
TEL. (55)56225742  
WWW.SMB.ORG.MX  
FACEBOOK:  
facebook.com/RedSMB

MESA DIRECTIVA 2021-2023

**PRESIDENTA**  
Dra. Soledad María Teresa Hernández  
Sotomayor

**VICEPRESIDENTE**  
Dr. Agustín Guerrero Hernández

**SECRETARIA TEGORERA**  
Dra. Bertha María Josefina González Pedrajo

**SUBSECRETARIA TEGORERA**  
Dra. María de Lourdes Girard Cuesy

**SOCIOS FUNDADORES**

Dr. Barbarín Arreguín Lozano  
Dr. Edmundo Calvo Cuadrilla  
Dr. Guillermo Canvajal Sandoval  
Dr. Joaquín Cravito  
Dr. Carlos del Río Estrada  
Dr. Silvestre Frenk Freund  
Dr. Mario García Hernández  
Dr. Jesús Guzmán García  
Dr. Jesús Kumate Rodríguez  
Dr. José Laguna García  
Dr. Guillermo Massieu Heiguera  
Dr. Raúl Ondarza Vidaurreta  
Dr. Efraín S. Pardo Godina  
Dr. Guillermo Soberón Acevedo

Se otorga la presente

## CONSTANCIA a:

Dalia González Esparragoza

Quien asistió y presentó el trabajo:

### Prediction of protein-protein interactions and molecular docking of the putative protein Ermp1 from the yeast *S. pombe*

Por: González Esparragoza Dalia, Carrasco Carballo Alan,  
Rosas Murrieta Nora, Millán Pérez Peña Lourdes,  
Luna Morales Félix, Herrera Camacho Irma

En la modalidad de cartel durante el  
XXXIII Congreso Nacional de Bioquímica  
16 - 21 de octubre de 2022, Mérida, Yucatán

Atentamente  
Por el Comité Organizador

Dra. Teresa Hernández Sotomayor  
Presidenta





Se otorga la presente

CONSTANCIA a:

*Dalia González Esparragoza*

Por su asistencia y presentación del trabajo titulado:

**Functional role of the metalloprotease Ermp1 from *Schizosaccharomyces pombe* in the stress response in endoplasmic reticulum**

Por:

Dalia González Esparragoza, Alan Carrasco Carballo, Nora Rosas Murrieta,  
Lourdes Millán Pérez Peña, Félix Morales Luna, Irma Herrera Camacho

En la modalidad de cartel en el XIV Congreso de la Rama de Biología Molecular  
y Celular de Hongos, 15 - 19 de octubre de 2023, Guadalajara, Jal.

Atentamente

Por el Comité Organizador

Dra. Alicia González Manjarrez



## RESEARCH ARTICLE

## OPEN ACCESS

## In silico analysis for metalloenzyme-protein interactions applied to MMP8-Fibronectin 1 and MMP12-Factor XII

Dalia González-Esparragoza<sup>a,b</sup>, Alan Carrasco-Carballo<sup>c</sup>, Nora H. Rosas-Murrieta<sup>a</sup>,  
Lourdes Millán-Pérez-Peña<sup>a</sup>, Irma Herrera-Camacho<sup>a\*</sup>

<sup>a</sup> Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, Instituto de Ciencias, Centro de Química, Laboratorio de Bioquímica y Biología Molecular, México

<sup>b</sup> Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, Posgrado en Ciencias Químicas, México

<sup>c</sup> Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, Laboratorio de Elucidación y Síntesis en Química Orgánica, México

## ARTICLE INFO

## Article History:

Received: 31 May 2023

Revised: 01 July 2023

Accepted: 17 July 2023

Available online: 18 July 2023

Edited by: E. S. Istifi

## Keywords:

Metalloenzymes  
Molecular docking  
Protein-protein interactions  
Metalloenzyme-substrate complex  
Proteolysis

## ABSTRACT

The prediction of the proteolytic susceptibility of the metalloenzyme-target protein complexes has been a little-explored field of protein-protein interactions (PPI). Thus, the development and application of bioinformatics tools focused on proteolytic propensity and molecular docking are needed. This study correlated the predictive ability of PROSPER and protein-protein docking tools for the identification of cleavage sites of known zinc-metalloprotease substrates. Human interaction complexes MMP8-Fibronectin 1 and MMP12-Factor XII were evaluated, and the comparative docking analysis was performed using ClusPro, BioLuminate, and PatchDock programs. According to the results, the sequences with the highest probability of proteolytic propensity proposed by PROSPER coincided with up to 50% of the true positives of the TOP10 solution obtained in ClusPro and BioLuminate. However, in PatchDock favorable results were not obtained. Finally, the solvation of MMP8-Fibronectin in the WaterMap tool showed the interaction of Zn<sup>2+</sup> with water molecules in the active site of the enzyme. The results were comparable with the usual proteolytic mechanism of zinc metalloproteases. In conclusion, this is a novel study that proposed powerful tools for the *in silico* prediction of the interaction of metalloenzymes and target proteins, because of their high predictive power. In addition, with the support of protein-protein interaction networks, the discovery of new targets could be facilitated.

## 1. Introduction

In the last 20 years, the number of scientific publications focused on the identification of protein-protein interaction networks (PPIs) has increased, but an area of limited exploration has been the proteolytic interaction of metalloenzymes with target proteins (Andreini et al., 2009; Iacobucci et al., 2021; López-Otín & Bond, 2008).

The prediction of proteolytic susceptibility has been a difficult process because it is a mechanism that does not depend only on the amino acid sequence to search for potential cleavage sites (Verspurten et al., 2009), but rather on the structural order of the proteins, the protease and substrate co-expression *in vivo*, and the physiological conditions must be considered (Kazanov et al., 2011; Verspurten et al., 2009).

Knowledge of the specific sites of hydrolysis by proteases is not only essential for understanding the dynamic interaction between enzymes and their substrates, but it is also a prerequisite for the design of sensitivity and specific activity of inhibitors (Eckhard et al., 2016; Kasperkiewicz et al., 2012; Ozols et al., 2021).

## Reviewed by:

Burçin Türkmenoğlu: Erzincan Binali Yıldırım University, Erzincan, Türkiye

Muhammad Muddasir Ali: University of Veterinary and Animal Sciences, Lahore 54000, Pakistan

## \* Corresponding author(s):

E-mail address:  
alan.carrascoc@correo.buap.mx  
(A. Carrasco-Carballo)  
irma.herrera@correo.buap.mx  
(I. Herrera-Camacho)  
e-ISSN: 2980-4027  
doi:

X-ray crystallography has been a major technique used to identify and characterize protein-metal interactions for linking structural stability and/or functional activity in a wide range of metalloenzymes (Abe et al., 2018; Aron et al., 2022); however, there is still a large number of metalloenzymes whose biological substrates are unknown. Currently, there are bioinformatic tools specialized in the prediction of proteolytic cleavage sites from the amino acid sequence (Li et al., 2019; Ozols et al., 2021).

For instance, the PROSPER web server is a tool that predicts protein cleavage sites with good specificity for a limited number of proteases (Hidayat et al., 2022; Ojha et al., 2022; Zolfaghari Emameh et al., 2022) showing comparable results with the experimental determination (Ojha et al., 2022; Sohn et al., 2022).

There is an important group of metalloenzymes extensively studied such as matrix metalloproteinase (MMP), which are endopeptidases dependent on calcium and zinc (Bassiouni et al., 2021; Cieplak & Strongin, 2017).

Metalloproteinases conserve a HEXGHXXGXXH motif in the catalytic domain, in which three histidines form coordination bonds with the  $Zn^{+2}$  (Tallant et al., 2010). The proteolytic mechanism requires a glutamate that acts as a base to extract a proton from a water molecule previously attached to  $Zn^{+2}$ , converting it into an  $OH^-$  radical, that directly hydrolyzes the amide bond of the target protein (Auld, 2013).

In this work, we correlated the predictive ability of PROSPER and protein-protein docking tools for the identification of the cleavage sites of known zinc metalloprotease substrates. For analysis, the human metalloproteinases MMP8 and MMP12 were selected, with evidence that these enzymes cleave human Fibronectin 1 and Coagulation Factor XII, respectively (Eckhard et al., 2016; Hiller et al., 2000), whose 3D structures are available in the Protein Data Bank (PDB). A comparative analysis of the protein-protein coupling for the prediction of enzyme complexes was carried out using the protein-protein docking programs ClusPro, BioLuminate, and PatchDock according to the TOP10 solutions, the receptor-ligand conformation, and the influence of  $Zn^{+2}$ .

## 2. Materials and methods

### 2.1. Prediction of proteolytic sites by metalloproteinases

The prediction of the cleavable sites of human Fibronectin 1 (UniProt ID: P02751) and human Coagulation Factor XII (UniProt ID: P00748) was performed in PROSPER (Protease Specificity Prediction Server: (<https://prosper.erc.monash.edu.au>)). The server determines the protein cleavage sites from the amino acid sequence and uses machine learning which predicts the secondary structure and proteolytic accessibility (Song et al., 2012). In addition, PROSPER uses the specific information on four groups of proteases (aspartic, cysteine, metallo- and serine-proteases) derived from the MEROPS database. In this study, the prediction results for the group of metalloproteases with scores higher than 0.9 were selected according to the experimental reports.

### 2.2. Selection of metalloproteinase structures and substrates

The crystal structures from MMP8 (PDB ID: 2OY2) (Dragoni et al., 2009) and MMP12 (PDB ID: 3EHX) (Bertini et al., 2006) were selected in the Protein Data Bank (<https://www.rcsb.org/>). Both structures have a resolution of 1.5 and 1.9 Å respectively, and it was ensured that the catalytic pocket of the metalloenzymes were co-

crystallized with  $Zn^{+2}$ . In addition, it was verified that the 3D structures of Fibronectin 1 (PDB ID: 2HA1) (Vakonakis et al., 2007) and Factor XII (PDB ID: 6GT6) (Pathak et al., 2019) included the cleavable amino acid sequence that would be targeted in molecular docking.

### 2.3. Preparation and minimization of receptors and ligands

The Protein Preparation Wizard (PrepWizard) tool in Maestro 13.0 from Schrödinger was used to process the PDB structures (Bhachoo & Beuming, 2017). The missing hydrogens were assigned and the conformations of the rotamers of the polar residues were verified. Moreover, the protonation states of the histidine, aspartate, and glutamate residues were optimized. Energy minimization was performed at pH 7.4, which corresponds to the physiological pH of the enzymatic activity of metalloproteinases (Bertini et al., 2006; Dragoni et al., 2009) according to the previously established protocol (Carrasco-Carballo et al., 2022). UCSF Chimera 1.15 (Pettersen et al., 2004) and Maestro 13.0 (Schrödinger Release, 2023-2a) were used for model editing and visualization.

### 2.4. Protein-protein docking in ClusPro 2.0

ClusPro 2.0 (<https://cluspro.bu.edu/home.php>) performs rigid molecular docking using the PIPER computer program, which is based on the Fast Fourier Transform (FFT) correlation method (Kozakov et al., 2017). The program automatically runs protein-protein docking with an RMSD < 10 Å between the rigid receptor and the ligand that rotates around it, to evaluate the possible interaction contacts (Kozakov et al., 2017). The best 1000 interaction models are processed to refine the energy minimization and the results are grouped according to scoring energetic contributions such as electrostatics-favored, hydrophobic-favored, van Der Waals-electrostatics, and balanced energies. Receptors and ligands in their monomeric form were uploaded to the server. For this study, the default settings of the program were used. The balanced energy category was selected to download the docked complex structures determined with this coefficient, which is recommended for the analysis of enzyme complexes. The TOP10 models were analyzed according to the number of members in each cluster instead of the energy value. Since PIPER does not estimate the true interaction energy, the score provided by ClusPro should not be considered a measure of binding affinity (Kozakov et al., 2017). Since ClusPro removes metal ions during the processing of PDB files,  $Zn^{+2}$  ions were added to the interaction complexes, according to the coordinates of MMP8 and MMP12 structures.

### 2.5. Protein-protein docking in BioLuminate 4.5

BioLuminate 4.5 software was utilized for docking simulations. Standard protein-protein docking was performed using monomers as receptors or ligands with a limit of 70.000 rotations per ligand. The 30 most favored conformations were analyzed by Maestro BioLuminate (Schrödinger Release, 2023-2b). The electrostatic potential of the  $Zn^{+2}$  atoms was assigned in the protein-protein docking module, with PIPER (Chuang et al., 2008; Desta et al., 2020; Kozakov et al., 2006) and Prime (Jacobson et al., 2002; Jacobson et al., 2004). WaterMap from the Schrödinger platform (Abel et al., 2008; Schrödinger Release, 2023-2b; Young et al., 2007) was used for the solvation of interacting complexes with water molecules. This tool quantifies the energetic effect of solvation on the protein-protein interface, resulting in the displacement of water molecules to the active site of proteins (Abel et al., 2008; Bhachoo & Beuming, 2017). The TOP10 models were analyzed according to the number

of members of the cluster and the localization of the interaction sites of interest.

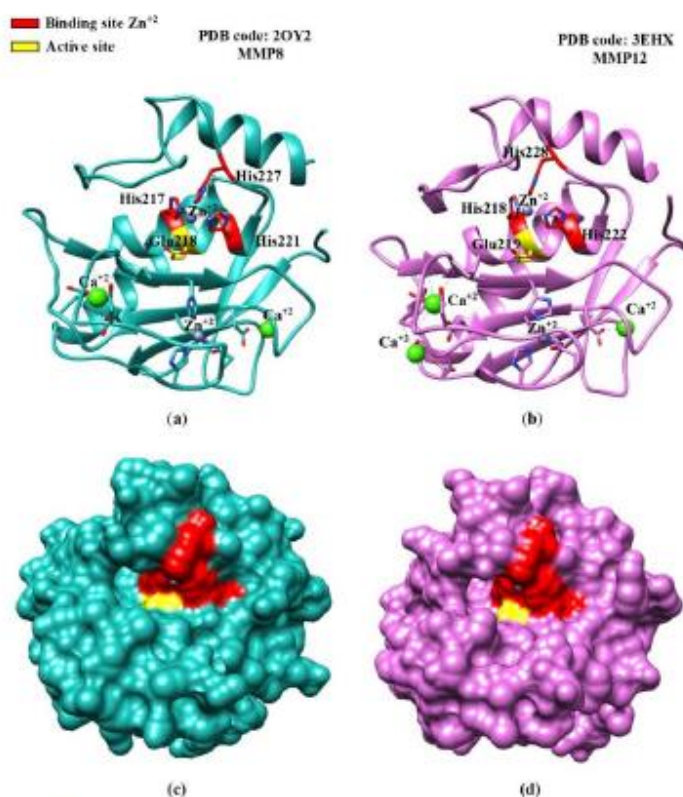
### 2.6. Protein-protein docking in PatchDock

PatchDock (<https://bioinfo3d.cs.tau.ac.il/PatchDock/>) uses a rigid molecular geometry and a surface complementarity docking algorithm [Schneidman-Duhovny et al., 2005]. The server has a set of parameters optimized for different types of interaction complexes: antigen-antibody, enzyme-inhibitor, and protein-ligand. In this case, the "enzyme-inhibitor" and "default" parameters were selected for a complete analysis and not to limit the search for surface interaction cavities. In addition, in the advanced options section of the program, a text file was submitted to specify the receptor and ligand binding sites (interface residues) for interaction analysis. An RMSD value of 4 Å was used as the interaction distance limit between the proteins. According to the score assigned by the program, the top 1000 interaction models were selected to refine via energy minimization in FireDock

(<https://bioinfo3d.cs.tau.ac.il/FireDock/>). This program optimizes the atomic contact energy (ACE), the energy of electrostatic interactions, and van Der Waals for calculating the global interaction energy in kcal/mol [Andrusier et al., 2007]). Finally, the TOP10 models were obtained, which were analyzed for the localization of the interaction sites of interest.

### 2.7. Analysis of the interaction of metalloenzyme-protein

The results of protein-protein interactions obtained from ClusPro, BioLuminate, and PatchDock were compared and correlated with the prediction of proteolytic propensity in PROSPER. The best TOP10 solutions, the influence of  $Zn^{+2}$  on the binding sites, and the correct receptor-ligand conformation were taken as selection criteria. Those interactions spanning the Fibronectin 1 and Factor XII cleavage sites reported for MMP8 and MMP12 were considered positive results. UCSF Chimera 1.15 and Maestro 13.0 were used for visualization and protein interaction analysis.



**Figure 1.** 3D structures and surface representation of human MMP8 and MMP12  
 (a) Catalytic domain of MMP8 (PDB ID: 2OY2); (b) Catalytic domain of MMP12 (PDB ID: 3EHX); (c) Surface representation of the catalytic domain of MMP8; (d) Surface representation of the catalytic domain of MMP12

### 3. Results and discussion

Since bioinformatics platforms have become essential tools in scientific research, the purpose of this work was to correlate PROSPER's proteolytic propensity prediction with protein-protein docking programs such as ClusPro, BioLuminate, and PatchDock with a focus on the interaction complexes of metalloenzymes. Therefore,

human MMP8 and MMP12 were selected as reference metalloenzymes for which the target proteins they cleave are known. The 3D structures of the catalytic domain of both metalloproteinases are shown in Figure 1. Like the rest of the MMPs, MMP8 and MMP12 have the same structural features:  $\beta$  sheets surrounded by  $\alpha$  helices, a catalytic pocket containing histidine residues binding to  $Zn^{+2}$  (indicated in red, Figure 1-a and 1-

b), and glutamate as catalytic residue (indicated in yellow, Figure 1-a and 1-b). In the surface representation, the shape of the catalytic pocket can be observed, which has the necessary space for the interaction with the polypeptide chains of the substrates (Figure 1-c and 1-d).

### 3.1. Prediction of cleavage sites of Fibronectin-1 and Factor XII in PROSPER

According to the literature review, MMP8 has a hydrolytic preference at P1'-Leu721 of human Fibronectin-1 (Eckhard et al.,

2016), and MMP12 cleaves Factor XII at the Leu377 and Leu380 (Hiller et al., 2000). Consequently, PROSPER was tested for the prediction of cleavage sites by the metalloprotease group.

Table 1 shows the results of proteolytic propensity evaluated in PROSPER based on the amino acid sequence of the ligands. Fibronectin 1 was cleaved at Leu721 on the PF5PLVAT segment with a score of 0.98 by MMP9. While Factor XII was cleaved on the VVGGLVAL segment at Leu377 with scores of 1.06 by MMP2 and MMP9, and 0.97 with MMP3.

Table 1. Prediction of cleavage sites of Fibronectin-1 and Factor XII by metalloproteases in PROSPER

Ligand	UniProt ID	MMP prediction	Position	Segment
Human Fibronectin-1	P02751	MMP9	Leu 721	PF5P ↓ LVAT
Human Factor XII	P00748	MMP2, MMP3, MMP9	Leu 377	VVGGL ↓ LVAL

However, the program did not identify the Leu380 residue cleavage site in the Factor XII sequence.

Since the PROSPER predictions were compared with the experimental evidence, 3D structures that conserved the Fibronectin 1 (PDB ID: 2HA1) and Factor XII (PDB ID: 6GT6) cleavage sequences were selected (Figure 2). Leucine residues at the cleavage site of Fibronectin 1 and Factor XII are highlighted in blue (Figure 2-a and 2-b, respectively) located in extended regions of proteins with

little or no defined structural conformation. These regions usually known as disordered regions have high structural flexibility which allows them to be susceptible to proteolysis (Suskiewicz et al., 2011). Many proteins with disordered regions have not been resolved by crystallography, therefore their absence has made it difficult to study enzyme-target protein interactions. For that reason, it is important to mention that the selection of appropriate crystallographic structures was critical for molecular docking.

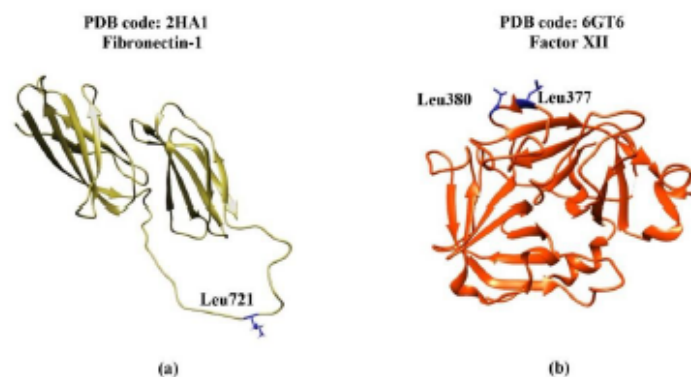


Figure 2. 3D structures of human Fibronectin-1 and Factor XII

(a) Fibronectin-1 (PDB ID: 2HA1), blue indicates the cleavage site Leu721; (b) Factor XII (PDB ID: 6GT6), blue indicates the cleavage sites Leu377 and Leu380

Table 2. Results of protein-protein docking of MMP8-Fibronectin 1 and MMP12-Factor XII in ClusPro, BioLuminate and PatchDock

Program	Docking MMP8-Fibronectin 1 (Leu 721)	Global energy score	Rank*	Docking MMP12-Factor XII (Leu 380)	Global energy score	Rank*
ClusPro	Yes	-710.50	1	Yes	-671.60	6
BioLuminate	Yes	-732.27	1	Yes	-668.06	9
PatchDock-FireDock	No	-	-	No	-	-

\* Numerical position within the 10 best solutions.

### 3.2. Protein-protein docking in PatchDock, ClusPro, and BioLuminate

The 10 best interaction models found in the TOP10 of each of the programs were analyzed according to the true positive predictions that favored the interaction between the MMPs catalytic pocket and the cleavage sites of the proposed ligands. Table 2 shows the ranking and the score of the global interaction energy of the best models obtained. Based on the analysis, the interactions of the catalytic pocket of the MMPs with the respective ligand cleavage sites were positive in ClusPro and BioLuminate, however, in PatchDock no results were obtained that favored these interactions.

Although contact of the catalytic pocket of MMP12 with Leu377 of Factor XII was not observed, a positive interaction result was obtained with Leu380, which was another proposed cleavage site within the same consensus sequence.

It should be mentioned that the global energy scores of each interaction complex determined by ClusPro and BioLuminate were similar (Table 2) since both programs operate with the same PIPER prediction algorithm. Therefore, these scores were not decisive for the selection of the best interaction models.

### 3.3. Analysis of the MMP8-Fibronectin 1 interaction in ClusPro and BioLuminate

Figure 3 shows the 3D representations of the MMP8-Fibronectin 1 docking in ClusPro and BioLuminate. Since ClusPro removes metal ions during the processing of PDB files,  $Zn^{+2}$  ions were added to the interaction complex according to the coordinates of the MMP8 (PDB ID: 2OY2) to visualize metal ions in the catalytic pocket of the metalloenzyme (Figure 3-a). By comparing the MMP8-Fibronectin 1 interaction in both programs, the rotational conformation of the

complexes was similar. It is observed that, certainly, the Leu721 cleavage site of Fibronectin 1 interacts near the catalytic pocket of MMP8. The docking pose generated in BioLuminate showed a change in the rotational orientation of the His217, His221, and His227 residues with respect to  $Zn^{+2}$  in MMP8 (Figure 3-b) different from the result obtained in ClusPro (Figure 3-a). This can be explained because BioLuminate's docking algorithm allows residues from the catalytic pocket to interact with  $Zn^{+2}$  through coordination bonds.

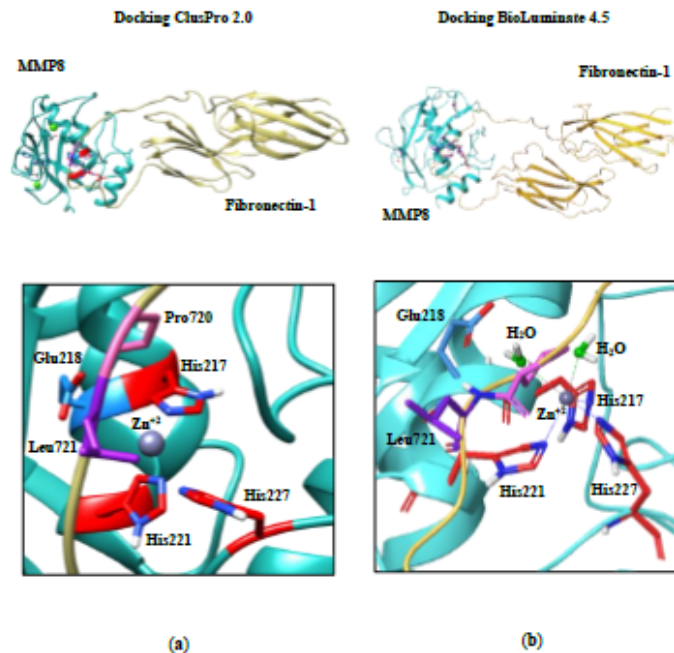


Figure 3. 3D structures of MMP8-Fibronectin 1 molecular docking in ClusPro and BioLuminate  
(a) The interaction of the MMP8 catalytic pocket with the Leu721 cleavage site in ClusPro; (b) The interaction of the catalytic pocket of MMP8 with the Leu721 cleavage site in BioLuminate solvated with  $H_2O$  molecules

Moreover, it was observed that  $Zn^{+2}$  interacts with  $H_2O$  molecules, following the solvation of the complex with WaterMap (Figure 3-b). This result is in accordance with the mechanism of action of MMPs, where the interaction of an  $H_2O$  molecule with  $Zn^{+2}$  is necessary to facilitate the nucleophilic attack on the N-terminus of the cleavage residue of the target protein. In this case, the residue that acts in the catalysis would be Glu218 of MMP8 on the N-terminal of Leu721 of Fibronectin 1.

### 3.4. Analysis of the MMP12-Factor XII interaction in ClusPro and BioLuminate

The results in MMP12-Factor XII docking in both programs as well show very similar rotational conformations, the interaction complex locates Leu380 in the catalytic pocket of MMP12 (Figure 4).  $Zn^{+2}$  ion was added to the PDB file of the interaction complex generated in ClusPro to visualize the metal ion in the catalytic pocket of the 3D structure of MMP12 (Figure 4-a). In the docking of MMP12-Factor XII obtained from BioLuminate, His218, His222, and His228 residues of the catalytic pocket also showed a change in their rotational conformation upon interaction with  $Zn^{+2}$  (Figure 4-b). Contrary to the solvation result observed in MMP8-Fibronectin 1 with

WaterMap, the interaction of  $H_2O$  molecules with  $Zn^{+2}$  was not favored in the MMP12-Factor XII complex. Probably due to the thermodynamic properties of the water and the hydrophobic environment of the proteins avoided the interaction. However, the interaction of MMP12 with Factor XII was also related to the proteolytic mechanism of MMPs. The Glu219 catalytic of MMP12 was located near the Leu380 cleavage residue of Factor XII, at an interface where the interaction of  $H_2O$  molecules with  $Zn^{+2}$  would be expected (Figure 4-b).

### 3.5. Comparative analysis of ClusPro, BioLuminate, and PatchDock

Three protein-protein docking programs were evaluated: ClusPro, BioLuminate, and PatchDock with a focus on the prediction of proteolytic interactions of the MMP8-Fibronectin 1 and MMP12-Factor XII complexes. Therefore, the number of true positive results of the TOP10 of each of the programs was plotted to compare the confidence of the prediction.

In Figure 5, the TOP10 protein-protein docking results are shown. The MMP8-Fibronectin 1 complex had similar interaction results in ClusPro and BioLuminate, with 4 and 5 true positives, respectively, while for the MMP12-Factor XII docking, only one true positive was

obtained in both programs. This is due to the experimentally resolved structural topology of each ligand. For example, the 3D structure of Fibronectin 1 (PDB ID: 2HA1) that covers positions 609-808 and contains within it the Leu721 cleavage site, is in a disordered region of the structure and is accessible to the MMP8 catalytic pocket. On the other hand, the 3D structure of Factor XII (PDB ID: 6GT6) covers the positions 373-615 including Leu377 and

Leu380 cleavage sites located at the N-terminus of the protein, in an area close to the globular regions. As a result, accessibility is less favored for the MMP12 catalytic pocket. Although other 3D Factor XII structures were examined, 6GT6 was the only PDB file containing the cleavage sites of interest.

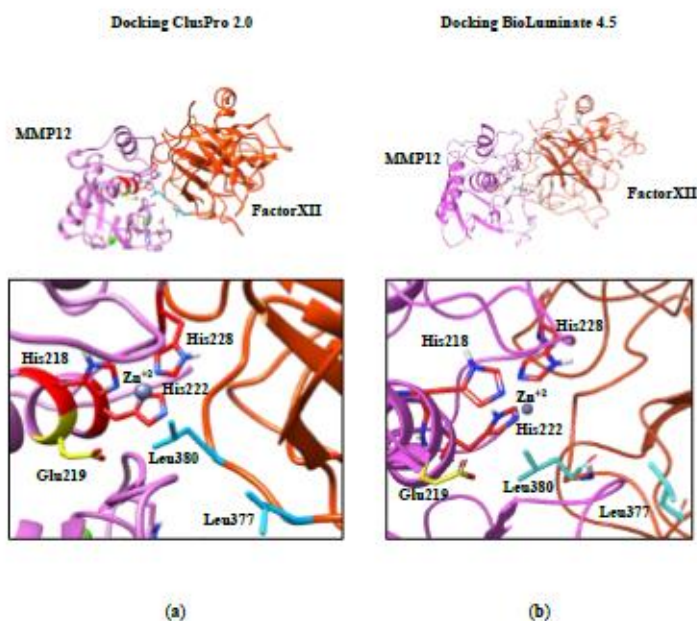


Figure 4. 3D structures of the docked conformations of MMP12-Factor XII in ClusPro and BioLuminate  
(a) The interaction of the MMP12 catalytic pocket with the Leu380 cleavage site in ClusPro; (b) The interaction of the MMP12 catalytic pocket with the Leu380 cleavage site in BioLuminate

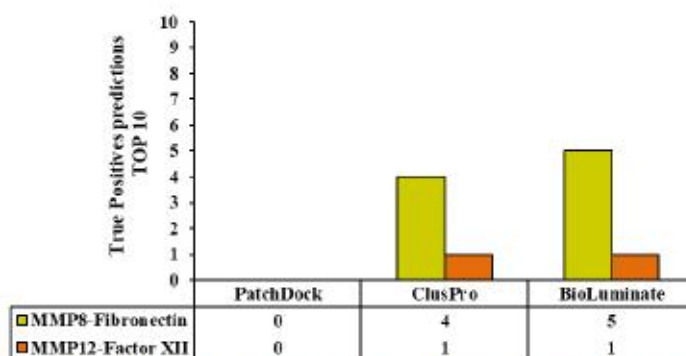


Figure 5. Comparison of protein-protein docking results with ClusPro, BioLuminate and PatchDock

With respect to the results of protein-protein docking in PatchDock, any prediction of TOP10 was not considered to be true positive because no interaction was found between the MMP catalytic pocket with the cleavage sites of their respective ligands.

Because PatchDock uses a geometric complementation algorithm, this program is not ideal for predicting enzyme-substrate and antigen-antibody complexes, as the success rate is less than 25%

(Zhang et al., 2021), while for predicting other types of complexes, it increases to 60% (Huang, 2015; Zhang et al., 2021).

Due to the fact that ClusPro and BioLuminate operate with the PIPER prediction algorithm, these programs require much more extensive computational work, so good docking results are obtained (Bhachoo & Beuming, 2017; Sunny & Jayaraj, 2022).

ClusPro is a web server commonly used in a wide variety of protein-protein docking research including enzyme complexes, obtaining a success rate of up to 50% within the results of the TOP10 (Bartholow et al., 2021; Sotudian et al., 2021; Tallei et al., 2021).

Moreover, BioLuminate is a licensed software that provides different tools for the computer application of different biological systems (Gupta et al., 2022; Kumar et al., 2023) such as the solvation of the interaction complexes with H<sub>2</sub>O molecules with WaterMap, which was used in this work.

#### 4. Conclusions

Thanks to this work, it was possible to correlate the prediction of PROSPER proteolytic propensity with the molecular docking results of the MMP8-Fibronectin 1 and MMP12-Factor XII complexes. ClusPro and BioLuminate were good option to predict enzyme-substrate interactions, getting up to 50% true positive within TOP10 results. Besides, BioLuminate's WaterMap tool was an excellent option for the analysis of enzyme complexes that require the interaction of H<sub>2</sub>O molecules and metal ions at the active site of metalloproteases. One of the advantages of using WaterMap is that it shows graphical visualization of hydrated sites to offer a more intuitive interpretation of the interactions involved in enzyme active sites.

According to the results, PatchDock was not the best program of choice for the prediction of enzyme complexes, since its geometric complementarity algorithm is not sufficient for the localization of the correct interaction regions, even if targeted docking is performed by pointing to the receptor and ligand binding sites.

It is important to mention that the selection of appropriate crystallographic structures is critical for molecular docking simulations. Particularly if the target proteins have disordered regions that cannot be resolved by crystallography. These regions are usually sensitive to proteolysis, so their absence in crystallographic structures makes it difficult to study enzyme-target protein interactions. Thus, *in silico* protein modeling would be a good option for the study of disordered regions.

In conclusion, the application of the PROSPER proteolytic propensity predictor and the ClusPro and BioLuminate molecular docking tools are proposed for the *in silico* analysis of the interaction of metalloenzymes and target proteins. This is a novel study, because, at present, there are few works focused on these interaction complexes. Therefore, there are still enzymes whose biological substrate and related mechanism of action are unknown. In addition, with the support of protein-protein interaction networks, the discovery of new targets could be facilitated.

#### Acknowledgments

We appreciated using the Schrödinger license supported by the CONAHCYT PRONACES Project 317580.

#### Conflict of interest

The authors confirm that there are no known conflicts of interest.

#### Statement of ethics

In this study, no method requiring the permission of the "Ethics Committee" was used.

#### Availability of data and materials

All data generated or analyzed during this study are included in this published article.

#### Funding

This study was supported by ICUAP and VIEP (100429633-VIEP 2021-2022) to Benemérita Universidad Autónoma de Puebla. Dalia González Esparragoza (BUAP ID: 220570034) received a scholarship from CONAHCYT-MEXICO (820490).

#### CRediT authorship contribution statement

**Dalia González-Esparragoza:** Conceptualization, Visualization, Formal analysis, Investigation, Methodology, Writing - original draft  
**Alan Carrasco-Carballo:** Conceptualization, Visualization, Formal analysis, Data curation, Supervision  
**Nora H. Rosas-Murrieta:** Formal analysis, Investigation, Visualization, Supervision, Writing-reviewing & editing  
**Lourdes Millán-Pérez-Peña:** Formal analysis, Conceptualization, Visualization  
**Irma Herrera-Camacho:** Resources, Formal analysis, Conceptualization, Visualization, Writing-reviewing & editing, Supervision

#### ORCID Numbers of the Authors

**D. González-Esparragoza:** 0000-0001-7905-6506  
**A. Carrasco-Carballo:** 0000-0003-1065-4211  
**N. H. Rosas-Murrieta:** 0000-0002-4605-670X  
**L. Millán-Pérez-Peña:** 0000-0002-4139-5577  
**I. Herrera-Camacho:** 0000-0003-2426-8469

#### Supplementary File

None.

#### Publisher's Note

All claims expressed in this article are solely those of the authors and do not necessarily represent those of their affiliated organizations, or those of the publisher, the editors and the reviewers. Any product that may be evaluated in this article, or claim that may be made by its manufacturer, is not guaranteed or endorsed by the publisher.



This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

#### References

- Abe, S., Maity, B., & Ueno, T. (2018). Functionalization of protein crystals with metal ions, complexes and nanoparticles. *Current Opinion in Chemical Biology*, 43, 68-76.  
 Abel, R., Young, T., Perid, R., Berne, B. J., & Friesner, R. A. (2008). Role of the active-site solvent in the thermodynamics of factor Xa ligand binding. *Journal of the American Chemical Society*, 130(9), 2817-2831.

- Andreini, C., Bertini, I., & Rosato, A. (2009). Metalloproteomes: a bioinformatic approach. *Accounts of Chemical Research*, 42(10), 1471-1479.
- Andrusier, N., Nuzinov, R., & Wolfson, H. J. (2007). FireDock: fast interaction refinement in molecular docking. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 69(1), 139-159.
- Aron, A. T., Petras, D., Schmid, R., Gauglitz, J. M., Büttel, I., Antelo, L., Zhi, H., Nuccio, S. P., Saeki, C. C., et al. (2022). Native mass spectrometry-based metabolomics identifies metal-binding compounds. *Nature Chemistry*, 14(1), 100-109.
- Auld, D. (2013). Catalytic mechanisms for metalloproteases. In R. ND & S. G. (Eds.), *Handbook of proteolytic enzymes*: Academic Press, Cambridge.
- Bartholow, T. G., Satain, T., Patel, A., Lee, D. J., Young, M. A., Abagyan, R., & Burkart, M. D. (2021). Elucidation of transient protein-protein interactions within carrier protein-dependent biosynthesis. *Communications Biology*, 4(1), 340.
- Bassiouni, W., Ali, M. A., & Schütz, R. (2021). Multifunctional intracellular matrix metalloproteinases: implications in disease. *The FEBS Journal*, 288(24), 7162-7182.
- Bertini, I., Calderone, V., Fraga, M., Luchinat, C., Maletta, M., & Yeo, K. J. (2006). Snapshots of the reaction mechanism of matrix metalloproteinases. *Angewandte Chemie International Edition*, 45(47), 7952-7955.
- Bhachoo, J., & Beuming, T. (2017). Investigating protein-peptide interactions using the Schrödinger computational suite. *Modeling Peptide-Protein Interactions: Methods and Protocols*, 1561, 235-254.
- Carrasco-Carballo, A., Mendoza-Lara, D. F., Rojas-Morales, J. A., Altriste, V., Merino-Montiel, P., Luna, F., & Sandoval-Ramirez, J. (2022). In silico study of coumarins derivatives with potential use in systemic diseases. *Biointerface Research in Applied Chemistry*, 13(3), 240.
- Chuang, G. Y., Kozlov, D., Brenke, R., Comesu, S. R., & Vajda, S. (2008). DARS (Decays As the Reference State) potentials for protein-protein docking. *Biophysical Journal*, 95(9), 4217-4227.
- Cieplik, P., & Strongin, A. Y. (2017). Matrix metalloproteinases—From the cleavage data to the prediction tools and beyond. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, 1864(11), 1952-1963.
- Desta, I. T., Porter, K. A., Xia, B., Kozlov, D., & Vajda, S. (2020). Performance and its limits in rigid body protein-protein docking. *Structure*, 28(9), 1071-1081. e1073.
- Dragonì, E., Calderone, V., Fraga, M., Jaiswal, R., Luchinat, C., & Nativi, C. (2009). Biotin-tagged probes for MMP expression and activation: design, synthesis, and binding properties. *Bioconjugate Chemistry*, 20(4), 719-727.
- Eckhard, U., Huesgen, P. F., Schilling, O., Bellac, C. L., Butler, G. S., Cox, J. H., Dufour, A., Goebeler, V., Kappelhoff, R., et al. (2016). Active site specificity profiling of the matrix metalloproteinase family: Proteomic identification of 4300 cleavage sites by nine MMPs explored with structural and synthetic peptide cleavage analyses. *Matrix Biology*, 49, 37-60.
- Gupta, S., Ali, A., Pandey, S., Khan, I. A., & Prakash, P. (2022). Fibronectin containing alternatively spliced extra domain A interacts at the central and c-terminal domain of Toll-like receptor-4. *Scientific Reports*, 12(1), 9662.
- Hidayat, M., Prahestuti, S., Afifah, E., Widowati, W., Yusuf, M., & Hasan, K. (2022). The role of green peas protein hydrolysate in TGF/SMAD signaling to prevent renal fibrosis. *Journal of King Saud University-Science*, 34(4), 101920.
- Hiller, O., Lichte, A., Oberpichler, A., Kocourek, A., & Tschesche, H. (2000). Matrix metalloproteinases collagenase-2, macrophage elastase, collagenase-3, and membrane type 1-matrix metalloproteinase impair clotting by degradation of fibrinogen and factor XII. *Journal of Biological Chemistry*, 275(42), 33008-33013.
- Huang, S. Y. (2015). Exploring the potential of global protein-protein docking: an overview and critical assessment of current programs for automatic ab initio docking. *Drug Discovery Today*, 20(8), 969-977.
- Iacobucci, I., Monaco, V., Cozzolino, F., & Monti, M. (2021). From classical to new generation approaches: An excursus of-omics methods for investigation of protein-protein interaction networks. *Journal of Proteomics*, 230, 103990.
- Jacobson, M. P., Friesner, R. A., Xiang, Z., & Honig, B. (2002). On the role of the crystal environment in determining protein side-chain conformations. *Journal of Molecular Biology*, 320(3), 597-608.
- Jacobson, M. P., Fincus, D. L., Rapp, C. S., Day, T. J., Honig, B., Shaw, D. E., & Friesner, R. A. (2004). A hierarchical approach to all-atom protein loop prediction. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 55(2), 351-367.
- Kasperkiewicz, P., Gajda, A. D., & Drag, M. (2012). Current and prospective applications of non-proteinogenic amino acids in profiling of proteases substrate specificity. *Biological Chemistry*, 393(9), 843-851.
- Kazanov, M. D., Igarashi, Y., Eroshkin, A. M., Cieplik, P., Ratnikov, B., Zhang, Y., Li, Z., Godzik, A., Osterman, A. L., et al. (2011). Structural determinants of limited proteolysis. *Journal of Proteome Research*, 10(8), 3642-3651.
- Kozlov, D., Brenke, R., Comesu, S. R., & Vajda, S. (2006). PIPER: an FFT-based protein docking program with pairwise potentials. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 65(2), 392-406.
- Kozlov, D., Hall, D. R., Xia, B., Porter, K. A., Padhorny, D., Yueh, C., Beglov, D., & Vajda, S. (2017). The ClusPro web server for protein-protein docking. *Nature Protocols*, 12(2), 255-278.
- Kumar, P., Kumar, A., Garg, N., & Giri, R. (2023). An insight into SARS-CoV-2 membrane protein interaction with spike, envelope, and nucleocapsid proteins. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, 41(3), 1062-1071.
- Li, F., Wang, Y., Li, C., Marquez-Lago, T. T., Leier, A., Rawlings, N. D., Haffner, G., Revote, J., Akutsu, T., et al. (2019). Twenty years of bioinformatics research for protease-specific substrate and cleavage site prediction: a comprehensive review and benchmarking of existing methods. *Briefings in Bioinformatics*, 20(6), 2150-2166.
- López-Otín, C., & Bond, J. S. (2008). Proteases: multifunctional enzymes in life and disease. *Journal of Biological Chemistry*, 283(45), 30433-30437.
- Ojha, R., Gurjar, K., Ratnakar, T. S., Mishra, A., & Prajapati, V. K. (2022). Designing of a bispecific antibody against SARS-CoV-2 spike glycoprotein targeting human entry receptors DPP4 and ACE2. *Human Immunology*, 83(4), 346-355.
- Ooils, M., Eckerley, A., Platt, C. I., Stewart-McGuinness, C., Hibbert, S. A., Revote, J., Li, F., Griffiths, C. E., Watson, R. E., et al. (2021). Predicting proteolysis in complex proteomes using deep learning. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(6), 3071.
- Pathak, M., Manna, R., Li, C., Kaira, B. G., Hamad, B. K., Bevisio, B. D., Bonturi, C. R., Dreveny, I., Fischer, P. M., et al. (2019). Crystal structures of the recombinant  $\beta$ -factor Xlla protease with bound Thr-Arg and Pro-Arg substrate mimetics. *Acta Crystallographica Section D: Structural Biology*, 75(6), 578-594.
- Pettersen, E. F., Goddard, T. D., Huang, C. C., Couch, G. S., Greenblatt, D. M., Meng, E. C., & Ferrin, T. E. (2004). UCSF Chimera—a visualization system for exploratory research and analysis. *Journal of Computational Chemistry*, 25(13), 1605-1612.
- Schneidman-Duhovny, D., Inbar, Y., Nuzinov, R., & Wolfson, H. J. (2005). PatchDock and SymmDock: servers for rigid and symmetric docking. *Nucleic Acids Research*, 33(suppl\_2), W363-W367.
- Schrödinger Release. (2022-2a). BioLuminate, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2021. [n.d.]. Retrieved January 19, 2023, from <https://www.schrodinger.com/products/bioluminate>.
- Schrödinger Release. (2022-2b). WaterMap, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2021. [n.d.]. Retrieved January 19, 2023, from <https://www.schrodinger.com/products/watermap>.
- Sohn, Y. S., Cardenas, A. E., Karmi, O., Yahana, M. D., Gruman, T., Rowland, L., Marjeut, H.-B., Webb, L. J., Mittler, R., et al. (2022). A peptide-derived strategy for specifically targeting the mitochondria and ER of cancer cells: A new approach in fighting cancer. *Chemical Science*, 13(23), 6929-6941.
- Song, J., Tan, H., Perry, A. J., Akutsu, T., Webb, G. I., Whistock, J. C., & Pike, R. N. (2012). PROSPER: an integrated feature-based tool for predicting protease substrate cleavage sites. *PLoS One*, 7(11), e50300.
- Sotudian, S., Desta, I. T., Hashemi, N., Zarfefian, S., Kozlov, D., Vakil, P., Vajda, S., & Paschalidis, I. C. (2021). Improved cluster ranking in protein-protein docking using a regression approach. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, 19, 2269-2278.
- Sunny, S., & Jayaraj, P. (2022). Protein-protein docking: Past, present, and future. *The Protein Journal*, 41(1), 1-26.
- Suskiewicz, M. J., Sussman, J. L., Silman, I., & Shaul, Y. (2011). Context-dependent resistance to proteolysis of intrinsically disordered proteins. *Protein Science*, 20(8), 1285-1297.
- Tallent, C., Marrero, A., & Gomis-Rüth, F. X. (2010). Matrix metalloproteinases: fold and function of their catalytic domains. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, 1803(1), 20-28.
- Talati, T. E., Yelnetty, A., Idroes, R., Kusumawaty, D., Emran, T. B., Yesilgü, T. Z., Sippl, W., Mahmud, S., Alqahtani, T., et al. (2021). An analysis based on molecular docking and molecular dynamics simulation study of bromelain as anti-SARS-CoV-2 variants. *Frontiers in Pharmacology*, 12, 2192.
- Vakonakis, I., Staunton, D., Rooney, L. M., & Campbell, I. D. (2007). Interdomain association in fibronectin: insight into cryptic sites and fibrillogenesis. *The EMBO Journal*, 26(10), 2575-2583.
- Verspurden, J., Gevaert, K., Dederoo, W., & Vandenaebelle, P. (2009). SitePredicting the cleavage of proteinase substrates. *Trends in Biochemical Sciences*, 34(7), 319-323.
- Young, T., Abel, R., Kim, B., Berne, B. J., & Friesner, R. A. (2007). Motifs for molecular recognition exploiting hydrophobic enclosure in protein-ligand binding. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(3), 808-813.
- Zhang, W., Meng, Q., Teng, J., & Guo, F. (2021). Exploring effectiveness of ab-initio protein-protein docking methods on a novel antibacterial protein complex dataset. *Briefings in Bioinformatics*, 22(6), bbab150.
- Zolfaghari Emameh, R., Kazoobi, J., & Yakhchal, B. (2022). Bioinformatics analysis of extracellular subtilisin E from *Bacillus subtilis*. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, 40(16), 7183-7190.

**[CIMB] Manuscript ID: cimb-2916902 - Accepted for Publication**

adela.liu@mdpi.com <adela.liu@mdpi.com>

en nombre de

CIMB Editorial Office <cimb@mdpi.com>

Lun 06/05/2024 20:17

Para: IRMA PILAR HERRERA CAMACHO <irma.herrera@correo.buap.mx>

CC: DALIA GONZALEZ ESPARRAGOZA <dalia.gonzalezesp@alumno.buap.mx>; ALAN CARRASCO - CARBALLO <alan.carrascoc@correo.buap.mx>; NORA HILDA <nora.rosas@correo.buap.mx>; LOURDES <lourdes.millan@correo.buap.mx>; FELIX <felix.luna@correo.buap.mx>; CIMB Editorial Office <cimb@mdpi.com>; Manuela Marcus <marcus@mdpi.com>

Dear Professor Herrera-Camacho,

Congratulations on the acceptance of your manuscript, and thank you for submitting your work to CIMB:

Manuscript ID: cimb-2916902

Type of manuscript: Article

Title: In silico analysis for protein-protein interactions of Putative Endoplasmic Reticulum Metallopeptidase 1 in *S. pombe*

Authors: Dalia González-Esparragoza, Alan Carrasco-Carballo \*, Nora H. Rosas-Murrieta, Lourdes Millán-Pérez Peña, Felix Luna, Irma Herrera-Camacho \*

Received: 28 Feb 2024

Bioinformatics and Systems Biology

<https://www.mdpi.com/journal/cimb/sections/bsb>

Structure and Function of Proteins: From Bioinformatics Insights

[https://www.mdpi.com/journal/cimb/special\\_issues/69ZIE2YDS6](https://www.mdpi.com/journal/cimb/special_issues/69ZIE2YDS6)

[https://susy.mdpi.com/user/manuscripts/review\\_info/c976d44e70194fa00660aec0d9fa9124](https://susy.mdpi.com/user/manuscripts/review_info/c976d44e70194fa00660aec0d9fa9124)

We will now edit and finalize your paper, which will then be returned to you for your approval. Within the next couple of days, an invoice concerning the article processing charge (APC) for publication in this open access journal will be sent by email from the Editorial Office in Basel, Switzerland.



*current issues in  
molecular biology*

an Open Access Journal by MDPI



# CERTIFICATE OF ACCEPTANCE

The certificate of acceptance for the manuscript (cimb-2916902) titled:  
In silico analysis for protein-protein interactions of Putative Endoplasmic Reticulum Metallopeptidase 1 in  
*S. pombe*

Authored by:

Dalia González-Esparragoza; Alan Carrasco-Carballo; Nora H. Rosas-Murrieta; Lourdes Millán-Pérez Peña;  
Felix Luna; Irma Herrera-Camacho

was accepted in *Curr. Issues Mol. Biol.* (ISSN 1467-3045) on 07 May 2024



Academic Open Access Publishing  
since 1996

Basel, May 2024

Prof. Dr. Madhav Bhatia  
Editor-in-Chief

## Manuscript Information

Received Date 28 February 2024  
Revised Date 26 April 2024  
Accepted Date 7 May 2024  
Submission to First Decision (Days) 64  
Submission to Publication (Days)  
Round of Revision 2  
Word Count 7517  
Page Count 19

## Editor Decision

Decision Accept in current form  
Decision Date 5 May 2024

## Manuscript Information Overview

Manuscript ID **cimb-2916902**  
Status Pending English  
Acceptance Certificate [Download Acceptance Certificate \(PDF\)](#) ▼  
Article type Article  
Title In silico analysis for protein-protein interactions of Putative Endoplasmic Reticulum Metallopeptidase 1 in *S. pombe*  
Journal *Current Issues in Molecular Biology*  
Section [Bioinformatics and Systems Biology](#)  
Special Issue [Structure and Function of Proteins: From Bioinformatics Insights](#)  
Abstract Ermp1 is a putative metalloprotease from *S. pombe* and a member of the Fxna peptidases. Although their function is unknown, orthologous proteins from other organisms such as rat and human have been related to the maturation of ovarian follicles and the progression of cancer. However, its proteolytic role has not been investigated. In this study, prediction of protein-protein interactions and proteolytic susceptibility was performed by molecular docking. A network of 45 highly conserved proteins in humans has been proposed according to the predictions. The endoplasmic reticulum (ER) location of Ermp1 could indicate that it is associated with Ca<sup>2+</sup> homeostasis and proteolysis. In addition, it is suggested that the interaction between Ermp1 and Amk2 and Gsk3 is connected to signaling pathways that regulate cellular stress response. Molecular docking suggests that it could cleavage Leu and Met residues. It was also observed that the interaction of Zn<sup>2+</sup> and water is favored in the active center of the metalloprotease, which coincides with the mechanism of action of zinc-metalloproteases. These results would guide future investigations of Fxna peptidases such as Ermp1 from *S. pombe* in molecular mechanisms of physiological importance for eukaryotic cells.  
Keywords Ermp1; *S. pombe*; metalloprotease; protein-protein interaction; molecular docking  
Manuscript File [manuscript.docx](#)  
PDF File [manuscript.pdf](#)  
Supplementary File [manuscript-supplementary.zip](#)

Article

# *In silico* analysis for protein-protein interactions of Putative Endoplasmic Reticulum Metallopeptidase 1 in *S. pombe*

Dalia González-Esparragoza <sup>1,2</sup>, Alan Carrasco-Carballo <sup>2,4,\*</sup>, Nora H. Rosas-Murrieta <sup>1</sup>, Lourdes Millán Pérez-Peña <sup>1</sup>, Félix Luna <sup>3</sup> and Irma Herrera-Camacho <sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup> Laboratorio de Bioquímica y Biología Molecular, Instituto de Ciencias, Centro de Química, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, Puebla 72570, México; dalia.gonzalezesp@alumno.buap.mx (D.G.E.); irma.herrera@correo.buap.mx (I.H.C.); nora.rosas@correo.buap.mx (N.H.R.M.); lourdes.millan@correo.buap.mx (L.M.P.P.)

<sup>2</sup> Laboratorio de Elucidación y Síntesis en Química Orgánica, ICUAF, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, Puebla 72570, México; alan.carrasco@correo.buap.mx

<sup>3</sup> Laboratorio de Neuroendocrinología, Facultad de Ciencias Químicas, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, Puebla 72570, México; felix.luna@correo.buap.mx

<sup>4</sup> CONAHCYT, ICUAF, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, Puebla 72570, México; alan.carrasco@conahcyt.mx

\* Correspondence: irma.herrera@correo.buap.mx (I.H.C.); alan.carrasco@correo.buap.mx (A.C.C.) Tel: +52 222295500 Ext: 7295; (I.H.C.)

**Abstract:** Ermp1 is a putative metalloprotease from *S. pombe* and a member of the Fxna peptidases. Although their function is unknown, orthologous proteins from other organisms such as rats and humans have been associated with the maturation of ovarian follicles and increased endoplasmic reticulum (ER) stress. To investigate the possible functional role of Ermp1 in fission yeast, this study focused on the prediction of protein-protein interactions by comparing human-yeast interologues and molecular docking. As results, a network of 45 highly conserved proteins in humans is proposed, and it is suggested that the interaction of Ermp1 with Amk2 and Gsk3 could be related to signaling pathways that regulate the stress response. Furthermore, Ermp1 localization to the ER could be associated with Ca<sup>2+</sup> homeostasis and proteolysis. Molecular docking suggests that the M28 domain of Ermp1 could cleavage Leu and Met residues of target proteins, consistent with the mechanism of action reported for the M28 family of zinc metalloproteases. These results could guide future research on Fxna peptidases such as Ermp1. Especially in the regulation of gene expression and biochemical aspects important for eukaryotic cells.

**Keywords:** Ermp1; *S. pombe*; metalloprotease; protein-protein interaction; molecular docking

**Citation:** González-Esparragoza, D.; Carrasco-Carballo, A.; Rosas-Murrieta, N.H.; Pérez-Peña, L.M.; Luna, F.; Herrera-Camacho, I. *In silico* analysis for protein-protein interactions of Putative Endoplasmic Reticulum Metallopeptidase 1 in *S. pombe*. *Curr. Issues Mol. Biol.* **2024**, *45*, x. <https://doi.org/10.3390/xxxxx>

Academic Editor(s): Name

Received: date

Revised: date

Accepted: date

Published: date



Copyright: © 2024 by the authors. Submitted for possible open access publication under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

## 1. Introduction

Endoplasmic Reticulum Metalloprotease 1 (ERMP1), also referred to as Fxna peptidase or Felix-ina, is a nine-transmembrane domain protease and a member of the M28 family of zinc metallopeptidases [1,2]. The gene was first initially discovered in the granulosa cells of rat ovarian follicles, where its expression is necessary for follicular organization, possibly to aid in the processing of protein precursors required for intraovarian cellular communication [2].

*In vitro* studies have suggested that overexpression of ERMP1 may contribute to increased ER stress by activating the Unfolded Protein Response (UPR) through GRP78-PERK-CHOP [1,3–5]. The role of the ERMP1 protein in cancer proliferation and progression through PI3K/AKT/mTOR/ $\beta$ -catenin signaling pathways has been identified as a promising therapeutic strategy for treating various types of cancer [6,7]. Although there is evidence that ERMP1 could play an important role in these signaling pathways, the molecular mechanism remains unclear.

The use of PPI networks has been instrumental in analyzing the molecular machinery of cells [8,9]. This approach is primarily employed to assign functional roles to potential proteins and to characterize multi-protein complexes and signaling pathways [10]. High-throughput technologies are available for the detection of PPIs, including yeast two-hybrid, immunoprecipitation, X-ray crystallography, and protein chips [11,12]. However, these techniques are limited to the analysis of reduced proteome coverage due to the time and cost required to perform experiments in the laboratory. Consequently, these limitations have prompted the development of computational tools for predicting large-scale PPIs, such as STRING, PEPPi, and deep neural networks [13–15]. Even so, the accuracy and reliability of these tools are highly dependent on the prior knowledge of the analyzed proteins. In contrast, there are databases that compile the interactions reported in publications based on experimental evidence, such as BIND, DIP, INTACT, MINT, and BioGRID [11,16–20].

In addition to the empirical discovery of PPIs, the comparative strategy of protein interactions conserved across species (interologues) has contributed to the functional annotation of uncharacterized proteins [21]. Although the prediction of human interologues inferred from model organisms is less frequent than expected, the high conservation of small groups of orthologues could be related to highly evolutionarily conserved cellular processes [9,21–23].

In particular, *Schizosaccharomyces pombe* is a fission yeast that shares many characteristics with eukaryotic cells despite their evolutionary divergence of approximately 1144 million years [24]. Genetic conservation between *S. pombe* and humans has been confirmed by functional complementation of yeast mutants with human genes, showing high similarity between the two species [24–27]. Therefore, this model organism has been useful for the functional analysis of eukaryotic genes related to the cell cycle and the regulation of gene expression. In recent years, *S. pombe* has also been useful for the study of biochemical aspects of genetic products, such as the identification of domains related to catalytic activity and inter-action with other proteins [28–31].

The orthologous gene *erm1* ([SPCC1259.02c](#)) in *S. pombe* encodes the protein Ermp1 (Putative Endoplasmic Reticulum Metallopeptidase 1), which has not yet been fully characterized. According to homology, it can be inferred that Ermp1 may be involved in proteolysis, as it contains the M28 domain commonly found in zinc metallopeptidases.

Fortunately, *S. pombe* conserves the UPR signaling pathway [32–34], which allows for the study of proteotoxic stress in the ER and its relationship with Ermp1. This could facilitate the identification of the most essential function of this type of protease, which has been conserved over millions of years of evolution. Because there is no precedent for the proteolytic characterization of other Fxna peptidases, in the present study, an *in-silico* analysis was performed for the prediction of PPI network by comparing human-yeast interologues and proteolytic susceptibility by molecular docking, focusing on the structural description of the M28 domain of Ermp1 in the fission yeast, and its functional relationship with target proteins.

## 2. Materials and Methods

### 2.1. Prediction of protein-protein interaction networks

The PPI network of human ERMP1 was obtained from the BioGRID repository [20]. The queries were conducted on the platform between 2020 and 2023, taking into account the latest updates to the database. The DIOPT Ortholog Finder server [35] was used to search for orthologous proteins in *S. pombe* using the PPI network of human ERMP1 as reference. DIOPT employs a suite of tools and algorithms, including Ensembl Compara, HomoloGene, Inparanoid, Isobase, OMA, orthoMCL, Phylome, RoundUp, and TreeFam, to predict orthologs across a range of species, including humans, mice, flies, worms, zebrafish, and yeast [35]. These tools provide a simplified method for integrating, comparing, and accessing orthological predictions based on sequence homology, phylogenetic

trees, and functional similarity. Additionally, DIOPT calculates a simple score indicating the number of tools supporting a given orthologous gene pair relationship. Moreover, Gene Ontology was used to assign subcellular localization and related biological processes. A PPI network for the Ermp1 protein was constructed using orthologous proteins identified in *S. pombe*. The orthologous relationship score assigned by DIOPT was used as a distribution criterion. The PPI network was then edited using Cytoscape 3.10 software.

## 2.2. *In silico* prediction of cleavage sequences of proteolytic candidates

In order to identify potential proteolytic candidates for interaction analysis with the M28 proteolytic domain of Ermp1, we considered proteins with DIOPT scores greater than 9 [35] and located in the cytosolic compartment, as well as membrane proteins with cytosolic regions. The proteins selected were the first to be identified as true human homologs in *S. pombe* when the BioGRID repository was reviewed. To predict the cleavage sequences for the metalloprotease family, the amino acid sequences of each protein were analyzed using PROSPER [36]. The results were selected according to the cleavage probability score greater than 0.8 [37] for subsequent protein-protein docking analysis.

## 2.3. 3D modeling of the M28 domain of Ermp1 and proteolytic candidates

The M28 domain of Ermp1 and the target proteins Ypt5, Pex12, Oca8, Fis1 and Pmc1 were modeled by homology in Phyre2 [38]. The templates were selected based on the percentage of homology of the sequences, domain conservation, and cellular function. Additionally, validation reports of potential templates in the Protein Data Bank were reviewed to select those meeting acceptance criteria, such as experimental method, structure resolution, and percentile scores (ranging from 0 to 100) of global validation metrics like R-value free, R-value work, R-value observed, and Ramachandran outliers. The models were validated using PDBFold [39] and PROCHECK-SAVES v6.0 Structure Validation Server [40]. A Q-score of approximately 1 and an RMSD value  $<1 \text{ \AA}$  were considered as the main modeling validation parameters, due to their association with the percentage of aligned residues and the quality of the alignment of the secondary structures with respect to the template [39,41,42]. Furthermore, it has been confirmed that the cleavage sequences predicted in PROSPER were present in the 3D models of the proteolytic candidates, which were subsequently utilized for docking analysis. As the N-terminal segment of the protein could not be modeled by homology and was essential for the docking analysis, the 3D model of Amk2 was obtained from the AlphaFold Protein Structure Database [43]. The model was subjected to a validation analysis using PROCHECK-SAVES v6.0, with the confidence score pLDDT of AlphaFold (ranging from 0 to 100) serving as the criterion for assessment.

## 2.4. Analysis of the sequence and structure of the M28 domain of Ermp1

A sequence alignment was conducted using NCBI-BLAST to determine the percentage of homology between the human ERMP1 (O7Z2K6) and Ermp1 from *S. pombe* (O94702) proteins. The M28 domain of both proteases was subjected to analysis, with supplementary information retrieved from the PhosphositePlus database regarding post-translational modifications of ERMP1 in humans [44]. Furthermore, a predictive analysis of serine phosphorylation sites of both proteases was carried out on the NetPhos 3.1 server [45], with results scoring  $>0.9$  considered as a measure of prediction accuracy [46].

## 2.5. Optimizing the conformational stability of proteins through energy minimization techniques

The PDB files were prepared, and energy minimized at pH 7.4 using the Protein Preparation Wizard (PrepWizard) tool from Maestro 13.0 [47] before molecular docking. The integrity of each of the structures was reviewed and adjusted. Hydrogen atoms were added for each protein and the conformations of rotamers of polar residues were verified. Furthermore, protonation and tautomeric states of Asp, Glu, Arg, Lys, and His were

adjusted to pH 7.4. Additionally, the orientation of the hydrogen bonds was adjusted using PROPKA at pH 7.4 and the proteins were minimized using the OPLS4 force field with an RMSD of 0.3 Å [48]. The models were edited and visualized using UCSF Chimera 1.17.1[49] and Maestro 13.0.

#### 2.6. Protein-Protein Docking of Ermp1 and Proteolytic Candidates

The Blind Docking process was conducted on the ClusPro 2.0 server [50] and BioLuminate 4.5 software [51] in accordance with previously established parameters for protein-protein docking of zinc metalloproteases [52]. The M28 domain of Ermp1 was designated as the rigid receptor, while the target proteins were considered as the ligands. The PDB files were imported into ClusPro 2.0, and protein-protein docking was initiated automatically with an RMSD of less than 10 Å between the receptor and ligand. The most promising interaction models were selected from the balanced energy category, as this is the recommended approach for the analysis of enzyme complexes. The score calculated by the program using the PIPER algorithm is derived from the favored energy contributions (electrostatics-favored, hydro-phobic-favored, and van der Waals-electrostatics), and thus, it is not considered a measure of binding affinity. Because ClusPro 2.0 removes metal ions during the processing of PDB files, Zn<sup>2+</sup> ions from the M28 domain of Ermp1 were added to the interaction complexes according to the model coordinates. In the BioLuminate 4.5 software, the protein-protein docking runs were conducted with a limit of 70,000 rotations for each ligand evaluated. The electrostatic potential of the Zn<sup>2+</sup> atoms of the M28 domain of Ermp1 was assigned for each inter-action complex using PIPER and Prime. The TOP30 ranking of results obtained from each program were analyzed to search for interactions between the catalytic cavity of Ermp1 and the cleavage sequences of the proteolytic candidates that were predicted in PROSPER. Molecular interactions were analyzed using DIMPLOT software in LigPlot program [53].

#### 2.7. Solvation of interaction models in WaterMap

The Ermp1 interaction complexes were hydrated in the WaterMap tool [54]. A molecular dynamics simulation was carried out in the presence of the solvent and a thermodynamic analysis of the water in the protein binding site was also performed [52,55]. The WaterMap calculations were run with the default simulation parameters: TIP4P solvent model at 300 K, 1 atmospheric pressure, and 2 ns simulation time. Subsequently, a cluster analysis was conducted to identify the principal hydration sites, through the partitioning of the sol-vent density distribution within the binding cavity [54,56].

#### 2.8. Molecular dynamics simulation

Molecular dynamics studies were conducted in Desmond [57,58] to assess the stability of the interaction complexes: Ermp1-Pex12, Ermp1-Amk2 and Ermp1-Ypt5. The simulation was conducted within an orthorhombic box, with the ligand-protein complex situated at the center at a distance of 10 Å. Molecules of water were utilized to solvate the box, with a concentration of 150 nM of sodium chloride employed to simulate physiological conditions. The energy system was minimized using the OPLS4 force field with 2000 interactions, with a convergence criterion of 1 kcal/mol/Å [59]. Finally, a 120 ns simulation was conducted at 300 K and 1 bar of pressure. The root means square deviation (RMSD) and root mean square fluctuation (RMSF) were reported.

### 3. Results

#### 3.1. Prediction of protein-protein interactions of Ermp1 in *S. pombe*

BioGRID is an open-access database resource that hosts gene and protein interactions from multiple species, including yeast, worm, fly, and human. All content is selected from experimental evidence reported in scientific publications, making it the most comprehensive repository of its kind [20]. Approximately 1.93 million of the reported interactions can



mutants is less severe than that observed in the single mutants. This may suggest that the gene products interact within the same signaling pathway [66–68].

Ermp1 is suggested to have a physical interaction with Amk2 and Gsk3, as there may be a synergy between GI and PPI. As a result, these proteins were included in the PPI network. Furthermore, the corresponding orthologous proteins in humans, PRKAB1 and GSK3B, were added to the human ERMP1 interaction network (Figure 1, highlighted in orange). PRKAB1 serves as a subunit of the heterotrimeric AMPK complex, which acts as a scaffold for the assembly of the PRKAA1 and PRKAG1 subunits. The AMPK complex plays a role as a negative regulator of the UPR pathway [69]. Additionally, GSK3B, a kinase, has been associated with an increased apoptosis response during ER stress, although its influence on the signaling pathway is not yet fully understood [70].

Analysis in DIOPT identified 45 human orthologous proteins in *S. pombe* (Figure 1, highlighted in yellow and orange, Table S1). The proteins were distributed in an interaction network based on the score assigned by DIOPT (Figure 2). Proteins with scores greater than 9 (Figure 2, highlighted in green, and Table S1) are considered true homologs, with conserved topological characteristics and cellular functions between fission yeast and humans.

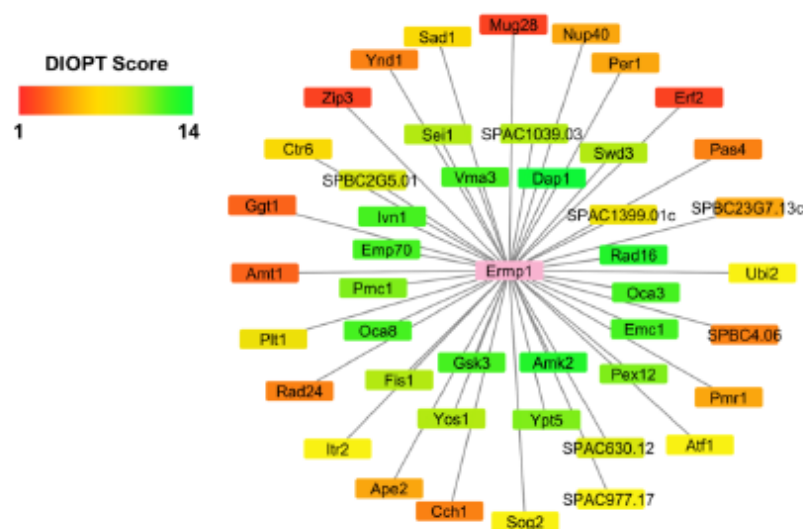


Figure 2. Prediction of a PPI network for Ermp1 in *S. pombe*. The network was edited using Cytoscape 3.10 software.

The proteins were classified based on their subcellular localization and biological processes using GO categories. 29 proteins were found to be abundantly located in the ER membrane, cell membrane, and cytosol, while the remaining proteins were categorized in other cellular compartments such as the nucleus, vacuole, mitochondria, peroxisome, and Golgi apparatus (Figure 3-A, Table S1). Fifteen proteins have been classified under transmembrane transport based on biological process. The primary function of these proteins is to transport ions, including but not limited to Ca<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup>, and H<sup>+</sup>. Additional details can be found in Figure 3-B and Table S1.

231  
232  
233  
234  
235  
236  
237  
238  
239  
240  
241  
242  
243  
244  
245  
246  
247

248  
249  
250

251  
252  
253  
254  
255  
256  
257  
258

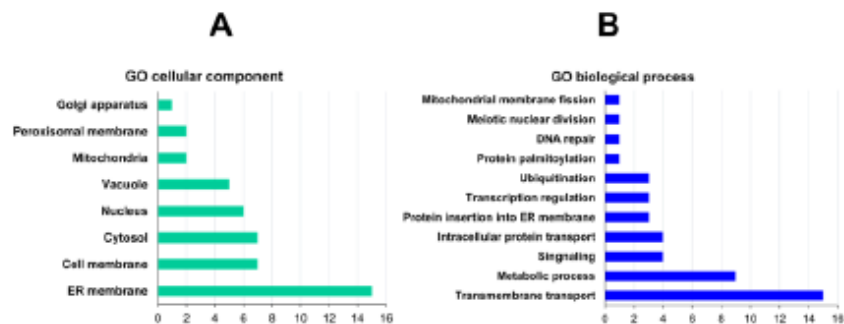


Figure 3. Clustering of Ermp1 interacting proteins in *S. pombe*. (A) Go cellular component and (B) biological process annotation.

Mammalian cells rely on the endoplasmic reticulum (ER) as the primary organelle for  $Ca^{2+}$  storage, due to the high oxidant potential required for the activity of numerous enzymes responsible for folding, post-translational processing, and protein trafficking [71]. Similarly, in *S. pombe*, calcium dependent ATPases such as Pmr1 and Pmc1 are responsible for regulating  $Ca^{2+}$  homeostasis in both the ER and vacuole [72]. Both transporters were identified in the *S. pombe* PPI network, which suggests a potential relationship between Ermp1 and  $Ca^{2+}$  homeostasis. On the other hand, 9 proteins associated with lipid and peptide metabolism were identified (Figure 3-B). As previously noted, the endoplasmic reticulum (ER) plays a crucial role in various cellular processes such as protein synthesis,  $Ca^{2+}$  storage, detoxification of chemical compounds, lipid synthesis, and lipid membrane assembly [73]. It is possible that the interaction of Ermp1 with metabolic proteins is linked to the maintenance of lipid and protein homeostasis within the organelle.

Considering that Ermp1 is a transmembrane protein, it is likely to interact with proteins involved in protein insertion into the ER membrane and vesicular trafficking. Moreover, Ermp1 may be regulated at the mRNA and protein level through transcriptional regulation, ubiquitination, and palmitoylation mechanisms (Figure 3-B). The proteins that were classified in a reduced proportion in biological processes, such as DNA repair, nuclear division, and mitochondrial fission, could potentially interact with Ermp1 in the ER before being directed to different cellular compartments.

### 3.2. Comparing the M28 domain of Ermp1 between humans and *S. pombe*

Fxna peptidases are classified as members of the M28 family of metalloproteases due to their conservation of the His-Xaa-Asp and Glu-Glu motif [74,75]. This family includes representative members such as aminopeptidase Y from *S. cerevisiae*, aminopeptidase S from *Streptomyces griseus*, aminopeptidase IAP from *E. coli*, and aminopeptidase Ap1 from *Vibrio proteolyticus*. The metalloproteases in question are characterized by the presence of two  $Zn^{2+}$  ions in their active center. These ions are tetrahedrally coordinated with three amino acids (His, Asp, and Glu) and a water molecule. Additionally, an aspartate or glutamate is coordinated to both metal ions [74,76].

Since Fxna peptidases such as Ermp1 have not yet been assigned to a subfamily due to their putative status, their structural or enzymatic characterization is not referenced. Therefore, the M28 domain of human ERMP1 was compared to its orthologous pair in *S. pombe* based on a sequence alignment. Both proteins share 37% identity and retain the active center residues: His, Asp, and Glu, which bind to  $Zn^{2+}$ . The residues Glu, His, and Tyr play important roles in the catalytic process (Figure 4, highlighted in orange, purple, and magenta respectively).

259

260

261

262

263

264

265

266

267

268

269

270

271

272

273

274

275

276

277

278

279

280

281

282

283

284

285

286

287

288

289

290

291

292

293

294

295

296

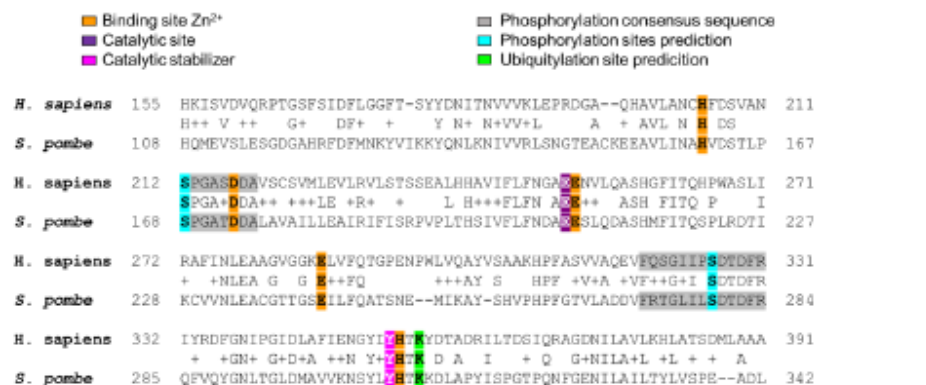


Figure 4. Sequence alignment of the M28 domain of Ermp1 in human and *S. pombe*.

According to experimental evidence provided by PhosphoSitePlus [77], it has been shown that the Ser326 residue of human ERMP1 is phosphorylated [78]. In light of this information, we decided to investigate whether Ermp1 from *S. pombe* could also contain this site. As shown in Figure 4, we aligned Ser326 with Ser279 of Ermp1 from *S. pombe*, which is located within a conserved consensus sequence (highlighted in cyan and gray, respectively). The sequences of the metalloproteases were analyzed using NetPhos 3.1 [45]. It was observed that one of the predicted potential phosphorylation sites matched the reference and alignment (Tables S2-S3.xlsx).

In addition, the analysis predicted the presence of a phosphorylation site for Ser212 of human ERMP1 and Ser168 of Ermp1 from *S. pombe* (Figure 4, highlighted in gray and cyan respectively; Tables S2-S3.xlsx). The specific type of kinases that could target this type of metalloproteases is currently unknown. However, the PPI network proposed for Ermp1 in fission yeast includes the serine/threonine kinase Gsk3. It is worth noting that phosphorylation of Gsk3 substrates typically leads to their inactivation or degradation [79]. It is possible that under certain physiological conditions, Ermp1's activity may be regulated by kinases, such as Gsk3, as part of cellular metabolic and energetic modulation [80].

In the PPI network, Ubi2, a ubiquitin protein ligase was identified. As a result, a search for ubiquitination consensus sequences for Ermp1 was also conducted. It is worth noting that, according to experimental reference in PhosphoSitePlus, the Lys356 residue of human ERMP1 can be ubiquitinated [81,82]. Furthermore, in sequence analysis, the alignment of Lys356 with Lys309 of Ermp1 from *S. pombe* was observed (Figure 4, highlighted in green). It is possible that Ubi2 may be involved in the proteasomal degradation of Ermp1, as suggested by predictions.

### 3.3. 3D modeling of the M28 domain of Ermp1 from *S. pombe*

To proceed with the analysis, it was necessary to obtain a three-dimensional structure of Ermp1. Unfortunately, there are no crystallographic structures of Fxna peptidases in the Protein Data Bank. Therefore, we opted for *in silico* modeling of the protein.

The AlphaFold artificial intelligence has been widely recognized for its ability to accurately predict complete 3D structures using a deep learning neural network system [83]. However, the 3D model of Ermp1 (Q94702) obtained from the AlphaFold database was found to be unsuitable for analyzing the M28 domain due to its conformation, which inhibits interaction with other proteins.

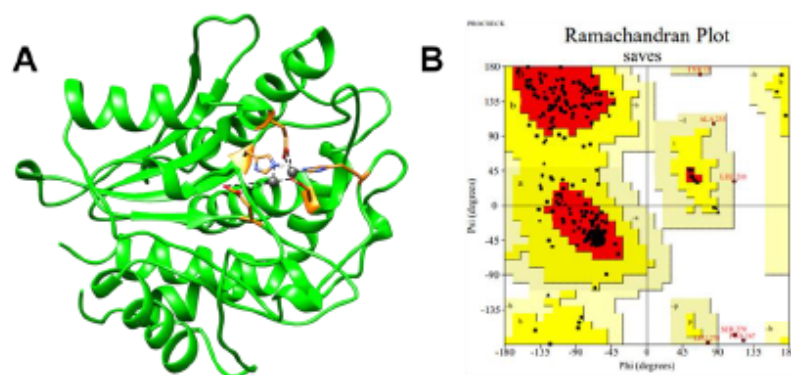
Due to the shortage of templates exhibiting high homology percentages, adequate modeling coverage, and validation metrics essential for generating the 3D model of the M28 domain of Ermp1 from *S. pombe*, the available templates were meticulously evaluated. The selection process prioritized templates that could yield validation parameters

335 closely aligned with the ideal values of PDBe-Fold and PROCHECK. Consequently, the  
336 aminopeptidase Ap1 from *V. proteolyticus* (PDB ID: 1RTQ) was identified as the optimal  
337 template for homology modeling in Phyre2.

338 The modeled sequence covered positions 39-339, with an identity percentage of 20%  
339 with respect to the template. The modeled sequence covered positions 39-339, with a 20%  
340 identity percentage compared to the template. A model was obtained with a Q-score of  
341 0.76 and an RMSD of 0.72 Å. These parameters were observed to have a correlation with  
342 the percentage of aligned residues and the quality of the alignment of secondary struc-  
343 tures with respect to the template.

344 Figure 5-A displays the 3D structure of the M28 domain of Ermp1, which shows the  
345 typical topology of metalloproteases. The enzyme is composed of  $\beta$ -sheets surrounded by  
346  $\alpha$ -helices, and its active center is represented by the  $Zn^{2+}$  binding residues located in the  
347 turns, highlighted in orange.

348 To ensure good quality, it is recommended that a model more than 85-90% of its resi-  
349 dues in the favored regions for each modeled secondary structure ( $\beta$ -sheets,  $\alpha$ -helices,  
350 and loops) on a Ramachandran plot [84]. The model obtained from the M28 domain of  
351 Ermp1 in Phyre2 represents 85.4% of the residues in the favored regions in the Ramachan-  
352 dran plot (Figure 5-B), which can be considered an acceptable model for the purposes of  
353 this study.



354  
355 **Figure 5.** 3D structure of the M28 domain of Ermp1 from *S. pombe*. (A) Homology modeling in  
356 Phyre2. Binding site  $Zn^{2+}$  shows in orange. (B) Model validation by using PROCHECK-SAVES v6.0  
357 server. Ramachandran plot shows 85.4 % residues are in the most favored region. Editing the model  
358 in UCSF Chimera 1.17.1.

359 Figure 6-A displays the surface representation of the M28 domain of Ermp1, high-  
360 lighting its globular conformation and the exposed active center available for interaction  
361 with target proteins and peptides. The catalytic cavity of the protein, as shown in Figure  
362 6-A with orange, purple, and magenta highlights, is formed by several  $Zn^{2+}$  binding resi-  
363 dues including His161, Asp173, Glu208, Glu234, and His307, as well as Glu207 and  
364 Tyr306. This cavity restricts access to small peptides and secondary structures, such as  
365 protein loops. Figure 6-B illustrates the amino acids that were identified in the catalytic  
366 cavity.

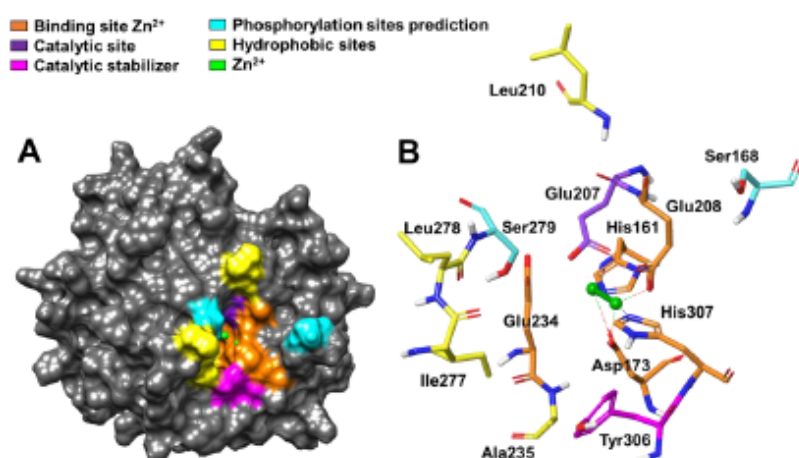


Figure 6. Representation of the catalytic cavity of the M28 domain of Ermp1 from *S. pombe*. (A) Surface model and (B) residues comprising the catalytic cavity. Editing the model in Maestro 13.0.

Based on the reference metalloprotease Ap1 from *V. proteolyticus* [85],  $Zn^{2+}$  is coordinated by Asp173, Glu208, and His307 to activate a molecule from  $H_2O$  to  $OH^-$ . Additionally, Glu207 plays a crucial role in accepting the proton, which is necessary to increase the polarity of the nucleophilic attack of  $Zn^{2+}$  on the peptide bond of the substrate. It is important to note that these findings are subject to further investigation and interpretation.

The additional  $Zn^{2+}$  ion coordinates with His161, Asp173, and Glu234 to lower the  $pK_a$  of the  $H_2O$  molecule, promoting greater specificity and stabilization of the catalytic reaction [86]. In addition, Tyr306 (highlighted in magenta in Figure 6-A and 6-B) plays a role in stabilizing the transition state of the substrate intermediate in the final step of catalysis.

The hydrophobic amino acids corresponding to residues Leu210, Ala235, Ile277, and Leu278 (highlighted in yellow in Figures 6-A and 6-B) could potentially play a crucial role in maintaining the structural conformation of the catalytic cavity. Additionally, as shown in Figures 6-A and 6-B, there are potential phosphorylation sites located near the active center of Ermp1 (highlighted in cyan), specifically Ser168 and Ser279. It is possible that the proteolytic activity of the metalloprotease is regulated by some type of kinase.

#### 3.4. Identification of potential proteolytic cleavage sequences and generation of 3D models

In the absence of methodological references for investigating protein-protein interactions involving zinc-metalloproteases and target proteins, we conducted a prior study focusing on predicting consensus sequences with proteolytic susceptibility. This investigation utilized PROSPER in conjunction with molecular docking tools such as ClusPro and BioLuminate, as previously reported [52]. The analysis aimed to identify consensus sequences of known proteins that can be cleaved by specific metalloproteases, for which there was experimental evidence of enzymatic interaction. The study showed that the tools used had a high predictive power. The results were similar to those of the published reports on the Metalloproteinase 8-Fibronectin 1 [87] and Metalloproteinase 12-Factor XII [88], which were used as validation controls.

Here in, the proteolytic analysis of selected proteins from the Ermp1 PPI network was also performed. A comparative analysis was conducted between the cleavage segments of proteins and their secondary structures, with a focus on the M28 domain of Ermp1. This domain has a narrow catalytic cavity, which affects the cleavage prediction. The consensus sequences were accepted for analysis if they were located in loops, as these structures have a greater probability of being cleaved. The PPI network proteins were

367

368

369

370

371

372

373

374

375

376

377

378

379

380

381

382

383

384

385

386

387

388

389

390

391

392

393

394

395

396

397

398

399

400

401

402

selected for analysis based on the order of identification in the comparative analysis of human-yeast interologues since 2020. Table 1 displays the results of the proteolytic analysis of selected proteins from the Ermp1 PPI network, specifically the cleavage sequences predicted by PROSPER for the proteins Amk2, Ypt5, Pex12, Oca8, Fis1, and Pmc1. Metalloproteinase 9 was found to have the highest scores with scores >0.8. The majority of the proteolytic cleavages were found to be located at the N-amino terminus of the Met and Leu residues.

Table 1. Prediction of PROSPER cleavage sites of Ermp1 target proteins in *S. pombe*.

Human protein	UniProt ID	Ortholog SCHPO <sup>1</sup>	UniProt ID	MMP <sup>2</sup> prediction	Segment	Position	Score <sup>3</sup>
PRKAB1	<a href="#">Q9Y478</a>	Amk2	<a href="#">P78789</a>	MMP9	RAQS↓MISI	Met40	1.16
RAB5C	<a href="#">P51148</a>	Ypt5	<a href="#">P36586</a>	MMP9	SLAP↓MYR	Met83	1.08
PEX12	<a href="#">Q00623</a>	Pex12	<a href="#">Q8TFH8</a>	MMP9	FWRL↓MI	Met342	1.22
CYB5B	<a href="#">Q43169</a>	Oca8	<a href="#">Q9USM6</a>	MMP9	GEEV↓LVDL	Leu45	0.98
FIS1	<a href="#">Q9Y3D6</a>	Fis1	<a href="#">Q9USZ8</a>	MMP9	EALK↓LKNR	Leu117	1.05
ATP2B2	<a href="#">Q01814</a>	Pmc1	<a href="#">Q9HDW7</a>	MMP9	TTMA↓MRTE	Met429	1.23

<sup>1</sup> *Schizosaccharomyces pombe*.

<sup>2</sup> Metalloproteinase.

<sup>3</sup> Values greater than 0.8 increase the confidence of predicting proteolytic cleavage.

↓ Cleavage site.

These predictions made in this study are consistent with the findings in other metalloproteases of the M28 family, such as the aminopeptidase Y from *S. cerevisiae* and the aminopeptidase Ap1 from *V. proteolyticus*. These proteases prefer cleaving the N-amino of Leu, but they are also capable of hydrolyzing the N-amino of Lys, Arg, Met, Val, and Ile [86,89]. Table 2 shows the templates that were used for homology modeling of the proteolytic candidates in Phyre2, with the exception of Amk2.

From the list of templates returned by Phyre2, those that exhibited reliability percentages approaching 100% were subjected to analysis. The reliability percentage calculated by Phyre2 considers the homology of sequences between the template and the target, therefore, this percentage is distinct from the quality of the model. Moreover, due to the limited availability of templates with high levels of homology, models for some *S. pombe* proteins were selected based on their ability to achieve validation parameters that were as close as possible to the ideal values. All models passed the validation and accuracy criteria, obtaining a Q-score >0.7 and RMSD values <1 Å. Additionally, in the Ramachandran plots, over 85% of the modeled residues of each protein were found in the favored regions for each secondary structure (please refer to Figure S1).

403  
404  
405  
406  
407  
408  
409

410

411

412

413

414

415

416

417

418

419

420

421

422

423

424

425

426

427

428

429

430

431

432

433

434

435

436

437

438

439

440

441

442

443

444

445

Table 2. Homology modeling in Phyre2 of Ermp1 target proteins in *S. pombe*. Model validation by using PDBeFold and PROCHECK-SAVES v6.0.

Protein	Template	Organism	PDB ID	Identity percentage	Q-score <sup>1</sup>	RMSD <sup>2</sup> (Å)	Ramachandran Plot <sup>3</sup>
Ypt5	Rab11	<i>H. sapiens</i>	2D7C [90]	43 %	0.95	0.33	87.1 %
Pex12	Ring 3 ligase	<i>S. cerevisiae</i>	4R7E [91]	28 %	0.71	0.71	85.1 %
Oca8	Cytochrome b5	<i>B. taurus</i>	1M2I [92]	50 %	1.00	0.00	90.3 %
Fis1	Fis1	<i>H. sapiens</i>	1NZN [93]	25 %	0.90	0.49	90.0 %
Pmc1	SERCA2b	<i>H. sapiens</i>	6LLE [94]	28 %	0.80	0.47	87.5 %

<sup>1</sup> Q-score: quality of alignment, the highest score=1.

<sup>2</sup> RMSD: the lower RMSD, the better the model is in comparison to the target structure.

<sup>3</sup> Ramachandran Plot: good quality model would be expected to find more than 85-90% in the most favored regions.

For molecular docking, the cleavable segments located in the loops were considered instead of the  $\beta$ -sheets and/or  $\alpha$ -helices of the 3D models of the proteolytic candidates. This is because these regions are typically more accessible, flexible, and susceptible to proteolytic cleavage [95].

In contrast to other proteins, it is worth noting that the 3D model of Amk2 was obtained from AlphaFold (P78789). It is important to mention that the crystallographic structures of Amk2 from *S. pombe* are deposited in the Protein Data Bank (PDBs ID: 2OOX, 2OOY, 2QRI, 2QRC, 2QRD, and 2QRE); however, it should be noted that they do not include the cleavage sequence of interest. This is due to the fact that the sequence is situated in an area with a consistent structural transition between order and disorder, referred to as an intrinsically disordered region (IDR), which cannot be resolved through crystallography [96,97]. As a result, homology modeling was also deemed unsuitable for incorporating IDRs.

Although the Ramachandran plot of the AlphaFold model indicated that 81.1% of the residues were located in the most favored regions, this can be attributed to the presence of residues in the IDRs. As these regions are considered dynamic, they lack a defined secondary structure (see Figure S2). This is consistent with the pLDDT score < 50 calculated in AlphaFold for that region, which, according to the program, would correspond to an unstructured region.

In the past two decades, the existence and abundance of proteins with IDRs such as Amk2 have been demonstrated [96]. The discovery of these proteins challenged the classic concept that a well-defined structure was essential for a protein to perform its function. Currently, it is known that IDRs are functional, as they are considered dynamic structures that are usually at the connection points of interaction with other proteins, mainly in cell signaling pathways[97]. Consequently, AlphaFold has emerged as a valuable bioinformatics tool for the prediction and modelling of IDRs.

### 3.5. Protein-protein docking between the M28 domain of Ermp1 and proteolytic candidates

To further evaluate the PROSPER proteolytic susceptibility prediction, a protein-protein rigid docking analysis was conducted using the ClusPro 2.0 server and BioLuminate software. The M28 domain of Ermp1 was docked with each of the proteolytic candidates. Table 3 shows the blind docking prediction results that were identified within the TOP30 of the ranking and the size of the clusters.

446  
447

448  
449  
450  
451  
452

453  
454  
455  
456  
457  
458  
459  
460  
461  
462  
463  
464  
465

466  
467  
468  
469  
470  
471

472  
473  
474  
475  
476  
477  
478

479

480  
481  
482  
483  
484

**Table 3.** Prediction of cleavage sites by docking of target proteins and Ermp1 in *S. pombe*. Comparison of molecular docking results in ClusPro and BioLuminate.

Ligand SCHPO <sup>1</sup>	Docking Prediction	Docking program	PIPER energy score	Cluster size
Amk2	RAQS ↓ MISI	ClusPro	-923.2	28
		BioLuminate	-951.3	57
Ypt5	S ↓ LAPMYR	ClusPro	-645.5	31
		BioLuminate	-638.4	28
Pex12	FWR ↓ LMI	ClusPro	-680.8	124
		BioLuminate	-667.4	78
Oca8	GEEVLVD ↓ L	ClusPro	-500.6	62
		BioLuminate	-542.6	54
Fis1	EALKLKN ↓ R	ClusPro	-607.1	92
		BioLuminate	-633.0	74
Pmc1	TT ↓ MAMRTE	ClusPro	-1137.7	35
		BioLuminate	-1212.5	20

<sup>1</sup> *Schizosaccharomyces pombe*.

↓ Cleavage site.

The scores obtained from ClusPro and BioLuminate were found to be similar, likely due to the use of the same prediction algorithm. However, it is important to note that these scores cannot be considered as measures of binding affinity without the use of refinement methods for energy minimization. Additionally, while the docking programs did show interaction shifts of the cleavage sites (indicated by red arrows in Table 3), it is worth noting that these interactions were found within the cleavage consensus sequences predicted by PROSPER for each proteolytic candidate.

Figures 7 A-F and Figure S3 display the cleavage sequences of the evaluated proteins. These sequences are located in flexible secondary structures, with the exception of Oca8 and Fis1, which were located in the short chains of the  $\alpha$ -helices. It is worth noting that although proteolysis in  $\alpha$ -helices is not common, enzyme-substrate interaction may still occur because secondary structures in solution are typically in a dynamic equilibrium that fluctuates between the  $\alpha$ -helix and the loops [98,99].

485  
486487  
488  
489490  
491  
492  
493  
494  
495  
496  
497  
498  
499  
500  
501  
502

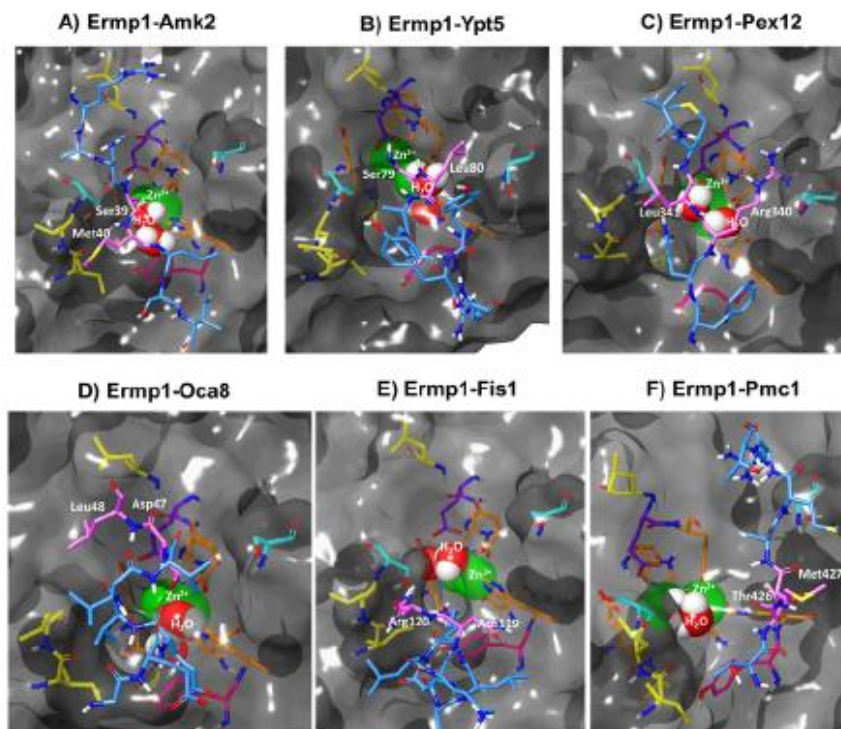


Figure 7. Molecular docking of the M28 domain of Ermp1 with protein targets (A-F). Highlighted are the binding sites for  $Zn^{2+}$  in orange, the catalytic site in purple, and the catalytic stabilizer in magenta. Additionally, the predicted phosphorylation sites are indicated in cyan. The hydrophobic areas are indicated by the yellow sites, and the ligand cleavage site is represented by the blue segment. The cleavage points are indicated by the pink residues. Solvation was performed using the WaterMap tool, and the models were edited in Maestro 13.0.

The interaction complexes were identified in areas near the N-amino terminus of the Leu, Met, and Arg residues of the target proteins (Figures 7 A-F and Figures S3-S4). It appears that Ermp1 may prefer these amino acids, which are similar to those found in the Ap1 aminopeptidase of *V. proteolyticus* with respect to proteolysis.

During the simulation of the models in WaterMap, it was noted that hydration appeared to facilitate the interaction of  $H_2O$  molecules with  $Zn^{2+}$  in the catalytic cavity of the M28 domain of Ermp1 (refer to Figures 7 A-F).

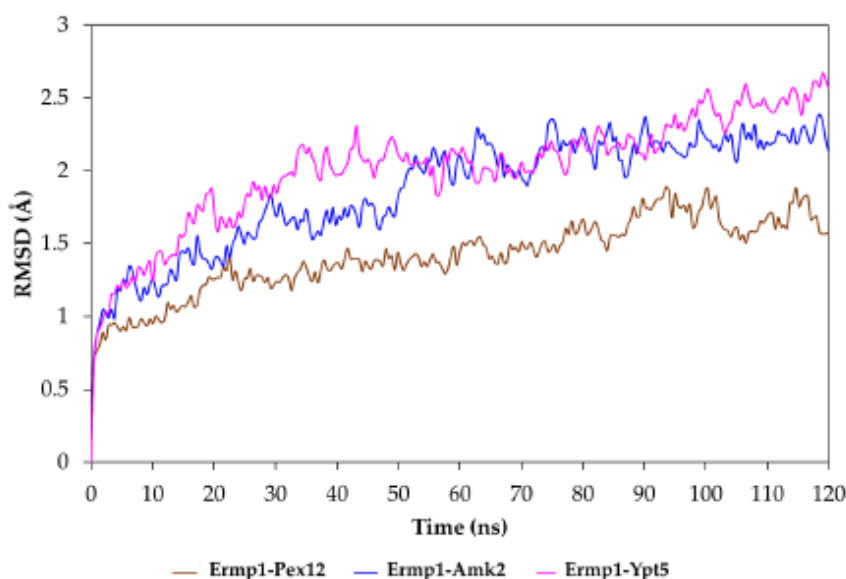
In the hydration and water exchange mechanism of  $Zn^{2+}$ , the bond distance between  $Zn^{2+}$  and the oxygen of  $H_2O$  ranges between 2.0 and 2.1 Å in the first coordination sphere of the metal, 3.6 Å in the second coordination sphere, and lengths between 2.7 and 3.0 Å in the transition states between both spheres [100].

The distances between  $Zn^{2+}$  and water oxygen were measured in each of the docking models (see Figure S5). Variations in the length of the bonds were observed that ranged between 2.46–3.51 Å, therefore, the interactions would be found between the first and second coordination spheres of  $Zn^{2+}$ . The length of the bonds varied between 2.46–3.51 Å, indicating that the interactions would be found between the first and second coordination spheres of  $Zn^{2+}$ . These results are consistent with other computational chemistry studies, where ligand exchange and catalytic mechanisms are favored in the transition states of both coordination spheres [101–103].

503  
504  
505  
506  
507  
508  
509

510  
511  
512  
513  
514  
515  
516  
517  
518  
519  
520  
521  
522  
523  
524  
525  
526  
527  
528

The results of the protein-protein docking procedure indicated that three systems were worthy of further investigation through molecular dynamics studies. The Ermp1-Amk2, Ermp1-ypt5, and Ermp1-Pex12 systems were selected based on the observation of highly interactive behavior between the catalytic cavity of the M28 do-main of Ermp1 and the cleavage sequences present in the target proteins. The root-mean-square deviation (RMSD) of each snapshot relative to the initial energy-minimized structure was calculated following alignment based on C $\alpha$  atoms for each trajectory. As depicted in Figure 8, the RMSD values for all systems exhibited reasonable fluctuations, ranging from 0.8 to 2.6 Å throughout the simulations. It can be noted that the interaction contacts of the complexes exhibit a constant behavior throughout the 120 ns simulation time.



**Figure 8.** Molecular Dynamics Simulation. Variation in the root mean square deviation (RMSD) of Ermp1-Pex12, Ermp1-Amk2 and Ermp1-Ypt5 complexes. Each simulation was 120 ns long in Desmond Molecular Dynamics System to assess the stability of protein-protein interactions.

The RMSF trajectory data revealed that fluctuations among most amino acids ranged from 0.4 to 3.2 Å (see Figure S6). Notably, the initial residues displayed the most substantial variations, spanning from residue 39 to 100. These residues correspond to protein regions serving as loops, which grant greater flexibility of movement. In contrast, amino acids located within the catalytic region displayed lower flexibility. Consequently, their capacity to bind to target proteins may be linked to the observed stability of interactions.

#### 4. Discussion

This study presents the initial *in silico* predictions of protein-protein interactions of the putative protein Ermp1 in *S. pombe*. Based on the results, it can be inferred that Ermp1 plays a crucial role in maintaining the homeostasis of Ca<sup>2+</sup>, amino acids, and proteins in the endoplasmic reticulum, an organelle with high protein synthesis and degradation activity. The analysis of the M28 domain of Ermp1 was intriguing because two phosphorylation sites near the active center were predicted. Therefore, it is hypothesized that the proteolytic activity of Ermp1 may depend on serine phosphorylation. The molecular docking evaluation suggests that Ermp1 may interact preferentially with consensus proteolytic cleavage sequences located in the loops of the proteins from the PPI network. This

interaction could potentially indicate a role for Ermp1 as an aminopeptidase, particularly in the vicinity of the N-amino of the Leu and Met residues.

Aminopeptidases have been found to be present in intracellular organelles, cytoplasm, and cell membranes [104]. Their role is crucial in protein degradation, as they cleave peptides generated by the proteasome or hydrolyze free amino acids for recycling and new protein synthesis [105]. The proteasome releases peptides consisting of 6-24 amino acids, which can be rapidly degraded by cytosolic peptidases [104,105].

For many years, aminopeptidases have been extensively studied in relation to various cellular processes and their implications in the development of different pathologies, such as inflammatory processes, diabetes, and cancer [106]. It has been observed that in cancer cells, the overexpression of aminopeptidases facilitates the exogenous supply of amino acids, which is necessary for their survival and proliferation [104,107]. The role of the tumor microenvironment in regulating the expression of aminopeptidases, which in turn increases the demand for protein synthesis, has been highlighted in previous studies [105,108,109].

*In vitro* studies have suggested that human ERMP1 may accelerate the proliferation and invasion of cancer cells through the PIK3/AKT/mTOR/ $\beta$ -catenin pathway. However, the molecular mechanism is still unclear [4–7]. This study proposes a possible interaction between Ermp1 and Amk2 and Gsk3 in *S. pombe*. These two signaling proteins regulate the metabolic and transcriptional activity of cells through TOR-dependent processes in response to environmental signals [65,110–113]. In humans, orthologous proteins of Amk2 and Gsk3 (PRKAB1 and GSK3B, respectively) have been linked to the ER stress response through the modulation of the UPR pathway [114–116]. Furthermore, it may be worthwhile to explore the potential correlation between Ermp1 and Amk2, as well as Gsk3, within the TOR and UPR signaling pathways, which are conserved in fission yeast and mammals [117,118]. In humans, these pathways are affected in some cancers due to ERMP1 overexpression, but the mechanism is unknown. Therefore, the study of the Ermp1 ortholog could help elucidate its functional role.

It is important to mention that the selection of appropriate 3D models is essential for molecular docking analysis. However, currently it has not yet been possible to experimentally determine the three-dimensional structures of a large number of proteins from different organisms of biological interest. For this reason, the availability of suitable templates for homology modelling is usually limited. In this study, Phyre2 and AlphaFold Protein Structure databases were employed to generate 3D models of the proteins of interest. Both tools are open access, facilitating exploration of bioinformatics analysis of different proteins with satisfactory results [119–121]. Nevertheless, the use of other more powerful modeling tools should be considered for the validation of structural predictions.

Finally, ClusPro 2.0 and BioLuminate 4.5 are molecular docking tools that have been widely utilized in diverse biological systems due to their automated computational system and the quality of the predictions, which exceed 50% of the success rate compared to other tools [122–125]. As the programs utilize the same algorithm, the protein-protein interaction predictions reported in this study were found to be similar, resulting in a high degree of congruence in the observed results.

## 5. Conclusions

In summary, the bioinformatics study proposes the first network of 45 proteins that interact with Ermp1 in *S. pombe*. This suggests that they have a significant role in  $Ca^{2+}$  homeostasis in the ER and proteolysis. While molecular docking suggests that the M28 domain of Ermp1 functions as an aminopeptidase that hydrolyzes the N-amino of Leu and Met residues, it is important to note that experimental assays are required to confirm these predictions. The potential interaction between Ermp1 and proteins such as Amk2 and Gsk3 suggests a connection with signaling pathways like UPR and TOR, which are conserved in fission yeast and mammals. In conclusion, these results provide a basis for future bioinformatics and experimental investigations, that contribute to the elucidation

of the functional role of Fxna peptidases, such as Ermp1. The primary focus of this field is the regulation of gene expression and biochemical processes that are of significance to eukaryotic cells and have been preserved throughout millions of years of evolution.

**Supplementary Materials:** The supporting information can be downloaded at: [www.mdpi.com/xxx/s1](http://www.mdpi.com/xxx/s1), Figure S1: 3D structures of target proteins of Ermp1 from *S. pombe*. Homology modeling in Phyre2 and Ramachandran plot. Model validation by using PROCHECK-SAVES v6.0 server. Editing the model in UCSF Chimera 1.17.1; Figure S2: AlphaFold prediction and Ramachandran Plot of the 3D structure of Amk2 from *S. pombe*; Figure S3: Molecular docking of the M28 domain of Ermp1 with protein targets. Ligand cleavage segment is shown in blue. Cleavage residues are shown in pink. Solvation performed in the WaterMap tool. Editing the models in Maestro 13.0; Figure S4: DIMPLOT 2D-interaction plot of M28 domain of Ermp1 with protein targets (A-F). The horizontal dashed line represents the interface. The green dotted line represents the hydrogen bond length, while the arc represents the hydrophobic interaction. The dotted boxes delineate the identified interactions between the residues of Ermp1's catalytic cavity and the potential cleavage residues within the target proteins; Figure S5: Representation of the solvation of the interaction complexes of the M28 domain of Ermp1 and cleavage sites of protein targets. Binding sites Zn<sup>2+</sup> are shown in orange. Catalytic site is shown in purple. Catalytic stabilizer is shown in magenta. Cleavage residues are shown in pink. Solvation performed in the WaterMap tool. Editing the models in Maestro 13.0; Figure S6: Analysis of RMSF trajectories of residues of the protein-protein complexes. The Root Mean Square Fluctuation (RMSF) was calculated to examine residual fluctuations throughout the simulation time for Ermp1-Amk2, Ermp1-Pex12, and Ermp1-Ypt5 (A-C respectively). Each simulation was conducted for 120 ns in the Desmond Molecular Dynamics System to assess the stability of protein-protein interaction; Table S1: Comparison of orthologous proteins that interact with ERMP1/Ermp1 in human and *S. pombe*. Go cellular component, biological process annotation, DI-OPT score, similarity, and identity percentages. Proteins highlighted in gray were selected for proteolytic propensity analysis and molecular docking; Table S2.xlsx: Predictions of phosphorylation sites in Netphos 3.1 of human ERMP1; Table S3.xlsx: Predictions of phosphorylation sites in Netphos 3.1 of Ermp1 from *S. pombe*.

**Author Contributions:** Conceptualization, D.G.E., A.C.C., I.H.C., N.H.R.M., L.M.P.P. and F.L.; methodology, D.G.E., A.C.C. and I.H.C.; software, A.C.C.; validation, D.G.E. and A.C.C.; formal analysis, D.G.E., A.C.C. and I.H.C.; investigation, D.G.E. AND I.H.C.; resources, I.H.C.; data curation, D.G.E. and A.C.C.; writing—original draft preparation, D.G.E. and I.H.C.; writing—review and editing, I.H.C., A.C.C., N.H.R.M., L.M.P.P. and F.L.; visualization, D.G.E., A.C.C. and I.H.C.; supervision, I.H.C., A.C.C., N.H.R.M., L.M.P.P. and F.L.; project administration, I.H.C.; funding acquisition, I.H.C. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** This research was funded by ICUAP and VIEP (100429633-VIEP 2021-2022) to Benemérita Universidad Autónoma de Puebla. Dalia González Esparragoza (BUAP ID: 220570034) received a scholarship from CONAHCYT-MEXICO (820490).

**Institutional Review Board Statement:** Not applicable.

**Informed Consent Statement:** Not applicable.

**Data Availability Statement:** The authors confirm that the data supporting the findings of this study are available within the article.

**Acknowledgments:** We appreciated using the Schrödinger license supported by the CONAHCYT PRONACES Project 317580.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflicts of interest.

## References

1. Grandi, A.; Santi, A.; Campagnoli, S.; Parri, M.; De Camilli, E.; Song, C.; Jin, B.; Lacombe, A.; Castori-Eppenberger, S.; Sarmientos, P.; et al. ERMP1, a Novel Potential Oncogene Involved in UPR and Oxidative Stress Defense, Is Highly Expressed in Human Cancer. *Oncotarget* **2016**, *7*, 63596–63610, doi:10.18632/oncotarget.11550.
2. Garcia-Rudaz, C.; Luna, F.; Tapia, V.; Kerr, B.; Colgin, L.; Galimi, F.; Dissen, G.A.; Rawlings, N.D.; Ojeda, S.R. Fxna, a Novel Gene Differentially Expressed in the Rat Ovary at the Time of Folliculogenesis, Is Required for Normal Ovarian Histogenesis. *Development* **2007**, *134*, 945–957, doi:10.1242/dev.02795.

3. Qu, J.; Zhang, L.; Li, L.; Su, Y. MiR-148b Functions as a Tumor Suppressor by Targeting Endoplasmic Reticulum Metalloprotease 1 in Human Endometrial Cancer Cells. *Oncol Res* 2018, 27, 81–88, doi:10.3727/096504018X15202988139874. 665
4. Chi, L.; Jiao, D.; Nan, G.; Yuan, H.; Shen, J.; Gao, Y. MiR-9-5p Attenuates Ischemic Stroke through Targeting ERMP1-Mediated Endoplasmic Reticulum Stress. *Acta Histochem* 2019, 121, 151438, doi:10.1016/j.acthis.2019.08.005. 666
5. Dastghaib, S.; Mokarram, P.; Erfani, M.; Ghavami, S.; Hosseini, S.V.; Zamani, M. Endoplasmic Reticulum Metalloprotease 1, a Triggering Factor for Unfolded Protein Response and Promising Target in Colorectal Cancer. *Biologia (Bratisl)* 2021, 76, 2403–2411, doi:10.1007/s11756-021-00769-y. 667
6. Lu, H.; Hu, J.; Li, J.; Lu, W.; Deng, X.; Wang, X. MiR-328-3p Overexpression Attenuates the Malignant Proliferation and Invasion of Liver Cancer via Targeting Endoplasmic Reticulum Metalloprotease 1 to Inhibit AKT Phosphorylation. *Ann Transl Med* 2020, 8, 754–754, doi:10.21037/atm-20-3749. 668
7. Rahmani-Kukia, N.; Zamani, M.; Mokarram, P. ERMP1 Facilitates The Malignant Characteristics of Colorectal Cancer Cells through Modulating PI3K/AKT/ $\beta$ -Catenin Pathway and Localization of GRP78. *Cell J* 2023, 25, 470–482, doi:10.22074/CELLJ.2023.1982707.1188. 669
8. Raman, K. Construction and Analysis of Protein – Protein Interaction Networks. *Autom Exp* 2010, 2, 1–11, doi:10.1186/1759-4499-2-2. 670
9. Zainal-Abidin, R.-A.; Afifah-Alen, N.; Abdullah-Zawawi, M.-R.; Harun, S.; Mohamed-Hussein, Z.-A. Protein – Protein Interaction (PPI) Network of Zebrafish Oestrogen Receptors: A Bioinformatics Workflow. *Life* 2022, 12, 1–19, doi:10.3390/life12050650. 671
10. de Las Rivas, J.; Fontanillo, C. Protein-Protein Interactions Essentials: Key Concepts to Building and Analyzing Interactome Networks. *PLoS Comput Biol* 2010, 6, 1–8, doi:10.1371/journal.pcbi.1000807. 672
11. Skrabanek, L.; Saini, H.K.; Bader, G.D.; Enright, A.J. Computational Prediction of Protein-Protein Interactions. *Mol Biotechnol* 2008, 38, 1–17, doi:10.1007/s12033-007-0069-2. 673
12. Murakami, Y.; Tripathi, L.P.; Prathipati, P.; Mizuguchi, K. Network Analysis and in Silico Prediction of Protein–Protein Interactions with Applications in Drug Discovery. *Curr Opin Struct Biol* 2017, 44, 134–142, doi:10.1016/j.sbi.2017.02.005. 674
13. Franceschini, A.; Szklarczyk, D.; Frankild, S.; Kuhn, M.; Simonovic, M.; Roth, A.; Lin, J.; Minguez, P.; Bork, P.; Von Mering, C.; et al. STRING v9.1: Protein-Protein Interaction Networks, with Increased Coverage and Integration. *Nucleic Acids Res* 2013, 41, doi:10.1093/nar/gks1094. 675
14. Bell, E.W.; Schwartz, J.H.; Freddolino, P.L.; Zhang, Y. PEPPi: Whole-Proteome Protein-Protein Interaction Prediction through Structure and Sequence Similarity, Functional Association, and Machine Learning. *J Mol Biol* 2022, 434, doi:10.1016/j.jmb.2022.167530. 676
15. Zhang, L.; Yu, G.; Xia, D.; Wang, J. Protein–Protein Interactions Prediction Based on Ensemble Deep Neural Networks. *Neurocomputing* 2019, 324, 10–19, doi:10.1016/j.neucom.2018.02.097. 677
16. Bader, G.D.; Donaldson, I.; Wolting, C.; Ouellette, B.F.F.; Pawson, T.; Hogue, C.W. V BIND-The Biomolecular Interaction Network Database. *Nucleic Acids Res* 2001, 29, doi:10.1093/nar/29.1.242. 678
17. Xenarios, I.; Salwinski, D.; Duan, J.; Higney, P.; Kim, S.-M.; Eisenberg, D. DIP, the Database of Interacting Proteins: A Research Tool for Studying Cellular Networks of Protein Interactions. *Nucleic Acids Res* 2002, 30, 303–305, doi:10.1093/nar/30.1.303. 679
18. del Toro, N.; Shrivastava, A.; Ragueneau, E.; Meldal, B.; Combe, C.; Barrera, E.; Perfetto, L.; How, K.; Ratan, P.; Shirodkar, G.; et al. The IntAct Database: Efficient Access to Fine-Grained Molecular Interaction Data. *Nucleic Acids Res* 2022, 50, D648–D653, doi:10.1093/nar/gkab1006. 680
19. Zanzoni, A.; Montecchi-Palazzi, L.; Quondam, M.; Ausiello, G.; Helmer-Citterich, M.; Cesareni, G. MINT: A Molecular INTeraction Database. *FEBS Lett* 2002, 513, 135–140, doi:10.1016/S0014-5793(01)03293-8. 681
20. Oughtred, R.; Rust, J.; Chang, C.; Breitkreutz, B.J.; Stark, C.; Willems, A.; Boucher, L.; Leung, G.; Kolas, N.; Zhang, F.; et al. The BioGRID Database: A Comprehensive Biomedical Resource of Curated Protein, Genetic, and Chemical Interactions. *Protein Science* 2021, 30, 187–200, doi:10.1002/pro.3978. 682
21. Lee, S.A.; Chan, C.H.; Tsai, C.H.; Lai, J.M.; Wang, F.S.; Kao, C.Y.; Huang, C.Y.F. Ortholog-Based Protein-Protein Interaction Prediction and Its Application to Inter-Species Interactions. *BMC Bioinformatics* 2008, 9, doi:10.1186/1471-2105-9-S12-S11. 683
22. Breitkopf, S.B.; Yang, X.; Begley, M.J.; Kulkarni, M.; Chiu, Y.H.; Turke, A.B.; Lauriol, J.; Yuan, M.; Qi, J.; Engelman, J.A.; et al. A Cross-Species Study of PI3K Protein-Protein Interactions Reveals the Direct Interaction of P85 and SHP2. *Sci Rep* 2016, 6, doi:10.1038/srep20471. 684
23. Wiles, A.M.; Doderer, M.; Ruan, J.; Gu, T.T.; Ravi, D.; Blackman, B.; Bishop, A.J.R. Building and Analyzing Protein Interactome Networks by Cross-Species Comparisons. *BMC Syst Biol* 2010, 4, 1–16, doi:10.1186/1752-0509-4-36. 685
24. Wood, V.; Gwilliam, R.; Rajandream, M.-A.; Lyne, M.; Lyne, R.; Stewart, A.; Sgouros, J.; Peat, N.; Hayles, J.; Baker, S.; et al. The Genome Sequence of Schizosaccharomyces Pombe. *W. R. McCombie* 2002, 415, doi:10.1038/nature724. 686
25. Owen, N.; Doe, C.L.; Mellor, J.; Davies, K.E. Characterization of the Schizosaccharomyces Pombe Orthologue of the Human Survival Motor Neuron (SMN) Protein. *Hum Mol Genet* 2000, 9, 675–684, doi:10.1093/hmg/9.5.675. 687
26. Zhao, Y.; Lieberman, H.B. Schizosaccharomyces Pombe: A Model for Molecular Studies of Eukaryotic Genes. *DNA Cell Biol* 1995, 14, 359–371, doi:10.1089/dna.1995.14.359. 688
27. Harris, M.A.; Rutherford, K.M.; Hayles, J.; Lock, A.; Bähler, J.; Oliver, S.G.; Mata, J.; Wood, V. Fission Stories: Using PomBase to Understand Schizosaccharomyces Pombe Biology. *Genetics* 2022, 220, doi:10.1093/GENETICS/TYAB222. 689

28. Deshpande, G.P.; Hayles, J.; Hoe, K.L.; Kim, D.U.; Park, H.O.; Hartsuiker, E. Screening a Genome-Wide *S. Pombe* Deletion Library Identifies Novel Genes and Pathways Involved in Genome Stability Maintenance. *DNA Repair (Amst)* **2009**, *8*, 672–679, doi:10.1016/j.dnarep.2009.01.016. 724  
725  
726
29. Vo, T. V.; Das, J.; Meyer, M.J.; Cordero, N.A.; Akturk, N.; Wei, X.; Fair, B.J.; Degatano, A.G.; Fragoza, R.; Liu, L.G.; et al. A Proteome-Wide Fission Yeast Interactome Reveals Network Evolution Principles from Yeasts to Human. *Cell* **2016**, *164*, 310–323, doi:10.1016/j.cell.2015.11.037. 727  
728  
729
30. Wang, Z. Big Data Mining Powers Fungal Research: Recent Advances in Fission Yeast Systems Biology Approaches. *Curr Genet* **2017**, *63*, 427–433, doi:10.1007/s00294-016-0657-4. 730  
731
31. Vyas, A.; Freitas, A. V.; Ralston, Z.A.; Tang, Z. Fission Yeast *Schizosaccharomyces Pombe*: A Unicellular “Micromammal” Model Organism. *Curr Protoc* **2021**, *1*, doi:10.1002/cpz1.151. 732  
733
32. Guydosh, N.R.; Kimmig, P.; Walter, P.; Green, R. Regulated Ire1-Dependent mRNA Decay Requires No-Go mRNA Degradation to Maintain Endoplasmic Reticulum Homeostasis in *S. Pombe*. *Elife* **2017**, *6*, doi:10.7554/eLife.29216. 734  
735
33. Kimmig, P.; Diaz, M.; Zheng, J.; Williams, C.C.; Lang, A.; Aragón, T.; Li, H.; Walter, P. The Unfolded Protein Response in Fission Yeast Modulates Stability of Select MRNAs to Maintain Protein Homeostasis. *Elife* **2012**, *2012*, 1–20, doi:10.7554/eLife.00048. 736  
737
34. van Anken, E.; Pincus, D.; Coyle, S.; Aragón, T.; Osman, C.; Lari, F.; Gómez Puerta, S.; Korennykh, A. V.; Walter, P. Specificity in Endoplasmic Reticulum-Stress Signaling in Yeast Entails a Step-Wise Engagement of HAC1 mRNA to Clusters of the Stress Sensor Ire1. *Elife* **2014**, *3*, e05031, doi:10.7554/eLife.05031. 738  
739  
740
35. Hu, Y.; Flockhart, I.; Vinayagam, A.; Bergwitz, C.; Berger, B.; Perrimon, N.; Mohr, S.E. An Integrative Approach to Ortholog Prediction for Disease-Focused and Other Functional Studies. *BMC Bioinformatics* **2011**, *12*, doi:10.1186/1471-2105-12-357. 741  
742
36. Song, J.; Tan, H.; Perry, A.J.; Akutsu, T.; Webb, G.L.; Whisstock, J.C.; Pike, R.N. PROSPER: An Integrated Feature-Based Tool for Predicting Protease Substrate Cleavage Sites. *PLoS One* **2012**, *7*, 1–23, doi:10.1371/journal.pone.0050300. 743  
744
37. Song, J.; Li, F.; Leier, A.; Marquez-Lago, T.T.; Akutsu, T.; Haffari, G.; Chou, K.C.; Webb, G.L.; Pike, R.N. PROSPEROUS: High-Throughput Prediction of Substrate Cleavage Sites for 90 Proteases with Improved Accuracy. *Bioinformatics* **2018**, *34*, 684–687, doi:10.1093/bioinformatics/btx670. 745  
746  
747
38. Kelley, L.A.; Mezulis, S.; Yates, C.M.; Wass, M.N.; Sternberg, M.J.E. The Phyre2 Web Portal for Protein Modeling, Prediction and Analysis. *Nat Protoc* **2015**, *10*, 845–858, doi:10.1038/nprot.2015.053. 748  
749
39. Krissinel, E.; Henrick, K. Secondary-Structure Matching (SSM), a New Tool for Fast Protein Structure Alignment in Three Dimensions. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **2004**, *60*, 2256–2268, doi:10.1107/S0907444904026460. 750  
751
40. Laskowski, R.A.; MacArthur, M.W.; Moss, D.S.; Thornton, J.M. Computer Programs PROCHECK: A Program to Check the Stereochemical Quality of Protein Structures. *J Appl Crystallogr* **1993**, *26*, 283–291, doi:10.1107/S0021889892009944. 752  
753
41. Julian, A.T.; Mascarenhas Dos Santos, A.C.; Pombert, J.F. 3DFI: A Pipeline to Infer Protein Function Using Structural Homology. *Bioinformatics Advances* **2021**, *1*, doi:10.1093/bioadv/vbab030. 754  
755
42. Read, R.J.; Adams, P.D.; Arendall, W.B.; Brunger, A.T.; Emsley, P.; Joosten, R.P.; Kleywegt, G.J.; Krissinel, E.B.; Lütteke, T.; Otwinowski, Z.; et al. A New Generation of Crystallographic Validation Tools for the Protein Data Bank. *Structure* **2011**, *19*, 1395–1412, doi:10.1016/j.str.2011.08.006. 756  
757  
758
43. David, A.; Islam, S.; Tankhilevich, E.; Sternberg, M.J.E. The AlphaFold Database of Protein Structures: A Biologist’s Guide. *J Mol Biol* **2022**, *434*, 167336, doi:10.1016/j.jmb.2021.167336. 759  
760
44. Hornbeck, P. V.; Kornhauser, J.M.; Tkachev, S.; Zhang, B.; Skrzypek, E.; Murray, B.; Latham, V.; Sullivan, M. PhosphoSitePlus: A Comprehensive Resource for Investigating the Structure and Function of Experimentally Determined Post-Translational Modifications in Man and Mouse. *Nucleic Acids Res* **2012**, *40*, D261–D270, doi:10.1093/nar/gkr1122. 761  
762  
763
45. Blom, N.; Sicheritz-Pontén, T.; Gupta, R.; Gammeltoft, S.; Brunak, S. Prediction of Post-Translational Glycosylation and Phosphorylation of Proteins from the Amino Acid Sequence. *Proteomics* **2004**, *4*, 1633–1649, doi:10.1002/pmic.200300771. 764  
765
46. Xu, Y.; Song, J.; Wilson, C.; Whisstock, J.C. PhosContext2vec: A Distributed Representation of Residue-Level Sequence Contexts and Its Application to General and Kinase-Specific Phosphorylation Site Prediction. *Sci Rep* **2018**, *8*, doi:10.1038/s41598-018-26392-7. 766  
767  
768
47. Bhachoo, J.; Beuning, T. Investigating Protein–Peptide Interactions Using the Schrödinger Computational Suite. *Methods in Molecular Biology* **2017**, *1561*, 235–254, doi:10.1007/978-1-4939-6798-8\_14. 769  
770
48. Carrasco-Carballo, A.; Mendoza-Lara, D.F.; Rojas-Morales, J.A.; Alatríste, V.; Merino-Montiel, P.; Luna, F.; Sandoval-Ramirez, J. In Silico Study of Coumarins Derivatives With Potential Use in Systemic Diseases. *Biointerface Res Appl Chem* **2023**, *13*, 1–21, doi:10.33263/BRIAC133.240. 771  
772  
773
49. Pettersen, E.F.; Goddard, T.D.; Huang, C.C.; Couch, G.S.; Greenblatt, D.M.; Meng, E.C.; Ferrin, T.E. UCSF Chimera - A Visualization System for Exploratory Research and Analysis. *J Comput Chem* **2004**, *25*, 1605–1612, doi:10.1002/jcc.20084. 774  
775
50. Kozakov, D.; Hall, D.R.; Xia, B.; Porter, K.A.; Padhomy, D.; Yueh, C.; Beglov, D.; Vajda, S. The ClusPro Web Server for Protein–Protein Docking. *Nat Protoc* **2017**, *12*, 255–278, doi:10.1038/nprot.2016.169. 776  
777
51. Schrödinger Release 2023-2b: BioLuminate, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2021. 778
52. González-Esparragoza, D.; Carrasco-Carballo, A.; Rosas-Murrieta, N.H.; Millán-Pérez-Peña, L.; Herrera-Camacho, I. In Silico Analysis for Metalloenzyme-Protein Interactions Applied to MMP8-Fibronectin 1 and MMP12-Factor XII; 2023; Vol. 1. 779  
780
53. Laskowski, R.A.; Swindells, M.B. LigPlot+: Multiple Ligand-Protein Interaction Diagrams for Drug Discovery. *J Chem Inf Model* **2011**, *51*, 2778–2786, doi:10.1021/ci200227u. 781  
782
54. Schrödinger Release 2023-2b: WaterMap, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2021. 783

55. Biswal, J.; Jayaprakash, P.; Rayala, S.K.; Venkatraman, G.; Rangaswamy, R.; Jeyaraman, J. WaterMap and Molecular Dynamic Simulation-Guided Discovery of Potential PAK1 Inhibitors Using Repurposing Approaches. *ACS Omega* 2021, 6, 26829–26845, doi:10.1021/acsomega.1c02032. 784
56. Sobhía, M.E.; Ghosh, K.; Sivangula, S.; Kumar, S.; Singh, H. Identification of Potential SARS-CoV-2 Mpro Inhibitors Integrating Molecular Docking and Water Thermodynamics. *J Biomol Struct Dyn* 2022, 40, 5079–5089, doi:10.1080/07391102.2020.1867642. 785
57. Schrödinger Release 2024-1: Desmond Molecular Dynamics System, D. E. Shaw Research, New York, NY, 2024. Maestro-Desmond Interoperability Tools, Schrödinger, New York, NY, 2024. 786
58. Bowers, K.J.; Chow, E.; Xu, H.; Dror, R.O.; Eastwood, M.P.; Gregersen, B.A.; Klepeis, J.L.; Kolossvary, I.; Moraes, M.A.; Sacerdoti, F.D.; et al. Scalable Algorithms for Molecular Dynamics Simulations on Commodity Clusters. *Proceedings of the 2006 ACM/IEEE Conference on Supercomputing, SC'06, Tampa, Florida 2006*, 11–17, doi:10.1145/1188455.1188544. 787
59. Iqbal, D.; Rehman, M.T.; Alajmi, M.F.; Alsaweed, M.; Jamal, Q.M.S.; Alasiry, S.M.; Albaker, A.B.; Hamed, M.; Kamal, M.; Albadrani, H.M. Multitargeted Virtual Screening and Molecular Simulation of Natural Product-like Compounds against GSK3 $\beta$ , NMDA-Receptor, and BACE-1 for the Management of Alzheimer's Disease. *Pharmaceuticals* 2023, 16, doi:10.3390/ph16040622. 788
60. Lieberman, H.B.; Hopkins, K.M.; Nass, M.; Demetrick, D.; Davey, S. A Human Homolog of the Schizosaccharomyces Pombe Rad9 Checkpoint Control Gene. *Genetics* 1996, 93, 13890–13895, doi:10.1073/pnas.93.24.13890. 789
61. Lieberman, H.B. Rad9, an Evolutionarily Conserved Gene with Multiple Functions for Preserving Genomic Integrity. *J Cell Biochem* 2006, 97, 690–697, doi:10.1002/jcb.20759. 790
62. Zhu, Y.; Xie, M.; Meng, Z.; Leung, L.K.; Chan, F.L.; Hu, X.; Chi, K.; Liu, C.; Yao, X. Knockdown of TM96F4 Boosts ER Stress to Trigger Cell Death of Chemoresistant Breast Cancer Cells. *Oncogene* 2019, 38, 5778–5791, doi:10.1038/s41388-019-0846-y. 791
63. Sun, J.; Ren, D. IER3IP1 Deficiency Leads to Increased  $\beta$ -Cell Death and Decreased  $\beta$ -Cell Proliferation. *Oncotarget* 2017, 8, 56768–56779, doi:10.18632/oncotarget.18179. 792
64. Lounis, M.A.; Lalonde, S.; Rial, S.A.; Bergeron, K.F.; Ralston, J.C.; Mutch, D.M.; Mounier, C. Hepatic BSCL2 (Seipin) Deficiency Disrupts Lipid Droplet Homeostasis and Increases Lipid Metabolism via SCD1 Activity. *Lipids* 2017, 52, 129–150, doi:10.1007/s11745-016-4210-5. 793
65. Rallis, C.; Townsend, S.; Bähler, J. Genetic Interactions and Functional Analyses of the Fission Yeast Gsk3 and Amk2 Single and Double Mutants Defective in TORC1-Dependent Processes. *Sci Rep* 2017, 7, 1–10, doi:10.1038/srep44257. 794
66. Roguev, A.; Bandyopadhyay, S.; Zofall, M.; Zhang, K.; Fischer, T.; Collins, S.R.; Qu, H.; Shales, M.; Park, H.-O.; Hayles, J.; et al. Conservation and Rewiring of Functional Modules Revealed by an Epistasis Map in Fission Yeast. *Science (1979)* 2008, 322, 405–410, doi:10.1126/science.1162609. 795
67. VanderShuis, B.; Costanzo, M.; Billmann, M.; Ward, H.N.; Myers, C.L.; Andrews, B.J.; Boone, C. Integrating Genetic and Protein-Protein Interaction Networks Maps a Functional Wiring Diagram of a Cell. *Curr Opin Microbiol* 2018, 45, 170–179, doi:10.1016/j.mib.2018.06.004. 796
68. Bouhaddou, M.; Eckhardt, M.; Chi Naing, Z.Z.; Kim, M.; Ideker, T.; Krogan, N.J. Mapping the Protein-Protein and Genetic Interactions of Cancer to Guide Precision Medicine. *Curr Opin Genet Dev* 2019, 54, 110–117, doi:10.1016/j.gde.2019.04.005. 797
69. Leclerc, G.M.; Leclerc, G.J.; Kuznetsov, J.N.; DeSalvo, J.; Barredo, J.C. Metformin Induces Apoptosis through AMPK-Dependent Inhibition of UPR Signaling in ALL Lymphoblasts. *PLoS One* 2013, 8, e74420, doi:10.1371/JOURNAL.PONE.0074420. 798
70. Meares, G.P.; Mines, M.A.; Beurel, E.; Eom, T.Y.; Song, L.; Zmijewska, A.A.; Jope, R.S. Glycogen Synthase Kinase-3 Regulates Endoplasmic Reticulum (ER) Stress-Induced CHOP Expression in Neuronal Cells. *Exp Cell Res* 2011, 317, 1621–1628, doi:10.1016/j.yexcr.2011.02.012. 799
71. Corazzari, M.; Gagliardi, M.; Fimia, G.M.; Piacentini, M. Endoplasmic Reticulum Stress, Unfolded Protein Response, and Cancer Cell Fate. *Front Oncol* 2017, 7, 1–11, doi:10.3389/fonc.2017.00078. 800
72. Lustoza, A.C.D.M.; Palma, L.M.; Façanha, A.R.; Okorokov, L.A.; Okorokova-Façanha, A.L. P 5a-Type ATPase Cta4p Is Essential for Ca 2+ Transport in the Endoplasmic Reticulum of Schizosaccharomyces Pombe. *PLoS One* 2011, 6, doi:10.1371/journal.pone.0027843. 801
73. Schönthal, A.H. Endoplasmic Reticulum Stress: Its Role in Disease and Novel Prospects for Therapy. *Scientifica (Cairo)* 2012, 2012, 1–26, doi:10.6064/2012/857516. 802
74. Chevrier, B.; D'Orchymont, H.; Schalk, C.; Tarnus, C.; Moras, D. The Structure of the Aeromonas Proteolytica Aminopeptidase Complexed with a Hydroxamate Inhibitor: Involvement in Catalysis of Glu151 and Two Zinc Ions of the Co-Catalytic Unit. *Eur J Biochem* 1996, 237, 393–398, doi:10.1111/j.1432-1033.1996.0393k.x. 803
75. Rawlings, N.D.; Barrett, A.J.; Thomas, P.D.; Huang, X.; Bateman, A.; Finn, R.D. The MEROPS Database of Proteolytic Enzymes, Their Substrates and Inhibitors in 2017 and a Comparison with Peptidases in the PANTHER Database. *Nucleic Acids Res* 2018, 46, D624–D632, doi:10.1093/nar/gkx1134. 804
76. Auld, D.S. Catalytic Mechanisms for Metallopeptidases. *Handbook of Proteolytic Enzymes* 2013, 1, 370–396, doi:10.1016/B978-0-12-382219-2.00078-8. 805
77. Hornbeck, P. V.; Zhang, B.; Murray, B.; Kornhauser, J.M.; Latham, V.; Skrzypek, E. PhosphoSitePlus, 2014: Mutations, PTMs and Recalibrations. *Nucleic Acids Res* 2015, 43, D512–D520, doi:10.1093/nar/gku1267. 806
78. Tsai, C.-F.; Wang, Y.-T.; Yen, H.-Y.; Tsou, C.-C.; Ku, W.-C.; Lin, P.-Y.; Chen, H.-Y.; Nesvizhskii, A.I.; Ishihama, Y.; Chen, Y.-J. Large-Scale Determination of Absolute Phosphorylation Stoichiometries in Human Cells by Motif-Targeting Quantitative Proteomics. *Nat Commun* 2015, 6, 6622, doi:10.1038/ncomms7622. 807

79. Mancinelli, R.; Carpino, G.; Petruogaro, S.; Mammola, C.L.; Tomaipitina, L.; Filippini, A.; Facchiano, A.; Ziparo, E.; Giampietri, C. Multifaceted Roles of GSK-3 in Cancer and Autophagy-Related Diseases. *Oxid Med Cell Longev* 2017, 2017, doi:10.1155/2017/4629495. 843
80. Plyte, S.E.; Feoktistova, A.; Burke, J.D.; Woodgett, J.R.; Gould, K.L. Schizosaccharomyces Pombe Skp1 Encodes a Protein Kinase Related to Mammalian Glycogen Synthase Kinase 3 and Complements a Cdc14 Cytokinesis Mutant. *Mol Cell Biol* 1996, 16, 179–191, doi:10.1128/MCB.16.1.179. 844
81. Kim, W.; Bennett, E.J.; Huttlin, E.L.; Guo, A.; Li, J.; Possemato, A.; Sowa, M.E.; Rad, R.; Rush, J.; Comb, M.J.; et al. Systematic and Quantitative Assessment of the Ubiquitin-Modified Proteome. *Mol Cell* 2011, 44, 325–340, doi:10.1016/j.molcel.2011.08.025. 845
82. Lumpkin, R.J.; Gu, H.; Zhu, Y.; Leonard, M.; Ahmad, A.S.; Clauser, K.R.; Meyer, J.G.; Bennett, E.J.; Komives, E.A. Site-Specific Identification and Quantitation of Endogenous SUMO Modifications under Native Conditions. *Nat Commun* 2017, 8, doi:10.1038/s41467-017-01271-3. 846
83. Jumper, J.; Evans, R.; Pritzel, A.; Green, T.; Figurnov, M.; Ronneberger, O.; Tunyasuvunakool, K.; Bates, R.; Židek, A.; Potapenko, A.; et al. Highly Accurate Protein Structure Prediction with AlphaFold. *Nature* 2021, 596, 583–589, doi:10.1038/s41586-021-03819-2. 847
84. Laskowski, R.A.; Furnham, N.; Thornton, J.M. The Ramachandran Plot and Protein Structure Validation. *Biomolecular Forms and Functions* 2013, 62–75, doi:10.1142/9789814449144\_0005. 848
85. Holz, R.C. The Aminopeptidase from *Aeromonas Proteolytica*: Structure and Mechanism of Co-Catalytic Metal Centers Involved in Peptide Hydrolysis. *Coord Chem Rev* 2002, 232, 5–26, doi:10.1016/S0010-8545(01)00470-2. 849
86. Desmarais, W.; Bienvenue, D.L.; Bzymek, K.P.; Petsko, G.A.; Ringe, D.; Holz, R.C. The High-Resolution Structures of the Neutral and the Low PH Crystals of Aminopeptidase from *Aeromonas Proteolytica*. *Journal of Biological Inorganic Chemistry* 2006, 11, 398–408, doi:10.1007/s00775-006-0093-x. 850
87. Richards, A.L.; Eckhardt, M.; Krogan, N.J. Mass Spectrometry-based Protein-Protein Interaction Networks for the Study of Human Diseases. *Mol Syst Biol* 2021, 17, 1–18, doi:10.1525/msb.20188792. 851
88. Hiller, O.; Lichte, A.; Oberpichler, A.; Kocourek, A.; Tschesche, H. Matrix Metalloproteinases Collagenase-2, Macrophage Elastase, Collagenase-3, and Membrane Type 1-Matrix Metalloproteinase Impair Clotting by Degradation of Fibrinogen and Factor XII. *Journal of Biological Chemistry* 2000, 275, 33008–33013, doi:10.1074/jbc.M001836200. 852
89. Yasuhara, T.; Nakai, T.; Ohashi, A. Aminopeptidase Y, a New Aminopeptidase from *Saccharomyces Cerevisiae*. Purification, Properties, Localization, and Processing by Protease B. *Journal of Biological Chemistry* 1994, 269, 13644–13650, doi:10.1016/s0021-9258(17)36878-3. 853
90. Shiba, T.; Koga, H.; Shin, H.-W.; Kawasaki, M.; Kato, R.; Nakayama, K.; Wakatsuki, S. Structural Basis for Rab11-Dependent Membrane Recruitment of a Family of Rab11-Interacting Protein 3 (FIP3) Arfophilin-1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006, 103, 15416–15421, doi:10.1073/pnas.0605357103. 854
91. Kumar, P.; Wolberger, C. Structure of the Yeast Bre1 RING Domain. *Proteins: Structure, Function and Bioinformatics* 2015, 83, 1185–1190, doi:10.1002/prot.24812. 855
92. Wu, J.; Wang, Y.; Gan, J.; Wang, W.; Sun, B.; Huang, Z.X.; Xia, Z.X. Structures of Cytochrome B5 Mutated at the Charged Surface-Residues and Their Interactions with Cytochrome c. *Chin J Chem* 2002, 2, 1225–1234, doi:10.1002/cjoc.20020201114. 856
93. Dohm, J.A.; Lee, S.J.; Hardwick, J.M.; Hill, R.B.; Gittis, A.G. Cytosolic Domain of the Human Mitochondrial Fission Protein Fis1 Adopts a TPR Fold. *Proteins: Structure, Function and Genetics* 2004, 54, 153–156, doi:10.1002/prot.10524. 857
94. Zhang, Y.; Inoue, M.; Tsutsumi, A.; Watanabe, S.; Nishizawa, T.; Nagata, K.; Kikkawa, M.; Inaba, K. Cryo-EM Structures of SERCA2b Reveal the Mechanism of Regulation by the Luminal Extension Tail. *Sci Adv* 2020, 6, eabb0147, doi:10.1126/sciadv.abb0147. 858
95. Kazanov, M.D.; Igarashi, Y.; Eroshkin, A.M.; Cieplak, P.; Ratnikov, B.; Zhang, Y.; Li, Z.; Godzik, A.; Osterman, A.L.; Smith, J.W. Structural Determinants of Limited Proteolysis. *J Proteome Res* 2011, 10, 3642–3651, doi:10.1021/pr200271w. 859
96. Oldfield, C.J.; Dunker, A.K. Intrinsically Disordered Proteins and Intrinsically Disordered Protein Regions. *Annu Rev Biochem* 2014, 83, 553–584, doi:10.1146/annurev-biochem-072711-164947. 860
97. Ruff, K.M.; Pappu, R. V. AlphaFold and Implications for Intrinsically Disordered Proteins. *J Mol Biol* 2021, 453, 1–11, doi:10.1016/j.jmb.2021.167208. 861
98. Mahrus, S.; Trinidad, J.C.; Barkan, D.T.; Sali, A.; Burlingame, A.L.; Wells, J.A. Global Sequencing of Proteolytic Cleavage Sites in Apoptosis by Specific Labeling of Protein N Termini. *Cell* 2008, 134, 866–876, doi:10.1016/j.cell.2008.08.012. 862
99. Timmer, J.C.; Zhu, W.; Pop, C.; Regan, T.; Snipas, S.J.; Eroshkin, A.M.; Riedl, S.J.; Salvesen, G.S. Structural and Kinetic Determinants of Protease Substrates. *Nat Struct Mol Biol* 2009, 16, 1101–1108, doi:10.1038/nsmb.1668. 863
100. Hartmann, M.; Clark, T.; Van Eldik, R. Hydration and Water Exchange of Zinc (II) Ions. Application of Density Functional Theory. *J Am Chem Soc* 1997, 119, 7843–7850, doi:10.1021/ja970483f. 864
101. Zhao, M.; Wang, H.B.; Ji, L.N.; Mao, Z.W. Insights into Metalloenzyme Microenvironments: Biomimetic Metal Complexes with a Functional Second Coordination Sphere. *Chem Soc Rev* 2013, 42, 8360–8375, doi:10.1039/c3cs60162e. 865
102. Zastrow, M.L.; Pecoraro, V.L. Designing Hydrolytic Zinc Metalloenzymes. *Biochemistry* 2014, 53, 957–978, doi:10.1021/bi4016617. 866
103. Jeong, W.J.; Lee, J.; Eom, H.; Song, W.J. A Specific Guide for Metalloenzyme Designers: Introduction and Evolution of Metal-Coordination Spheres Embedded in Protein Environments. *Acc Chem Res* 2023, 56, 2416–2425, doi:10.1021/acs.accounts.3c00336. 867

104. Hitzerd, S.M.; Verbrugge, S.E.; Ossenkuppele, G.; Jansen, G.; Peters, G.J. Positioning of Aminopeptidase Inhibitors in next Generation Cancer Therapy. *Amino Acids* **2014**, *46*, 793–808, doi:10.1007/s00726-013-1648-0. 902
105. Holstein, S.A.; Heckman, C.A.; Davies, F.E.; Morgan, G.J.; Gelius, S.S.; Lehmann, F. Aminopeptidases in Cancer, Biology and Prospects for Pharmacological Intervention. *Curr Cancer Drug Targets* **2022**, *23*, 25–46, doi:10.2174/1568009622666220623112605. 904
106. Polaina, Julio.; MacCabe, A.P. Industrial Enzymes: Structure, Function and Applications. In: Springer, 2007; pp. 243–260 ISBN 9781402053771. 906
107. Mina-Osorio, P. The Moonlighting Enzyme CD13: Old and New Functions to Target. *Trends Mol Med* **2008**, *14*, 361–371, doi:10.1016/j.molmed.2008.06.003. 908
108. Moore, H.E.; Davenport, E.L.; Smith, E.M.; Muralikrishnan, S.; Dunlop, A.S.; Walker, B.A.; Krige, D.; Drummond, A.H.; Hooftman, L.; Morgan, G.J.; et al. Aminopeptidase Inhibition as a Targeted Treatment Strategy in Myeloma. *Mol Cancer Ther* **2009**, *8*, 762–770, doi:10.1158/1535-7163.MCT-08-0735. 910
109. Qi, L.; Tsai, B.; Arvan, P. New Insights into the Physiological Role of Endoplasmic Reticulum-Associated Degradation. *Trends Cell Biol* **2017**, *27*, 430–440. 912
110. Suzuki, T.; Bridges, D.; Nakada, D.; Skinotis, G.; Morrison, S.J.; Lin, J.D.; Saltiel, A.R.; Inoki, K. Inhibition of AMPK Catabolic Action by GSK3. *Mol Cell* **2013**, *50*, 407–419, doi:10.1016/j.molcel.2013.03.022. 915
111. Xiao, B.; Sanders, M.J.; Carmena, D.; Bright, N.J.; Haire, L.F.; Underwood, E.; Patel, B.R.; Heath, R.B.; Walker, P.A.; Hallen, S.; et al. Structural Basis of AMPK Regulation by Small Molecule Activators. *Nat Commun* **2013**, *4*, doi:10.1038/ncomms4017. 916
112. Cetrullo, S.; D'Adamo, S.; Tantini, B.; Borzi, R.M.; Flamigni, F. MTOR, AMPK, and Sirt1: Key Players in Metabolic Stress Management. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* **2015**, *25*, 59–75, doi:10.1615/CritRevEukaryotGeneExpr.2015012975. 919
113. Evangelisti, C.; Chiarini, F.; Paganelli, F.; Marmiroli, S.; Martelli, A.M. Crosstalks of GSK3 Signaling with the MTOR Network and Effects on Targeted Therapy of Cancer. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res* **2020**, *1867*, 118635, doi:10.1016/j.bbamer.2019.118635. 921
114. Nie, T.; Yang, S.; Ma, H.; Zhang, L.; Lu, F.; Tao, K.; Wang, R.; Yang, R.; Huang, L.; Mao, Z.; et al. Regulation of ER Stress-Induced Autophagy by GSK3B-TIP60-ULK1 Pathway. *Cell Death Dis* **2016**, *7*, e2563, doi:10.1038/cddis.2016.423. 924
115. Liu, C.M.; Yang, H.X.; Ma, J.Q.; Yang, W.; Feng, Z.J.; Sun, J.M.; Cheng, C.; Li, J.; Jiang, H. Role of AMPK Pathway in Lead-Induced Endoplasmic Reticulum Stress in Kidney and in Paeonol-Induced Protection in Mice. *Food and Chemical Toxicology* **2018**, *122*, 87–94, doi:10.1016/j.fct.2018.10.024. 926
116. Nascimento Mello, A.L.; Sagrillo, F.S.; de Souza, A.G.; Costa, A.R.P.; Campos, V.R.; Cunha, A.C.; Imbroisi Filho, R.; da Costa Santos Bochat, F.; Sola-Penna, M.; de Souza, M.C.B.V.; et al. Selective AMPK Activator Leads to Unfolded Protein Response Downregulation and Induces Breast Cancer Cell Death and Autophagy. *Life Sci* **2021**, *276*, 1–12, doi:10.1016/j.lfs.2021.119470. 929
117. Hartnuth, S.; Petersen, J. Fission Yeast Tor1 Functions as Part of TORC1 to Control Mitotic Entry through the Stress MAPK Pathway Following Nutrient Stress. *J Cell Sci* **2009**, *122*, 1737–1746, doi:10.1242/jcs.049387. 932
118. Wu, H.; Ng, B.S.H.; Thibault, G. Endoplasmic Reticulum Stress Response in Yeast and Humans. *Biosci Rep* **2014**, *34*, 321–330, doi:10.1042/BSR20140058. 934
119. Hu, W.; Ohue, M. SpatialPPI: Three-Dimensional Space Protein-Protein Interaction Prediction With AlphaFold Multimer. *Comput Struct Biotechnol J* **2024**, doi:10.1016/j.csbj.2024.03.009. 936
120. Malladi, S.; Powell, H.R.; David, A.; Islam, S.A.; Copeland, M.M.; Kundrotas, P.J.; Sternberg, M.J.E.; Vakser, I.A. GWYRE: A Resource for Mapping Variants onto Experimental and Modeled Structures of Human Protein Complexes. *J Mol Biol* **2022**, *434*, doi:10.1016/j.jmb.2022.167608. 937
121. Mishra, M.; Jiang, H.; Wei, Q. New Insights on the Differential Interaction of Sulfiredoxin with Members of the Peroxiredoxin Family Revealed by Protein-Protein Docking and Experimental Studies. *Eur J Pharmacol* **2023**, *954*, doi:10.1016/j.ejphar.2023.175873. 938
122. Jakhmola, V.; Parashar, T.; Ghildiyal, P.; Ansori, A.N.M.; Sharma, R.K.; Rao, N.G.R.; Kalra, K.; Singh, N.; Nainwal, N.; Singh, R.K.; et al. An In Silico Study to Explore the Role of EGFR in Ovarian Cancer. *Pharmacognosy Journal* **2022**, *14*, 817–821, doi:10.5530/pj.2022.14.173. 939
123. Desta, I.T.; Porter, K.A.; Xia, B.; Kozakov, D.; Vajda, S. Performance and Its Limits in Rigid Body Protein-Protein Docking. *Structure* **2020**, *28*, 1071–1081.e3, doi:10.1016/j.str.2020.06.006. 942
124. Gupta, S.; Ali, A.; Pandey, S.; Khan, I.A.; Prakash, P. Fibronectin Containing Alternatively Spliced Extra Domain A Interacts at the Central and C-Terminal Domain of Toll-like Receptor-4. *Sci Rep* **2022**, *12*, 1–12, doi:10.1038/s41598-022-13622-2. 949
125. Sotudian, S.; Desta, I.T.; Hashemi, N.; Zarbafian, S.; Kozakov, D.; Vakili, P.; Vajda, S.; Paschalidis, I.C. Improved Cluster Ranking in Protein-Protein Docking Using a Regression Approach. *Comput Struct Biotechnol J* **2021**, *19*, 2269–2278, doi:10.1016/j.csbj.2021.04.028. 950

**Disclaimer/Publisher's Note:** The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content. 955