



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**FACULTAD DE QUÍMICA**

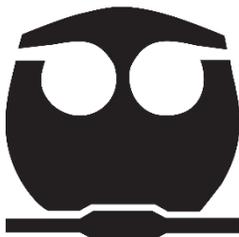
**ANÁLISIS ESTRUCTURAL DE LAS PROTEÍNAS  
DISULFURO ISOMERASAS MEDIANTE  
HERRAMIENTAS BIOINFORMÁTICAS**

**TESINA**

**PARA OBTENER EL TÍTULO DE:  
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**

**P R E S E N T A:**

**DANIEL CUEVAS ORTIZ**



**CIUDAD UNIVERSITARIA CDMX**

**AÑO 2024**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

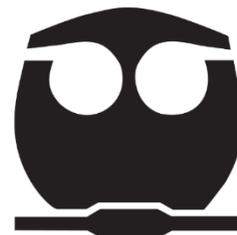
**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE  
MÉXICO



**PROTESTA UNIVERSITARIA DE INTEGRIDAD Y  
HONESTIDAD ACADÉMICA Y PROFESIONAL  
(Titulación o Graduación con trabajo escrito)**

De conformidad con lo dispuesto en los artículos 87, fracción V, del Estatuto General, 68, primer párrafo, del Reglamento General de Estudios Universitarios y 26, fracción I, y 35 del Reglamento General de Exámenes, me comprometo en todo tiempo a honrar a la Institución y a cumplir con los principios establecidos en el Código de Ética de la Universidad Nacional Autónoma de México, especialmente con los de integridad y honestidad académica.

De acuerdo con lo anterior, manifiesto que el trabajo escrito titulado ANÁLISIS ESTRUCTURAL DE LAS PROTEÍNAS DISULFURO ISOMERASAS MEDIANTE HERRAMIENTAS BIOINFORMÁTICAS que presenté para obtener el título/grado de Químico Farmacéutico Biólogo, es original, de mi autoría y lo realicé con el rigor metodológico exigido por la Facultad de Química, citando las fuentes de ideas, textos, imágenes, gráficos u otro tipo de obras empleadas para su desarrollo.

En consecuencia, acepto que la falta de cumplimiento de las disposiciones reglamentarias y normativas de la Universidad, en particular las ya referidas en el Código de Ética, llevará a la nulidad de los actos de carácter académico administrativo del proceso de titulación/graduación.

**Atentamente**

Daniel Cuevas Ortiz

316303697

(Nombre completo, firma y número de cuenta)

**JURADO ASIGNADO:**

**PRESIDENTE:** Profesor: Rosario Adelaida Muñoz Clares

**VOCAL:** Profesor: Marina Gavilanez Ruiz

**SECRETARIO:** Profesor: Myriam Marlenne Altamirano Bustamante

**1er. SUPLENTE:** Profesor: Jesús Fernando Montiel Aguirre

**2° SUPLENTE:** Profesor: Tzvetanka Dimitrova Dinkova

**SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA: UNIDAD DE INVESTIGACIÓN DE ENFERMEDADES METABÓLICAS DEL CENTRO MÉDICO NACIONAL SIGLO XXI, IMSS**

**ASESOR DEL TEMA: MYRIAM M. ALTAMIRANO BUSTAMANTE**

**SUSTENTANTE (S): DANIEL CUEVAS ORTIZ**

## **AGRADECIMIENTOS**

Agradezco enormemente el apoyo económico brindado por CONAHCYT y a la Dra. Myriam Altamirano Bustamante por darme la oportunidad de participar como su ayudante de investigación SNII.

## TABLA DE CONTENIDO

1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	3
2. OBJETIVOS GENERALES Y PARTICULARES.....	5
2.1 OBJETIVO GENERAL.....	5
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	5
3. ANTECEDENTES.....	6
3.1 PROTEÍNAS DISULFURO ISOMERASAS.....	6
3.1.1 FUNCIONES.....	7
3.1.2 ESTRUCTURA.....	12
3.1.3 ENSAYOS PARA MEDIR LA ACTIVIDAD DE PDI.....	19
3.1.4. EVOLUCIÓN.....	21
3.2 PDI EN PROCESOS FISIOLÓGICOS.....	23
3.2.1 HOMEOSTASIS DE PROTEÍNAS.....	23
3.2.2 PLEGAMIENTO OXIDATIVO DE PROTEÍNAS.....	25
3.2.3 RESPUESTA A PROTEÍNAS MAL PLEGADAS.....	27
3.2.4 DEGRADACIÓN DE PROTEÍNAS ASOCIADA AL RE.....	28
3.3 PDI EN PROCESOS PATOLÓGICOS.....	29
3.3.1 ENFERMEDADES METABÓLICAS.....	30
3.3.2 ENFERMEDADES CARDIOVASCULARES.....	30
3.3.3 ENFERMEDADES NEURODEGENERATIVAS.....	31
3.3.4 CÁNCER.....	32
3.4 TERAPIAS ACTUALES CON CHAPERONAS.....	33
3.5 HERRAMIENTAS BIOINFORMÁTICAS PARA EL ANÁLISIS DE PROTEÍNAS.....	34

4. METODOLOGÍA.....	37
4.1 ANÁLISIS FILOGENÉTICO Y DE LA ESTRUCTURA PRIMARIA.....	37
4.2 ANÁLISIS DE LA ESTRUCTURA SECUNDARIA.....	38
4.3 ANÁLISIS DE LA ESTRUCTURA TERCIARIA.....	39
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	40
5.1 ANÁLISIS FILOGENÉTICO Y DE LA ESTRUCTURA PRIMARIA.....	40
5.2 ANÁLISIS DE LA ESTRUCTURA SECUNDARIA.....	44
5.3 ANÁLISIS DE LA ESTRUCTURA TERCIARIA.....	46
6. CONCLUSIONES.....	55
7. REFERENCIAS.....	56
8. APÉNDICES.....	68
APÉNDICE I. Matriz de identidad de las 29 PDI presentadas en el árbol filogenético.....	68
APÉNDICE II. Alineamiento de las 11 PDI realizado en Clustal Omega donde se muestran aminoácidos altamente conservados (*), medianamente conservados (:) y poco conservados (.) coloreados según sus características fisicoquímicas. .....	69
APÉNDICE III. Alineamiento de estructuras secundarias de las 11 PDI seleccionadas realizado con Dali. $\alpha$ -hélices (H), hebras $\beta$ (E) y asas (L).....	74
APÉNDICE IV. Alineamiento de estructuras secundarias de proteínas Dsb realizado con Dali. $\alpha$ -hélices (H), hebras $\beta$ (E) y asas (L).....	75
APÉNDICE V. Conservación de aminoácidos en ortólogos de las 11 PDI seleccionadas. Entre más grande el tamaño de la letra hay una mayor conservación con proteínas ortólogas. ....	76

## 1. INTRODUCCIÓN

Las proteínas llevan a cabo diversas funciones celulares como formar parte de elementos estructurales, catalizar reacciones, transportar moléculas, participar en la transmisión de señales, la respuesta inmunológica, en la regulación metabólica y genética, entre muchas otras. La función que desempeñan las proteínas depende de su estructura tridimensional, de ahí la importancia que su plegamiento sea adecuado para que adquieran su forma nativa (Gomes & Faísca, 2019).

Muchas de las proteínas sintetizadas en células eucariotas pasan por el retículo endoplásmico, en donde se lleva a cabo su plegamiento, maduración y estabilización con la asistencia de otras proteínas conocidas como chaperonas o foldasas (Maattanen et al., 2014).

La familia de las proteínas disulfuro isomerasas (PDI) oxidan, reducen e isomerizan puentes disulfuro, por lo tanto, son enzimas protagonistas del plegamiento oxidativo; además, son chaperonas que evitan la agregación de proteínas mal plegadas, participan en el mantenimiento del equilibrio redox, en la homeostasis de proteínas desplegadas, en la viabilidad de la célula, en la respuesta de proteínas mal plegadas (UPR) y en la degradación de proteínas asociada al retículo endoplásmico (ERAD) y poseen roles importantes en diversas enfermedades (Matsusaki et al., 2021).

La familia de las PDI contiene al menos un dominio de tipo tiorredoxina, el cual se caracteriza por su conformación de hebras  $\beta$  rodeadas por  $\alpha$  hélices y que contiene un motivo CXXC (una cisteína, otros dos aminoácidos y otra cisteína), el cual participa en el plegamiento oxidativo de proteínas (Horibe et al., 2004). Sin embargo, la familia de las PDI es muy diversa en tamaño, número de dominios, acomodo tridimensional de los dominios, la composición del sitio activo, intervención en procesos fisiológicos, funciones catalíticas y su eficiencia en éstas.

Si bien se ha determinado la estructura de diversas proteínas de esta familia y se han identificado residuos de aminoácidos clave en su función, aún no hay estudios que clarifiquen las diferencias estructurales entre las PDI y sus homólogas en procariotas, las proteínas formadoras de puentes disulfuro (Dsb), y tampoco hay investigaciones sobre las estructuras que se mantienen conservadas a través de distintos organismos y proteínas parálogas que conforman esta familia de foldasas. Además, quedan por contestar preguntas como cuáles son las unidades estructurales que son fundamentales para que las PDI realicen eficientemente sus funciones y si es posible que sean capaces de desintegrar oligómeros amiloides característicos de las enfermedades conformacionales.

En este trabajo se identifican regiones altamente conservadas presentes en las PDI que no se encuentran en las Dsb, dando una posible explicación de por qué las PDI son capaces de llevar a cabo distintos tipos de reacciones y la familia de las enzimas procariotas, no. Además, se reportan las estructuras secundarias y su disposición en el espacio de las cadenas de aminoácidos conservadas en organismos distintos, desde la ameba hasta el ser humano.

Estudiar a profundidad la estructura de estas proteínas es de gran importancia, pues el conocimiento generado se puede aplicar en el diseño de proteínas. De esta manera, se facilitaría el desarrollo de PDI con una actividad mejorada de chaperona que sería muy útil para el tratamiento de enfermedades conformacionales, o bien, para la identificación de moléculas inhibitorias de una actividad específica de las PDI, lo cual puede ser muy útil en el tratamiento del cáncer debido a que reduciría la viabilidad de las células cancerígenas (Powell & Foster, 2021).

Adentrarse en la relación que existe entre la estructura y la actividad de esta familia permitirá comprender de mejor manera procesos fisiológicos como la homeostasis de proteínas o el plegamiento oxidativo de proteínas y otros procesos patológicos relacionados con la actividad de la PDI como el cáncer, la inflamación o el estrés oxidante en la célula.

Las herramientas bioinformáticas se han vuelto prácticamente indispensables para el análisis estructural de las proteínas, pues se han recolectado un gran número de datos experimentales, lo que requiere de estas herramientas para su manejo. Además, los avances en la ciencia computacional como del inmenso desarrollo en la inteligencia artificial se han reflejado en la creación de plataformas y programas capaces de analizar, predecir y visualizar datos biológicos, actividades sumamente valiosas en las investigaciones de la genómica, transcriptómica, proteómica y metabolómica (Ertelt et al., 2024).

Definir la arquitectura o el andamio proteico (*protein scaffold* en inglés) es muy prometedor para brindar enfoques terapéuticos innovadores en padecimientos como la diabetes, obesidad, Alzheimer, Parkinson, cáncer, etcétera (Wallis & Freedman, 2013).

Los resultados abrirán el horizonte epistémico y sentarán las bases para próximas investigaciones sobre el diseño y generación de nuevas foldasas; además, se podría estudiar el efecto de modificaciones concretas de ciertos aminoácidos en esos segmentos específicos. Al reducir la brecha entre la Bioquímica y las ciencias computacionales, este conocimiento se empleará en el desarrollo y entrenamiento de modelos de aprendizaje automático que pretendan mejorar la función de las PDI o simplificar su estructura para facilitar su producción como medicamento biotecnológico y disminuir inmunogenicidad (Guevara et al., 2013).

Este enfoque es muy prometedor y alentador, pues su fin último es impactar en el bienestar y calidad de vida de las personas, en el avance de la ciencia y la tecnología y en el desarrollo pleno de la sociedad.

## 1.1 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Cuando las proteínas no se pliegan correctamente pueden causar mal funcionamiento o muerte celular y dar lugar a agregados nocivos como son los

oligómeros amiloides. También se espera un efecto perjudicial profundo, que a menudo resulta en las denominadas enfermedades conformacionales de proteínas (Grasso et al., 2023). Es en esta pérdida de la homeostasis proteica, en donde las PDI podrían intervenir para evitar la formación de oligómeros y el desarrollo de estas enfermedades.

Algunos miembros de la familia de las PDI se encuentran sobre expresados en varios tipos de cáncer, pues existe una mayor demanda para controlar el estrés oxidante, una mayor demanda de plegamiento proteico para la rápida proliferación celular y, por tanto, para la supervivencia de las células cancerígenas (Ye et al., 2023).

Además, se ha encontrado que una inactivación de PDI disminuye la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS), la fosforilación del factor nuclear kappa B (NF- $\kappa$ B) que permite su traslocación al núcleo y activando la transcripción de genes de citoquinas, por lo tanto, reduce la secreción de TNF- $\alpha$  e IL-6; también se disminuye la migración de macrófagos (Xiao et al., 2018), esto implica que las PDI también participan procesos inflamatorios..

Las PDI están relacionadas con diversas enfermedades, por lo que estudiar su estructura se vuelve crucial para investigar y proponer nuevos enfoques terapéuticos para padecimientos que afectan a millones de personas en México y el mundo, abarcando desde mejorar su función como chaperona para el tratamiento de las enfermedades conformacionales hasta inhibir selectivamente alguna de sus funciones asociadas con procesos inflamatorios o cancerígenos.

## 1.2 HIPÓTESIS

Es posible identificar regiones conservadas y variables en las PDI mediante herramientas bioinformáticas, a pesar de que es una familia muy diversa en secuencia de aminoácidos, estructura tridimensional y actividad catalítica.

## 2. OBJETIVOS GENERALES Y PARTICULARES

### 2.1 OBJETIVO GENERAL

Identificar regiones conservadas en las proteínas disulfuro isomerasas a nivel de estructuras primaria, secundaria y terciaria mediante herramientas bioinformáticas, considerando diversas proteínas homólogas en esta familia de proteínas.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Identificar zonas conservadas en las PDI y caracterizar sus propiedades estructurales.
- Identificar zonas variables que dan lugar a nuevas propiedades a lo largo de la evolución.
- Alinear secuencias de la familia de las PDI e identificar residuos de aminoácidos conservados.
- Predecir las estructura secundaria y terciaria de proteínas de esta familia de foldasas.

### 3. ANTECEDENTES

#### 3.1 PROTEÍNAS DISULFURO ISOMERASAS

Las proteínas disulfuro isomerasas (PDI) son chaperonas que se encuentran en el retículo endoplásmico (RE) de las células eucariotas, miembros en esta familia poseen una secuencia desde los 200 hasta 800 aminoácidos aproximadamente (Bateman et al., 2023). Esta familia es una de las más grandes que residen en el RE y sus miembros presentan una gran variedad en estructura y función.

Las PDI son muy relevantes en el plegamiento oxidativo de proteínas debido a su capacidad de oxidar, reducir e isomerizar puentes disulfuro presentes en aproximadamente un tercio de las proteínas que pasan por el retículo endoplásmico. Además, por su actividad como oxidorreductasas tienen un rol importante en la redoxstasis.

También ayudan en el plegamiento de proteínas sin oxidar o reducir puentes disulfuro, mediante interacciones no covalentes o de manera más indirecta manteniendo el equilibrio redox creando un ambiente favorable para el plegamiento correcto, además de participar en la respuesta a proteínas mal plegadas (UPR), en la degradación de proteínas asociada al retículo endoplásmico (ERAD) y, por ende, interviniendo en la proteostasis (Maattanen et al., 2014). Existen muchos estudios que han encontrado relación entre la actividad de las PDI y el desarrollo o gravedad de diversas enfermedades, tales como Alzheimer, Parkinson, trombosis, diabetes y diversos tipos de cáncer (Wang et al., 2022).

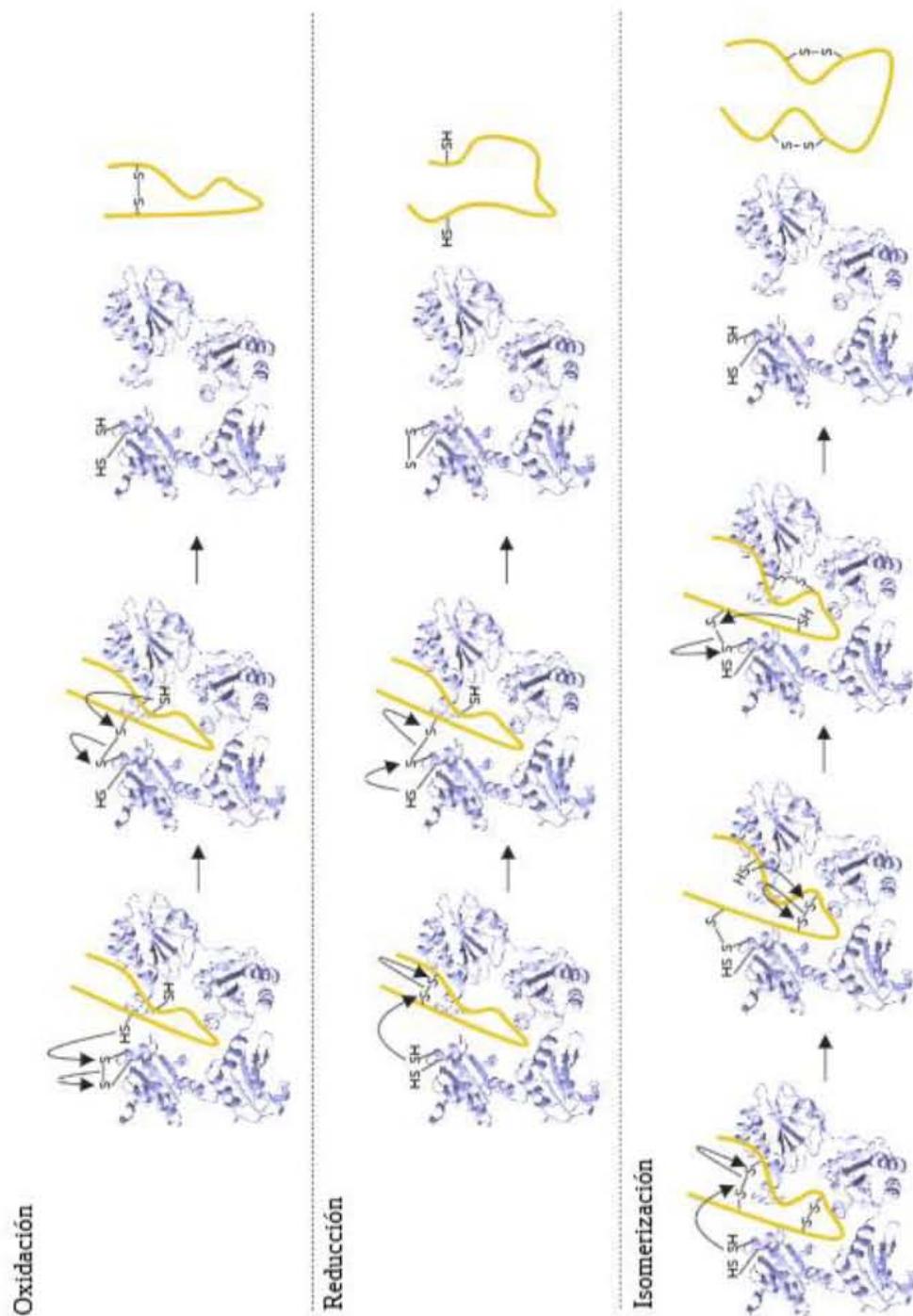
### 3.1.1 FUNCIONES

Se han identificado cuatro funciones en la familia de las PDI: formación, reducción e isomerización de los puentes disulfuro y función de chaperona independiente del plegamiento oxidativo. Es decir, la PDI puede contribuir al plegamiento correcto de otras proteínas mediante reacciones redox, o bien, por otros mecanismos como la unión a proteínas mal plegadas evitando su agregación, participación en la respuesta a proteínas mal plegadas (UPR) y en la degradación de proteínas asociada al retículo endoplásmico (ERAD).

Los mecanismos de reacción de las funciones de la PDI no están completamente dilucidados, pero existen propuestas que explican como esta familia de proteínas lleva a cabo cada una de sus funciones, las cuales se comentan a continuación y en la Figura 1 se muestra una representación resumida de los mecanismos de acción de las reacciones redox llevadas a cabo por las PDI. Además, se muestra cómo la oxidación, reducción e isomerización cambia la estructura terciaria de las proteínas sustrato; es decir, es una explicación ilustrativa del plegamiento oxidativo de estas proteínas sustrato.

Se propone que, en la formación de puentes disulfuro mediada por la PDI, la cisteína en el sustrato se desprotona para formar un anión tiolato reactivo, el cual ataca el enlace disulfuro de la PDI formando un disulfuro mixto entre las dos proteínas que se libera por el ataque de un segundo anión tiolato en el sustrato (Appenzeller-Herzog & Ellgaard, 2008b). Después de este proceso, la PDI quedaría reducida al transferir su enlace disulfuro a la proteína sustrato.

El mecanismo de la reacción de reducción sería el inverso de la reacción de oxidación; es decir, el tiol libre o el tiolato (no está clara la especie) de la PDI atacaría a una de las cisteínas que forma el puente disulfuro del sustrato, formando el disulfuro mixto, luego el segundo tiol libre o tiolato de la PDI formaría el enlace disulfuro en esta enzima, liberando al sustrato reducido (Shouldice et al., 2010).



**Figura 1. Mecanismos de acción redox de las PDI.** La representación de la estructura terciaria de la PDI aparece en gris, mientras que la proteína sustrato está representada con una línea amarilla. Las flechas curvas indican el posible movimiento de electrones que se lleva a cabo en las reacciones redox para la formación, reducción e isomerización de puentes disulfuro. La imagen fue creada con ChimeraX y BioRender.

La formación de enlaces disulfuro mediado por las PDI es a menudo propensa a tener errores, dando lugar a enlaces disulfuro no nativos y, por lo tanto, un plegamiento incorrecto de las proteínas sustrato. Sin embargo, la PDI es capaz de catalizar la isomerización de estos enlaces en el par correcto de disulfuros rompiéndolos y reformándolos con diferentes cisteínas (Schwaller et al., 2003).

La cisteína N-terminal del sitio activo es más proclive a iniciar la reacción al atacar un enlace disulfuro no nativo y, en consecuencia, forma un intermedio disulfuro mixto entre PDI y el sustrato (Wang & Wang, 2023). El tiol del sustrato resultante es libre de atacar otro enlace disulfuro de la proteína, reorganizándose a su forma nativa.

Como en cualquier reacción, la isomerización es impulsada por la minimización de energía, donde los enlaces disulfuro nativos son favorecidos energéticamente debido a que los enlaces no covalentes, como enlaces de hidrógeno o interacciones iónicas, son termodinámicamente estables. En cambio, cuando una proteína adquiere una forma no nativa, estas interacciones se dan entre otros residuos de aminoácidos. Esto también permite que la reacción de isomerización ocurra más rápido que la reacción de formación del mismo enlace disulfuro no nativo (Neves et al., 2017).

La función de isomerasa de las PDI se ve favorecida cuando el disulfuro mixto entre la PDI y la proteína sustrato es estable. Esta estabilidad depende a su vez tanto del pKa de ambos residuos de cisteína en el motivo como de la afinidad de los sitios de unión del sustrato a la PDI (Karala et al., 2010).

Las PDI pueden distinguir entre sustratos proteicos parcialmente plegados, desdoblados y correctamente plegados. Tienen una alta afinidad hacia las proteínas mal plegadas en lugar de las proteínas nativas, seguramente porque las proteínas no nativas exponen superficies hidrofóbicas que en parte hace que se agreguen entre sí, pero también que se unan fácilmente a bolsillos hidrofóbicos de PDI,

generalmente ubicados en los dominios b y b'. Esta propiedad y su flexibilidad conformacional hacen a la PDI una chaperona altamente efectiva (Irvine et al., 2014). En el RE, se une a las proteínas mal plegadas y está relacionada con la respuesta de proteínas desplegadas (UPR) (Perri et al., 2015).

La función principal de la UPR es reducir la concentración de proteínas desplegadas al disminuir la biosíntesis de proteínas. Otra de sus funciones es incrementar la transcripción de genes que codifican a PDI y otras chaperonas para aumentar la capacidad de plegamiento de proteínas en el RE (Puig et al., 1994). Sin embargo, este mecanismo protector puede llegar a ser peligroso, ya que una activación prolongada de UPR puede conducir a la apoptosis de la célula (Kersteen et al., 2005).

Hay muchas otras funciones en las que PDI participa. Facilita la degradación de proteínas mal plegadas a través de la vía de degradación asociada al RE (ERAD), que ocurre por translocación de proteínas desde el RE al citosol, donde el sistema ubiquitina-proteasoma es responsable del proceso de degradación (Honjo et al., 2010).

PDI también ayuda en el control de calidad de las proteínas al retener las proteínas no ensambladas hasta que se forma la estructura nativa correcta. También puede unirse a otras proteínas para estabilizar su conformación nativa, como ocurre con la prolil 4-hidroxilasa del colágeno, proteína con 2 subunidades  $\alpha$  y dos subunidades  $\beta$  idénticas a PDI (Irvine et al., 2014).

Dependiendo de su concentración inicial, PDI puede mostrar actividad chaperona o anti-chaperona. En experimentos en los que la concentración inicial es alta, básicamente todos los sustratos proteicos se plegaron correctamente. Por otro lado, se ha encontrado que cuando la concentración inicial de PDI es baja puede promover la formación de agregados de lisozima, probablemente mediante

múltiples interacciones no covalentes entre ambas proteínas que forman primero agregados solubles y luego una red insoluble (Sideraki & Gilbert, 2000).

Las PDI también pueden volverse disfuncionales a través de modificaciones postraduccionales como la S-nitrosilación sobre los residuos de cisteína que participan en las reacciones redox. El peroxinitrito oxida los residuos de cisteína en ácidos sulfénicos que reaccionan con tioles formando disulfuros. El estrés oxidativo causa la inactivación de las funciones de PDI a través de estas modificaciones (Peixoto et. al., 2018).

La PDIA1 de tipo silvestre (*wild type*) muestra una  $k_{cat}$  de  $0.76 \text{ min}^{-1}$  y una constante de Michaelis ( $K_m$ ) de  $6.9 \mu\text{M}$  en la isomerización de ribonucleasa (RNasa) desnaturalizada. Bajo las mismas condiciones experimentales, una variante de PDI con el sitio activo C-terminal inactivado con serinas (C379S,C382S) exhibe una actividad enzimática casi de tipo silvestre, con una  $k_{cat}$  de  $0.73 \text{ min}^{-1}$  y  $K_m$  de  $29 \mu\text{M}$ . Por el contrario, un mutante con un sitio activo N-terminal inactivado (C35S,C38S) muestra una capacidad catalítica reducida, con  $k_{cat}$  de  $0.24 \text{ min}^{-1}$  pero manteniendo una  $K_m$  casi de tipo silvestre de  $7.1 \mu\text{M}$ . Estas observaciones sugieren que el sitio activo C-terminal juega un papel más significativo en la unión del sustrato, mientras que el sitio activo N-terminal es más importante para la isomerización de sustratos (Lyles & Gilber, 1994).

Otro hallazgo en línea con lo mencionado anteriormente es que las cisteínas N-terminales del sitio activo poseen un  $pK_a$  bajo (alrededor de 4.5) y están expuestas, por lo que estos grupos tiol son altamente reactivos. Por el contrario, las cisteínas C-terminales tienen un  $pK_a$  alto (alrededor de 9.0) por lo que son poco reactivas (Nakasako et al., 2010).

El equilibrio tiol-disulfuro entre una proteína de la superfamilia de tiorredoxinas como PDI y su proteína sustrato depende de la estabilidad relativa de sus formas ditiol y

disulfuro. Las dos cisteínas de cada sitio activo pueden formar un enlace disulfuro intramolecular, lo que da como resultado una PDI oxidada, o permanecer como tioles libres produciendo una PDI reducida. PDI oxidada participa en la formación de puentes disulfuro de otras proteínas, mientras que PDI reducida en la reducción de puentes disulfuro en los sustratos (Carvalho et al., 2006).

Por lo general, las PDI con potenciales de reducción estándar menos negativos funcionan como oxidasas, mientras que las que tienen potenciales más negativos actúan como reductasas. Proteínas como PDIA3 son capaces de llevar a cabo eficientemente reacciones de isomerización, oxidación y reducción, lo que sugiere que tiene un potencial de reducción equilibrado (Robinson et al., 2023).

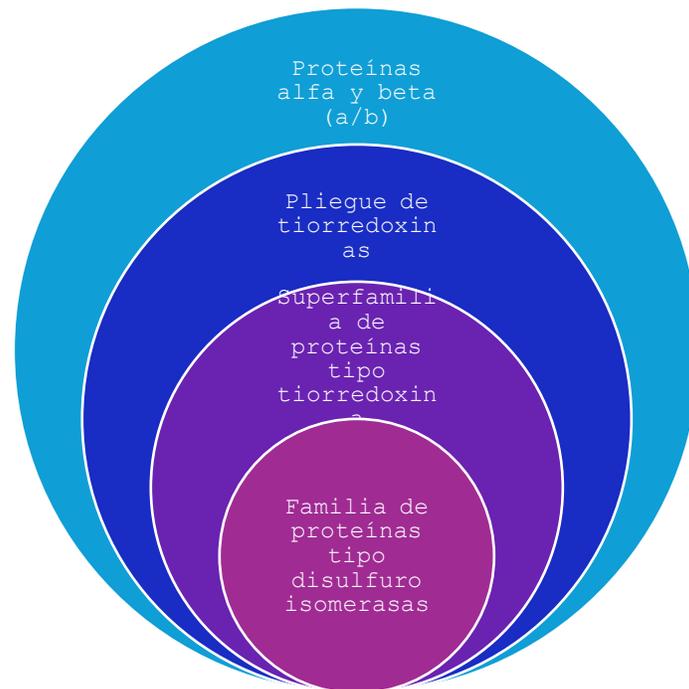
### 3.1.2 ESTRUCTURA

Las proteínas se pueden clasificar según su estructura en cuatro grandes grupos: aquellas formadas únicamente por hélices alfa, aquellas formadas solamente por hebras beta, aquellas que poseen algunos dominios conformados exclusivamente por hebras beta y otros dominios por hélices alfa (proteínas a+b) y proteínas que en un mismo dominio presentan alfa hélices y hebras beta intercaladas (proteínas a/b). A este último grupo pertenecen las PDI, representado en la Figura 2.

Los dominios activos de tipo tiorredoxina tienen una composición general  $\beta_1\alpha_1\beta_2\alpha_2\beta_3\beta_4\alpha_5$ , donde las beta son hebras beta y las alfa son hélices alfa. Aunque dependiendo de la proteína podría aparecer o eliminarse alguna estructura secundaria, en las PDI, los dominios activos suelen tener la forma  $\beta\alpha\beta\alpha\beta\beta\alpha$  (Gross et al., 2013).

Estos dominios de tipo tiorredoxina se caracterizan por poseer un motivo CXXC en la región N-terminal de la  $\alpha_2$ , que está directamente involucrado en las reacciones de oxidorreducción e isomerización de los puentes disulfuro de sus sustratos (Okumura et al., 2015).

Además del motivo, hay otros residuos que normalmente contribuyen a la actividad catalítica de la tiorredoxina humana, tales como Asp26, Trp31 y Pro75, los cuales se encuentran conservados en los dominios catalíticos, pero no en los no en los dominios



**Figura 2. Clasificación estructural de las proteínas disulfuro isomerasas obtenida en SCOP (*Structural Classification of Proteins*).**

La base de datos SCOP describe que el plegamiento de las tiorredoxinas posee un andamiaje con un núcleo de 3 capas a/b/a, es decir, que hay hebras beta en medio de dos capas de hélices alfa. Además, menciona la capa intermedia consta de 4 hebras beta con orden 2134, y que la hebra 3 es antiparalela al resto.

En esta unidad de plegamiento se encuentra la superfamilia de las proteínas tipo tiorredoxina que incluye por supuesto la familia de las PDI, pero también otras proteínas como las de tipo glutatión peroxidasa, calsecuestrinas y las proteínas formadoras de puentes disulfuro (Dsb) (Andreeva et al., 2020).

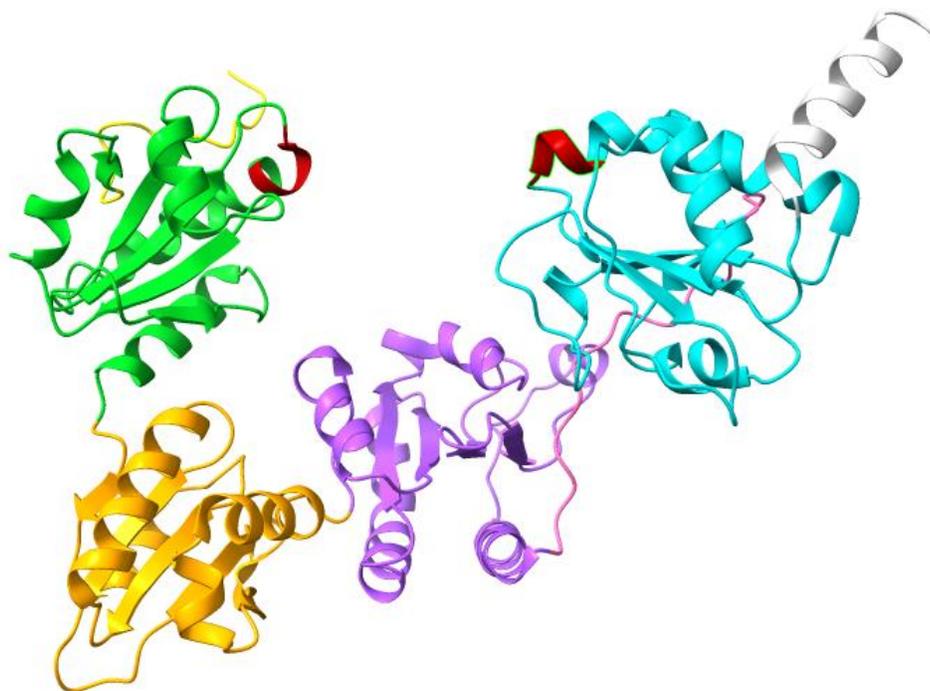
Las proteínas Dsb son homólogas a las PDI, pero en los organismos procariotas, donde la DsbA se encarga de formar puentes disulfuro, Dsb reoxida a DsbA y el sistema DsbC/DsbG y DsbD se encarga de la isomerización de los puentes disulfuro, es decir, estas clásicas Dsb no tienen la capacidad de llevar a cabo ambas funciones, oxidorreducción e isomerización, como sí lo hacen las PDI (Vertommen et al., 2008).

De manera general, las PDI poseen cuatro dominios organizados en “forma de U”, los cuales se denominan a, b, b’ y a’. Los dominios a y a’ son los dominios de tipo tiorredoxina activos que contienen los motivos CXXC, sitios activos que le confieren la función de oxidorreductasa. En las PDI humanas, este motivo suele ser CGHC, aunque claro que hay sus excepciones. Estos motivos del sitio activo pueden estar en forma de sulfhidrilo libre o formar un par de enlaces disulfuro entre sí y son donantes o receptores de disulfuro para los sustratos durante el proceso de oxidación, reducción o isomerización de sustratos, procesos determinados por el valor del pKa de las cisteínas y su equilibrio redox (Fu et al., 2021).

Por otra parte, los dominios b y b’ son dominios hidrofóbicos que están involucrados en la unión a los sustratos y posiblemente en la actividad de chaperona (independiente del plegamiento oxidativo) de las PDI. Este sería el caso de miembros como la PDIA1, cuyo dominio b’ posee un bolsillo hidrofóbico perfectamente identificado que incluye residuos como Phe240, Phe249, Phe258, Phe304, Leu242, Leu244 e Ile272 (Okumura et al., 2015).

Hay muchas PDI que presentan un “conector x” que une el dominio b’ con el a’ y está conformado de alrededor de 19 aminoácidos. Además, tienen un motivo de tipo KDEL en el extremo C-terminal que previene su secreción del retículo endoplásmico (Wang et al., 2010).

A continuación, en la Figura 3 se presenta la estructura general de las PDI, de la forma abb’xa’ y con dos motivos CXXC.



**Figura 3. Estructura de la PDI de *S. cerevisiae* (PDB 2B5E).** Se observa el péptido señal (amarillo), el dominio a (verde), el dominio b (naranja), el dominio b' (morado), el conector x (rosa), el dominio a' (azul), los motivos CXXC (rojo) y la región C-terminal (gris). Se utilizó el programa ChimeraX para elaborar la imagen.

La unión de un inhibidor como el bisfenol-A al bolsillo hidrofóbico de las PDI induce un reordenamiento a una estructura más compacta de la PDI, ocultando el bolsillo e impidiendo que la PDI se una a otros sustratos (Okumura et al., 2014).

Sin embargo, El dominio b' de otro miembro de la familia de las PDI, ERp57, no tiene un bolsillo hidrofóbico, sino residuos cargados positivamente Lys214, Lys274 y Arg282 que participan en interacciones electrostáticas con las chaperonas calnexina (CNX) y calreticulina (CRT). ERp57 contiene más residuos polares en comparación a PDIA1, es menos capaz de introducir enlaces disulfuro y no puede controlar las conformaciones dependientes de reacciones redox y el reclutamiento de sustratos a lo largo de la ruta de plegamiento de proteínas porque carece del residuo de aminoácido correspondiente a Arg300 de PDI humana (Kanemura et al., 2020).

A pesar de las características generales, la familia de las PDI es muy diversa en estructura y función. Poseen mayor o menor similitud con el dominio de tiorredoxina, varían en longitud, en el número los dominios que poseen y su acomodo, e incluso algunos ejemplares poseen dominios distintos a los de tiorredoxina. A pesar de que el motivo CGHC es el más conservado en las PDI, hay algunos miembros que presentan motivos distintos en alguno de sus dominios.

Estas variaciones hacen que también su función sea distinta en cada uno de los miembros de la familia, cada una reconociendo con diferente afinidad a cierto tipo de sustratos, mostrando mayor o menor eficiencia para desempeñar una función en concreto, ligeras diferencias en estabilidad, etcétera. En la Figura 4 se presentan los 19 miembros de la familia de las PDIA en humano, donde se indica el arreglo de sus dominios, los motivos que poseen y su longitud.

Símbolo del gen	Nombre común de la proteína	Organización de los dominios	Longitud (aa)
PDIA1	P4HB	CGHC [ ] [ ] CGHC KDEL	508
PDIA2	PDIA2	CGHC [ ] [ ] CGHC KDEL	525
PDIA3	ERp57	CGHC [ ] [ ] CGHC QEDL	505
PDIA4	ERp70	CGHC CGHC [ ] [ ] CGHC KEEL	645
PDIA5	PDIA5	[ ] [ ] CGHC CGHC CGHC KEEL	519
PDIA6	P5	CGHC CGHC [ ] KDEL	440
PDIA7	PDILT	SKQS [ ] [ ] SKKG KEEL	584
PDIA8	ERp27	[ ] [ ] KVEL	273
PDIA9	ERp29	[ ] [ ] KEEL	262
PDIA10	ERp44	CRFS [ ] [ ] RDEL	406
PDIA11	TMX	CPAC	280
PDIA12	TMX2	SNDC KVEL	296
PDIA13	TMX3	CGHC [ ] [ ] KKKD	454
PDIA14	TMX4	CPSC RQR	349
PDIA15	EndoPDI	CGHC CGHC CGHC KDEL	432
PDIA16	ERp19	CGHC EDEL	172
PDIA17	AG2	CPHC KTEL	175
PDIA18	AGR3	CQYS QSEL	166
PDIA19	DNAJC10	DNAJ CSHC [ ] CPPC CHPC CGPC KEDL	793

**Figura 4. Organización de los dominios de los miembros de la familia PDIA del humano.** Cada recuadro representa un dominio a excepción del rosa, el cual es el extremo C-terminal. Las letras en los recuadros indican ya sea la secuencia del motivo CXXC, el motivo del extremo C-terminal (similar a KDEL), o bien un dominio J (DNAJ) diferente al dominio de tipo tiorredoxina. Los colores de los dominios indican que existe mayor similitud estructural entre sí. La imagen está inspirada en la publicada por Ye et.al., 2023.

La función de las PDI está mediada por su estado redox, es decir, si los sulfuros de las cisteínas del motivo CXXC forman un puente disulfuro se comportan como oxidasas, pues tienen la capacidad de transferir el puente disulfuro a las proteínas sustrato; por otro lado, si los sulfuros están reducidos en forma de sulfhidrilos, serán capaces de reducir o isomerizar a las proteínas sustrato.

Como muchas PDI tienen al menos 2 motivos CXXC, según las condiciones del medio puede que ambos sitios estén reducidos, que un sitio este reducido y el otro oxidado, o bien, que presenten ambos sitios activos oxidados (Appenzeller-Herzog & Ellgaard, 2008a).

La oxidorreductasa 1 del RE (Ero1) se encarga de la oxidación de PDI donde el oxígeno es el último aceptor de electrones (Shergalis et al., 2020). Por lo tanto, Ero1 posee un rol importante en la regulación de la función de la PDI.

En un modelo de acoplamiento realizado recientemente entre la PDIA1 y Ero1 se observó que hay una menor distancia cuando el dominio a' de PDI interactúa con el sitio activo de Ero1 en comparación a cuando el dominio "a" de PDI interactúa con el sitio activo de Ero1. Esto sugiere que el motivo CXXC del dominio a' se oxida más fácil y que tiene un mejor desempeño en la formación de puentes disulfuro, mientras que el dominio "a" se encargaría principalmente de la isomerización (Wang & Wang, 2023). Esto no quiere decir que cada uno de los sitios se especialice en una función concreta.

En la región x de las PDI se encuentra una serina altamente conservada en la posición 357 (posición correspondiente a la PDIA1). Es importante mencionar que en condiciones de estrés del RE se induce la fosforilación de este residuo de aminoácido por la cinasa Fam20C, la PDI adopta una conformación más abierta y cambia su clásica forma de "U" a una forma de "L", exponiendo mucho más la superficie hidrofóbica de los dominios bb' y evitando el plegamiento incorrecto en el

RE. La fosforilación de esta serina funciona como un *switch* de la función oxidorreductasa a la de chaperona, manteniendo la proteostasis y protegiendo contra el estrés del ER. La disminución de los niveles de PDI fosforilada podrían deberse a una fosfatasa no identificada aún, por degradación asociada al RE o autofagia. (Yu et al., 2020).

Se ha demostrado que la actividad de las PDI está regulada por el estado redox, pues cuando está reducido el dominio a' adopta una conformación más compacta con el dominio b', mientras que la oxidación del dominio a' provoca que adopte una conformación más abierta, exponiendo la región hidrofóbica y facilitando la actividad de chaperona (Wang et al., 2012).

La PDI puede formar homodímeros creando una cavidad hidrofóbica central con múltiples sitios redox-activos para un plegamiento oxidativo eficiente de proteínas desplegadas. Esta dimerización inducida por el sustrato desplegado sólo se observa con la PDI oxidada (Kanemura et al., 2020).

Las argininas 120 y 461 de la PDIA1 humana disminuyen el pKa de las cisteína C-terminal del sitio activo y, por tanto, modulan su reactividad (Karala et al., 2010), pues la disociación del tiol en la cisteína genera una especie altamente reactiva, el tiolato. La formación de este anión favorece las reacciones de oxidación y reducción de puentes disulfuro mientras que el tiol mejora la actividad de isomerasa de las PDI por dar lugar a disulfuros mixtos (especie intermediaria que consta de un puente disulfuro entre la PDI y el sustrato) más estables.

Otro aminoácido conservado es el triptófano que se encuentra inmediatamente antes del motivo CXXC capaz de estabilizar a diversos sustratos mediante interacciones hidrofóbicas (Tian et al., 2006).

Se había propuesto que las cisteínas C-terminales del motivo CXXC jugaban un papel importante en la isomerización de sustratos, pues si el sustrato no fuera capaz

de formar el puente disulfuro adecuado, la cisteína podría liberar a la PDI del disulfuro mixto formado con el sustrato. Sin embargo, un estudio donde se cambió el motivo CXXC por CXXA encontró que la actividad de isomerasa se mantuvo en comparación a la PDI silvestre (Kersteen et al., 2005).

Esto último contrasta con estudios anteriores que plantearon que cuando la segunda cisteína en el sitio activo de PDI se cambia por serina, la actividad de la isomerasa disminuye 7-8 veces, proponiendo que hay ciclos rápidos de oxidación y reducción de la PDI (Schwaller et al., 2003).

### 3.1.3 ENSAYOS PARA MEDIR LA ACTIVIDAD DE PDI

Existen varias formas de medir la actividad de la PDI para cada una de sus funciones, como oxidasa, reductasa, isomerasa y chaperona.

Estos ensayos se realizan para varios propósitos como identificar especies intermediarias y de esa manera comprender mejor el mecanismo de reacción, para estos ensayos se requiere el análisis y detección de estos intermediarios mediante espectroscopía de masas; también se realizan para cribar sustratos o inhibidores de la PDI y un tercer objetivo principal es comprender la función de la PDI en un contexto fisiológico mediante la comparación de sus actividades en muestras biológicas bajo diferentes condiciones experimentales (Watanabe et al., 2014).

Además, cuando se identifica una proteína que pertenece a la familia de las PDI, se suelen realizar uno o varios ensayos para describir su función y algunas veces se compara su eficiencia catalítica con la de proteínas bien caracterizadas como la PDIA1 de hígado bovino. El parámetro cinético más empleado es la  $K_m$ .

Sin embargo, a diferencia de los ensayos utilizando la enzima purificada, los ensayos de PDI en muestras biológicas constituyen un reto considerable, pues la

interpretación sigue siendo difícil debido a la presencia o ausencia de otros reductores en el ensayo y a que en los ensayos *in vitro* es muy complicado imitar exactamente las mismas condiciones fisiológicas en las que funciona la PDI *in vivo*.

Otra cuestión importante es que, aunque las actividades de chaperona e isomerasa *in vitro* de la PDI pueden medirse por separado, el plegamiento de otras proteínas que facilita la PDI *in vivo* no discriminará entre ambas actividades y, por el contrario, parece requerir que las actividades isomerasa y chaperona actúen conjuntamente. Se propone que la actividad de chaperona se encarga del acercamiento y unión al sustrato, empezando el plegamiento, el cual se refuerza posteriormente con la formación e isomerización de puentes disulfuro (Laurindo et al., 2012).

Los ensayos para medir la actividad isomerasa de las PDI se basan en la recuperación de la función de un sustrato proteico inactivo que contiene enlaces disulfuro no nativos. La enzima más utilizada como sustrato es la RNasa, enzima con 4 puentes disulfuro. Para las pruebas, la RNasa se reduce en condiciones desnaturalizantes y luego se deja oxidar al aire a temperatura ambiente para que adquiera enlaces disulfuro aleatorios (RNasa revuelta o *scrambled RNase* en inglés). Después de incubarla con PDI, la recuperación de su actividad se mide por la hidrólisis de un sustrato de la RNasa, como el monofosfato cíclico de citidina (cCMP), que proporciona altos incrementos medibles de absorbancia a una longitud de onda de 296 nm. El buffer de ensayo generalmente contiene el par redox GSH/GSSG para imitar las condiciones fisiológicas, regenerando la actividad de PDI, pero menos eficientemente a cómo lo haría Ero1 *in vivo*. Una desventaja de este método es la falta de reproducibilidad de los resultados debido a la heterogeneidad del sustrato entre preparaciones, pues los enlaces disulfuro fueron formados de forma aleatoria (Watanabe et al., 2014).

Para medir la actividad de oxidasa de la PDI se pueden usar proteínas completamente reducidas, generalmente con ditioneitol (DTT), un agente que reduce de forma significativa los puentes disulfuro. La misma RNasa que ya se

mencionó y el inhibidor de la tripsina pancreática bovina (que contiene 3 puentes disulfuro) son los sustratos más utilizados en estos ensayos. Otro sustrato utilizado con frecuencia incluye a la lisozima (con 4 disulfuros). La aplicación de los ensayos de plegamiento oxidativo a muestras biológicas presenta las mismas dificultades que las de la actividad isomerasa comentadas anteriormente (Watanabe et al., 2014).

Por otro lado, en los ensayos de actividad de reductasa se utilizan sustratos oxidados. El sustrato más popular, debido a su metodología sencilla y bajo coste, es la insulina. La reducción de la insulina promueve la agregación de su cadena B y produce un aumento de la turbidez de la muestra. Otro compuesto utilizado para el ensayo de reducción de la PDI es el glutatión oxidado unido covalentemente a la eosina (Di-E-GSSG), el cual no es fluorescente, pero tras su reducción, la sonda muestra fluorescencia (Watanabe et al., 2014).

Finalmente, la medición de la actividad de chaperona de la PDI se basa en el plegamiento de sustratos completamente desnaturalizados que no poseen enlaces disulfuro. La D-gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa, la lactato deshidrogenasa, la citrato sintasa o la alcohol deshidrogenasa desnaturalizadas se pueden utilizar como sustratos los cuales se incuban con un exceso de PDI y se miden los cambios en la agregación por dispersión de luz o turbidez. Ya que los cambios en la agregación pueden no correlacionarse con una ganancia de función catalítica del sustrato, muchos autores también miden la reactivación del sustrato (Watanabe et al., 2014).

#### 3.1.4. EVOLUCIÓN

Las proteínas actuales son el resultado de cambios evolutivos graduales respecto a sus formas originales o atávicas. Estos cambios quedan registrados en las proteínas que se encuentran en las distintas especies vivas. Se ha descubierto que la estructura y funciones generales de las proteínas se mantienen más constantes

a lo largo del tiempo que la secuencia exacta de su estructura primaria. Es importante destacar, que estas proteínas atávicas parecen ser más resistentes, capaces de soportar mejor el calor y la desnaturalización (Cadet et al., 2022).

Una gran pregunta para entender cómo han evolucionado las proteínas es cómo es que los pequeños cambios en la secuencia de aminoácidos pueden modificar la función de una proteína sin cambiar su andamiaje global. Otros estudios revelan que cada estructura secundaria de una proteína está interconectada, y que estas conexiones (asas y giros) difieren de una proteína a otra. Esta red de conexiones añade una capa de variedad y flexibilidad a estructuras y funciones de las proteínas que son esenciales para la vida (Paxman & Heras, 2017).

En los seres humanos se han encontrado 21 genes que codifican para PDI, en otros organismos como en *Arabidopsis thaliana* se expresan 14 y en procariontes se encuentran alrededor de 5 genes que codifican para proteínas Dsb, proteínas ortólogas de las PDI, este número varía entre organismos. No está claro por qué ha evolucionado una gran cantidad de PDI en eucariotas superiores; algunos autores sugieren que las diferentes PDI presentan distintas especificidades de sustrato, lo que es razonable, ya que el proteoma disulfuro es mucho más grande y complicado en los seres humanos que en otros organismos como levaduras o plantas (Hatahet & Ruddock, 2009). Otra propuesta es que las PDI presentan una división del trabajo durante el plegamiento oxidativo de las proteínas, con un grupo de PDI más eficiente en la oxidación y otro grupo funcionando principalmente como isomerasa para corregir enlaces disulfuro no nativos (Wang & Wang, 2023).

Todas las PDI contienen al menos un dominio tipo tiorredoxina, de composición  $\beta 1\alpha 1\beta 2\alpha 2\beta 3\beta 4\alpha 5$ , ya sea catalíticamente activo o inactivo (con o sin motivo CXXC). Aunque la función enzimática de estos dominios no está conservada, se propone que los miembros de la familia PDI evolucionaron mediante duplicaciones de

dominios a partir de una PDI procariota ancestral que contenía un único dominio de tiorredoxina (Darby et al., 1998).

Se ha encontrado que, en las tiorredoxinas, la hélice  $\alpha 3$  es más flexible y la  $\alpha 4$  más rígida en las formas modernas que en las antiguas que datan de 4 mil millones de años atrás. Se sugiere que estos cambios fueron seleccionados porque permitieron que la proteína pudiera funcionar en temperaturas más bajas (Modi et al., 2018).

Las proteínas solían plegarse sin la presencia de chaperonas, pero con el tiempo, las células desarrollaron el plegamiento asistido por chaperonas. Esto significa que la rapidez con la que se pliega una determinada proteína no es algo que se haya conservado estrictamente a través de la evolución. En concreto, para las tiorredoxinas, una prolina cercana a la posición 76, ralentiza el proceso de plegamiento (Gamiz-Arco et al., 2019), pero está altamente conservada por ser crucial para que el sitio activo de la proteína funcione correctamente, pues estabiliza la estructura mediante interacciones de Van der Waals entre el asa que contiene la prolina y el motivo CXXC (Charbonnier et al., 1999).

## 3.2 PDI EN PROCESOS FISIOLÓGICOS

### 3.2.1 HOMEOSTASIS DE PROTEÍNAS

La homeostasis de proteínas, proteostasis, se refiere a los procesos celulares que mantienen el equilibrio proteico dentro de las células. Esto implica la síntesis, el plegamiento, el tráfico y la degradación de proteínas para garantizar el funcionamiento celular adecuado (Li et al., 2018).

Aproximadamente un tercio de las proteínas pasan por la vía secretora antes de llegar a su localización subcelular correspondiente, siendo el RE el primer compartimento de esta vía, el cual se encarga del plegamiento y maduración de las

proteínas sustrato mediante chaperonas y foldasas como las PDI (Rahman et al., 2022).

Las chaperonas son un componente clave de la proteostasis, debido a que ayudan al plegamiento correcto de otras proteínas proporcionando un equilibrio entre las proteínas correctamente plegadas, parcialmente plegadas, desplegadas y mal plegadas, y además de evitar su agregación. Un ejemplo bien conocido de chaperonas son las proteínas de choque térmico (HSP por sus siglas en inglés), las cuales tienen interacciones no covalentes con una gran variedad de proteínas para asistir en su plegamiento eficiente (Chen et al., 2023).

Después de pasar por el RE, las proteínas que fueron plegadas correctamente son transportadas hacia el complejo de Golgi donde sufren modificaciones como la glicosilación y la lipidación. Por otro lado, las proteínas mal plegadas son reconocidas y degradadas por el sistema ubiquitina-proteasoma de degradación asociado al RE (ERAD).

La degradación de proteínas mal plegadas es otro proceso fundamental en la proteostasis, la cual es llevada a cabo mediante el sistema ubiquitina-proteasoma y la vía de autofagia por lisosomas.

Es posible que enfermedades metabólicas, cáncer y enfermedades neurodegenerativas se deban al estrés celular producido por la acumulación y agregación de proteínas desplegadas o mal plegadas (Ye et al., 2023). Es por ello que los mecanismos que mantienen el equilibrio entre proteínas correctamente plegadas y mal plegadas en el retículo endoplásmico son de gran importancia, pues optimizar las vías de control de calidad que mantienen la homeostasis de proteínas podría disminuir la agregación de proteínas, el estrés celular y el desarrollo de enfermedades.

### 3.2.2 PLEGAMIENTO OXIDATIVO DE PROTEÍNAS

Las proteínas son capaces de desempeñar su función debido a su estructura, tanto por los aminoácidos que las componen como por la disposición en el espacio que adquieren; es por ello por lo que alteraciones en su estructura muy probablemente resulten en cambios de su función. Por lo tanto, el plegamiento adecuado de las proteínas se vuelve crucial para el funcionamiento de la célula.

Las proteínas se pliegan en una diversidad de estructuras tridimensionales con diversas topologías y jerarquías estructurales bien definidas. La estructura primaria de una proteína consiste en la secuencia de aminoácidos que forman la cadena peptídica, la cual se auto ensambla en elementos estructurales secundarios como la hélice  $\alpha$ , las láminas  $\beta$  y giros, cuya disposición en el espacio determina la estructura terciaria de la proteína. Algunas proteínas forman multímeros y, por lo tanto, adquieren una estructura cuaternaria.

La conservación de la estructura tridimensional de una proteína se debe a la contribución aditiva de diferentes interacciones físicas que en conjunto mantienen unida la proteína. Estas interacciones pueden ser hidrofóbicas, que incluyen las interacciones de Van der Waals, e interacciones electrostáticas que comprenden puentes salinos y enlaces de hidrógeno. A pesar de sus bajas energías individuales, en conjunto, estas interacciones no covalentes aseguran el mantenimiento del plegamiento y la estabilidad de las proteínas (Gomes & Faísca, 2019).

Sin embargo, el plegamiento oxidativo sí se debe a enlaces covalentes, los puentes disulfuro presentes en muchas proteínas, los cuales requieren ser formados en la configuración correcta para que la proteína en su totalidad adquiera su forma nativa. Este proceso es llevado a cabo en el RE y aunque puede ser mediado por el glutatión oxidado, sin duda las PDI son las protagonistas de este proceso (Wallis & Freedman, 2013).

La perturbación de la homeostasis redox del RE debida a la acumulación de proteínas mal plegadas puede conducir al estrés del RE y a diversas enfermedades (Wang & Wang, 2023). De ahí la importancia de comprender el mecanismo a través del cual las células garantizan la eficiencia y la fidelidad del plegamiento oxidativo de proteínas y el mantenimiento de la redoxstasis en el RE.

Ero1 reduce el oxígeno molecular y forma puentes disulfuro en uno o varios sitios activos de la PDI, de esta manera, la PDI es capaz de formar enlaces disulfuro en otras proteínas, produciendo su plegamiento correcto, función y regulación adecuadas. Esta regeneración de puentes disulfuro de PDI mediada por Ero1 libera peróxido de hidrógeno, de tal manera que una sobre-regulación en esta vía conduciría a un incremento de especies reactivas de oxígeno, que contribuyen al estrés del ER asociado con patogénesis (Shergalis et al., 2020). Por ello, es muy importante comprender el mecanismo a través del cual las células garantizan la eficiencia y la fidelidad del plegamiento oxidativo de proteínas, así como el mantenimiento de la actividad adecuada de la PDI y ERO1 y la redoxstasis en el RE.

Evidentemente, la reducción es igualmente importante para el mantenimiento de la redoxstasis. Se requiere que el glutatión reducido reduzca a la PDI para que así la enzima pueda eliminar o isomerizar puentes disulfuro presentes en los sustratos.

En la Figura 5 se presentan las reacciones de oxidación y reducción de PDI por parte de la Ero1 y el glutatión. Es necesario recordar que la PDI con puentes disulfuro son capaces de “transferirlos” a las proteínas sustratos, por lo que es otra forma de regenerar a las PDI sin puentes disulfuro.



**Figura 5. Formación y reducción de los puentes disulfuro en las PDI.** La abreviatura ox indica que la proteína posee un puente disulfuro mientras que red indica que posee sulfhidrilos libres. La figura fue creada con Biorender.

### 3.2.3 RESPUESTA A PROTEÍNAS MAL PLEGADAS

La respuesta a proteínas mal plegadas (UPR por sus siglas en inglés) forma parte de una red de transducción de señales que se activa generalmente por el estrés en el ER y que involucra la transcripción de genes, la traducción ARNm, la expresión de proteínas que asisten en el plegamiento y el aumento de la degradación de proteínas mal plegadas, con el objetivo de restablecer la proteostasis.

La UPR adaptativa activa tres mecanismos principales. En el primero de ellos, participa PERK, una cinasa que atenúa la síntesis de proteínas reduciendo la traducción de ARNm, exceptuando algunos que codifican a proteínas involucradas en el metabolismo de aminoácidos, respuesta antioxidante, autofagia y plegamiento de proteínas, por ejemplo, de ATF4 (Hetz et al., 2020).

La segunda vía involucra a la cinasa IRE1 $\alpha$ , que activa el decaimiento regulado dependiente de IRE1, escindiendo ARNm y microARN para reducir la carga de plegamiento de proteínas. También favorece la proteostasis y respuestas inflamatorias (Hetz et al., 2020).

El tercer mecanismo involucra a la proteína ATF6 que regula la transcripción de genes que codifican chaperonas y enzimas que promueven la translocación, el plegamiento, la maduración y la secreción de proteínas. Además, se activa el proteasoma basado en la degradación de proteínas asociada al retículo endoplásmico y se aumenta la capacidad secretora de la célula (Hetz et al., 2020).

Las PDI son chaperonas sobre expresadas en la UPR, teniendo un rol importante en este mecanismo estabilizador de la proteostasis, con el propósito de aliviar el estrés en el RE. Un ejemplo es la PDIA5 que reorganiza los enlaces disulfuro de ATF6 incluso bajo condiciones de estrés, permitiendo la transcripción de los genes diana de esta vía (Higa et al., 2014).

Otro hallazgo importante es que la PDIA1 oxidada es capaz de activar a PERK desencadenando la supervivencia o bien, apoptosis celular (aún no está bien comprendido de qué depende un resultado u otro). Además, es PDIA3 quien mantiene a PDIA1 reducida, por lo que una inactivación de PDIA3 resulta en la activación de PERK (Kranz et al., 2017).

Sin embargo, se le han atribuido roles que podrían ir en contra de su papel protector (Perri et al., 2015). Por ejemplo, se ha encontrado que la interacción entre PDIA5 y ATF6 contribuye a la quimio resistencia en células cancerígenas (Higa et al., 2014), que interactúa con NADPH oxidasa incrementando los niveles de ROS en la célula (de A Paes et al., 2011) y cuando sufre S-nitrosilación promueve la agregación de proteínas y la muerte de la célula (Uehara et al., 2006). De cualquier modo, falta comprender cómo es que la UPR y la actividad de las PDI no parecen ser suficientes en algunos casos, como en las enfermedades conformacionales.

Diversos estudios han encontrado que una UPR anormal conduce a procesos patológicos como neurodegeneración, inflamación crónica, fibrosis, autoinmunidad, defectos en la digestión, función endocrina y otras condiciones fisiológicas (Hetz et al., 2020).

#### 3.2.4 DEGRADACIÓN DE PROTEÍNAS ASOCIADA AL RE

Hay ocasiones en las que las proteínas no se pueden plegar en su forma nativa por diversas razones por lo que para mantener la proteostasis, las proteínas desplegadas o mal plegadas generadas en el RE deben ser exportadas al citosol y degradadas por el proteasoma a través de la vía de degradación asociada al RE (ERAD).

La ERAD está mediada por el sistema ubiquitina-proteasoma, proceso que consiste en la unión de varias moléculas de ubiquitina a las proteínas que deben degradarse, formando una cola. La reacción de ubiquitinación está mediada por un complejo de

enzimas (E1, E2 y E3). Posteriormente, la proteína ubiquitinada pasa al proteasoma en donde es degradada (Gurina & Mohiuddin, 2024).

El desdoblamiento reductor de las proteínas mal plegadas facilita su translocación y su posterior degradación por el sistema ubiquitina-proteasoma en el citosol. Un miembro de las PDI, ERdj5 (también conocido como DNAJC10 y J-PDI), reduce los enlaces disulfuro aberrantes, lo que potencia la degradación en el RE. La estructura de ERdj5 de *Mus musculus* tiene un dominio J y dos grupos de dominios tipo tiorredoxina con motivos CXXC y potenciales de reducción muy negativos que promueven la reducción de proteínas mal plegadas, facilitando la ERAD (Kanemura et al., 2020).

La proteína similar a  $\alpha$ -manosidasa que mejora la degradación de ER 1, es capaz de capturar glicoproteínas mal plegadas y luego unirse a ERdj5, acelerando la reducción de enlaces disulfuro no nativos para luego ser degradadas por el proteasoma (Pierre et al., 2024).

### 3.3 PDI EN PROCESOS PATOLÓGICOS

Cuando la proteostasis es incapaz de controlar el estrés celular, mutaciones o incluso la edad, se forman agregados de proteínas, los cuales son tóxicos para la célula y están asociados a las enfermedades conformacionales (Hoppe & Cohen, 2020), como diabetes tipo II, obesidad, Alzheimer, Parkinson, entre muchas otras.

Adicionalmente, miembros de PDI están involucrados en otro tipo de enfermedades, como es el caso de TXNDC5, que es capaz de aumentar la secreción de citoquinas y favorecer el desarrollo de artritis reumatoide cuando está sobre expresada, pues exagera el fenotipo inflamatorio de los fibroblastos (Wang et al., 2018). Esta proteína también promueve mecanismos oncogénicos y está asociada a enfermedades como diabetes tipo II, hígado graso, esquizofrenia y otras (Jiao et al., 2024).

Dado que las PDI desempeñan un rol indispensable en la proteostasis, redoxstasis y supervivencia de la célula, la sobrerregulación de su actividad está asociada a muchos tipos de cáncer. A continuación, se da una visión general de lo importante que son las PDI en muchas enfermedades y se mencionan algunos ejemplos de cómo potenciar o inhibir su actividad ha resultado beneficioso en pacientes o modelos animales.

### 3.3.1 ENFERMEDADES METABÓLICAS

Se sabe que hay un proceso rápido de agregación-oligomerización-fibrilización de agregados de proteínas formados en enfermedades conformacionales, y se ha logrado extraer dodecámeros, hexámeros, trímeros y heterómeros del suero de pacientes pediátricos con obesidad y diabetes mellitus tipo II (Altamirano-Bustamante et al., 2019).

La eliminación específica de PDI en células  $\beta$  del páncreas promueve la formación de complejos de proinsulina de alto peso molecular y agrava la intolerancia a la glucosa. PDIp, un homólogo específico en el páncreas, previene la formación de agregados de disulfuros en varios zimógenos de enzimas digestivas y mejora su plegamiento y maduración. ERdj5, una PDI con dominio J, reduce los enlaces disulfuro no nativos del receptor de lipoproteínas de baja densidad (LDLR) para asegurar su correcto plegamiento y ensamblaje (Wang & Wang, 2023).

### 3.3.2 ENFERMEDADES CARDIOVASCULARES

Cada vez hay más evidencia de que la PDIA1 en los vasos sanguíneos está involucrada en el inicio y progresión de padecimientos como trombosis, inflamación vascular, infarto al miocardio, accidente cerebrovascular y aterosclerosis, por lo que inhibidores de la actividad de esta PDI se han vuelto realmente importantes en el tratamiento de enfermedades cardiovasculares (Xiong et al., 2020).

Recientemente, se ha encontrado que ratas con hipertensión poseen niveles elevados de PDI en arterias de resistencia mesentéricas y se ha demostrado que

contribuyen a la disfunción vascular y al desarrollo de la enfermedad (Camargo et al., 2024).

Se ha identificado que la activación de ATF6, una proteína involucrada en la UPR y en el reconocimiento de estrés celular, mejora su activación cuando se une a las PDIA1, PDIA5 y ERp18 (una proteína con dominio de tiorredoxina). Sin embargo, cuando hay un estrés prolongado en el retículo endoplásmico, la PDIA6 disminuye la activación de IRE $\alpha$ 1 y PERK, cinasas involucradas en la UPR adaptativa (Hetz et al., 2020).

### 3.3.3 ENFERMEDADES NEURODEGENERATIVAS

Hasta ahora se sabe que las enfermedades neurodegenerativas tienen un punto en común: la agregación de proteínas mal plegadas. De manera simple, se propone que el proceso neurodegenerativo se inicia cuando el plegamiento de las proteínas se ve afectado por mutaciones o factores ambientales, provocando que se agreguen. Estos agregados provocan un estrés del ER excesivo, e incluso crónico, que supera a las vías de estabilización como la UPR, por lo que desemboca en la pérdida de células neuronales.

La enfermedad de Alzheimer es inducida por la agregación del péptido  $\beta$ -amiloide, la proteína Tau y otras proteínas. La agregación de estos oligómeros amiloides parecen iniciar procesos que resultan en disfunción sináptica, neurodegeneración y demencia. Se han encontrado niveles elevados de PDIA1 en muestras cerebrales de pacientes con Alzheimer y en modelos animales con esta enfermedad (Ostapchenko et al., 2015), y se ha encontrado que la activación de PDIA3 con diosgenina reduce las placas amiloides en ratones (Perri et al., 2015). Esto sugiere que es necesaria la sobre expresión de varias PDI para mantener la proteostasis en enfermedades conformacionales y que cuando se potencia su activación es cuando son capaces de reducir los agregados de oligómeros amiloides.

La relación entre los agregados de  $\alpha$ -sinucleína y la enfermedad de Parkinson es bien conocida, lo cual resulta en la degeneración de neuronas dopaminérgicas provocando que los pacientes sufran de temblores, rigidez y marcha anormal. Se

han encontrado niveles elevados de PDIP en muestras *post-mortem* del cerebro humano afectado por esta enfermedad (Conn et al., 2004).

Enfermedades como Alzheimer y Parkinson se suelen asociar a disfunciones del retículo endoplasmático. Aunque los agregados proteicos suelen acumularse en el citosol, estudios indican que estos interactúan anormalmente con componentes de la vía secretora del RE, afectando procesos como la ERAD, la señalización de ATF6 y el tráfico vesicular (Hetz et al., 2020).

La enfermedad de Huntington se caracteriza por movimientos espasmódicos, cambios de personalidad y demencia. Existen mutaciones en el gen de la huntingtina que resultan en cadenas largas de poliglutamina y en la agregación en cuerpos de inclusión. En el hipocampo de ratones con esta enfermedad se encontró una sobreexpresión de PDIA1 (Safren et al., 2014).

### 3.3.4 CÁNCER

Hay cada vez más evidencias para asociar al cáncer con un desequilibrio de la proteostasis, ya que es una condición en donde la sobreexpresión de oncogenes resulta en una síntesis y secreción de proteínas elevadas. Es por ello por lo que las células cancerígenas requieren de una UPR muy eficiente para su supervivencia, y todas las vías de la UPR favorecen el crecimiento tumoral, angiogénesis y evasión inmunológica (Hetz et al., 2020).

Se han identificado varios miembros de la familia de las PDI que se sobre expresan en distintos tipos de cáncer, incluyendo gliomas, cáncer de colon, mama, pulmón y riñón. Por mencionar un ejemplo, PDIA1 puede interactuar con los receptores de hormonas tiroideas de la superficie celular a través de su actividad de reductasa/isomerasa, lo que sugiere su posible papel en los cánceres de tiroides (Campos et al., 2018).

Las células cancerosas necesitan altos niveles de proteínas PDI para superar el importante estrés del RE y la elevada demanda de plegamiento de proteínas para mantener el rápido ritmo de proliferación celular. Esto puede hacer que las células cancerosas sean más vulnerables a la inhibición de las PDI que las células normales (Ye et al., 2023).

Bajo este razonamiento, se han desarrollado algunos fármacos inhibidores de las PDI como alternativas terapéuticas para el cáncer, aun cuando hay muchas preguntas por resolver respecto al papel de las PDI en la carcinogénesis. Un ejemplo es E64FC26, un fármaco desarrollado para el tratamiento del mieloma múltiple que ha mostrado eficacia *in-vivo* e *in-vitro* (Lin et al., 2024). Otro caso es PACMA 31 que suprime el crecimiento tumoral en ovarios sin causar toxicidad en tejidos normales (Xu et al., 2012). Un último ejemplo es LOC14, un inhibidor potente de la PDIA1 que además induce su oxidación, teniendo un efecto neuro protector (Kaplan et al., 2015) y que ha probado suprimir el crecimiento tumoral en el cáncer gástrico inhibiendo a la PDIA3 (Yang et al., 2024).

Incluso, recientemente se han identificado a algunos miembros de la familia de las PDI como factores de pronóstico, como es el caso de la PDIA3 en el carcinoma oral de células escamosas (Wang et al., 2023), cáncer de endometrio (F. Yu et al., 2023) y otros tipos de cáncer (Zhang et al., 2022).

### 3.4 TERAPIAS ACTUALES CON CHAPERONAS

Se han desarrollado tratamientos innovadores para las enfermedades conformacionales, las denominadas chaperonas farmacológicas, las cuales son moléculas pequeñas que se unen a proteínas mal plegadas para restaurar interacciones intramoleculares que se perdieron. Su bajo peso molecular permite la disponibilidad oral, el tráfico a través membranas y llegada a diversos tejidos. Algunos ejemplos de enfermedades tratadas con este grupo de moléculas que ya se encuentran aprobadas por la FDA incluyen la fenilcetonuria, la enfermedad de Fabry y la amiloidosis hereditaria relacionada con la transtiretina. Además, otros

tratamientos prometedores aún se encuentran en fases clínicas y preclínicas (Grasso et al., 2023).

Aunque es verdad que las investigaciones para desarrollar moléculas pequeñas que potencien o inhiban la actividad de chaperonas como las PDI son muy prometedoras, también es cierto que otros enfoques como el desarrollo de proteínas simples que reestablezcan la proteostasis pueden brindar alternativas terapéuticas innovadoras desde la Biotecnología e incluso, las ciencias computacionales.

### 3.5 HERRAMIENTAS BIOINFORMÁTICAS PARA EL ANÁLISIS DE PROTEÍNAS

Las herramientas bioinformáticas son aquellos programas y plataformas utilizadas para el análisis, interpretación y visualización de datos biológicos, las cuales se han vuelto prácticamente indispensables y absolutamente necesarias en la actualidad, pues se aprovecha el poder de procesamiento que poseen al poder trabajar con volúmenes grandes y complejos de datos, cuyo manejo manual sería casi imposible o sumamente tardado.

Este tipo de herramientas tienen diversos usos que incluyen el tamizado y selección de moléculas para blancos terapéuticos definidos, predicciones de las uniones proteína-sustrato y proteína-proteína, y por supuesto, el análisis estructural de las proteínas para identificar regiones conservadas.

Una herramienta increíblemente útil en el estudio de proteínas es UniProt, una plataforma que busca proporcionar a los usuarios un conjunto completo, de alta calidad y de libre acceso de estructura primaria de proteínas anotadas con información funcional (Bateman et al., 2023). Contiene tanta información como sea posible de miles de proteínas, además de herramientas como BLAST que permite encontrar homólogos de una proteína buscando en los proteomas que tiene recopilados.

Clustal Omega es un programa del Instituto Europeo de Bioinformática capaz de realizar alineamientos múltiples de secuencias que compara dos o hasta cuatro mil secuencias (Madeira et al., 2024), haciendo notar de manera sencilla aquellas regiones que coinciden más, las diferencias entre ellas y, por lo tanto, facilita la identificación de regiones conservadas y variaciones importantes.

A veces los alineamientos presentan zonas poco conservadas que no son útiles para análisis posteriores, de ahí que herramientas como GBlocks se vuelvan especialmente útiles, pues identifican y eliminan esas regiones poco significativas, dejando aquellas partes realmente informativas; en otras palabras, GBlocks limpia los alineamientos de secuencias que se le proporcionan y así se puede dar toda la atención a las regiones que lo ameritan.

El servidor web DALI sirve para el análisis estructural que incluye alineaciones estructurales anotadas con estructura secundaria, familias de proteínas y logotipos de secuencias, y superposición de estructuras 3D apoyada por la conservación de secuencias y estructuras codificadas por colores (Holm et al., 2023).

Es necesario recordar que otra área crucial para la Bioinformática es la visualización y manipulación de los datos biológicos. Jalview es una aplicación para la visualización, edición y análisis de proteínas y ácidos nucleicos, en donde se pueden ver los alineamientos en una interfaz gráfica, reorganizar secuencias, calcular árboles filogenéticos y análisis de conservación.

Por otro lado, ChimeraX es un programa de visualización y análisis de macromoléculas, donde se puede observar la estructura terciaria de las proteínas, herramientas de edición gráfica, manejar datos provenientes de cristalografías de rayos X, resonancias magnéticas nucleares o modelados computacionales, realizar análisis estructurales que permiten realizar sobreposiciones de varias proteínas y observar puentes de hidrógeno, densidad de electrones y regiones hidrofóbicas e hidrofílicas de la superficie de las proteínas.

El aprendizaje automático (en inglés *Machine Learning*) forma parte de una ciencia computacional llamada Inteligencia Artificial, la cual está enfocada en lograr que las computadoras ejecuten tareas sin ser explícitamente programadas para ello. Para lograrlo, debe atravesar un proceso de entrenamiento, en el cual el modelo es sometido a una experiencia para realizar una tarea (como predecir péptidos con mayor actividad) y donde se evalúa su rendimiento con una medida determinada (Colliot, 2023).

AlphaFold es una herramienta basada en aprendizaje profundo, un área del aprendizaje automático que es capaz de predecir con una precisión impresionante la estructura terciaria de las proteínas a partir de su secuencia de aminoácidos mediante un algoritmo que incorpora redes neuronales que considera características evolutivas, físicas y geométricas de las proteínas (Casadevall et al., 2023).

Una ventaja destacable de este tipo de herramientas es el procesamiento de una enorme cantidad de datos y la gran capacidad de memoria. Sin embargo, seleccionar adecuadamente el set de entrenamiento para que el modelo funcione exitosamente, puede ser un gran reto.

Es por eso por lo que la identificación de características relevantes se vuelve una etapa crucial para definir ciertas consideraciones que impactarán significativamente el entrenamiento del modelo de aprendizaje automático.

En nuestro caso, el análisis estructural de las PDI puede brindar información valiosa a considerar en caso de que se quiera emplear un modelo de aprendizaje automático para identificar inhibidores potentes de su función o para predecir una nueva PDI con actividad mejorada, como el evitar la agregación y plegar correctamente oligómeros amiloides.

## 4. METODOLOGÍA

### 4.1 ANÁLISIS FILOGENÉTICO Y DE LA ESTRUCTURA PRIMARIA

Primero se identificaron proteínas PDI en la base de datos UniProt mediante la búsqueda avanzada, obteniendo lo siguiente: (id:PDI\*) AND (protein\_name:"protein disulfide isomerase\*") AND (existence:1) AND (reviewed:true). Esta búsqueda filtra resultados que contengan PDI en el nombre de entrada, que el nombre de la proteína contenga "*protein disulfide isomerase*", que su nivel de existencia sea *protein level* (que indica que existen pruebas experimentales claras de la existencia de la proteína) y que sean *Reviewed Swiss-Prot* (que indica que la entrada ha sido anotada manualmente y revisada por UniProtKB). Se encontraron 35 proteínas, de las cuales se seleccionaron las 29 que contienen al menos un puente disulfuro reportado y correspondiente al motivo CXXC.

Para eliminar proteínas redundantes (aquellas que tienen una similitud mayor al 70%) se utilizó el programa CD-HIT escribiendo el siguiente comando: `./cd-hit -i "35 PDI.fasta" -o "PDI_n70.fasta" -c 0.7 -n 5`, donde se indican los nombres de los archivos de entrada y salida, el umbral de identidad igual a 0.7 y el tamaño de palabras igual a 5. Se obtuvieron 11 grupos de secuencias no redundantes.

Se utilizó el programa Molecular Evolutionary Genetics Analysis para construir un árbol filogenético de las 29 secuencias de aminoácidos seleccionadas y calcular los valores de bootstrap realizando 1000 iteraciones.

Para los siguientes análisis se seleccionaron 11 proteínas, una por cada grupo identificado por CD-HIT. Los grupos y las proteínas seleccionadas se presentan en el árbol filogenético (Figura 5).

Se alinearon éstas 11 secuencias en Clustal Omega, en el Apéndice II se muestra únicamente las regiones donde hay aminoácidos conservados.

Se empleó la base de datos UniProt para encontrar características generales de las proteínas seleccionadas, las cuales se resumen en la Tabla 1.

Se alinearon estas 11 proteínas en Clustal Omega, se descargó en formato FASTA y se cargó en GBlocks para identificar bloques de aminoácidos que la herramienta consideró relevantes, pues son segmentos continuos de aminoácidos poco y muy conservados, con características fisicoquímicas muy similares. De igual forma se descargó el archivo generado únicamente con las regiones conservadas.

El archivo generado en GBlocks se cargó en Jalview para identificar los aminoácidos que más se repiten en las secuencias y de esa manera obtener una estructura primaria consenso.

Empleando la herramienta Dali también fue posible comparar cada una de las 11 proteínas seleccionadas con sus ortólogas y así visualizar fácilmente los residuos de aminoácidos que más se repiten entre sí.

#### 4.2 ANÁLISIS DE LA ESTRUCTURA SECUNDARIA

Se descargó el PDB con código 2B5E, correspondiente a la estructura de la PDIA1 de *S. cerevisiae* determinada por difracción de rayos X con una resolución de 2.4 Å. Para el resto de las proteínas se descargó la predicción de su estructura realizada por AlphaFold, pues no se han determinado experimentalmente, o bien, se ha determinado sólo una fracción de su estructura.

Después se hizo un alineamiento en Dali, tomando como consulta el PDB de la PDI de levadura; esto para identificar las estructuras secundarias conservadas entre la familia de las PDI y determinar su estructura secundaria consenso.

También se descargaron las estructuras 1EEJ, 1T3B, 4I5Q, correspondientes a la DsbC de *Escherichia coli*, *Haemophilus influenzae* y *Salmonella enterica* respectivamente junto con los archivos 1V57, 3TDG and 4IHU correspondientes a

la DsbG de *E. coli*, *Helicobacter pylori* y *Mycobacterium tuberculosis* respectivamente. Después se determinó su estructura secundaria consenso como se realizó con las PDI.

#### 4.3 ANÁLISIS DE LA ESTRUCTURA TERCIARIA

Con el alineamiento realizado previamente con Dali, se visualizó la superposición de las estructuras tridimensionales y se diferenció por colores la conservación de la secuencia de aminoácidos y la conservación de estructuras terciarias.

También se utilizó el programa ChimeraX para realizar la superposición de los dominios conservados, identificar puentes de hidrógeno y visualizar regiones hidrofóbicas en las proteínas. También se comparó la estructura terciaria de la PDIA1 del humano y las proteínas DsbC y DsbG de *E. coli*.

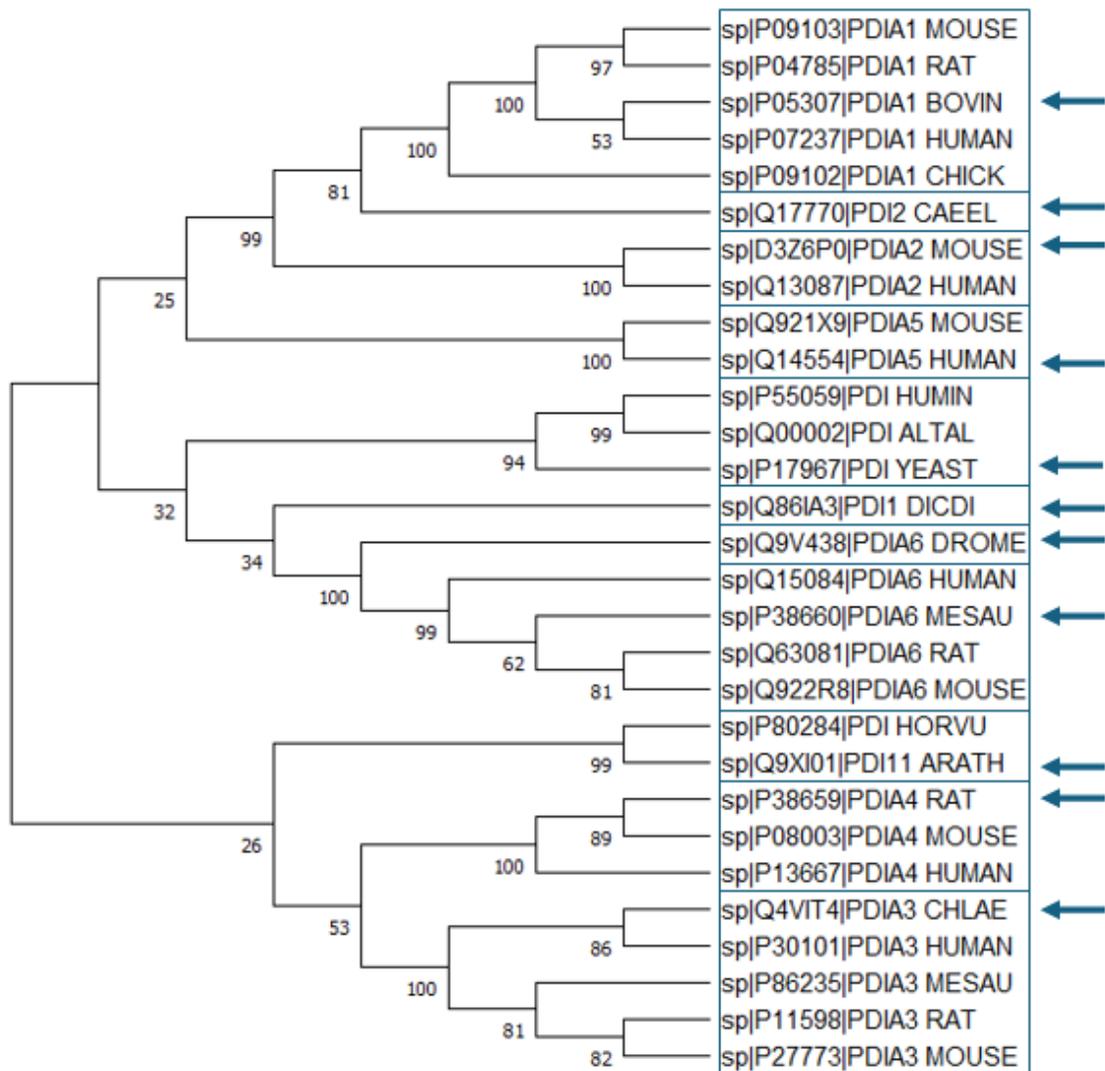
## 5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 5.1 ANÁLISIS FILOGENÉTICO Y DE LA ESTRUCTURA PRIMARIA

Existe una gran diversidad en proteínas parálogas de la familia de las PDI, incluyendo, por ejemplo, las proteínas ricas en cisteína con dominio tipo factor de crecimiento epidérmico, que a pesar de poseer motivos CXXC y la capacidad de isomerizar puentes disulfuro, tienen muy poca similitud con las PDI con dominio de tipo tiorredoxina.

Según el alineamiento de secuencias de aminoácidos de estas 29 proteínas, se pueden distinguir varios clados. El primero incluye a las proteínas PDIA1 y a la proteína PDI2 de *Caenorhabditis elegans*, con un valor de bootstrap igual a 81, por lo que su relación evolutiva es moderadamente confiable a pesar de tener un porcentaje de similitud menor al 70%. El segundo incluye a las PDIA2 las cuales tienen una relación evolutiva altamente confiable con las PDIA1 (valor de bootstrap de 99). De hecho, en la matriz de identidad se observan porcentajes de similitud mayores a 50% entre estos dos clados, lo que no ocurre entre el resto de los clados (Apéndice I). El tercero incluye a las PDIA5, cuya relación evolutiva con las PDIA1 y PDIA2 es poco confiable, presentando un valor de bootstrap de 25. El cuarto clado incluye a las PDI de levaduras, las cuales podrían estar relacionadas con formas más ancestrales de las PDI. El quinto sólo incluye a la PDI1 de *Dictyostelium discoideum*. El sexto incluye a las PDIA6, donde la enzima de *Drosophila melanogaster* (mosca de fruta) tiene un porcentaje de similitud menor al 70% muy probablemente por la distancia evolutiva entre este organismo y los mamíferos. El séptimo corresponde a la PDI de *Hordeum vulgare* y PDI11 de *Arabidopsis thaliana*. El octavo a las PDIA4 y el noveno a las PDIA3 de mamíferos.

El árbol filogenético presenta limitaciones sin duda; se encuentran valores de bootstrap muy bajos y no se posee suficiente información sobre la relación evolutiva entre los clados mencionados. En estudios posteriores podrían modificarse los criterios de selección de secuencias para obtener un árbol filogenético que brinde más información al respecto, así como aumentar el número de secuencias.



**Figura 5. Árbol filogenético de 29 PDI de diferentes organismos.** Los recuadros contienen proteínas con al menos un 70% de similitud, las flechas indican las PDI seleccionadas de cada grupo utilizadas en los análisis posteriores y los valores de bootstramp se encuentran cerca de cada nodo. Las abreviaciones para cada organismo son: *H. sapiens* (HUMAN), *S. cerevisiae* (YEAST), *Mus musculus* (MOUSE), *D. melanogaster* (DROME), *Mesocricetus auratus* (MESAU), *Rattus norvegicus* (RAT), *Arabidopsis thaliana* (ARATH), *Caenorhabditis elegans* (CAEEL), *Gallus gallus* (CHICK), *Bos taurus* (BOVIN), *Hordeum vulgare* (HORVU), *Humicola insolens* (HUMIN), *Dictyostelium discoideum* (DICDI), *Chlorocephus aethiops* (CHLAE), *Alternaria alternata* (ALTAL).

Se seleccionaron once proteínas de las presentadas en el cladograma para realizar los siguientes análisis, procurando abarcar diferentes organismos y elegir un miembro de cada uno de los 11 grupos identificados por CD-HIT. En la Tabla 1 se resumen algunas características de las PDI que se seleccionaron, la cual contiene

su código de UniProt, nombre breve, la especie a la que pertenece la proteína, el número de residuos de aminoácidos que contienen, la masa en dáltones, la posición de sus puentes disulfuros y la organización de sus dominios.

Tabla 1. Generalidades de las once PDI seleccionadas

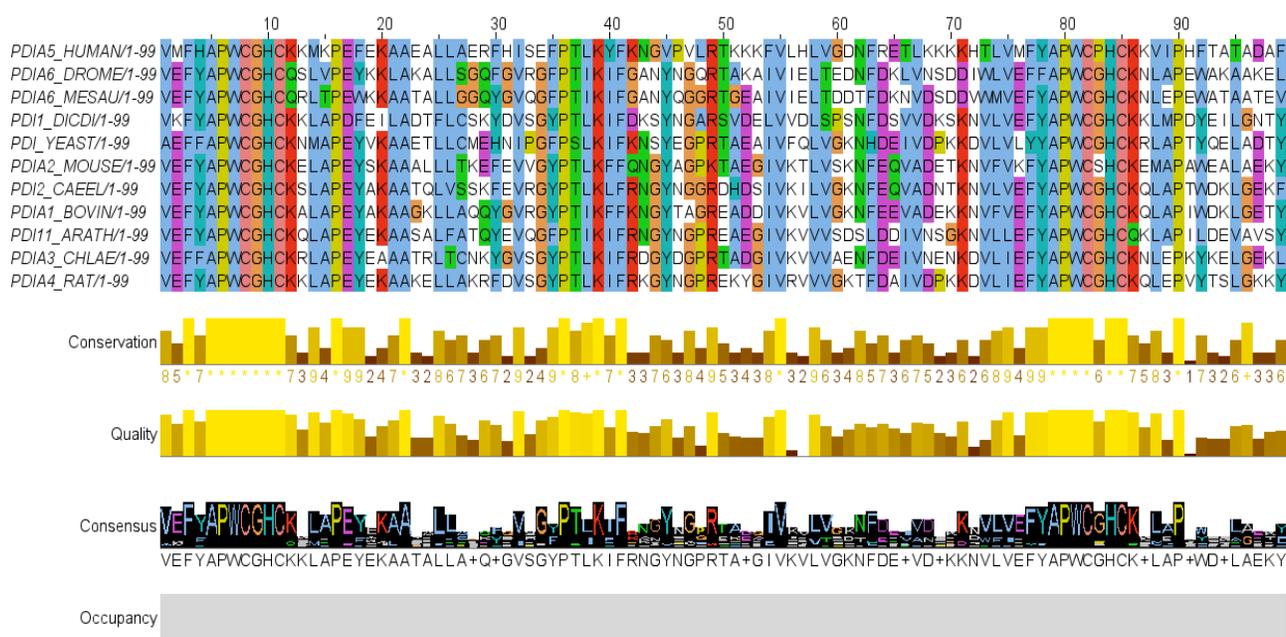
Código UniProt	Nombre	Organismo	Longitud (aa)	Masa (Da)	Motivos CXXC	Dominios
P17967	PDI	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	522	58,227	61-64; 406-409	abb'xa'-HDEL
Q86IA3	PDI1	<i>Dictyostelium discoideum</i>	363	39,905	51-54; 172-175	aa'b'-FKSK
Q9XI01	PDI11	<i>Arabidopsis thaliana</i>	501	55,602	59-62; 404-407	abb'xa'-KDEL
Q17770	PDI2	<i>Caenorhabditis elegans</i>	493	55,152	52-55; 393-396	abb'xa'-HDEL
P05307	PDIA1	<i>Bos taurus</i>	510	57,266	55-58; 399-402	abb'xa'-KDEL
D3Z6P0	PDIA2	<i>Mus musculus</i>	527	58,316	74-77; 421-424	abb'xa'-KEEL
Q4VIT4	PDIA3	<i>Chlorocebus aethiops</i>	505	56,779	57-60; 406-409	abb'xa'-QEDL
P38659	PDIA4	<i>Rattus norvegicus</i>	643	72720	89-92; 204-207; 553-556	aa'bb'xa''-KEEL
Q14554	PDIA5	<i>Homo sapiens</i>	519	59594	182-185; 305-308; 426-429	baa'a''-KEEL
P38660	PDIA6	<i>Mesocricetus auratus</i>	439	48161	55-58; 190-193	aa'b'-KDEL
Q9V438	PDIA6H	<i>Drosophila melanogaster</i>	433	46752	55-58; 186-189	aa'b'-KDEL

En la Tabla 1 se muestra que aun cuando la mayoría de PDI tiene una longitud de alrededor de 500 residuos de aminoácidos, la PDIA4 de la rata tiene muchos más y la PDI2 de la ameba muchos menos.

También se aprecia que algunas de las PDI presentan más de dos puentes disulfuros, aunque se desconoce si también participan en la oxidorreducción o isomerización de disulfuros.

En el alineamiento de Clustal Omega se encontraron 25 aminoácidos que están altamente conservados, 29 medianamente conservados y 16 poco conservados. El alineamiento se presenta en Apéndice II.

GBlocks identificó cinco bloques conservados en la secuencia de las PDI, los cuales fueron visualizados en Jalview. En la Figura 7, se muestran los aminoácidos categorizados por colores según sus características fisicoquímicas.



**Figura 7. Alineamiento de los bloques conservados identificados por GBlocks.** En azul se muestran los aminoácidos hidrofóbicos, en rojo los positivamente cargados, en magenta los negativamente cargados, en verde los polares, en rosa las cisteínas, en naranja las glicinas, en amarillo las prolina, en color cian los aromáticos y en blanco los aminoácidos no conservados. También se muestra la proporción de conservación en barras amarillas y la estructura consenso en la parte inferior.

Los aminoácidos contiguos al motivo CXXC no sólo comparten las mismas propiedades fisicoquímicas, sino que también son el mismo aminoácido en prácticamente todas las estructuras. Además, con la ayuda de las barras amarillas se pueden identificar fácilmente tres segmentos de aminoácidos contiguos que están conservados, dos de ellos en regiones cercanas de ambos motivos CXXC (Figura 7).

Hay 99 aminoácidos que forman parte de la estructura consenso, en la que no se incluyen todos los 29 que identificó Clustal Omega, pues algunos de ellos fueron descartados por GBlocks al no considerarlos relevantes para el análisis de regiones conservadas.

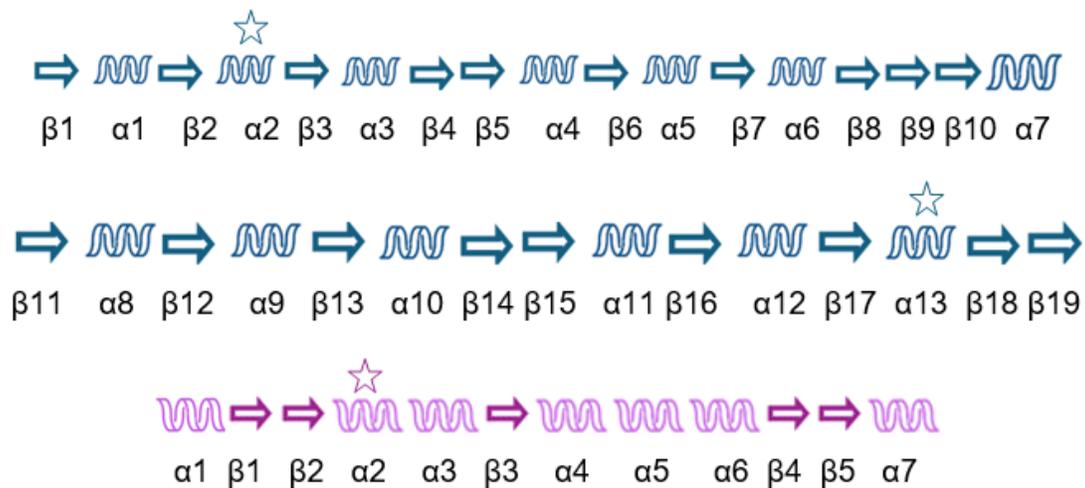
## 5.2 ANÁLISIS DE LA ESTRUCTURA SECUNDARIA

La estructura de la PDI de levadura determinada experimentalmente y del resto de PDI predichas con AlphaFold se cargaron en formato PDB en Dali, en su sección “comparación de estructuras por pares”. De esa manera se obtuvo el alineamiento de estructuras secundarias presentada en Apéndice III.

Con estos resultados se obtuvo un consenso para las proteínas PDI y otro consenso para sus homólogas en procariotas, las proteínas Dsb. En la Figura 8 se muestra la comparación de cada una de ellas.

En general las estructuras secundarias de las PDI están muy conservadas, las mayores diferencias se aprecian cuando las proteínas tienen más o menos dominios. Como están compuestas en su totalidad o parcialmente por dominios de tipo tiorredoxina es de esperar que el número y posición de hélices alfa y hebras beta se mantenga prácticamente igual, a pesar de las diferencias entre miembros de las PDI y organismos.

En la Figura 8 se muestra la estructura secundaria consenso de las PDI determinada por la plataforma Dali. Para determinar si una  $\alpha$  hélice o una hebra  $\beta$  estaban conservadas, se estableció que estuviera presente en al menos 6 de las 11 PDI alineadas. Se realizó lo mismo para las proteínas Dsb, sólo que para determinar su consenso bastó que la estructura secundaria se presentara en 5 de las 9 secuencias alineadas.



**Figura 8. Estructuras secundarias conservadas en las PDI y Dsb.** El consenso de estructura secundaria de las PDI está en la parte superior de color azul y el de las Dsb en la parte inferior en morado. Las estrellas indican las hélices alfa en donde se encuentra el motivo CXXC.

Se encontró mediante un alineamiento en UniProt que la  $\beta 1$  de las Dsb corresponde a la  $\beta 16$  en las PDI y la  $\beta 2$  de Dsb es homóloga a la  $\beta 17$  en PDI y que la  $\alpha 12$  de PDI no se encuentra en las proteínas de procariontas. Otra diferencia es que en las Dsb la  $\alpha 2$  y  $\alpha 3$  son pequeñas y se encuentran una junto a otra, mientras que en las PDI es una hélice más grande ( $\alpha 13$ ), estas estructuras secundarias contienen el motivo CXXC. Finalmente, la  $\beta 3$  de las Dsb se alinea con la  $\beta 18$  de las PDI, pero parece que la  $\alpha 4$  en procariontas cambió por la  $\beta 19$  en eucariotas.

Para facilitar la identificación de la estructura consenso de cada uno de los bloques conservados, se presenta la Tabla 2. La posición corresponde al alineamiento realizado en Clustal Omega y la estructura consenso es la determinada con Jalview, donde los signos “+” corresponden a aminoácidos de los que no se pudo discernir cuál estaba más conservado en las estructuras alineadas y por eso no se consideran para el consenso.

Tabla 2. Consenso de cada bloque conservado por propiedades fisicoquímicas en la estructura primaria de las PDI y su ubicación según el consenso de estructura secundaria.

Número de bloque	Posición en el alineamiento	Consenso de la estructura primaria	Estructura secundaria donde se encuentra ubicada
1	315-339	VEFYAPWCGHCKKLAPEYEKAATAL	$\beta$ 2 y $\alpha$ 2
2	362-380	LA+Q+GVSGYPTLKIFRNG	$\alpha$ 3 y $\beta$ 4
3	388-397	YNGPRTA+GIV	$\alpha$ 4
4	676-688	KVLVGKNFDE+V	$\beta$ 16 y $\alpha$ 12
5	690-721	D+KKNVLVEFYAPWCGHCK+LAP+WD+LAEKY	$\beta$ 17 y $\alpha$ 13

### 5.3 ANÁLISIS DE LA ESTRUCTURA TERCIARIA

Se realizó una comparación de “todos contra todos” en Dali y con la información de la estructura tridimensional, se generó una matriz de similitud con escala del 0 al 50; cuanto más alto el valor más similitud existe entre las proteínas.

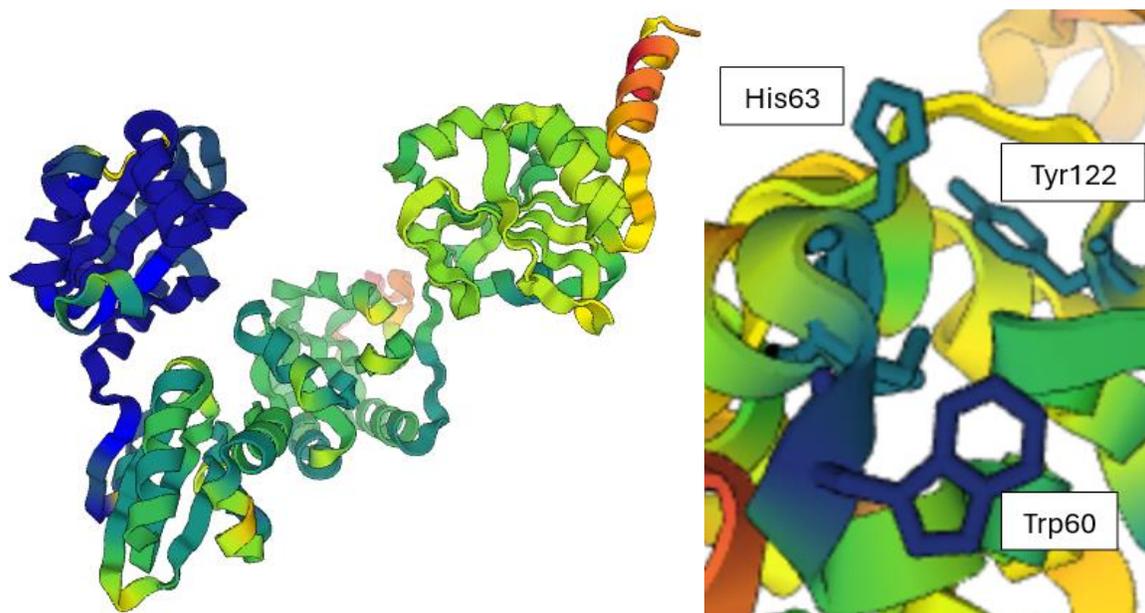
PDI1	45.3	18.5	17.8	17.3	18.2	19.1	16.8	17.7	17.2	17.6	17.9
PDIA6H	18.5	48.7	17.8	18	19.3	20.1	19.3	18.9	17.1	17.4	18.8
PDIA5	17.8	17.8	46.8	32.4	19.3	18.4	18.1	19.1	18.1	17.4	19.4
PDIA6	17.3	18	32.4	47.3	18.6	18.4	19.2	18.4	17.6	17.6	18.8
PDIA3	18.2	19.3	19.3	18.6	49.9	24.3	19.2	25.4	21	21.5	22.7
PDIA4	19.1	20.1	18.4	18.4	24.3	45.7	26	26.4	23.4	22.1	21.9
PDI	16.8	19.3	18.1	19.2	19.2	26	49.7	25.2	25.1	24.1	25.4
PDI1-1	17.7	18.9	19.1	18.4	25.4	26.4	25.2	47.7	28.2	26.4	27.3
PDIA2	17.2	17.1	18.1	17.6	21	23.4	25.1	28.2	52.6	29.9	29.8
PDI1	17.6	17.4	17.4	17.6	21.5	22.1	24.1	26.4	29.9	45.9	36.9
PDI2	17.9	18.8	19.4	18.8	22.7	21.9	25.4	27.3	29.8	36.9	46.3
	PDI1	PDIA6H	PDIA5	PDIA6	PDIA3	PDIA4	PDI	PDI1-1	PDIA2	PDI1	PDI2

Figura 9. Matriz de similitud estructural entre las PDI seleccionadas. Las etiquetas son las mismas utilizadas en la Tabla 1.

Al igual que en la matriz generada por UniProt (Apéndice I), se muestra que las PDIA1, 2, 3, y 4 tienen mayor similitud entre sí que con las PDIA5 y 6. En la Figura 9 se muestra que la PDIA6 de hámster tiene una mayor similitud con la PDIA5 de humano que con su homóloga en la mosca de fruta, lo cual se podría deber a la relación que existe entre ambos mamíferos.

A diferencia de la matriz generada en UniProt, la generada por Dali muestra menos similitudes entre la PDI de la ameba y el resto de las PDI. Este organismo es mucho menos complejo y lejano a todos los demás, por lo que este resultado no se sale de lo esperado.

La superposición realizada con el servidor Dali identificó aminoácidos y estructuras conservadas, las cuales se muestran en la Figura 10.



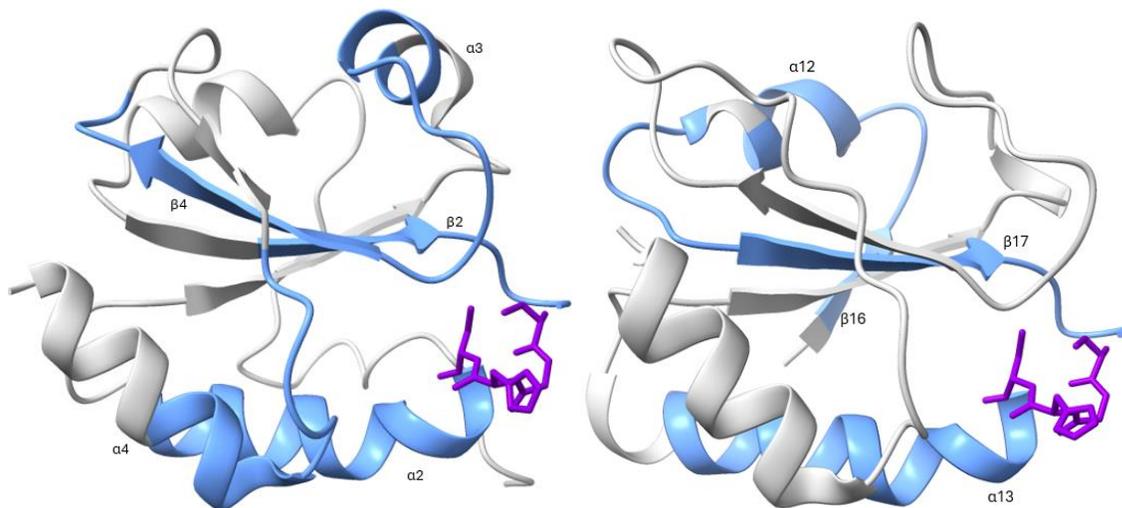
**Figura 10. Conservación de secuencia y estructura terciaria de las PDI seleccionadas.** Del lado derecho se muestra un acercamiento al sitio activo de las PDI donde se identificaron 5 aminoácidos conservados, Cys61, His63, Cys64 (correspondientes al motivo CXXC), Trp60 y Tyr122, todos enumerados con base en la PDI de levadura. Del lado izquierdo se muestra la conservación de la estructuras terciarias, los tonos de azul y verde son regiones conservadas mientras que las amarillas y rojas son poco conservadas.

No es de extrañar que el dominio “a” sea el más conservado, ya que al final de cuentas es el que contiene el motivo CXXC indispensable en la actividad como oxidorreductasa e isomerasa.

Además, los dominios b y b’ también están muy conservados en esta familia de proteínas, lo que sugiere que a pesar de que entre distintos miembros de las PDI los residuos de aminoácidos en estos dominios poseen propiedades fisicoquímicas distintas, la estructura tridimensional se conserva.

El dominio a’ está lejos de estar altamente conservado como el dominio a. Se propone que pudiera ser debido a la flexibilidad de las PDI, pues su acomodo tridimensional depende de diversos factores (como su fosforilación y estado redox) que no pueden ser tomados en cuenta con la predicción estructural de AlphaFold.

Luego, se optó por ubicar los segmentos identificados por GBLOCKS, 3 segmentos o bloques se encuentran en el dominio a y otros dos en el dominio a’. A continuación, en la Figura 11 se presenta la visualización que se tuvo en ChimeraX de ambos dominios.



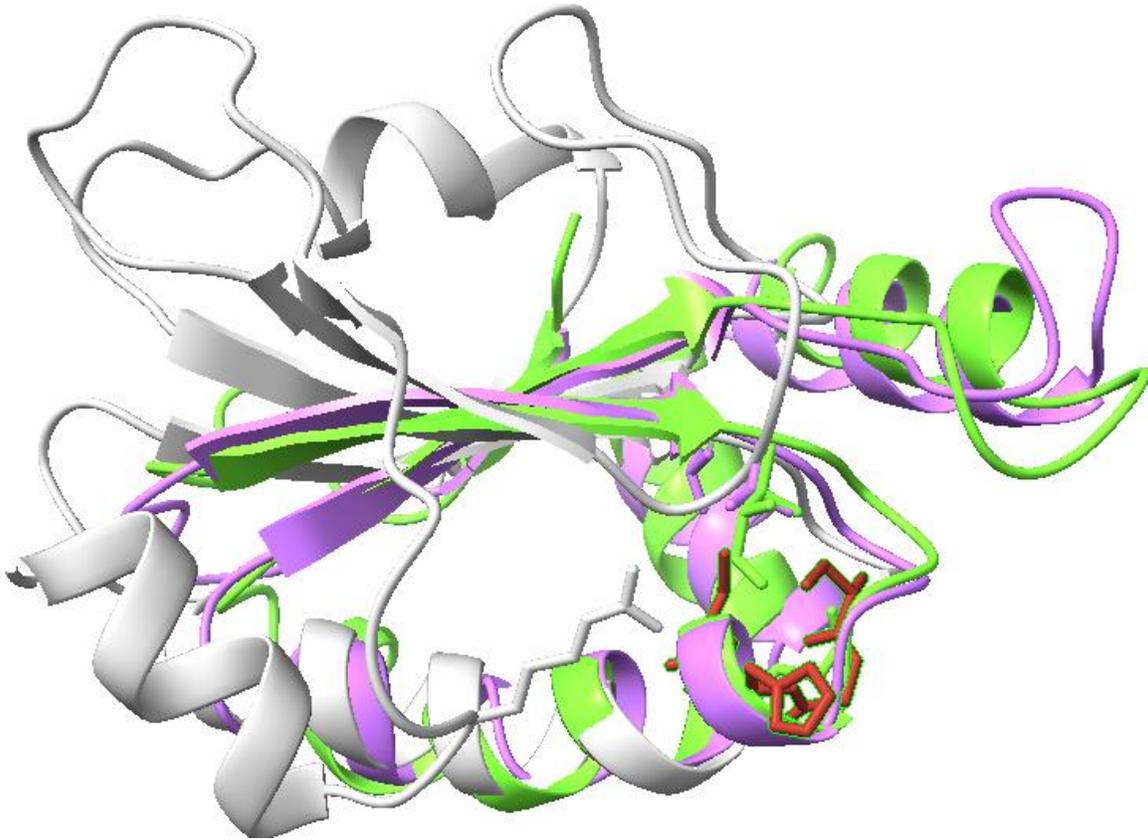
**Figura 11. Visualización de los bloques conservados a nivel de estructura terciaria.** Regiones conservadas en los dominios catalíticos de las PDI, las cuales están de color azul. En el lado izquierdo se encuentra el dominio a, mientras que en el lado derecho el dominio a’. El motivo CXXC se muestra de color morado.

Es interesante observar cambios en la conservación de ambos dominios. Por un lado, en el dominio a se pueden observar tres fragmentos conservados, que en conjunto rodean al sitio activo con asas, las cuales contienen aminoácidos clave como el triptófano anterior al motivo CXXC, la arginina cercana a la posición 120 que disminuye el pKa de la cisteína C-terminal del motivo y la prolina cercana a la posición 76 que ralentiza el proceso de plegamiento de las PDI, cada uno de ellos en cada asa cercana al sitio activo.

Por otra parte, en el dominio a' solo una de las tres asas que rodean al sitio activo está conservada, en cambio una pequeña alfa hélice de la parte superior del dominio (Figura 10) aparece conservada. Esta región está muy lejana al sitio activo como para intervenir de manera directa en el proceso catalítico y por la posición en la que se encuentra es poco probable que participe en la unión al sustrato; sin embargo, podría estar involucrada en regulación alostérica de las PDI interactuando con algún efector.

Estos resultados sugieren que si se desea diseñar una PDI con mejor actividad de isomerasa habrá que prestar atención a las 3 asas que rodean al sitio activo en el dominio a, desde los aminoácidos que contienen hasta las interacciones que presentan con el motivo catalítico.

También se superpuso la estructura tridimensional de la PDIA1, DsbC y DsbG con ChimeraX (Figura 12), donde además de verse claramente las estructuras secundarias que se encuentran acomodadas de manera similar en el espacio y las que no, se aprecia también que dos de las asas que estaban muy conservadas en las PDI, en las Dsb no se encuentran.

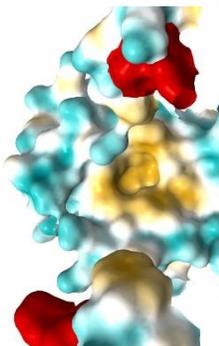
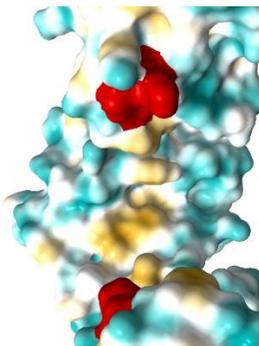
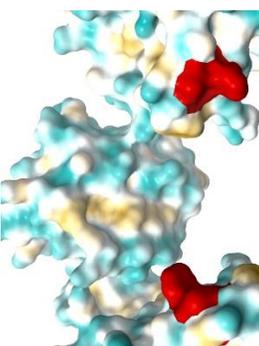
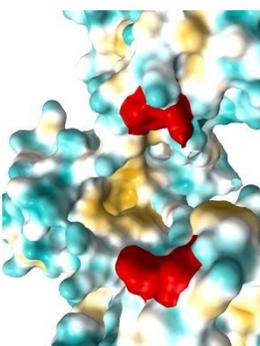


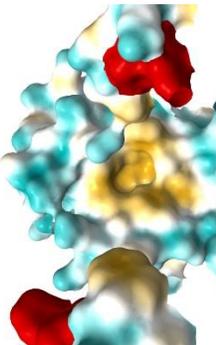
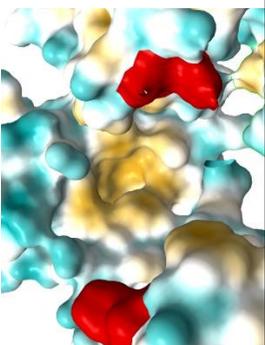
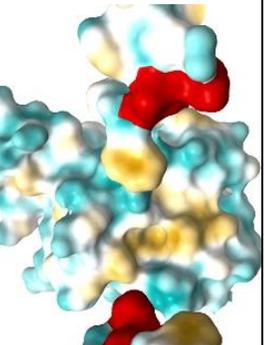
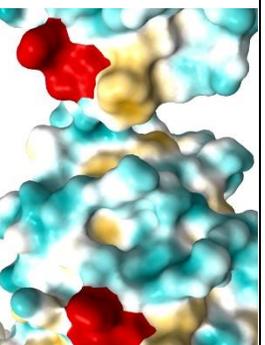
**Figura 12. Comparación entre PDIA1 del humano (gris), DsbC (morado) y DsbG (verde) de *E. coli*. El motivo CXXC de la PDI se muestra de color rojo.**

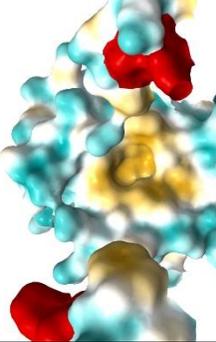
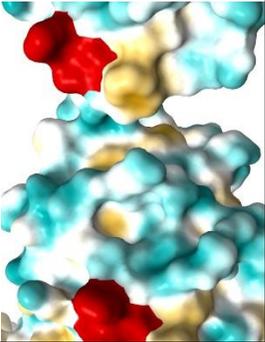
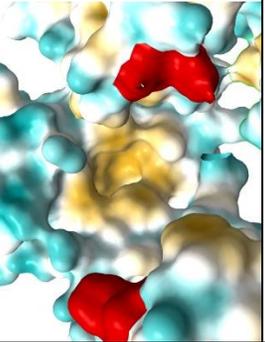
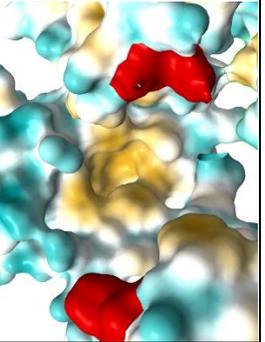
Finalmente, en la Tabla 3 se presentan los valores de  $K_m$  de diferentes PDI, el sustrato que se utilizó en el ensayo y qué función de la PDI se midió, mostrando también una imagen de la superficie del sitio activo de cada una de las proteínas para intentar reconocer algún patrón de relación entre la superficie hidrofóbica cercana al sitio activo y la afinidad por el sustrato.

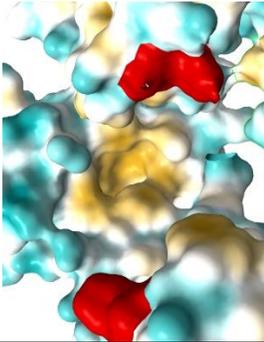
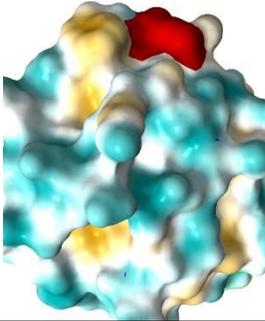
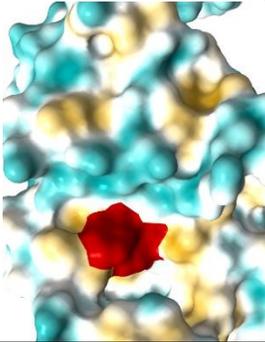
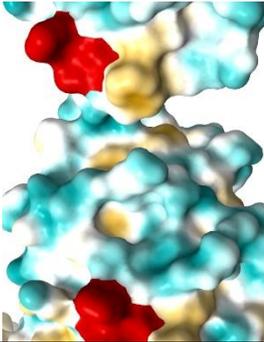
Se había supuesto que las proteínas con valores menores de  $K_m$  tendrían una superficie hidrofóbica significativamente mayor, con bolsillos más grandes o mayor número de regiones lipofílicas; sin embargo, con nuestros resultados no se identifica esa relación o algún otro patrón de relación con la superficie.

Tabla 3. Superficie del sitio activo de PDI a las que se les ha determinado la Km.

Cita	Organismo	Proteína	Km ( $\mu\text{M}$ )	Actividad específica ( $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ )	Sustrato	Actividad	Sitio activo
(Kajino et al., 1998)	<i>Bos taurus</i>	PDI de hígado bovino	1.1	No reportado	RNasa revuelta	Isomerasa	
(De Azevedo et al., 1984)	<i>Triticum aestivum</i>	PDI de trigo	2.0	No reportado	RNasa revuelta	Isomerasa	
(Kajino et al., 1998)	<i>Humicola insolens</i>	PDI	3.3	829	RNasa revuelta	Isomerasa	
(Gilbert, 1998)	<i>Rattus norvegicus</i>	PDI	5.0	No reportado	Insulina	Reductasa	

Cita	Organismo	Proteina	Km ( $\mu\text{M}$ )	Actividad especifica ( $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ )	Sustrato	Actividad	Sitio activo
(Hillson & Freedman, 1980)	<i>Bos taurus</i>	PDI de hígado bovino	5.4	0.737	DTT	Oxidase	
(Denisov et al., 2009)	<i>Homo sapiens</i>	PDIA1	7.0	No reportado	RNAasa A	Isomerasa	
(Mizunaga et al., 1990)	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	PDI de levadura	10	6.3	RNAasa revuelta	Isomerasa	
(Ramos et al., 2011)	<i>Entamoeba histolytica</i>	EhPDI	11.6	No reportado	Lisozima revuelta	Isomerasa	

Cita	Organismo	Proteína	Km (μM)	Actividad específica (μmol/min/mg)	Sustrato	Actividad	Sitio activo
(Mizunaga et al., 1990)	<i>Bos taurus</i>	PDI de hígado bovino	20	7	RNAasa revuelta	Isomerasa	
(Ramos et al., 2011)	<i>Entamoeba histolytica</i>	EhPDI	25.3	No reportado	Lisozima reducida	Oxidasa	
(Langenbach & Sottile, 1999)	<i>Homo sapiens</i>	PDIA1	27.8	No reportado	RNAasa desnaturalizada	Isomerasa	
(Denisov et al., 2009)	<i>Homo sapiens</i>	PDIA1 con pérdida de las 2 Cys en dominio a'	30	No reportado	RNAasa A	Isomerasa	

Cita	Organismo	Proteina	Km (μM)	Actividad específica (μmol/min/)	Sustrato	Actividad	Sitio activo
(Denisov et al., 2009)	<i>Homo sapiens</i>	PDIA1 con pérdida de las 2 Cys en dominio a'y una en el dominio a	50	No reportado	RNAsa A	Isomerasa	
(Langenbach & Sottile, 1999)	<i>Homo sapiens</i>	Tiorredoxina	66.5	No reportado	RNAsa desnaturalizada	Isomerasa	
(Liu et al., 2021)	<i>Corynebacterium glutamicum</i>	NCgl2478	510	No reportado	Hidroxi metil disulfuro y 2-hidroxi metil disulfuro	Reductasa	
(Ramos et al., 2011)	<i>Entamoeba histolytica</i>	EhPDI	2,026	No reportado	Insulina	Reductasa	

## 6. CONCLUSIONES

Los avances en ciencias computacionales han generado resultados impresionantes como el desarrollo de AlphaFold, algoritmo indispensable para predecir con una gran exactitud la estructura de muchas de las proteínas analizadas en esta tesina. El uso de diversas herramientas bioinformáticas permitió identificar, analizar y visualizar regiones conservadas en los diferentes niveles estructurales de las PDI, en las cuales habrá que poner especial atención en alternativas terapéuticas innovadoras para diversas enfermedades.

Aún queda un largo recorrido para el entendimiento completo de los mecanismos de acción y la relación estructura-actividad de estas proteínas. Una propuesta es realizar estudios enzimáticos donde se evalúe una actividad en concreto de diferentes PDI bajo las mismas condiciones experimentales y el mismo ensayo, calcular  $k_{cat}/K_m$  y así poder etiquetar cada proteína según su capacidad catalítica, para que después un algoritmo de aprendizaje automático identifique patrones entre ellas y dirigir estos resultados a una aplicación concreta.

## 7. REFERENCIAS

- Altamirano-Bustamante, M. M., Altamirano-Bustamante, N. F., Larralde-Laborde, M., Lara-Martínez, R., Leyva-García, E., Garrido-Magaña, E., Rojas, G., Jiménez-García, L. F., Revilla-Monsalve, C., Altamirano, P., & Calzada-León, R. (2019). Unpacking the aggregation-oligomerization-fibrillization process of naturally-occurring hIAPP amyloid oligomers isolated directly from sera of children with obesity or diabetes mellitus. *Scientific Reports*, *9*(1), 18465. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-54570-8>
- Andreeva, A., Kulesha, E., Gough, J., & Murzin, A. G. (2020). The SCOP database in 2020: expanded classification of representative family and superfamily domains of known protein structures. *Nucleic Acids Research*, *48*(D1), D376–D382. <https://doi.org/10.1093/nar/gkz1064>
- Appenzeller-Herzog, C., & Ellgaard, L. (2008a). In vivo reduction-oxidation state of protein disulfide isomerase: the two active sites independently occur in the reduced and oxidized forms. *Antioxidants & Redox Signaling*, *10*(1), 55–64. <https://doi.org/10.1089/ars.2007.1837>
- Appenzeller-Herzog, C., & Ellgaard, L. (2008b). The human PDI family: Versatility packed into a single fold. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, *1783*(4), 535–548. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2007.11.010>
- Bateman, A., Martin, M.-J., Orchard, S., Magrane, M., Ahmad, S., Alpi, E., Bowler-Barnett, E. H., Britto, R., Bye-A-Jee, H., Cukura, A., Denny, P., Dogan, T., Ebenezer, T., Fan, J., Garmiri, P., da Costa Gonzales, L. J., Hatton-Ellis, E., Hussein, A., Ignatchenko, A., ... Zhang, J. (2023). UniProt: The universal protein knowledgebase in 2023. *Nucleic Acids Research*, *51*(D1), D523–D531. <https://doi.org/10.1093/nar/gkac1052>
- Cadet, X. F., Gelly, J. C., van Noord, A., Cadet, F., & Acevedo-Rocha, C. G. (2022). Learning strategies in protein directed evolution. *Methods in Molecular Biology*, *2461*, 225–275. [https://doi.org/10.1007/978-1-0716-2152-3\\_15](https://doi.org/10.1007/978-1-0716-2152-3_15)
- Camargo, L. D. L., Trevelin, S. C., da Silva, G. H. G., Dos Santos Dias, A. A., Oliveira, M. A., Mikhaylichenko, O., Androwiki, A. C. D., Dos Santos, C. X., Holbrook, L.-M., Ceravolo, G. S., Denadai-Souza, A., Ribeiro, I. M. R.,

- Sartoretto, S., Laurindo, F. R. M., Coltri, P. P., Antunes, V. R., Touyz, R., Miller, F. J. J., Shah, A. M., & Lopes, L. R. (2024). Protein disulfide isomerase-mediated transcriptional upregulation of Nox1 contributes to vascular dysfunction in hypertension. *Journal of Hypertension*, *42*(6), 984–999. <https://doi.org/10.1097/HJH.0000000000003677>
- Campos, J. L. O., Doratioto, T. R., Videira, N. B., Ribeiro Filho, H. V, Batista, F. A. H., Fattori, J., Indolfo, N. de C., Nakahira, M., Bajgelman, M. C., Cvorovic, A., Laurindo, F. R. M., Webb, P., & Figueira, A. C. M. (2018). Protein disulfide isomerase modulates the activation of thyroid hormone receptors. *Frontiers in Endocrinology*, *9*, 784. <https://doi.org/10.3389/fendo.2018.00784>
- Carvalho, A. P., Fernandes, P. A., & Ramos, M. J. (2006). Similarities and differences in the thioredoxin superfamily. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, *91*(3), 229–248. <https://doi.org/10.1016/j.pbiomolbio.2005.06.012>
- Casadevall, G., Duran, C., & Osuna, S. (2023). AlphaFold2 and deep learning for elucidating enzyme conformational flexibility and its application for design. *JACS Au*, *3*(6), 1554–1562. <https://doi.org/10.1021/jacsau.3c00188>
- Charbonnier, J. B., Belin, P., Moutiez, M., Stura, E. A., & Quéméneur, E. (1999). On the role of the cis-proline residue in the active site of DsbA. *Protein Science : A Publication of the Protein Society*, *8*(1), 96–105. <https://doi.org/10.1110/ps.8.1.96>
- Chen, X.-Q., Shen, T., Fang, S.-J., Sun, X.-M., Li, G.-Y., & Li, Y.-F. (2023). Protein homeostasis in aging and cancer. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, *11*, 1143532. <https://doi.org/10.3389/fcell.2023.1143532>
- Colliot, O. (2023). *Machine learning for brain disorders* (1st ed.). Humana New York, NY.
- Conn, K. J., Gao, W., McKee, A., Lan, M. S., Ullman, M. D., Eisenhauer, P. B., Fine, R. E., & Wells, J. M. (2004). Identification of the protein disulfide isomerase family member PDip in experimental Parkinson's disease and Lewy body pathology. *Brain Research*, *1022*(1–2), 164–172. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2004.07.026>

- Darby, N. J., Penka, E., & Vincentelli, R. (1998). The multi-domain structure of protein disulfide isomerase is essential for high catalytic efficiency. *Journal of Molecular Biology*, 276(1), 239–247. <https://doi.org/10.1006/jmbi.1997.1504>
- de A Paes, A. M., Veríssimo-Filho, S., Guimarães, L. L., Silva, A. C. B., Takiuti, J. T., Santos, C. X. C., Janiszewski, M., Laurindo, F. R. M., & Lopes, L. R. (2011). Protein disulfide isomerase redox-dependent association with p47(phox): evidence for an organizer role in leukocyte NADPH oxidase activation. *Journal of Leukocyte Biology*, 90(4), 799–810. <https://doi.org/10.1189/jlb.0610324>
- De Azevedo, G. M. V., Brockway, B. E., Freedman, R. B., Greenwell, P., & Roden, L. T. (1984). Protein disulphide-isomerase of mature and developing wheat. *Biochemical Society* <http://portlandpress.com/biochemsoctrans/article-pdf/12/6/1043/493989/bst0121043.pdf>
- Denisov, A. Y., Määttänen, P., Dabrowski, C., Kozlov, G., Thomas, D. Y., & Gehring, K. (2009). Solution structure of the bb' domains of human protein disulfide isomerase. *FEBS Journal*, 276(5), 1440–1449. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2009.06884.x>
- Ertelt, M., Mulligan, V. K., Maguire, J. B., Lyskov, S., Moretti, R., Schiffner, T., Meiler, J., & Schoeder, C. T. (2024). Combining machine learning with structure-based protein design to predict and engineer post-translational modifications of proteins. *PLoS Computational Biology*, 20(3), e1011939–e1011939. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1011939>
- Fu, J., Gao, J., Liang, Z., & Yang, D. (2021). PDI-regulated disulfide bond formation in protein folding and biomolecular assembly. *Molecules* 26(1). <https://doi.org/10.3390/molecules26010171>
- Gamiz-Arco, G., Risso, V. A., Candel, A. M., Inglés-Prieto, A., Romero-Romero, M. L., Gaucher, E. A., Gavira, J. A., Ibarra-Molero, B., & Sanchez-Ruiz, J. M. (2019). Non-conservation of folding rates in the thioredoxin family reveals degradation of ancestral unassisted-folding. *Biochemical Journal*, 476(23), 3631–3647. <https://doi.org/10.1042/BCJ20190739>
- Gilbert, H. F. (1998). Protein disulfide isomerase. *Methods in Enzymology*, 290, 26–50. [https://doi.org/10.1016/s0076-6879\(98\)90005-2](https://doi.org/10.1016/s0076-6879(98)90005-2)

- Gomes, C. M., & Faisca, P. F. N. (2019). Protein folding: an introduction. (pp. 1–63). Springer International Publishing. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-00882-0\\_1](https://doi.org/10.1007/978-3-319-00882-0_1)
- Grasso, D., Galderisi, S., Santucci, A., & Bernini, A. (2023). Pharmacological chaperones and protein conformational diseases: Approaches of computational structural biology. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(6). <https://doi.org/10.3390/ijms24065819>
- Gross, E., Dobson, J., & Petersilka, M. (2013). Topics in current chemistry: Molecular chaperones. *Berlin: Springer*. <http://scholar.google.com/scholar?hl=en&btnG=Search&q=intitle:Topics+in+Current+Chemistry#0>
- Guevara-Hernández, E., López-Zavala, A. A., Jiménez-Gutiérrez, L. R., & Sotelo-Mundo, R. R. (2013). Perspectivas actuales del uso de proteínas recombinantes y su importancia en la investigación científica. *Biotecnia*, 15(3), 8–17. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=672971124002>
- Gurina, T. S., & Mohiuddin, S. S. (2024). Biochemistry, protein catabolism.
- Hatahet, F., & Ruddock, L. W. (2009). Protein disulfide isomerase: a critical evaluation of its function in disulfide bond formation. *Antioxidants & Redox Signaling*, 11(11), 2807–2850. <https://doi.org/10.1089/ars.2009.2466>
- Hetz, C., Zhang, K., & Kaufman, R. J. (2020). Mechanisms, regulation and functions of the unfolded protein response. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 21(8), 421–438. <https://doi.org/10.1038/s41580-020-0250-z>
- Higa, A., Taouji, S., Lhomond, S., Jensen, D., Fernandez-Zapico, M. E., Simpson, J. C., Pasquet, J.-M., Schekman, R., & Chevet, E. (2014). Endoplasmic reticulum stress-activated transcription factor ATF6 $\alpha$  requires the disulfide isomerase PDIA5 to modulate chemoresistance. *Molecular and Cellular Biology*, 34(10), 1839–1849. <https://doi.org/10.1128/MCB.01484-13>
- Hillson, D. A., & Freedman, R. B. (1980). Resolution of protein disulphide-isomerase and glutathione-insulin transhydrogenase activities by covalent chromatography Properties of the purified protein disulphide-isomerase (Vol. 191). *Biochemical Journal*. <http://portlandpress.com/biochemj/article-pdf/191/2/373/575268/bj1910373.pdf>

- Holm, L., Laiho, A., Törönen, P., & Salgado, M. (2023). DALI shines a light on remote homologs: One hundred discoveries. *Protein Science: A Publication of the Protein Society*, 32(1), e4519. <https://doi.org/10.1002/pro.4519>
- Honjo, Y., Ito, H., Horibe, T., Takahashi, R., & Kawakami, K. (2010). Protein disulfide isomerase-immunopositive inclusions in patients with Alzheimer disease. *Brain Research*, 1349, 90–96. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2010.06.016>
- Hoppe, T., & Cohen, E. (2020). Organismal protein homeostasis mechanisms. *Genetics*, 215(4), 889–901. <https://doi.org/10.1534/genetics.120.301283>
- Horibe, T., Gomi, M., Iguchi, D., Ito, H., Kitamura, Y., Masuoka, T., Tsujimoto, I., Kimura, T., & Kikuchi, M. (2004). Different contributions of the three CXXC motifs of human protein-disulfide isomerase-related protein to isomerase activity and oxidative refolding. *Journal of Biological Chemistry*, 279(6), 4604–4611. <https://pesquisa.bvsalud.org/portal/resource/es/mdl-14627699>
- Irvine, A. G., Wallis, A. K., Sanghera, N., Rowe, M. L., Ruddock, L. W., Howard, M. J., Williamson, R. A., Blindauer, C. A., & Freedman, R. B. (2014). Protein disulfide-isomerase interacts with a substrate protein at all stages along its folding pathway. *PloS One*, 9(1), e82511–e82511. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0082511>
- Jiao, M., Zhang, Y., Song, X., & Xu, B. (2024). The role and mechanism of TXNDC5 in disease progression. *Frontiers in Immunology*, 15, 1354952. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2024.1354952>
- Kajino, T., Miyazaki, C., Asami, O., Hirai, M., Yamada, Y., & Udaka, S. (1998). Thermophilic fungal protein disulfide isomerase. *Methods in Enzymology*, 290, 50–59. <https://pesquisa.bvsalud.org/portal/resource/es/mdl-9534150>
- Kanemura, S., Matsusaki, M., Inaba, K., & Okumura, M. (2020). PDI Family Members as guides for client folding and assembly. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(24). <https://doi.org/10.3390/ijms21249351>
- Kaplan, A., Gaschler, M. M., Dunn, D. E., Colligan, R., Brown, L. M., Palmer, A. G., Lo, D. C., & Stockwell, B. R. (2015). Small molecule-induced oxidation of protein disulfide isomerase is neuroprotective. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(17), E2245–E2252. <https://doi.org/10.1073/pnas.1500439112>

- Karala, A. R., Lappi, A. K., & Ruddock, L. W. (2010). Modulation of an active-site cysteine pKa allows PDI to act as a catalyst of both disulfide bond formation and isomerization. *Journal of Molecular Biology*, 396(4), 883–892. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2009.12.014>
- Kersteen, E. A., Barrows, S. R., & Raines, R. T. (2005). Catalysis of protein disulfide bond isomerization in a homogeneous substrate. *Biochemistry*, 44(36), 12168–12178. <https://doi.org/10.1021/bi0507985>
- Kranz, P., Neumann, F., Wolf, A., Classen, F., Pompsch, M., Ocklenburg, T., Baumann, J., Janke, K., Baumann, M., Goepelt, K., Riffkin, H., Metzen, E., & Brockmeier, U. (2017). PDI is an essential redox-sensitive activator of PERK during the unfolded protein response (UPR). *Cell Death & Disease*, 8(8), e2986–e2986. <https://doi.org/10.1038/cddis.2017.369>
- Langenbach, K. J., & Sottile, J. (1999). Identification of protein-disulfide isomerase activity in fibronectin. *Journal of Biological Chemistry*, 274(11), 7032–7038. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.11.7032>
- Laurindo, F. R. M., Pescatore, L. A., & Fernandes, D. de C. (2012). Protein disulfide isomerase in redox cell signaling and homeostasis. *Free Radical Biology & Medicine*, 52(9), 1954–1969. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2012.02.037>
- Li, J., Zhang, D., Wiersma, M., & Brundel, B. J. J. M. (2018). Role of autophagy in proteostasis: friend and foe in cardiac diseases. *Cells*, 7(12). <https://doi.org/10.3390/cells7120279>
- Lin, C. H., Tariq, M. J., Ullah, F., Sannareddy, A., Khalid, F., Abbas, H., Bader, A., Samaras, C., Valent, J., Khouri, J., Anwer, F., Raza, S., & Dima, D. (2024). Current novel targeted therapeutic strategies in multiple myeloma. *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 25, Issue 11). <https://doi.org/10.3390/ijms25116192>
- Liu, Y., Li, X., Luo, J., Su, T., Si, M., & Chen, C. (2021). A novel mycothiol-dependent thiol–disulfide reductase in *Corynebacterium glutamicum* involving oxidative stress resistance. *BioTech*, 11(8). <https://doi.org/10.1007/s13205-021-02896-4>

- Lyles, M. M., & Gilber, H. F. (1994). Mutations in the thioredoxin sites of protein disulfide isomerase reveal functional nonequivalence of the N- and C-terminal domains. *Journal of Biological Chemistry*, 269(49), 30946–30952. [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(18\)47373-5](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(18)47373-5)
- Maattanen, P., Jansen, G., Kozlov, G., Gehring, K., & Thomas, D. Y. (2014). Chaperones in the endoplasmic reticulum (ER): Function and interaction network. W. A. Houry (Ed.), *The molecular chaperones interaction networks in protein folding and degradation* (pp. 235–271). Springer New York. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-1130-1\\_10](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-1130-1_10)
- Madeira, F., Madhusoodanan, N., Lee, J., Eusebi, A., Niewielska, A., Tivey, A. R. N., Lopez, R., & Butcher, S. (2024). The EMBL-EBI job dispatcher sequence analysis tools framework in 2024. *Nucleic Acids Research*, 52(W1), W521–W525. <https://doi.org/10.1093/nar/gkae241>
- Matsusaki, M., Okada, R., Tanikawa, Y., Kanemura, S., Ito, D., Lin, Y., Watabe, M., Yamaguchi, H., Saio, T., Lee, Y.-H., Inaba, K., & Okumura, M. (2021). Functional interplay between P5 and PDI/ERp72 to drive protein folding. *Biology*, 10(11). <https://doi.org/10.3390/biology10111112>
- Mizunaga, T., Katakura, Y., Miura, T., & Maruyama, Y. (1990). Purification and characterization of yeast protein disulfide isomerase. *Journal of Biochemistry* (Vol. 108). <https://academic.oup.com/jb/article/108/5/846/813790>
- Modi, T., Jonathan, H., Ghosh, K., & Ozkan, S. B. (2018). Ancient thioredoxins evolved to modern- day stability–function requirement by altering native state ensemble. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, 373(20170184). <http://dx.doi.org/10.1098/rstb.2017.0184>
- Nakasako, M., Maeno, A., Kurimoto, E., Harada, T., Yamaguchi, Y., Oka, T., Takayama, Y., Iwata, A., & Kato, K. (2010). Redox-dependent domain rearrangement of protein disulfide isomerase from a thermophilic fungus. *Biochemistry*, 49(32), 6953–6962. <https://doi.org/10.1021/bi1006089>
- Neves, R. P. P., Fernandes, P. A., & Ramos, M. J. (2017). Mechanistic insights on the reduction of glutathione disulfide by protein disulfide isomerase.

- Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 114(24), E4724–E4733. <https://doi.org/10.1073/pnas.1618985114>
- Okumura, M., Kadokura, H., Hashimoto, S., Yutani, K., Kanemura, S., Hikima, T., Hidaka, Y., Ito, L., Shiba, K., Masui, S., Imai, D., Imaoka, S., Yamaguchi, H., & Inaba, K. (2014). Inhibition of the functional interplay between endoplasmic reticulum (ER) oxidoreductin-1 $\alpha$  (Ero1 $\alpha$ ) and protein-disulfide isomerase (PDI) by the endocrine disruptor bisphenol A. *The Journal of Biological Chemistry*, 289(39), 27004–27018. <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.564104>
- Okumura, M., Kadokura, H., & Inaba, K. (2015). Structures and functions of protein disulfide isomerase family members involved in proteostasis in the endoplasmic reticulum. *Free Radical Biology & Medicine*, 83, 314–322. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2015.02.010>
- Ostapchenko, V. G., Chen, M., Guzman, M. S., Xie, Y.-F., Lavine, N., Fan, J., Beraldo, F. H., Martyn, A. C., Belrose, J. C., Mori, Y., MacDonald, J. F., Prado, V. F., Prado, M. A. M., & Jackson, M. F. (2015). The transient receptor potential melastatin 2 (TRPM2) channel contributes to  $\beta$ -Amyloid oligomer-related neurotoxicity and memory impairment. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 35(45), 15157–15169. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4081-14.2015>
- Paxman, J. J., & Heras, B. (2017). Bioinformatics tools and resources for analyzing protein structures. *Methods in Molecular Biology*, 1549, 209–220. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6740-7\\_16](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6740-7_16)
- Peixoto, Á. S., Geyer, R. R., Iqbal, A., Truzzi, D. R., Moretti, A. I. S., Laurindo, F. R. M., & Augusto, O. (2018). Peroxynitrite preferentially oxidizes the dithiol redox motifs of protein-disulfide isomerase. *Journal of Biological Chemistry*, 293(4), 1450–1465. <https://doi.org/10.1074/jbc.M117.807016>
- Perri, E. R., Thomas, C. J., Parakh, S., Spencer, D. M., & Atkin, J. D. (2015). The Unfolded Protein Response and the role of protein disulfide isomerase in neurodegeneration. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 3, 80. <https://doi.org/10.3389/fcell.2015.00080>

- Pierre, A. S., Gavriel, N., Guilbard, M., Ogier-Denis, E., Chevet, E., Delom, F., & Igbaria, A. (2024). Modulation of protein disulfide isomerase functions by localization: The example of the anterior gradient family. *Antioxidants & Redox Signaling*, *41*(10–12), 675–692. <https://doi.org/10.1089/ars.2024.0561>
- Powell, L. E., & Foster, P. A. (2021). Protein disulphide isomerase inhibition as a potential cancer therapeutic strategy. *Cancer Medicine*, *10*(8), 2812–2825. <https://doi.org/10.1002/cam4.3836>
- Puig, A., Lyles, M. M., Noiva, R., & Gilbert, H. F. (1994). The role of the thiol/disulfide centers and peptide binding site in the chaperone and anti-chaperone activities of protein disulfide isomerase. *Journal of Biological Chemistry*, *269*(29), 19128–19135. [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(17\)32284-6](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(17)32284-6)
- Rahman, N. S. A., Zahari, S., Syafruddin, S. E., Firdaus-Raih, M., Low, T. Y., & Mohtar, M. A. (2022). Functions and mechanisms of protein disulfide isomerase family in cancer emergence. *Cell & Bioscience*, *12*(1), 129. <https://doi.org/10.1186/s13578-022-00868-6>
- Ramos, M. A., Mares, R. E., Magaña, P. D., Rivas, I. D., & Meléndez-López, S. G. (2011). *Entamoeba histolytica*: Biochemical characterization of a protein disulfide isomerase. *Experimental Parasitology*, *128*(1), 76–81. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2011.02.009>
- Robinson, P. J., Pringle, M. A., Fleming, B., & Bulleid, N. J. (2023). Distinct role of ERp57 and ERdj5 as a disulfide isomerase and reductase during ER protein folding. *Journal of Cell Science*, *136*(2). <https://doi.org/10.1242/jcs.260656>
- Safren, N., El Ayadi, A., Chang, L., Terrillion, C. E., Gould, T. D., Boehning, D. F., & Monteiro, M. J. (2014). Ubiquilin-1 overexpression increases the lifespan and delays accumulation of Huntingtin aggregates in the R6/2 mouse model of Huntington's disease. *PloS One*, *9*(1), e87513. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0087513>
- Schwaller, M., Wilkinson, B., & Gilbert, H. F. (2003). Reduction-reoxidation cycles contribute to catalysis of disulfide isomerization by protein-disulfide isomerase. *Journal of Biological Chemistry*, *278*(9), 7154–7159. <https://doi.org/10.1074/jbc.M211036200>

- Shergalis, A. G., Hu, S., Bankhead, A., & Neamati, N. (2020). Role of the ERO1-PDI interaction in oxidative protein folding and disease. *Pharmacology and Therapeutics*, 210, 107525. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2020.107525>
- Shouldice, S. R., Cho, S.-H., Boyd, D., Heras, B., Eser, M., Beckwith, J., Riggs, P., Martin, J. L., & Berkmen, M. (2010). *In vivo* oxidative protein folding can be facilitated by oxidation-reduction cycling. *Molecular Microbiology*, 75(1), 13–28. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2009.06952.x>
- Sideraki, V., & Gilbert, H. F. (2000). Mechanism of the antichaperone activity of protein disulfide isomerase: Facilitated assembly of large, insoluble aggregates of denatured lysozyme and PDI. *Biochemistry*, 39(5), 1180–1188. <https://doi.org/10.1021/bi992246q>
- Tian, G., Xiang, S., Noiva, R., Lennarz, W. J., & Schindelin, H. (2006). The crystal structure of yeast protein disulfide isomerase suggests cooperativity between its active sites. *Cell*, 124(1), 61–73. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.10.044>
- Uehara, T., Nakamura, T., Yao, D., Shi, Z.-Q., Gu, Z., Ma, Y., Masliah, E., Nomura, Y., & Lipton, S. A. (2006). S-nitrosylated protein-disulphide isomerase links protein misfolding to neurodegeneration. *Nature*, 441(7092), 513–517. <https://doi.org/10.1038/nature04782>
- Vertommen, D., Depuydt, M., Pan, J., Leverrier, P., Knoop, L., Szikora, J.-P., Messens, J., Bardwell, J. C. A., & Collet, J.-F. (2008). The disulphide isomerase DsbC cooperates with the oxidase DsbA in a DsbD-independent manner. *Molecular Microbiology*, 67(2), 336–349. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2614554>
- Wallis, A. K., & Freedman, R. B. (2013). Assisting oxidative protein folding: How do protein disulphide-isomerases couple conformational and chemical processes in protein folding? S. Jackson (Ed.), *Molecular chaperones* (pp. 1–34). Springer Berlin Heidelberg. [https://doi.org/10.1007/128\\_2011\\_171](https://doi.org/10.1007/128_2011_171)
- Wang, C., Chen, S., Wang, X., Wang, L., Wallis, A. K., Freedman, R. B., & Wang, C.-C. (2010). Plasticity of human protein disulfide isomerase: evidence for mobility around the X-linker region and its functional significance. *The Journal*

- of *Biological Chemistry*, 285(35), 26788–26797.  
<https://doi.org/10.1074/jbc.M110.107839>
- Wang, C., Yu, J., Huo, L., Wang, L., Feng, W., & Wang, C. (2012). Human protein-disulfide isomerase is a redox-regulated chaperone activated by oxidation of domain a'. *The Journal of Biological Chemistry*, 287(2), 1139–1149.  
<https://doi.org/10.1074/jbc.M111.303149>
- Wang, L., Dong, H., Song, G., Zhang, R., Pan, J., & Han, J. (2018). TXNDC5 synergizes with HSC70 to exacerbate the inflammatory phenotype of synovial fibroblasts in rheumatoid arthritis through NF- $\kappa$ B signaling. *Cellular & Molecular Immunology*, 15(7), 685–696. <https://doi.org/10.1038/cmi.2017.20>
- Wang, L., & Wang, C.-C. (2023). Oxidative protein folding fidelity and redox-taxis in the endoplasmic reticulum. *Trends in Biochemical Sciences*, 48(1), 40–52.  
<https://doi.org/10.1016/j.tibs.2022.06.011>
- Wang, L., Wang, X., Zhang, J., Duan, J., Tang, C., Zhang, L., Zeng, H., Li, H., Li, Y., & Zhou, Y. (2023). The role of PDIA3 in oral squamous cell carcinoma and its value as a diagnostic and prognostic biomarker. *Heliyon*, 9(12), e22596.  
<https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2023.e22596>
- Wang, X., Li, H., & Chang, X. (2022). The role and mechanism of TXNDC5 in diseases. *European Journal of Medical Research*, 27(1), 145.  
<https://doi.org/10.1186/s40001-022-00770-4>
- Watanabe, M. M., Laurindo, F. R. M., & Fernandes, D. C. (2014). Methods of measuring protein disulfide isomerase activity: a critical overview. *Frontiers in Chemistry*, 2, 73. <https://doi.org/10.3389/fchem.2014.00073>
- Xiao, Y., Li, C., Gu, M., Wang, H., Chen, W., Luo, G., Yang, G., Zhang, Z., Zhang, Y., Xian, G., Li, Z., & Sheng, P. (2018). Protein disulfide isomerase silence inhibits inflammatory functions of macrophages by suppressing reactive oxygen species and NF- $\kappa$ B pathway. *Inflammation*, 41(2), 614–625.  
<https://doi.org/10.1007/s10753-017-0717-z>
- Xiong, B., Jha, V., Min, J.-K., & Cho, J. (2020). Protein disulfide isomerase in cardiovascular disease. *Experimental & Molecular Medicine*, 52(3), 390–399.  
<https://doi.org/10.1038/s12276-020-0401-5>

- Xu, S., Butkevich, A. N., Yamada, R., Zhou, Y., Debnath, B., Duncan, R., Zandi, E., Petasis, N. A., & Neamati, N. (2012). Discovery of an orally active small-molecule irreversible inhibitor of protein disulfide isomerase for ovarian cancer treatment. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *109*(40), 16348–16353. <https://doi.org/10.1073/pnas.1205226109>
- Yang, M., Li, Q., Yang, H., Li, Y., Lu, L., Wu, X., Liu, Y., Li, W., Shen, J., Xiao, Z., Zhao, Y., Du, F., Chen, Y., Deng, S., Cho, C. H., Li, X., & Li, M. (2024). Downregulation of PDIA3 inhibits gastric cancer cell growth through cell cycle regulation. *Biomedicine & Pharmacotherapy = Biomedecine & Pharmacotherapie*, *173*, 116336. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2024.116336>
- Ye, Z.-W., Zhang, J., Aslam, M., Blumental-Perry, A., Tew, K. D., & Townsend, D. M. (2023). Protein disulfide isomerase family mediated redox regulation in cancer. *Advances in Cancer Research*, *160*, 83–106. <https://doi.org/10.1016/bs.acr.2023.06.001>
- Yu, F., Liu, X., Li, M., Liu, X., Wang, X., & Guo, M. (2023). Protein disulfide isomerase A3 as novel biomarker for endometrial cancer. *Frontiers in Oncology*, *13*, 1247446. <https://doi.org/10.3389/fonc.2023.1247446>
- Yu, J., Li, T., Liu, Y., Wang, X., Zhang, J., Wang, X., Shi, G., Lou, J., Wang, L., Wang, C.-C., & Wang, L. (2020). Phosphorylation switches protein disulfide isomerase activity to maintain proteostasis and attenuate ER stress. *The EMBO Journal*, *39*(10), e103841. <https://doi.org/10.15252/emboj.2019103841>
- Zhang, J., Wang, K., Hainisayimu, T., & Li, H. (2022). Pan-cancer analysis of PDIA3: Identifying it as a potential biomarker for tumor prognosis and immunotherapy. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, *2022*, 9614819. <https://doi.org/10.1155/2022/9614819>

## 8. APÉNDICES

### APÉNDICE I. Matriz de identidad de las 29 PDI presentadas en el árbol filogenético.

1: sp Q921X9 PDIA5_MOUSE	100.00	89.92	26.32	27.49	27.89	27.89	27.49	28.06	30.83	27.78	19.57	27.05	26.88	30.50	29.43	29.39	29.39	30.80	30.27	29.30	27.92	31.00	30.40	29.77	30.12	28.68	28.29	29.46	29.84
2: sp Q14554 PDIA5_HUMAN	89.92	100.00	27.53	27.89	28.29	28.29	27.89	29.64	31.95	28.17	20.29	28.47	28.67	29.73	30.19	29.77	29.77	31.18	29.89	29.67	27.92	30.42	30.08	29.70	31.33	29.46	29.07	29.07	29.46
3: sp Q9V438 PDIA6_DROME	26.32	27.53	100.00	59.11	59.21	59.67	59.44	32.06	28.32	32.25	22.95	29.75	30.00	34.34	32.39	32.38	32.38	32.27	32.86	33.58	34.83	32.71	32.33	32.33	35.16	35.79	35.42	35.06	35.42
4: sp P38660 PDIA6_MESAU	27.49	27.89	59.11	100.00	93.17	94.53	94.76	30.24	30.82	31.56	22.87	28.07	27.97	34.56	33.45	32.75	32.75	33.68	33.57	33.10	34.31	33.09	33.09	32.72	32.63	35.74	35.38	36.46	35.74
5: sp Q15084 PDIA6_HUMAN	27.89	28.29	59.21	93.17	100.00	94.77	95.45	30.48	30.14	30.50	22.22	28.77	29.02	34.19	34.14	33.10	33.10	34.03	33.92	33.10	34.67	32.72	32.35	31.99	31.58	35.02	34.66	35.02	33.94
6: sp Q63081 PDIA6_RAT	27.89	28.29	59.67	94.53	94.77	100.00	98.86	30.82	30.48	30.14	22.75	28.42	28.67	33.82	33.79	32.75	32.75	33.33	33.57	32.74	35.04	32.72	32.35	31.99	33.68	34.30	33.94	35.38	34.66
7: sp Q922R8 PDIA6_MOUSE	27.49	27.89	59.44	94.76	95.45	98.86	100.00	30.48	30.14	30.14	22.22	28.07	28.67	33.82	33.79	32.75	32.75	33.68	33.57	32.74	34.67	32.72	32.35	31.99	33.68	34.66	34.30	35.74	35.02
8: sp Q86IA3 PDI1_DICDI	28.06	29.64	32.06	30.24	30.48	30.82	30.48	100.00	33.21	36.76	30.05	30.77	30.66	34.60	32.03	34.19	34.19	34.43	34.32	36.76	32.45	37.35	37.74	38.13	33.73	38.17	37.79	37.02	37.40
9: sp P17967 PDI_YEAST	30.83	31.95	28.32	30.82	30.14	30.48	30.14	33.21	100.00	41.89	32.36	26.26	26.21	29.23	27.80	28.08	28.48	28.83	28.34	29.89	30.90	29.49	29.49	29.91	23.04	26.69	26.69	25.85	26.27
10: sp P55059 PDI_HUMIN	27.78	28.17	32.25	31.56	30.50	30.14	30.14	36.76	41.89	100.00	57.25	28.72	28.24	36.34	34.36	34.38	34.59	34.73	34.66	35.81	36.18	33.92	33.92	34.14	33.33	36.44	36.88	35.79	35.79
11: sp Q00002 PDI_ALTAL	19.57	20.29	22.95	22.87	22.22	22.75	22.22	30.05	32.36	57.25	100.00	22.55	22.49	26.52	26.13	25.00	25.27	25.74	25.74	29.68	29.24	26.10	25.22	25.81	29.14	28.33	28.33	28.33	28.90
12: sp D3Z6P0 PDIA2_MOUSE	27.05	28.47	29.75	28.07	28.77	28.42	28.07	30.77	26.26	28.72	22.55	100.00	78.97	41.07	46.23	45.31	45.71	45.42	46.00	31.02	32.29	27.90	27.90	28.72	35.05	29.71	29.29	29.50	29.92
13: sp Q13087 PDIA2_HUMAN	26.88	28.67	30.00	27.97	29.02	28.67	28.67	30.66	26.21	28.24	22.49	78.97	100.00	41.31	47.43	46.32	46.32	46.23	46.61	31.43	31.73	28.63	28.83	29.65	34.02	29.37	28.96	28.96	29.17
14: sp Q17770 PDI2_CAEEL	30.50	29.73	34.34	34.56	34.19	33.82	33.82	34.60	29.23	36.34	26.52	41.07	41.31	100.00	58.04	56.21	56.21	56.10	56.94	34.62	33.11	31.53	30.45	31.10	34.72	33.84	33.84	33.41	33.41
15: sp P09102 PDIA1_CHICK	29.43	30.19	32.39	33.45	34.14	33.79	33.79	32.03	27.80	34.36	26.13	46.23	47.43	58.04	100.00	83.60	84.19	83.43	84.36	35.06	35.52	31.71	30.87	31.50	34.02	33.47	33.26	32.01	32.22
16: sp P09103 PDIA1_MOUSE	29.39	29.77	32.38	32.75	33.10	32.75	32.75	34.19	28.08	34.38	25.00	45.31	46.32	56.21	83.60	100.00	97.05	93.12	93.89	35.01	34.62	32.34	31.28	31.70	35.05	33.19	32.98	32.77	32.98
17: sp P04785 PDIA1_RAT	29.39	29.77	32.38	32.75	33.10	32.75	32.75	34.19	28.48	34.59	25.27	45.71	46.32	56.21	84.19	97.05	100.00	93.32	93.89	35.22	34.83	32.34	31.28	31.91	35.05	33.19	32.98	32.77	33.19
18: sp P05307 PDIA1_BOVIN	30.80	31.18	32.27	33.68	34.03	33.33	33.68	34.43	28.83	34.73	25.74	45.42	46.23	56.10	83.43	93.12	93.32	100.00	95.28	35.56	35.39	32.13	30.85	31.49	34.02	32.49	32.28	32.07	32.28
19: sp P07237 PDIA1_HUMAN	30.27	29.89	32.86	33.57	33.92	33.57	33.57	34.32	28.34	34.66	25.74	46.00	46.61	56.94	84.36	93.89	93.89	95.28	100.00	35.50	35.76	32.48	31.41	31.84	34.54	32.42	32.20	32.63	32.84
20: sp P80284 PDI_HORVU	29.30	29.67	33.58	33.10	33.10	32.74	32.74	36.76	29.89	35.81	29.68	31.02	31.43	34.62	35.06	35.01	35.22	35.56	35.50	100.00	58.32	36.31	35.06	35.27	38.46	35.42	35.83	34.79	35.42
21: sp Q9XI01 PDI11_ARATH	27.92	27.92	34.83	34.31	34.67	35.04	34.67	32.45	30.90	36.18	29.24	32.29	31.73	33.11	35.52	34.62	34.83	35.39	35.76	58.32	100.00	37.39	36.55	36.76	38.78	36.13	35.92	36.55	36.13
22: sp P13667 PDIA4_HUMAN	31.00	30.42	32.71	33.09	32.72	32.72	32.72	37.35	29.49	33.92	26.10	27.90	28.63	31.53	31.71	32.34	32.34	32.13	32.48	36.31	37.39	100.00	88.18	88.40	41.46	39.67	39.67	39.67	39.88

23: sp P38659 PDIA4_RAT	30.40	30.08	32.33	33.09	32.35	32.35	32.35	37.74	29.49	33.92	25.22	27.90	28.83	30.45	30.87	31.28	31.28	30.85	31.41	35.06	36.55	88.18	100.00	95.77	40.49	39.05	39.05	39.26	39.46
24: sp P08003 PDIA4_MOUSE	29.77	29.70	32.33	32.72	31.99	31.99	31.99	38.13	29.91	34.14	25.81	28.72	29.65	31.10	31.50	31.70	31.91	31.49	31.84	35.27	36.76	88.40	95.77	100.00	40.49	39.67	39.67	39.05	39.26
25: sp P86235 PDIA3_MESAU	30.12	31.33	35.16	32.63	31.58	33.68	33.68	33.73	23.04	33.33	29.14	35.05	34.02	34.72	34.02	35.05	35.05	34.02	34.54	38.46	38.78	41.46	40.49	40.49	100.00	91.83	91.35	95.19	94.23
26: sp Q4VIT4 PDIA3_CHLAE	28.68	29.46	35.79	35.74	35.02	34.30	34.66	38.17	26.69	36.44	28.33	29.71	29.37	33.84	33.47	33.19	33.19	32.49	32.42	35.42	36.13	39.67	39.05	39.67	91.83	100.00	99.21	92.67	93.47
27: sp P30101 PDIA3_HUMAN	28.29	29.07	35.42	35.38	34.66	33.94	34.30	37.79	26.69	36.88	28.33	29.29	28.96	33.84	33.26	32.98	32.98	32.28	32.20	35.83	35.92	39.67	39.05	39.67	91.35	99.21	100.00	92.28	93.07
28: sp P11598 PDIA3_RAT	29.46	29.07	35.06	36.46	35.02	35.38	35.74	37.02	25.85	35.79	28.33	29.50	28.96	33.41	32.01	32.77	32.77	32.07	32.63	34.79	36.55	39.67	39.26	39.05	95.19	92.67	92.28	100.00	97.43
29: sp P27773 PDIA3_MOUSE	29.84	29.46	35.42	35.74	33.94	34.66	35.02	37.40	26.27	35.79	28.90	29.92	29.17	33.41	32.22	32.98	33.19	32.28	32.84	35.42	36.13	39.88	39.46	39.26	94.23	93.47	93.07	97.43	100.00

APÉNDICE II. Alineamiento de las 11 PDI realizado en Clustal Omega donde se muestran aminoácidos altamente conservados (\*), medianamente conservados (:) y poco conservados (.) coloreados según sus características fisicoquímicas.

sp Q14554 PDIA5_HUMAN	MARAGPAWLLLLAIWVVLPSWLLSSAKVSSLIERISDPKDLKLLRTRNNVLVLYSKSEVAA	60
sp P38660 PDIA6_MESAU	-----	0
sp Q9V438 PDIA6_DROME	-----	0
sp Q86IA3 PDI1_DICDI	-----	0
sp P17967 PDI_YEAST	-----	0
sp D3Z6P0 PDIA2_MOUSE	-----	0
sp P05307 PDIA1_BOVIN	-----	0
sp Q17770 PDI2_CAEEL	-----	0
sp Q9XI01 PDI11_ARATH	-----	0
sp P38659 PDIA4_RAT	-MKLRKAWLLVLLL-----	13
sp Q4VIT4 PDIA3_CHLAE	-----	0
sp Q14554 PDIA5_HUMAN	ENHLRLLSTVAQAVKGGTICWVDCGDAESRKLCCKMKVDLSPKDKKVELFHYQDGAFHT	120
sp P38660 PDIA6_MESAU	-----	0
sp Q9V438 PDIA6_DROME	-----	0
sp Q86IA3 PDI1_DICDI	-----	0
sp P17967 PDI_YEAST	-----	0
sp D3Z6P0 PDIA2_MOUSE	-----	0
sp P05307 PDIA1_BOVIN	-----	0
sp Q17770 PDI2_CAEEL	-----	0
sp Q9XI01 PDI11_ARATH	-----	0
sp P38659 PDIA4_RAT	-----ALTQLLAAA-----SAEDAH-----ED-----	30
sp Q4VIT4 PDIA3_CHLAE	-----	0

```

sp|Q14554|PDIA5_HUMAN EYNRAVTFKSIVAF LKDPKGPPLWEED-----PGAK-----DVVHLDSEKDFRRL LK 167
sp|P38660|PDIA6_MESAU ----- 0
sp|Q9V438|PDIA6_DROME ----- 0
sp|Q86IA3|PDI1_DICDI ----- 0
sp|P17967|PDI_YEAST ----- 0
sp|D3Z6P0|PDIA2_MOUSE ----- 0
sp|P05307|PDIA1_BOVIN ----- 0
sp|Q17770|PDI2_CAEEL ----- 0
sp|Q9XI01|PDI11_ARATH ----- 0
sp|P38659|PDIA4_RAT -----ASDS-ENPIEODDDDEEEDDEDDLEVKKEENGWV LNDENFDNF-V 74
sp|Q4VIT4|PDIA3_CHLAE ----- 0

```

```

sp|Q14554|PDIA5_HUMAN KEEKPLLIMFYAPW CSMCKRMPHFQKAATQLRGHAVLAGMNVYSS-EFENIKKEYSVRG 226
sp|P38660|PDIA6_MESAU -----MARLG 5
sp|Q9V438|PDIA6_DROME -----MRQLA 5
sp|Q86IA3|PDI1_DICDI -----MKILL 5
sp|P17967|PDI_YEAST -----MKFSAGAVLS 10
sp|D3Z6P0|PDIA2_MOUSE -----MDKQL 5
sp|P05307|PDIA1_BOVIN -----M 1
sp|Q17770|PDI2_CAEEL -----M 1
sp|Q9XI01|PDI11_ARATH -----MAMRG 5
sp|P38659|PDIA4_RAT ADKDTVLLLEFYAPW CGHCKQFAPEYEKIASTLKDNDPPIAVAKIDATSASMLASKFDVSG 134
sp|Q4VIT4|PDIA3_CHLAE -----MRL--RRLAL 8

```

```

sp|Q14554|PDIA5_HUMAN FPTICYFEKGRFLFYQDNYGSTAEDIVEWLNKPQPQPVPETPWADEGGSVYHLTDEDF 286
sp|P38660|PDIA6_MESAU FGLVSC-----TF-F-L-----AASGLYSSDDVIELTPSNF 35
sp|Q9V438|PDIA6_DROME SILLLA-----FV-V-G-----SVSAFYSPDGVVELTPSNF 35
sp|Q86IA3|PDI1_DICDI FVTLIA--LA-----FVALCSAEGNVVVLSPDNF 32
sp|P17967|PDI_YEAST WSSLLL--A-SSV-F-----AQQEAVAPEDSAVVKLATDSF 42
sp|D3Z6P0|PDIA2_MOUSE LPVLLL-LLGVSGS-W-GQGEPPG-----PSEVLPEEPTGEEVPEKEDGILV LNHRTL 55
sp|P05307|PDIA1_BOVIN LRRALL-CLALTAL-F-RAG-----AGAPDEEDHVLV LHKGNF 36
sp|Q17770|PDI2_CAEEL FRLVGL---FFLV-L-GAS-----AAVIEEENIVLTKDNF 33
sp|Q9XI01|PDI11_ARATH FTLFSILVLSLC-----ASSIRSEETETKEFVLTLDHTNF 40
sp|P38659|PDIA4_RAT YPTIKILKKGQAVD-Y-DGSR TQEE-----IVAKVREVSQPDWTPPPEVTLTLTKENF 185
sp|Q4VIT4|PDIA3_CHLAE FPGVALL-----AAARLAAASDVLELTDONF 35

```

\* :

```

sp|Q14554|PDIA5_HUMAN DQFV--KEHSSVLVMFHAPWCGHCKKMKPEFEKAAEALHGEADSSGV LAAVDATVNKA- 342
sp|P38660|PDIA6_MESAU NREV--IQNSLWLV EFYAPWCGHCQRLTPEWKKAAATALK----DVKVGVADADKHQS- 88
sp|Q9V438|PDIA6_DROME DREV--LKDDAIWVVEFYAPWCGHCQSLVPEYKKLAKALK---GVVKVGSVNADADST- 88
sp|Q86IA3|PDI1_DICDI DTVV--DGSKTVFVKFYAPWCGHCKKLAPDFEILADTFAPVS-NKVIIVKVDCCQADNK 88
sp|P17967|PDI_YEAST NEYI---QSHDLVLA EFFAPWCGHCKNMAPEYVYKAAETLVE--KNITLAQIDCTENQD- 95
sp|D3Z6P0|PDIA2_MOUSE SLAL---QEHSALMVEFYAPWCGHCKELAPEYKAAALAAES-AVVTLAKV DGAPEE- 110
sp|P05307|PDIA1_BOVIN DEAL---AAHKYLLVEFYAPWCGHCKALAPEYAKAAGK LKAEG-SEIRLAKVDATEESD- 91
sp|Q17770|PDI2_CAEEL DEVI---NGNEFIVVEFYAPWCGHCKSLAPEYAKAATQLKEEG-SDIKLGLD ATVHGE- 88
sp|Q9XI01|PDI11_ARATH TDTI---NKHDFIVVEFYAPWCGHCKQLAPEYEKAAALSSNV-PPVVLAKIDASEETNR 96
sp|P38659|PDIA4_RAT DDVV---NNADIILVEFYAPWCGHCKKLAPEYEKAAKELSKRS-PPIPLAKVDATEQTD- 240
sp|Q4VIT4|PDIA3_CHLAE ESRVSDTGSAGLMLVEFFAPWCGHCKRLAPEYEAATRLK----GIVPLAKVDCTANTN- 90

```

: ..\*.\*\*\*\*\*: \*:: \* : :. :.

```

sp|Q14554|PDIA5_HUMAN -LAERFHISEFPTLK YFKNGEKY---AVPVLRTKKKFL EWMQNPEAPPPP----- 388
sp|P38660|PDIA6_MESAU -LGGQYGVQGFPTIKIFGANK-NKPEDYQGGRTGEAIVDAALSALRQLV----- 135
sp|Q9V438|PDIA6_DROME -LSGQFGVRGFPTIKIFGANK-KSPDYNGQRTAKAIAEAAALAEVKKKV----- 135
sp|Q86IA3|PDI1_DICDI ALCSKYDVSGYPTLKIFDKSTT--AKDYNGARSVDELLTYINNHAKTNV----- 135
sp|P17967|PDI_YEAST -LCMEHNIPGFPSLKIFKNSDVNNSIDYEGPRTAEAIVQFMIKQSQPAVAVVADLPAYLA 154
sp|D3Z6P0|PDIA2_MOUSE -LTKEFEVVGYPYTLKFFQNGNRTNPEEYAGPKTAEGIAEWLRRRVGPSATHLEDEEGVQA 169
sp|P05307|PDIA1_BOVIN -LAQQYGVRYGPTIKFFKNGDTASPKYTAGREADDIVNWLKKRTGPAASTLSDGAAAEA 150
sp|Q17770|PDI2_CAEEL -VSSKFEVRYGPTLKLFRNGK---PQEYNGGRDHDSIIAWLKKKTGPVAKPLADADAVKE 144
sp|Q9XI01|PDI11_ARATH EFATQYEVQGFPTIKIFRNGKA-VQEYNGPREAEGIVTYLKKQSGPASAIEKSAADASE 155
sp|P38659|PDIA4_RAT -LAKRFDVSGYPTLKIFRKGGR---FDYNGPREKYGIVDYMVEQSGPPSKEILTLLKQVQE 296
sp|Q4VIT4|PDIA3_CHLAE -TCNKYGVSGYPTLKIFRDGEE--AGAYDGPRTADGIVSHLKKQAGPASVPLRTEEEFKK 147
.. : *::* * . : :

sp|Q14554|PDIA5_HUMAN ----- 388
sp|P38660|PDIA6_MESAU --KDRL-----S----- 140
sp|Q9V438|PDIA6_DROME --QGVL-----G----- 140
sp|Q86IA3|PDI1_DICDI ----- 135
sp|P17967|PDI_YEAST NETFVT--PVIVQSGKIDAFNATFYSMANKHFNDYDFVSAENAD-----DDFKLSIY 205
sp|D3Z6P0|PDIA2_MOUSE LMAKWD-MVVIIGFFQDLQGDMAFLALAKDA-LDMTFGFTDQPQLFEKFGTLKDTVVLF 227
sp|P05307|PDIA1_BOVIN LVE SSE-VAVIGFFKDMESDSAKQFFLAAEVI-DDIPFGITSNSDVF SKYQLDKDGVVLF 208
sp|Q17770|PDI2_CAEEL LQESAD-VVVIIGYFKDTSDDAKTFLEVAAGI-DDVPFGISTEDAVKSEIELKGGIVLF 202
sp|Q9XI01|PDI11_ARATH VVSDKK-VVVVIGFPKLSGSEFDSFMAIAEKLRSSELDFAHTSDAKLLPRGESSVTGPVVR 214
sp|P38659|PDIA4_RAT FLKDGDDVILGVFGVGDYQYQDAANTLREDYKFHHTFSTEIAKFLKVLGKLVLM 356
sp|Q4VIT4|PDIA3_CHLAE FISDKD-ASVVGFFDDLSEAHSEFLKAASNLRDNYRFAHTNVKSLVNEYDDNGEGILF 206

sp|Q14554|PDIA5_HUMAN ----- 388
sp|P38660|PDIA6_MESAU -----GRSGGYSSG----- 149
sp|Q9V438|PDIA6_DROME -----GGGG-----S----- 145
sp|Q86IA3|PDI1_DICDI -----K----- 136
sp|P17967|PDI_YEAST LPSAMDE----PVVYNGKKADIADADVFEKWLQVEALPYFGEIDGSVFAQYVESGLPLG 260
sp|D3Z6P0|PDIA2_MOUSE --KKFDE----GRADFPVDKETGLDLGDL SRFLVIHSMHLVTEFNSTSPKIFA-AKILN 280
sp|P05307|PDIA1_BOVIN --KKFDE----GRNPFEGE----VTKEKLLDFIKHNQLPLVIEFTEQTAPKIFG-GEIKT 257
sp|Q17770|PDI2_CAEEL --KKFDD----GRVAFDEK----LTQDGLKTWIQANRLALVSEFTQETASVIFG-GEIKS 251
sp|Q9XI01|PDI11_ARATH LFKPFDE-----QFVDS--KDFDGEALEKFKVKESSIPLITVFDKDPNN-----HPYV 259
sp|P38659|PDIA4_RAT QPEKFQSKYEPRMHVMDVQ--GSTEASAIKDYVVKHALPLVGHKRTSNDAKRYS-KRPLV 413
sp|Q4VIT4|PDIA3_CHLAE RPSHLTNKFEKTVAYTEQ--K-MTSGKIKKFIQENIFGICPHMTE-DNKDLIQ-GKDLL 261

sp|Q14554|PDIA5_HUMAN ----- 388
sp|P38660|PDIA6_MESAU ----- 149
sp|Q9V438|PDIA6_DROME ----- 145
sp|Q86IA3|PDI1_DICDI ----- 136
sp|P17967|PDI_YEAST Y--LFYNDEEEL-EEYKPLFTELAKKNRGLMNFV-----SIDARKFGRHAG 303
sp|D3Z6P0|PDIA2_MOUSE HLLLFVNQTLAQHRELLTDFREAAPFRGQVLFV-----MVDVA-ADNSHVLN 327
sp|P05307|PDIA1_BOVIN HILLFLPKSVSDYEGKLSNFKKAESFKGKILFI-----FIDSHTDNQRILE 305
sp|Q17770|PDI2_CAEEL HNLLFVSKESSEFAKLEQEFKNAAKQFKGKVLV-----YINTDVEENARIME 299
sp|Q9XI01|PDI11_ARATH I--KFFESTNTKAMLFINFTGEGAESLSKSKYREVAT--SNKGQGLSFLLGDAENSQGFQ 315
sp|P38659|PDIA4_RAT V--VYYSVDFSFQ-----YRTATQFWRNKVLEVAKDFPE---YTFIAI DEEDYATEVK 461
sp|Q4VIT4|PDIA3_CHLAE I--AYYDV DYEKN-----A-KGSNYWRNRVMMVAKKFLDAGHKLNF AVASPKTFSHELS 312

```

```

sp|Q14554|PDIA5_HUMAN ----- 388
sp|P38660|PDIA6_MESAU ----K-----QGRGD----- 155
sp|Q9V438|PDIA6_DROME ----S-----SGGSG----- 151
sp|Q86IA3|PDI1_DICDI ---VK-----K----- 139
sp|P17967|PDI_YEAST NLNMKEQFPLFAIHDMTEOLKYGLPQLSEAFDELSDKIVLESKAIESLVKDFLKGDASP 363
sp|D3Z6P0|PDIA2_MOUSE YFGLK-----AEEAP-TLRLINVETTKKYAPTGVIAITAASVAAFQAVLHGEIKH 377
sp|P05307|PDIA1_BOVIN FFGLK-----KEECP-AVRLITLEEEMTKYKPEDELTAEKITEFCHRFLEGGKIKP 355
sp|Q17770|PDI2_CAEEL FFGLK-----KDELP-AIRLISLEEDMTKFKPDEEITENISKFTQNYLDGSVVKP 349
sp|Q9XI01|PDI11_ARATH YFGLE-----ESQ--VPLIIQTADDKYLKT---NVEVDQIESWVKDFKDKGIAP 361
sp|P38659|PDIA4_RAT DLGLS-----ESGEDVN-AAILDESGKKFAMEPE-EFDSALQEFVMAFKKGLKP 510
sp|Q4VIT4|PDIA3_CHLAE DFGLE-----STAGEIPVVAIRTAKEGKFMVQEEFSRDGKALERFLQDYFDGNLKR 363

sp|Q14554|PDIA5_HUMAN ----EPTWEE-QQTSVLHLVGDNFRETL-KKKKHTLVMFYAPWCPHCCKVIPHFTATADA 442
sp|P38660|PDIA6_MESAU -----SSSKDVIELTDDTFDKNVLDSDVVMVIFYAPWCGHCKNLEPEWATAATE 206
sp|Q9V438|PDIA6_DROME -----SSSGDDVIELTEDNFDKLVLSDDIWLVEFFAPWCGHCKNLAPAWAKAAKE 202
sp|Q86IA3|PDI1_DICDI -----APSNVVDLSPSNFDSVLDKSKNVLVIFYAPWCGHCCKLMPDYEILGNT 188
sp|P17967|PDI_YEAST IVKSQEIFEN-QDSSVFQLVGNHDEIVNDPKKDVLLVYAPWCGHCCKRLAPTYQELADT 422
sp|D3Z6P0|PDIA2_MOUSE YLLSQEIPPDDWDQGPVKTLVSKNFEQVAFDETKNVFVKFYAPWCSHCCKEMAPAWELAEK 437
sp|P05307|PDIA1_BOVIN HLMSEQELPDDWDKQPVKVLVGNKFEVAVFDEKKNVFEFYAPWCGHCCKQLAPITWDLGET 415
sp|Q17770|PDI2_CAEEL HLMSEDIPEDWDKNPVKILVGNKFEQVARDNTKNVLEFYAPWCGHCCKQLAPITWDLGET 409
sp|Q9XI01|PDI11_ARATH HKSQPIPAE-NNEPVKVVVSDSLDDIVLNSGKNVLEFYAPWCGHCCKQLAPITDEVAVS 420
sp|P38659|PDIA4_RAT VIKSQPVPKN-NKGPVRRVVVGTFDIVMDPKKDVLEFYAPWCGHCCKLEPVYTSLGKK 569
sp|Q4VIT4|PDIA3_CHLAE YLKSSEPIPES-NDGPPVKVVAENFDEIVNENKDVLEFYAPWCGHCCKNLEPKYKELGK 422
      * : .. . . :: :***** **:!: * .

sp|Q14554|PDIA5_HUMAN FKDD--RKIACAAVDCVKDKNQDLCQEQEAVKGYPTFHYYHYGKF----AEKYDSRTELG 496
sp|P38660|PDIA6_MESAU VKEQTKGKVKLAAVDATVNQ--VLANRYGIRGFPTIKIFQKGEA----PVDYDGGRTSD 260
sp|Q9V438|PDIA6_DROME L---KGKVKLGALDATAHQ--SKAAEYNVRGYPTIKFFPAGSKRASDAQEYDGGRTASD 256
sp|Q86IA3|PDI1_DICDI YANE--KDVVIAKIDCAADNKAICSKYGVTFPTLKWFGKQSK---DGEKYEQGRDLDT 243
sp|P17967|PDI_YEAST YANAT-SDVLIAKLDHTEND--VR--GVVIEGYPTIVLYPGGKKS--ESVYQGSRLDS 475
sp|D3Z6P0|PDIA2_MOUSE YKDR--EDIVIAELDATANE--LE--AFSVLGYPTLKFFPAGPDR--KVIDYKSTRDLET 489
sp|P05307|PDIA1_BOVIN YKDH--ENIVIAKMDSTANE--VE--AVKVHSFPTLKFFPASADR--TVIDYNGERTLDG 467
sp|Q17770|PDI2_CAEEL FADD--ESIVIAKMDSTLNE--VE--DVKIQSFPTIKFFPAGSN---KVVDYTGDRITIEG 460
sp|Q9XI01|PDI11_ARATH YQSD--SSVVIKLDATAND--FPKDTFDVKGFPPTIYFKSASG---NVVVYEGDRTKED 472
sp|P38659|PDIA4_RAT YKGQ--KDLVIAKMDATAND--ITNDRYKVEGFPPTIYFAPSGDKK--NPIKFEGGNRDLE 623
sp|Q4VIT4|PDIA3_CHLAE LSKD--PNIVIAKMDATAND--VP-SPYEVRFPTIYFSPANKKL--NPKYEGGRELSD 475
      .: . :* . : :***: : .

sp|Q14554|PDIA5_HUMAN FTN-YIRALREGDHERLGKK-----KEE-----L----- 519
sp|P38660|PDIA6_MESAU IVSRALDLFSDNA---P-----PPELLEIINED---V-----AKKMCEEHQLCVV 299
sp|Q9V438|PDIA6_DROME IVSWASDKHVANV---P-----APELIEIINES---T-----FETACEGKPLCVV 295
sp|Q86IA3|PDI1_DICDI FIN-YINKQAGVNR--VKGGKLA--GAGRVEQLDTIATEFIAAAAEVRKELVKKAQTVV 298
sp|P17967|PDI_YEAST LFD-FIKENGHFD---VDGKALYEEAQKAAEEADADAE-LADEEDAIHDEL----- 522
sp|D3Z6P0|PDIA2_MOUSE FSK-FLDSGGHLP---KEEP-KEPAASA----P---EA--QANSTLGPKEEL----- 527
sp|P05307|PDIA1_BOVIN FKK-FLESGGQDG---AGDD-DDLEDLEEAEEP---DLE-EDDDQKAVKDEL----- 510
sp|Q17770|PDI2_CAEEL FTK-FLETNGKEG---AGAS-EEEEKAEEDAE---GHT-EL----- 493
sp|Q9XI01|PDI11_ARATH FIS-FVDKNKDTV---G---EPKKEEETTEE---V-----KDEL----- 501
sp|P38659|PDIA4_RAT HLSKFIDEHATKR---SRTK-----EE---L----- 643
sp|Q4VIT4|PDIA3_CHLAE FIS-YLQREATNP---PVIQEEKPKKKKKAQED---L----- 505

```

sp Q14554 PDIA5_HUMAN	-----	519
sp P38660 PDIA6_MESAU	AVLPHILDTGA-ARNSYLEILLKLADKYKKKMWGLWTEAGAQSELENALGIGGFYPAM	358
sp Q9V438 PDIA6_DROME	SVLPHILDCDAKCRNKFLDTRLTLGKFKQKQWGWAWAEGGQQLALEESLEVGGFGYPAM	355
sp Q86IA3 PDI1_DICDI	DSLPEELRTEGS---YVVKVMKTIAEKS----IDFVTTEI-----	331
sp P17967 PDI_YEAST	-----	522
sp D3Z6P0 PDIA2_MOUSE	-----	527
sp P05307 PDIA1_BOVIN	-----	510
sp Q17770 PDI2_CAEEL	-----	493
sp Q9XI01 PDI11_ARATH	-----	501
sp P38659 PDIA4_RAT	-----	643
sp Q4VIT4 PDIA3_CHLAE	-----	505
sp Q14554 PDIA5_HUMAN	-----	519
sp P38660 PDIA6_MESAU	ARINARKMKFALLKGSFSEQGINEFLRELSFGRASTAPVGGGSFPAITAREPWDGRDDEL	418
sp Q9V438 PDIA6_DROME	AVVNFKKMKFSVLKGSFSKDGINEFLRDISYGRGHTAPVRGAKKPAIVSVDPWDGKDGQL	415
sp Q86IA3 PDI1_DICDI	AR-----ITKLVSGSMSGKKADEFKAKLNILESFKSK-----	363
sp P17967 PDI_YEAST	-----	522
sp D3Z6P0 PDIA2_MOUSE	-----	527
sp P05307 PDIA1_BOVIN	-----	510
sp Q17770 PDI2_CAEEL	-----	493
sp Q9XI01 PDI11_ARATH	-----	501
sp P38659 PDIA4_RAT	-----	643
sp Q4VIT4 PDIA3_CHLAE	-----	505
sp Q14554 PDIA5_HUMAN	-----	519
sp P38660 PDIA6_MESAU	PVEEDIDLSDELDDLEKDEL	439
sp Q9V438 PDIA6_DROME	PTEEDIDLSIDLDKDEL---	433
sp Q86IA3 PDI1_DICDI	-----	363
sp P17967 PDI_YEAST	-----	522
sp D3Z6P0 PDIA2_MOUSE	-----	527
sp P05307 PDIA1_BOVIN	-----	510
sp Q17770 PDI2_CAEEL	-----	493
sp Q9XI01 PDI11_ARATH	-----	501
sp P38659 PDIA4_RAT	-----	643
sp Q4VIT4 PDIA3_CHLAE	-----	505

### APÉNDICE III. Alineamiento de estructuras secundarias de las 11 PDI seleccionadas realizado con Dali. $\alpha$ -hélices (H), hebras $\beta$ (E) y asas (L).



```

      :           :           :           400           :           :           :           |           :           :           :
VGKNDHEIVNDPKKDVLLVYAPWCGHCKRLAPTYQELADTYANATSDVLIAKLDHTENDVRGVVIEGYPTIVLYPGGKSESVVYQGSRLSDSLDFDIKENGHFDVDGKALYEEAQEKAAEE
VAENFDEIVNNEKNDVLIIFYAPWCGHCKNLEPKYKELGKLS-KDPNIVIAKMDATANDVPSYVEVGFPTIYFSPANK-LNPKKYEGRELSDFISYLRQREATNPPV---IQEE--KPKK-
-SDSLDDIVLNSG---LLEFYAP-WCGHCQKLAPILDEVAVSY---VVIAKLDATA--DFPKDT-----DFIS-----
VSKNFEQVAFDETKNVFVKFYAPWCSHCKEMAPAWAELAEKYK-DREDIVIAELDATANELEAFSVLGYPTLKFPPAGPDRKVIDYKSTRDLETFSKFLDSGG-----
VGKNFEQVARDNTKINVLEFYAPWCGHCKQLAPTWDKLGKFA-DDESIVIAKMDSTLNEVEDVKIQSFPTIKFFPA-GSNKVVDTGDRTIEGFTKFLDTNG-----
VGKNFEVAFDEKK---EFYAPWCG-----FFPAS-----FKKF--QDGA-----
-----
VGKTFDAIVMDPKKDVLIIFYAPWCGHCKQLEPVYTSLGKKYK-GQKDLVIAKMDATANDITNYKVEGFPITIFAPSGDKKNPDKFEGNRDLEHLSKFIIDEHATKRS-----KEEL--
-----GKDg-----LPTe-----DLSD
-----ELDD-----KDEL-----
-----
      :           :           :           400           :           :           :           |           :           :           :
LLLLHHHHHLLLLLEEEEEELLLLLHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHH
LLLLHHHHHLLLLLEEEEEELLLLLHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHH
-HHHHHHLLLL--EEEEEL-LHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHH
LHHHHHHHHLLLLLEEEEEELLLLLHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHH
LHHHHHHHHLLLLLEEEEEELLLLLHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHH
LHHHHHHHHLLLL--EEELLLLH-----EELLL-----HHHH--LLLL-----
-----
LHHHHHHHLLLLLEEEEEELLLLLHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHH
-----LLLL-----LHHH
-----LLLL-----LHHH
-----

```

APÉNDICE IV. Alineamiento de estructuras secundarias de proteínas Dsb realizado con Dali. α-hélices (H), hebras β (E) y asas (L).

```

      :           :           :           :           |           :           :           :           :           100
s001A  LHHHHHHHHHHLLLLLEEEEEELLLLLLEEEEEELLEEEEEELLLLLEEEELLEEELLLLLLEHHHHHHHHHHHLLHHHLEEEELLLLLLEEEEEELLLLLHHHHHHHHHLL
t002B  LLHHHHHHHHHHLLLLLEEEEEELLLLLLEEEEEELLEEEEEELLLLLEEEELLEEELLLLLLEHHHHHHHHHHHLLHHHLEEEELLLLLLEEEEEELLLLLHHHHHHHHHLL
t002A  HHHHHHHHHHHLLLLLEEEEEELLLLLLEEEEEELLEEEEEELLLLLEEEELLEEELLLLLLEHHHHHHHHHHHLLHHHLEEEELLLLLLEEEEEELLLLLHHHHHHHHHLL
t001A  -LLLLHHHHHLLLLLLLLLLLLLLLLLEEELEEELEEELEELLLLLEELLLLLLLLLLLLLLLLLHHHHHHHHHHHLLHHHLEEEELLLLLLEEEEEELLLLLHHHHHHHHHLL
t003A  -----EELL-----HHHHLLHH-HHHHHHHHHLL--LLEEEELLLLLLEEEEEELLLLLHHHHHHHHH
t003B  -----EEE-----HHHHLLHHHHHHHHHHLL--LLEEEELLLLLLEEEEEELLLLLHHHHHHHHH
t004A  -----LLEHHHHHHHHHHHHHHLL--LLEEEELLLLLLEEEEEELLLLLHHHHHHHHH
t005A  -----LLEEEELLLLLLEEEEEELLLLLHHHHHHHHH
t005B  -----LLLHHH-----LLEEEELLLLLLEEEEEELLLLLHHHHHHHHH
-----
      :           :           :           :           |           :           :           :           :           200           :
HHHHHHHLEEEEEELLLLLLLLLHHHHHHHHHHHLLLLHHHHHHHHHHLLLLLLLLLLLLLHHHHHHHHHHLLLLLEEEELLLLLEEEELLLLLHHHHHHHHHHHHHHHHHLL
HHHHHHHLEEEEEELLLLLLLLLHHHHHHHHHHHLLLLHHHHHHHHHHLLLLLLLLLLLLLHHHHHHHHHHLLLLLEEEELLLLLEEEELLLLLHHHHHHHHHHHHHHHHHLL--
HHHHHHHLEEEEEELLLLLLLLLHHHHHHHHHHHLLLLHHHHHHHHHHLLLLLLLLLLLLLHHHHHHHHHHLLLLLEEEELLLLLEEEELLLLLHHHHHHHHHHHHHHHHHLL--
HHHHHHHLEEEEEELLLLLLLLLHHHHHHHHHHHLLLLHHHHHHHHHHLLLLLLLLLLLLLHHHHHHHHHHLLLLLEEEELLLLLEEEELLLLLHHHHHHHHHHHHHHHHHLL--
HHHHHHHLEEEEEELLLL--LHHHHHHHHHHHLLHHHHHHHHHHLLLLLLLLLHHHHHHHHHHHHHHHHHLLLEEEELLEEELLLL-HHHHHHLLL-----
HHHHHHHLEEEEEELLLL--LHHHHHHHHHHHLLHHHHHHHHHHLLLLLLLLLHHHHHHHHHHHHHHHHHLLLEEEELLEEELLLL-HHHHHHLLL-----
HHHHHHHLEEEEEELLLL--LHHHHHHHHHHH-HHHHHHHHHHLLHHHHHHHLLHHHHHHHHHHHHHHHHHLLLEEEELLEEELLLL-HHHHHHHHHHHHHHHHLL--
HHHHHHHLEEEEEELLLL-LHHHHHHHHHHH-HHHHHHHHHHLLHHHHHHHLLHHHHHHHHHHHHHHHHHLLLEEEELLEEELLLL-HHHHHHHHHHHHHHHHLL--
HHHHHHHLEEEEEELLLL-LHHHHHHHHHHH-HHHHHHHHHHLL-HHHH-LLLLLHHHHHHHHHHHLL--LLEEEELLEEELLLL-HHHHHHHHHHHHHHHHLL--

```

APÉNDICE V. Conservación de aminoácidos en ortólogos de las 11 PDI seleccionadas. Entre más grande el tamaño de la letra hay una mayor conservación con proteínas ortólogas.

