



Research / Araştırma

Soyada Protein Disülfid İzomeraz'ların İn Silico Analizi

Fatih DEMİREL^{1*}

ÖZET

Protein disülfid izomerazlar protein katlanma sürecinde disülfid bağlarının doğru bir şekilde oluşmasında görev alan thioredoxin domaini içeren moleküler şaperonlardır. Hayvanlarda PDI proteinlerinin katalitik ve şaperon rollerinin araştırıldığı birçok çalışma mevcuttur. Bitkilerde ise PDI proteinlerinin varyasyonu ve fonksiyonu ile ilgili çalışmalar sınırlıdır. Bu çalışmada *Arabidopsis* PDI geni referans alınarak soya genomunda 12 PDI geninin varlığı gösterilmiş ve bu genlere ait proteinlerin özellikleri in silico yaklaşımlar ile ortaya konmuştur. WCXXC aktif dizi motifinin GmPDI6c ve GmPDI6d proteinlerinde korunmadığı ve diğer proteinlerde bu dizinin mevcut olduğu tespit edilmiştir. Protein modellemesi sonucunda soya PDI proteinlerinden GMQE skoru en yüksek olanı ele alınarak *Tobacco ringspot virus*'e ait kılıf proteini arasındaki etkileşim docking ile ortaya konmuştur. Çalışma sonucunda elde edilen in silico analiz sonuçlarının deneysel yaklaşımlar ile doğrulanması gerekmektedir.

Anahtar Kelimeler: Soya, Protein disülfid izomeraz (PDI), İn silico, Protein-protein docking

In Silico Analysis of Protein Disulfide Isomerases in Soybean

ABSTRACT

Protein disulfide isomerases are molecular chaperones containing the thioredoxin domain that are involved in the correct formation of disulfide bonds during the protein folding process. There are many studies investigating the catalytic and chaperone roles of PDI proteins in animals. Studies on the diversity and function of PDI proteins in plants are limited. In this study, the presence of 12 PDI genes in the soybean genome was shown with reference to the *Arabidopsis* PDI gene. The properties of the proteins belonging to these genes were revealed by in silico approaches. It was found that the active site-WCXXC motif was not conserved in the GmPDI6c and GmPDI6d proteins, but this sequence was present in other proteins. As a result of protein modeling, the protein with the highest GMQE score among soy PDI proteins was taken into consideration and its interaction with the coat protein of *Tobacco ringspot virus* was revealed through docking. The in silico analysis results obtained from the study need to be verified by experimental approaches.

Keywords: Soybean, Protein disulfide isomerase (PDI), In silico, protein-protein docking

¹ Fatih DEMİREL (Orcid ID: 0000-0002-6846-8422), Iğdır Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Tarımsal Biyoteknoloji Bölümü, Iğdır, Türkiye

*Sorumlu Yazar/Corresponding Author: Fatih DEMİREL, e-mail: drfdemirel@gmail.com

GİRİŞ

Protein disülfit izomerazlar'lar (PDI) grubu endoplazmik retikulumun lümenindeki yeni sentezlenmiş proteinlerde disülfit bağlarının oluşumundan, redüksiyonundan ve izomerizasyonundan sorumlu olan oxidoreductase sınıfındaki enzimlerdendir (Fränd and Kaiser 1998; Tu et al. 2000; Wedemeyer et al., 2000). Hedef proteinde PDI aracılığıyla disülfit bağ oluşumu, proteinin doğru katlanması, stabilitesi, katalitik aktivitesi ve diğer proteinler ile interaksyonu için gereklidir (Freedman et al., 1994; Aslund and Beckwith, 1999). PDI'lar kendilerinin integral redox-aktif thioredoxin domain ile disülfit bağlarını değiştirirler (Kanai et al., 1998; Motohashi et al., 2001). PDI ile ilişkili birçok gen tüm genom sekanslaması aracılığıyla birçok ökaryotik genomda tanımlanmıştır. Bu genlere karşılık gelen birçok proteinin biyokimyasal fonksiyondan yoksun olduğu gösterilmiş ve bunlar PDI-benzeri (PDI-Like) proteinler olarak adlandırılmıştır. PDIL proteinleri thioredoxin (TRX) süper ailesi içerisinde çoklu gen ailesinin bir üyesidir (Jacquot et al., 2002). Bu atasal ailedeki bütün proteinler CXXC dörtlü peptid sekansında Cys kalıntıları aracılığıyla fonksiyona sahip olan en az bir yapısal domaine sahiptir (Ellgaard, 2004; Wilkinson and Gilbert, 2004). TRX adlı bu domainler korunmuş üç boyutlu konfarmasyonda dizili olan amino asitlere sahiptir (Kemink et al., 1997). Proteindeki CGHC motifi proteinin bütün potansiyel indirgeme reaksiyonlarını modüle eder ve böylece disülfit bağlarını aktif olarak okside etmek ya da indirgemek için aktif sistein dizilerinin katalitik yeteneğini düzenler (Chivers et al., 1997). Bütün PDI aile üyeleri disülfit bağlarını yeniden düzenlenme potansiyeline sahip olmasına rağmen, sadece birkaç üyede bu aktivitenin gerçekleştirildiği ve geriye kalanların fonksiyondan ziyade evrim aracılığıyla bu ailenin üyesi durumunda kaldığı görülmüştür (Galligan and Petersen, 2012). Thioredoxin ailesinde PDI'dan sonraki en yaygın çalışılan aile üyelerinin Erp57, Erp72, Erp29, Erp44 ve PDIA2 olduğu belirtilmiştir (Appenzeller-Herzog and Ellgaard, 2008).

Hayvanlarda ve mayalarda PDI'lar farklı hücre fonksiyonlarına sahiptir. PDI'lar hücrenin canlılığı, iyon alımı, gen transkripsiyonunun aktivasyonu, hücre farklılaşması gibi birçok hücre fonksiyonu için gereklidir (Ferrari and Soling, 1999; Honscha et al., 1993; Markus and Benezra, 1999; Ohtani et al., 1993; Fornes and Bustos-Obregon, 1994). PDI'lar çekirdekte, sitoplazmada, endoplazmik retikulumda, mitokondri ve hücre dışı ortamlarda bulunurlar (Cheng et al., 1987; Couet et al., 1996; Wilson et al., 1998; Lahav et al., 2000; Rigobello et al., 2001; Turano et al., 2002). PDI'ların proteinlerin agregasyonunu önleyerek şaperon görevi üstlendikleri de rapor edilmiştir (Irvine et al., 2014)

İnsan PDI proteini dört modül domaininden (a,b,b',a') ve karboksil uçta endoplazmik retikulum retansiyon sinyalinin (KDEL) oluşmaktadır (Alanen et al., 2003). Domain a ve a' di-sistein motifi (CXXC) ile thioredoxin domainiyle homoloji paylaşan katalitik domainlerdir. b ve b' domain ise U-şeklinde tüm molekülün tersiyer yapısını muhafaza etmede rol oynamaktadır (Kemink et al., 1997; Byrne et al., 2009).

Hayvanlarda mevcut olan PDI'ların çoğu ER (Endoplazmik retikulum)'de stres durumunda katlanmamış protein cevabında yer alır. Bu süreç çoğunlukla diyabet ve nörodejenaratif hastalıklar gibi birçok hastalığın gelişimi ve ilerlemesi ile yakın ilişkilidir (Kemink et al., 1997; Byrne et al., 2009). Hayvanlarda çok çalışılan PDI proteinlerinin varlığı pirinç (12), buğday (9), şalgam (*Brassica napobrassica*) (32) ve mısır (22) gibi farklı bitkilerin genom sekanslarında da tanımlanmış olmasına rağmen, bu proteinin bitkilerdeki çalışmaları sınırlıdır (Houston et al., 2005; D'Aloisio et al., 2010; Onda and Kobori, 2016; Kayum et al., 2017). Bitkilerde bulunan PDI proteinlerinin hayvanlardaki gibi protein katlanması ya da yeniden katlanma süreçlerinde rol oynadığı rapor

edilmiştir (Takemoto et al., 2002; Lu and Christopher, 2008; Kimura et al., 2015; Onda and Kobori, 2016; Peng et al., 2017). Ayrıca bu proteinlerin bitkilerde embriyo kesesinin olgunlaşması, tohum gelişiminde endotelial hücrelerin programlı hücre ölümü ve biyotik strese cevap oluşturmada rol aldıkları da bildirilmiştir (Wang et al., 2008; Gruber et al., 2007; Ondzighi and Staehelin, 2008). Bitkiler büyüme ve gelişme dönemlerinde birçok stres faktörüne maruz kalmaktadır. Bitki PDI'larının abiyotik stres altında up-regüle olduğu bilinmektedir. *Brachypodium distachyon* L. ve *Brassica rapa* ssp. *pekinensis*'e ait PDI genlerinin abiyotik stres altında up regüle olduğu ve çoklu stres cevabında rol oynadığı görülmüştür (Zhu et al., 2014; Kayum et al., 2017).

Tahıllarda PDI proteinleri üzerine yapılan araştırmalarda çoğunlukla tohum depo proteinlerinin sınıflandırılmasındaki roller üzerine odaklanılmıştır. Buğdayda ve pirinçte tohum depo proteinin yeniden pozisyonlandırılması süreci, başlangıç polipeptitlerin ER lümenine transferi, peptitlerin katlanması ve endosperm hücrelerine depozosiyonunu kapsamaktadır (Shewry and Halford, 2002; Herman and Schmidt, 2004; Vitale and Ceriotti, 2004; Tosi et al., 2009). Bu olaylar birkaç günlük periyod içerisinde gerçekleşmektedir. Hücre içi ER stresini temsil eden tohum protein süreçleri ve dış çevresel faktörler depo proteinlerinin miktarı ve kalitesini büyük ölçüde etkilemektedir (Dupont et al., 2006).

Son zamanlarda bilgisayar tabanlı teknoloji ile biyoinformatik yaklaşımlar geliştikçe, bitki, bakteri, fungus ve hayvan gibi farklı organizmalara ait sekans verilerinin kullanımına olanak sağlayan in silico analizlere izin veren yaklaşımlar yaygınlaşmıştır. İn silico analiz, günümüzde genlerin fonksiyonlarının anlaşılması, yeni genlerin ortaya çıkarılması ve ilaç geliştirme gibi amaçlar doğrultusunda sıkça kullanılan bir yaklaşımdır. Bu çalışmada hayvanlara kıyasla bitkilerde daha az çalışılmış olan PDI proteinlerinin soya genomunda varlığı araştırılmış ve bu genlere ait proteinlerin farklı özellikleri in silico analizler ile ortaya konmaya çalışılmıştır. Ayrıca, çalışmada PDI proteinleri ile soyada hastalığa neden olan *Turnip mosaic virus*'e ait kılıf proteini arasındaki interaksiyon da araştırılmıştır.

MATERYAL ve METOT

Arabidopsis PDI genomik sekansı (At3g54960) BLASTn araştırması için referans alındıktan sonra soya (*Glycine max Wm82.a2.v1*) genomunda PDI genlerinin varlığı Phytozome v13 database kullanılarak taranmıştır. Soya PDI genlerinin yapısı Houston ve ark. (2005)'nin rapor ettiği EST, TA ve cDNA'lar göz önüne alınarak oluşturulan gen modeli ile karşılaştırılarak Gene Structure Display Server (GSDS) (<http://gsds.cbi.pku.edu.cn/>) programı kullanılarak oluşturulmuştur (Şekil 1). Soya PDI'lara ait amino asit sekansları Phytozome database'den elde edilmiştir. Soya PDI amino sekans hizalama (align) PARALINE Multiple Sequence Align kullanılarak gerçekleştirilmiştir (Şekil 2). Peptitlere ait fizikokimyasal özellikler ProtParam aracı (<https://web.expasy.org/protparam/>) kullanılarak elde edilmiştir (Çizelge 1). Proteinde disülfid bağları ve lokasyonları SCRATCH Protein Predictor programı (<http://scratch.proteomics.ics.uci.edu/>) kullanılarak araştırılmıştır (Çizelge 1). Peptit sekanslarına ait protein 3-D (3 boyut) yapısı swiss-model database (<https://swissmodel.expasy.org/interactive>) kullanılarak belirlenmiştir ve bu modeller protein docking için kullanılmıştır. Protein-Protein interaksiyonunun belirlenmesi için HDOCK SERVER kullanılmıştır (<http://hdock.phys.hust.edu.cn/>).

Çizelge 1. Soya PDI proteinlerinin fizikokimyasal özellikleri

Örnek	Gen ismi	Accession No	Kromozom	Başlangıç bölgesi	Bitiş bölgesi	pI (protein izoelektrik noktası)	MW (kDa) (moleküler ağırlık)	Amino asit sayısı	Disülfid bağ sayısı	Pozisyonlar
1	GmPDI14a	Glyma.14G152000	14	32942545	329479906	5.28	55834.16	496	2	61-64, 406-409
2	GmPDI14b	Glyma.14G050600	14	3961456	3965431	5.41	47650.66	483	3	290-296, 64-67, 192-195
3	GmPDI4	Glyma.04G247900	4	51508103	51512541	5.06	58714.88	525	2	418-421, 73-76
4	GmPDI6a	Glyma.06G114700	6	9307220	9315112	5.74	44398.02	394	2	37-40, 303,306
5	GmPDI6b	Glyma.06G114800	6	9319023	9322977	4.88	56115.09	503	2	61-64, 406-409
6	GmPDI6c	Glyma.06G218800	6	23847777	23849959	7.71	14296.90	126	2	67-75, 102-113
7	GmPDI6d	Glyma.06G245200	6	41415611	41418860	9.40	18372.44	196	2	27-57, 94-97
8	GmPDI13a	Glyma.13G077300	13	18273603	18279038	5.32	55699.98	495	2	60-63, 405-408
9	GmPDI13b	Glyma.13G326200	13	42127387	42131740	4.72	62382.13	558	2	106-109, 445-448
10	GmPDI2a	Glyma.02G266900	2	45143254	45147258	5.37	47827.82	438	3	64-67, 192-195, 290-296
11	GmPDI2b	Glyma.02G014000	2	1271043	1276316	5.37	40843.43	368	3	57-60, 87-94, 180-183
12	GmPDI10	Glyma.10G014700	10	1313154	1318059	5.73	40355.80	364	3	57-60, 87-94, 176-179

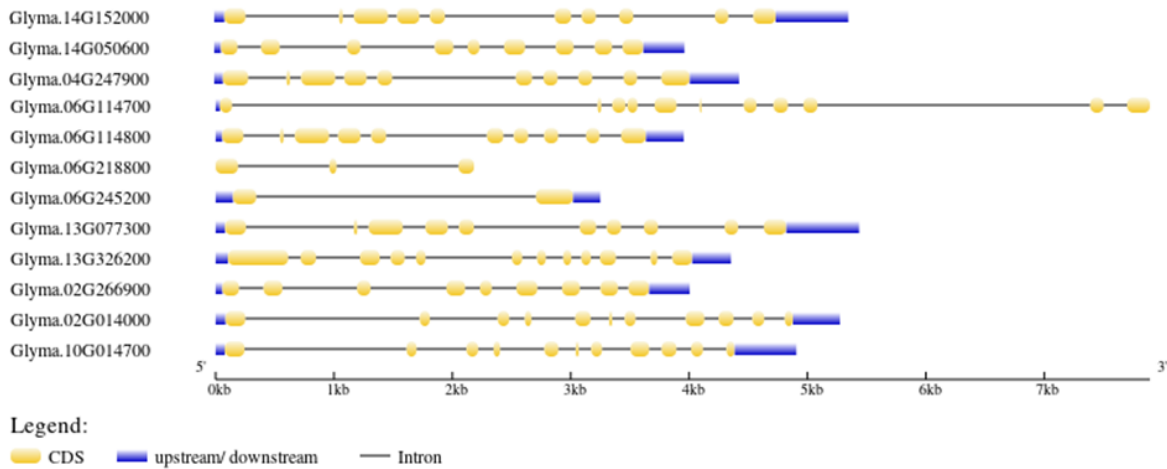
BULGULAR ve TARTIŞMA

Bitkilerde PDIL ailesine ait proteinler hakkında bilgi edinmek için veri tabanlarında gerçekleştirilen araştırmalarda sorgu kelimesi olarak *Arabidopsis* PDI kullanılmaktadır. Soya genomunda Blastn ile 12 GmPDI geninin varlığı belirlenmiştir (Şekil 1). Bu genlerdeki intron ve exon bölgeleri ve gen uzunlukları Şekil 2’de verilmiştir. Genler arasındaki intron sayısı 1 ile 10 arasında değişirken, ekzon sayısı ise 3 ile 11 arasında değişmektedir. PDIL proteinlerinde TRX (thioredoxin), ferredoxin, glutaredoxin, ferredoxin, peroxidoxin gibi domainler yer almaktadır (Jacquat et al., 2002). Multiple Sequence Aligment (Çoklu sekans hizalama) sonucunda CXXC terapeptit katalitik sekansın GmPDI proteinlerinde korunmuş olduğu ortaya konmuştur. Houston et al. (2005), *Arabidopsis* bitkisine ait AtPDI proteinlerindeki aktif dizi motiflerinin WCGAC, WCARS, WCVNC, WCINC şeklinde varyantlara sahip olduğunu göstermiştir. Holmgren (1985), WCXXC dizilerinin disülfid oksidasyon/reduksiyon ve izomerizasyondan sorumlu olduğunu rapor ederken, diğer araştırmacılar WCXXA motifinin sadece disülfid izomerizasyonundan sorumlu olduğunu belirtmiştir (Woycechowsky et al., 2000; Serratoet al., 2008). Iwasaki et al., (2009) CPRS/CXXC dizilerinin ER lümen’ine lokalizasyonda sorumlu olduğunu göstermiştir. Biyokimyasal ve hücre fraksiyon çalışmaları PDI aktivitesinin genellikle ER ile ilişkili olduğunu ve salgılama yollarının çoğuna katıldığını göstermiştir (Houston et al., 2005). Çoğu PDI proteini ER hedefleme için sinyal peptidi olarak tahmin edilen NH₂-uca ait sekansa sahiptir. Diğer taraftan birçok protein de COOH-terminal KDEL motifine sahiptir (Pelham, 1990). Bu çalışmada, amino asit aligment sonucunda proteinin N’ terminal ucunda bulunan korunmuş KDEL sekanslarının soya PDI proteinlerinde de korunmuş genellikle korunmuş olduğu belirlenmiştir (Şekil 3). Proteine ait disülfid bağlarının sayısı 2 ve 3’tür. Soya PDI proteinlerindeki en küçük amino asit sayısı GmPDI6 proteinine ait iken en büyük Amino asit sayısı 558’dir. GmPDI proteinlerindeki izoelektrik noktasının 4.72 ile 9.40 arasında değiştiği görülmüştür (Çizelge 1).

Defline	Score	E	Query View	3246
▶ Chr14	320.5	1.1E-84		850-1018 2490-2501 241-333 2087-2839 1928-2084 2513-2548
▶ Chr04	320.5	1.1E-84		859-1030 1931-2087 241-334 2084-2846 2500-2824 257-334
▶ Chr06	302.4	2.8E-79		859-1030 859-1030 1000-1150 241-334 1931-2087 2084-2911 2504-2594 257-334 2502-2578 1272-1428
▶ Chr13	208.7	4.6E-51		850-1110 2490-2501 241-333 1928-2084 2087-2850 272-332
▶ Chr18	174.4	9.9E-41		847-1155 1300-1428
▶ Chr20	165.4	5.1E-38		883-1428
▶ Chr17	163.6	1.8E-37		907-1428
▶ Chr03	80.6	1.7E-12		1080-1150
▶ Chr02	53.6	2.3E-4		2513-2548 2531-2559
▶ Chr12	50.0	2.8E-3		2502-2548 2504-2545
▶ Chr10	48.2	9.9E-3		2531-2559
▶ Chr07	46.4	3.5E-2		1709-1759

Şekil 1. Soyada Phytozome PDI blast sonucu

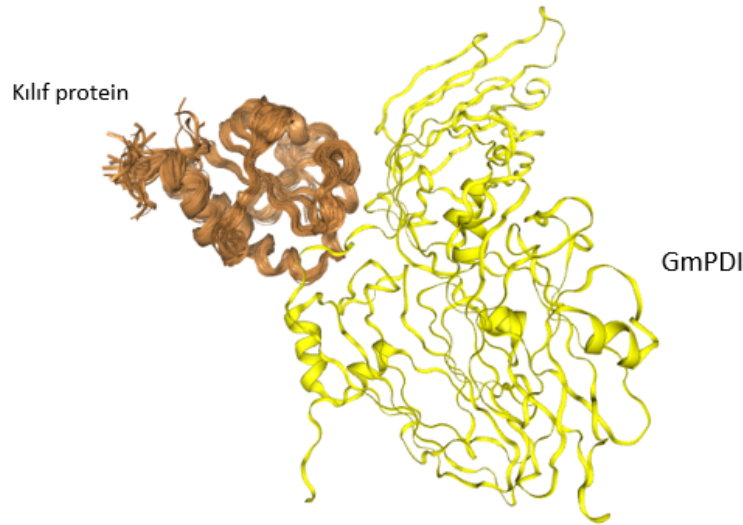
Bitki virüsleri tarafından kaynaklanan enfeksiyöz hastalıklar tarımsal üretimi ve küresel olarak tarımsal ürün miktarını negatif olarak etkilemektedir. Soya insan ve hayvan beslenmesinde önemli bir besin kaynağıdır. *Tobacco ringspot virus* soya bitkisini enfekte eden virüsler arasındadır. Bitkisel ve hayvansal kaynaklı hastalıklarda bitki ve patojen arasındaki protein interaksyonları hastalığın oluşum mekanizmasının anlaşılması adına önem taşımaktadır. PDI proteinlerinin hayvanlarda hastalıklarla ilişkili olduğu birçok çalışma da ele alınmıştır. Bitki hastalıklarında ile bu proteinin ilişkisi adına yapılan çalışmalar oldukça sınırlıdır. Yang ve ark. (2014), PDI proteinlerinin bitki virüslerine duyarlılıkta rol oynadığını bildirmiştir. Bu çalışmada *Tobacco ringspot virus* kılıf proteini ile soya PDI proteininin geni arasındaki interaksiyon araştırılmıştır. Kılıf proteini ve PDI proteini arasında bir ligan-reseptör bağlanmasının mümkün olduğu, protein docking sonucuna göre belirlenmiştir (Şekil 4).



Şekil 2. Soya PDI genlerinin yapısı



Şekil 3. Soya PDI proteinlerinin hizalaması



Complex Template Information

Molecule	Chain ID	Align_length	Coverage	Seq_ID (%)
Receptor	A	120	1.000	100.0
Ligand	A	513	1.000	100.0

Şekil 4. Protein-Protein docking sonucu

SONUÇ

Bu çalışma önemli bir baklagil bitkisi olan soya bitkisindeki PDI proteinlerinin yapısal olarak farklılığı ve fonksiyonel özellikleri üzerine önemli bilgiler sunmaktadır. İn silico analizler PDI ile *Tobacco ringspot virus* kılıf proteini arasında bağlanma deseni görselleştirilmiştir. Protein-protein interaksyonu ile ilgili amino asit kalıntılarının belirlenmesi için kapsamlı çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır. İn silico çalışmalardan elde edilen bilgiler yeni genlerin karakterizasyonu ve fonksiyonel özelliğinin belirlenmesi için önemli veriler sunmaktadır. Dolayısıyla bu çalışmanın sonuçları ileride PDI proteinleri ile ilgili gerçekleştirilecek çalışmalara katkı sağlayacaktır.

KAYNAKLAR

- Alanen, H. I., Salo, K. E., Pekkala, M., Siekkinen, H. M., Pirmeskoski, A., and Ruddock, L. W. (2003). Defining the domain boundaries of the human protein disulfide isomerases. *Antioxid. Redox Signal.* 5, 367–374.
- Appenzeller-Herzog, C., and Ellgaard, L. (2008). The human PDI family: versatility packed into a single fold. *Biochim. Biophys. Acta* 1783, 535–548.
- Aslund F, J Beckwith 1999 Bridge over troubled waters: sensing stress by disulfide bond formation. *Cell* 96:751–753.
- Byrne, L. J., Sidhu, A., Wallis, A. K., Ruddock, L. W., Freedman, R. B., Howard, M. J., et al. (2009). Mapping of the ligand-binding site on the b0 domain of human PDI: interaction with peptide ligands and the x-linker region. *Biochem. J.* 423, 209–217.
- Cheng SY, QH Gong, C Parkison, EA Robinson, E Appella, GT Merlino, I Pastan 1987 The nucleotide sequence of a human cellular thyroid hormone binding protein present in endoplasmic reticulum. *J Biol Chem* 262:11221–11227.
- Chivers P. T., Prehoda K. E., Raines R. T. (1997). The CXXC motif: a rheostat in the active site. *Biochemistry* 36, 4061–4066.
- Couet J, S de Bernard, H Loosfelt, B Saunier, E Milgrom, M Misrahi 1996 Cell surface protein disulfide-isomerase is involved in the shedding of human thyrotropin receptor ectodomain. *Biochemistry* 35:14800–14805.
- D'Aloisio E., Paolacci A. R., Dhanapal A. P., Tanzarella O. A., Porceddu E., Ciaffi M. (2010). The protein disulfide isomerase gene family in bread wheat (*T. aestivum* L.). *BMC Plant Biol.* 10:101.
- DuPont F., Hurkman W., Vensel W., Chan R., Lopez R., Tanaka C. & Altenbach S. 2006. Differential accumulation of sulfur-rich and sulfur-poor wheat flour proteins is affected by temperature and mineral nutrition during grain development. *J. Cereal Sci.* 44: 101–112.
- Ellgaard L. & Ruddock L. 2005. The human protein disulphide isomerase family: substrate interactions and functional properties. *EMBO Rep.* 6: 28–32.
- Ferrari, D.M., Soling, H.D., 1999. The protein disulphide-isomerase family: unravelling a string of folds. *Biochem. J.* 339 (Pt 1), 1–10.
- Fornes MW, E Bustos-Obregon 1994 Study of nuclear decondensation of the rat spermatozoa by reducing agents during epididymal transit. *Andrologia* 26:87–92.
- Frand AR, CA Kaiser 1998 The ERO1 gene of yeast is required for oxidation of protein dithiols in the endoplasmic reticulum. *Mol Cell* 1:161–170.
- Freedman RB, TR Hirst, MF Tuite 1994 Protein disulphide isomerase: building bridges in protein folding. *Trends Biochem Sci* 19: 331–336.
- Galligan J. J., Petersen D. R. (2012). The human protein disulfide isomerase gene family. *Hum. Genomics* 6, 1–15.
- Gruber C. W., Cemazar M., Clark R. J., Horibe T., Renda R. F., Anderson M. A., et al. (2007). A novel plant protein-disulfide isomerase involved in the oxidative folding of cystine knot defense proteins. *J. Biol. Chem.* 282 20435–20446.

- Herman E. & Schmidt M. 2004. Endoplasmic reticulum to vacuole trafficking of endoplasmic reticulum bodies provides an alternate pathway for protein transfer to the vacuole. *Plant Physiol.* 136: 3440–3446.
- Holmgren A. 1985. Thioredoxin. *Annu. Rev. Biochem.* 54: 237–271.
- Honscha W, M Ottallah, A Kistner, H Platte, E Petzinger 1993 A membrane-bound form of protein disulfide isomerase (PDI) and the hepatic uptake of organic anions. *Biochim Biophys Acta* 1153: 175–183.
- Houston N. L., Fan C., Xiang J. Q., Schulze J. M., Jung R., Boston R. S. (2005). Phylogenetic analyses identify 10 classes of the protein disulfide isomerase family in plants, including single-domain protein disulfide isomerase-related proteins. *Plant Physiol.* 137 762–778.
- Houston N., Fan C., Xiang Q. & Schulze J. 2005. Phylogenetic analyses identify 10 classes of the protein disulfide isomerase family in plants, including single-domain protein disulfide isomerase-related proteins. *Plant Physiol.* 137: 762–778.
- Houston, N. L., Fan, C., Schulze, J. M., Jung, R., & Boston, R. S. (2005). Phylogenetic analyses identify 10 classes of the protein disulfide isomerase family in plants, including single-domain protein disulfide isomerase-related proteins. *Plant Physiology*, 137(2), 762-778.
- Irvine, A. G., Wallis, A. K., Sanghera, N., Rowe, M. L., Ruddock, L.W., Howard, M. J., et al. (2014). Protein disulfide-isomerase interacts with a substrate protein at all stages along its folding pathway. *PLoS ONE* 9:e82511.
- Jacquot J., Gelhaye E., Rouhier N., Corbier C., Didierjean C. & Aubry A. 2002. Thioredoxins and related proteins in photosynthetic organisms: molecular basis for thiol dependent regulation. *Biochem. Pharmacol.* 64: 1065–1069.
- Jacquot J., Gelhaye E., Rouhier N., Corbier C., Didierjean C. & Aubry A. 2002. Thioredoxins and related proteins in photosynthetic organisms: molecular basis for thiol dependent regulation. *Biochem. Pharmacol.* 64: 1065–1069.
- Kanai S, H Toh, T Hayano, M Kikuchi 1998 Molecular evolution of the domain structures of protein disulfide isomerases. *J Mol Evol* 47:200–210.
- Kayum M. A., Park J. I., Nath U. K., Saha G., Biswas M. K., Kim H. T., et al. (2017). Genome-wide characterization and expression profiling of PDI family gene reveals function as abiotic and biotic stress tolerance in Chinese cabbage (*Brassica rapa* ssp. *pekinensis*). *BMC Genomics* 18:885.
- Kayum M. A., Park J. I., Nath U. K., Saha G., Biswas M. K., Kim H. T., et al. (2017). Genome-wide characterization and expression profiling of PDI family gene reveals function as abiotic and biotic stress tolerance in Chinese cabbage (*Brassica rapa* ssp. *pekinensis*). *BMC Genomics* 18:885.
- Kemmink J., Darby N., Dijkstra K., Nilges M. & Creighton T. 1997. The folding catalyst protein disulfide isomerase is constructed of active and inactive thioredoxin modules. *Curr. Biol.* 7: 239–245.
- Kemmink, J., Darby, N. J., Dijkstra, K., Nilges, M., and Creighton, T. E. (1997). The folding catalyst protein disulfide isomerase is constructed of active and inactive thioredoxin modules. *Curr. Biol.* 7, 239–245.
- Kimura S., Higashino Y., Kitao Y., Masuda T., Urade R. (2015). Expression and characterization of protein disulfide isomerase family proteins in bread wheat. *BMC Plant Biol.* 15:73.
- Lahav J, N Gofer-Dadosh, J Luboshitz, O Hess, M Shaklai 2000 Protein disulfide isomerase mediates integrin-dependent adhesion. *FEBS Lett* 475:89–92.
- Lu D. P., Christopher D. A. (2008). Endoplasmic reticulum stress activates the expression of a sub-group of protein disulfide isomerase genes and AtbZIP60 modulates the response in *Arabidopsis thaliana*. *Mol. Genet. Genomics* 280 199–210.
- Markus M, R Benezra 1999 Two isoforms of protein disulfide isomerase alter the dimerization status of E2A proteins by a redox mechanism. *J Biol Chem* 274:1040–1049.
- Motohashi K, A Kondoh, MT Stumpp, T Hisabori 2001 Comprehensive survey of proteins targeted by chloroplast thioredoxin. *Proc Natl Acad Sci USA* 98:11224–11229.
- Ohtani H, H Wakui, T Ishino, A Komatsuda, AB Miura 1993 An isoform of protein disulfide isomerase is expressed in the developing acrosome of spermatids during rat spermiogenesis and is transported into the nucleus of mature spermatids and epididymal spermatozoa. *Histochemistry* 100:423–429.

- Onda Y., Kobori Y. (2016). Differential activity of rice protein disulfide isomerase (PDI) family members for disulfide bond formation and reduction. *FEBS Open Bio.* 4 730–734.
- Ondzighi C. A., Staehelin L. A. (2008). *Arabidopsis* protein disulfide isomerase-5 inhibits cysteine proteases during trafficking to vacuoles before programmed cell death of the endothelium in developing seeds *W. Plant Cell* 20 2205–2220.
- Pelham HR (1990) The retention signal for soluble proteins of the endoplasmic reticulum. *Trends Biochem Sci* 15: 483–486
- Peng R. H., Qiu J., Tian Y. S., Gao J. J., Han H. J., Fu X. Y., et al. (2017). Disulfide isomerase-like protein AtPDIL1–2 is a good candidate for trichlorophenol phytodetoxification. *Sci. Rep.* 7:40130.
- Rigobello MP, A Donella-Deana, L Cesaro, A Bindoli 2001 Distribution of protein disulphide isomerase in rat liver mitochondria. *Biochem J* 356:567–570.
- Serrato A., Guillemintot J., Meyer Y. & Vignols F. 2008. AtCXXS: atypical members of the *Arabidopsis thaliana* thioredoxin h family with a remarkably high disulfide isomerase activity. *Physiol. Plant.* 133: 611–622.
- Shewry P.R. & Halford N.G. 2002. Cereal seed storage proteins: structures, properties and role in grain utilization. *J. Exp. Bot.* 53: 947–958.
- Takemoto Y., Coughlan S. J., Okita T. W., Satoh H., Ogawa M., Kumamaru T. (2002). The rice mutant esp2 greatly accumulates the glutelin precursor and deletes the protein disulfide isomerase. *Plant Physiol.* 128 1212–1222.
- Tosi P., Parker M., Gritsch C., Carzaniga R., Martin B. & Shewry S. 2009. Trafficking of storage proteins in developing grain of wheat. *J. Exp. Bot.* 60: 979–991.
- Tu B, SC Ho-Schleyer, KJ Travers, JS Weissman 2000 Biochemical basis of oxidative protein folding in the endoplasmic reticulum. *Science* 290:1571–1574.
- Turano C, S Coppari, F Altieri, A Ferraro 2002. Proteins of the PDI family: unpredicted non-ER locations and functions. *J Cell Physiol* 193:154–163.
- Vitale A. & Ceriotti A. 2004. Protein quality control mechanisms and protein storage in the endoplasmic reticulum. A conflict of interests? *Plant Physiol.* 136: 3420–3426.
- Wang H., Boavida L. C., Ron M., McCormick S. (2008). Truncation of a protein disulfide isomerase, PDIL2-1, delays embryo sac maturation and disrupts pollen tube guidance in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell* 20 3300–3311. 10.1105/tpc.108.062919
- Wedemeyer WJ, E Welker, M Narayan, HA Scheraga 2000 Disulfide bonds and protein folding. *Biochem* 39:4207–4216.
- Wilkinson B. & Gilbert H. 2004. Protein disulfide isomerase. *Biochim. Biophys. Acta* 1699: 35–44.
- Wilson R, JF Lees, NJ Bulleid 1998 Protein disulfide isomerase acts as a molecular chaperone during the assembly of procollagen. *J Biol Chem* 273:9637–9643.
- Woycechowsky K, Raines R. 2000. Native disulfide bond formation in proteins. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 4: 533–539.
- Yang, P., Lüpken, T., Habekuss, A., Hensel, G., Steuernagel, B., Kilian, B., ... & Ordon, F. (2014). PROTEIN DISULFIDE ISOMERASE LIKE 5-1 is a susceptibility factor to plant viruses. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(6), 2104-2109.
- Zhu C., Luo N., He M., Chen G., Zhu J., Yin G., et al. (2014). Molecular characterization and expression profiling of the protein disulfide isomerase gene family in *Brachypodium distachyon* L. *PLoS One* 9:e94704.