

## TRANSGLUTAMINAZY I ICH BIOLOGICZNE FUNKCJE\*

### TRANSGLUTAMINASES AND THEIR BIOLOGICAL ROLE

Anna SAMELAK, Ewa SOBIESZCZUK-NOWICKA, Jolanta LEGOCKA

Zakład Fizjologii Roślin, Uniwersytet im. A. Mickiewicza w Poznaniu

*Streszczenie:* W komórce struktura kompleksów białek oligomerycznych może być utrzymywana poprzez wiązania wodorowe, jonowe oraz siły van der Waalsa. W ich tworzeniu mogą również uczestniczyć modyfikacje potranslacyjne, takie jak fosforylacja czy defosforylacja. Formowanie silniejszych połączeń – wiązań kowalencyjnych, wymaga zależnych od jonów wapniowych acylotransferaz – transglutaminaz (TGaz). Transglutaminazy (EC 2.3.2.13) katalizują kowalentne wiązanie się pomiędzy substratem obdarzonym pierwszorzędową grupą aminową i glutaminową resztą łańcucha białkowego. Odgrywają one znaczącą rolę w potranslacyjnej modyfikacji białek przez tworzenie kowalentnych wiązań krzyżowych w obrębie pojedynczego białka lub pomiędzy różnymi białkami. Biorą udział w stabilizacji makromolekuł, co z kolei wpływa na strukturalną integralność tkanek roślinnych i zwierzęcych. U zwierząt TGazy katalizują także reakcje acylacji, estryfikacji, deamidacji i proteolitycznego cięcia izopeptydu, choć ich biologiczne znaczenie nie jest do końca poznane. Biologiczna funkcja TGaz to głównie potranslacyjna modyfikacja białek. Niekiedy enzym ten może mieć funkcję niekatalityczną związaną z organizacją cytoszkieletu, integralnością błon komórkowych, może wspomagać adhezję i migrację komórek oraz brać udział w transdukcji komórkowego sygnału. Scharakteryzowano trzy rodziny TGaz. Pierwsza ma specyficzną strukturę centrum aktywnego, które tworzą reszty cysteiny, histydyny i asparaginy lub asparaginianu. Powszechny u tej grupy TGaz jest również brak modyfikacji łańcucha białkowego, poza kilkoma miejscami, w których może zajść N-glikozylacja. Drugą grupę TGaz charakteryzuje zbliżona do opisanej powyżej budowa centrum katalicznego oraz dodatkowa aktywność enzymatyczna przypisywana izomerazom dwusiarczkowym. Trzecia zidentyfikowana grupa wykryta została u toksynogennych szczepów bakterii. Rodzina ta różni się zdecydowanie od dwóch poprzednich zarówno budową centrum katalicznego, jak i sekwencją nukleotydów. W genomie człowieka zidentyfikowano dziewięć genów kodujących TGazy i mających swoje analogi w organizmach zwierzęcych, począwszy od ssaków, a skończywszy na bezkręgowcach. Geny te są ze sobą blisko spokrewnione, ponadto cechuje je wysoka konserwatywność, której wyrazem jest niewielka zmienność i istotne podobieństwo struktury drugorzędowej białek enzymów, a co za tym idzie także zgodność struktury trzeciorzędowej. Mimo że wszystkie wyizolowane do tej pory geny mają podobną organizację, ich sekwencje flankujące na końcu 5' oraz mechanizmy regulacji transkrypcji różnią się od siebie, co ma związek między innymi z różnicami w strukturze promotorów oraz elementów wzmacniających. Transglutaminazy są aktywowane przez jony wapnia. Wysokie stężenie wapnia w komórce sprzyja tworzeniu się  $\epsilon$ -( $\gamma$ -glutamyl)lizynowych izopeptydów hamując tym samym włączanie się amin do białek. Innymi ważnymi czynnikami wpływającymi

\*Praca finansowana z projektu MNiSzW nr N N303418236.

na aktywność transglutaminaz są: pH, jony magnezu i grupy tiolowe w białkach. Zwierzęce transglutaminazy zlokalizowane są zarówno w matriks wewnątrz- (cytoplasma, mitochondria, jądro) oraz w zewnątrzkomórkowej, gdzie zaangażowane są w procesy różnicowania, sygnalizacji, adhezji oraz organizacji samej matriks. W procesie apoptozy komórki zwierzęcej transglutaminazy i ich wzmożona aktywność określone są markerami procesu. Roślinne transglutaminazy powszechnie występują we wszystkich organach i kompartmentach roślinnej komórki. Dużo mniej wiadomo o ich budowie i funkcji w porównaniu z komórką zwierzęcą. Roślinne TGazy zidentyfikowano w cytoplazmie, ścianie komórkowej, chloroplastach i mitochondriach. Najszerzej badane są zależne od światła chloroplastowe TGazy. Głównie ich funkcje można scharakteryzować jako: udział w różnicowaniu się chloroplastów, zwłaszcza w procesie formowania gran, w formowaniu wielkocząsteczkowego kompleksu, jakim jest Rubisco oraz w stabilizacji LHCP II i innych białek antenowych, co przekłada się na katalityczną aktywność enzymu oraz wydajność w zbieraniu energii świetlnej. Ponadto, dzięki swojej specyficznej aktywności TGazy uczestniczą w: zapyleńiu, reakcjach obronnych rośliny na działania czynnika stresowego, w procesie starzenia, w programowanej śmierci komórki i w wielu innych. Najlepiej poznanym roślinnym genem kodującym transglutaminazę jest *AtPnglp* zsekwencjonowany u rzodkiewnika. Podobieństwo sekwencji *AtPnglp* z jakąkolwiek spośród zwierzęcych TGaz jest mniejsza niż 20%, jedynie jego centrum aktywne ma sekwencję charakterystyczną dla domeny katalitycznej TGaz zwierzęcych (Cys-His-Asp). Niemniej jednak enzymy te u przedstawicieli obu królestw pełnią podobne funkcje i mają podobne właściwości biochemiczne, mogą zatem mieć zbliżone konformacje. Niniejsza praca przeglądowa podsumowuje dotychczasowy stan wiedzy na temat struktury, biochemii, lokalizacji komórkowej zarówno zwierzęcych, jak i roślinnych TGaz oraz ich biologicznej funkcji w komórce.

**Słowa kluczowe:** enzym, komórka roślinna, komórka zwierzęca, transglutaminazy, wiązania krzyżowe białek.

**Summary:** Oligomeric and polymeric protein associations often involve purely secondary chemical forces that is, hydrogen bonds, ionic bonds and van der Waals forces. Protein assembly and disassembly can also be regulated by post-translational modifications, such as phosphorylation or dephosphorylation, even in these cases the subunits are not linked covalently. The first transglutaminase enzyme (TGase, EC 2.3.2.13) was recognised on the basis of its ability to catalyse the covalent incorporation of amine into proteins. In general, TGases are a family of enzymes that catalyse the covalent binding of substrates with primary amine groups to the carboxamide group of protein glutamine residues. These enzymes are called 'biological glues' in that they catalyse the post-translational modification of proteins by forming stable intra- and inter-molecular bridges. Through a similar catalytic process, transglutaminases can carry out acylation, esterification, deamidation and isopeptide cleavage, although the biological relevance of these reactions is characteristic only for animal cell and is less clear. Biological functions of TGases are generally attributed to their protein-modifying activity, in some instances it is due to specialised non-catalytic actions, such as scaffolding of the cytoskeleton to maintain membrane integrity, cell adhesion and possibly signal transduction. Three structurally-characterised families of TGases have been identified. These are the papain-like TGases, members of the superfamily of cysteine proteases. These enzymes have a catalytic triad of Cys-His-Asp/Asn. Second group are the protein disulphide isomerase-like TGases, which have disulphide-bond isomerase activity in addition to their TGase activity, and third group is the bacterial toxin TGases; these proteins have an atypical catalytic triad and show no sequence homology with other two groups. Nine different TGase genes have been identified in the human genome. Eight encode potential  $\text{Ca}^{2+}$  regulated crosslinking enzymes and one encodes the catalytically inactive homologue. Apparent orthologues of the different human TGases have also been identified in organisms ranging from mammals to invertebrates. TGases are encoded by a family of closely related genes. All of the genes isolated so far seem to be organised in a similar way. Despite marked similarities in the organization of the TGase genes, their 5' flanking sequences and mechanisms of transcriptional regulation are not homologous, and this is consistent with their varied and regulated tissue-specific and developmental expression. High sequence conservation and high degree of preservation of residue of secondary structure indicates that all TGases might share a four-domain tertiary structure. Transglutaminases are  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent enzymes, as shown by EGTA inhibition. It has been demonstrated in pea root and leaf that calcium concentration affected the type of linkage that regulated intracellular role of TGases. High concentration of  $\text{Ca}^{2+}$  activated the formation of the glutamyl-lysyl isodipeptide bonds and inhibited amines conjugation to proteins. Other than  $\text{Ca}^{2+}$  factors like pH, magnesium and -SH protein groups can also modulate the enzyme activity. In animals transglutaminases are located both: intra- (cytosol, mitochondria, nucleus) and

extra-cellularly in the matrix where they are involved in differentiation, transmembrane signalling, cell adhesion and organization of the extracellular matrix. Moreover, the presence and the activity of transglutaminases in dying animal cells are considered markers of apoptosis. Transglutaminases are also widespread in all plant organs and cell compartments. Much less is known about plant transglutaminases compared to their animal counterparts. In plants they are found at several different subcellular compartments, including the cytosol, cell wall, chloroplasts and mitochondria. Most data concern the chloroplast transglutaminase activity, which is regulated by light and known to modify Rubisco and several antenna proteins of photosystems I and II, influencing possibly the catalytic activity of the former and the energy transfer efficiency of the latter. Additional roles specific for plants are related to fertilisation, stresses, senescence and programmed cell death. AtPng1p, the first plant transglutaminase sequenced shows undetectable sequence homology to the animal enzymes, except for the catalytic triad (Cys-His-Asp). Despite that, AtPng1p shares with them immunological and biochemical properties and possibly a similar conformation. This review summarises our current knowledge of the structure, biochemical features, and cell localisation of animal and plant transglutaminases and their biological role in the cell.

*Key words:* animal cell, enzyme, plant cell, protein cross-links, transglutaminases.

## 1. WPROWADZENIE

W każdej komórce, zarówno roślinnej, zwierzęcej, jak i bakteryjnej istnieje wiele sposobów tworzenia koniugatów białkowych. Białka oddziałują ze sobą poprzez stosunkowo słabe wiązania wodorowe, jonowe oraz siły van der Waalsa. Formowanie silniejszych połączeń wiązań kowalencyjnych, wymaga zależnych od jonów wapniowych acylotransferaz – transglutaminaz (TGaz) [22]. Enzymy te odgrywają znaczącą rolę w potranslacyjnej modyfikacji białek. Przez tworzenie wiązań krzyżowych w obrębie pojedynczego białka lub pomiędzy różnymi białkami biorą udział w stabilizacji tych makromolekuł [2]. W zjawisku tworzenia wyżej wspomnianych wiązań TGazy współdziałają m.in. z poliaminami (PA), których głównymi reprezentantami w komórkach są putrescyna (PU), spermidyna (SD) i spermina (SM). Zalicza się je do grupy regulatorów rozwoju komórki, a zaangażowane są między innymi w procesy podziału, embriogenezę, morfogenezę, reakcje na stresy oraz starzenie [25], a także w funkcjonowanie aparatu fotosyntetycznego u roślin [1, 15, 17].

W niniejszej pracy porównano TGazy roślinne i zwierzęce, biorąc pod uwagę ich budowę, właściwości biochemiczne oraz funkcje pełnione w różnych przedziałach komórkowych.

## 2. BUDOWA ENZYMU

W genomie człowieka zidentyfikowano dziewięć genów kodujących TGazy i mających swoje analogi w organizmach zwierzęcych, począwszy od ssaków, a skończywszy na bezkręgowcach. Geny te cechuje wysoka konserwatywność, której następstwem jest niewielka zmienność i istotne podobieństwo zarówno struktury drugorzędowej, jak i trzeciorzędowej białek enzymów [11].

Mimo że wszystkie wyizolowane do tej pory geny mają podobną organizację, ich sekwencje flankujące na końcu 5' oraz mechanizmy regulacji transkrypcji różnią się od siebie, co ma związek między innymi z różnicami w strukturze promotorów oraz elementów wzmacniających [19].

Najlepiej poznanym roślinnym genem kodującym transglutaminazę jest *AtPng1p* zsekwencjonowany u rzodkiewnika [5]. Składa się on z 17 egzonów i jest genem pojedynczym ulegającym konstytutywnej ekspresji na niskim poziomie. Jego model został utworzony przy uwzględnieniu, że białkowy produkt tego genu przejawia aktywność N-glikanazy (PNGazy), a jego rdzeń wykazuje znaczne podobieństwo sekwencji (ok. 40%) z rdzeniowym fragmentem PNGazy. Glikanazy są ewolucyjnie blisko spokrewnione z TGazami [10]. Najbliższy homolog *AtPng1p* został zidentyfikowany w ryżu, co sugeruje, że enzym kodowany przez ten gen może być rozpowszechniony wśród roślin wyższych [10].

### 2.1. Struktura enzymu

Budowa wszystkich zwierzęcych transglutaminaz wykazuje wiele podobieństw. Jednym z głównych jest specyficzna struktura centrum aktywnego, które tworzą reszty cysteiny, histydyny i asparaginy lub asparaginanu. Powszechny u TGaz jest również brak modyfikacji łańcucha białkowego, poza kilkoma miejscami, w których może zajść N-glikozylacja. Nieliczne są także mostki dwusiarczkowe, występujące jedynie pomiędzy resztami cysteiny [19]. Nieznaczna zmienność TGaz powoduje, że czterodomenowa struktura trzeciorzędowa określona dla np. fXIIIA, TG2 i TG3 może być charakterystyczna także dla pozostałych enzymów tej grupy. W związku z tym wyróżnia się domenę N-kończową, katalityczną i dwie domeny C-końcowe. W przeważającej części mają one strukturę  $\beta$ -baryłek lub  $\beta$ -kanapek.  $\alpha$ -helisy można odnaleźć w domenie katalitycznej [11].

Liczba łańcuchów polipeptydowych budujących TGazy jest różna. Dla przykładu fXIIIA ma dwa łańcuchy, podczas gdy TG2 aż sześć [19]. Podobnie jak inne białka, także TGazy podlegają potranslacyjnym modyfikacjom. U większości polegają one na N-acetylacji i usunięciu inicjatorowej reszty metioniny. W znacznej mierze TGazy działają jako monomery [19].

Podobieństwo sekwencji *AtPng1p* z jakkolwiek spośród zwierzęcych TGaz jest mniejsza niż 20% i niewystarczająca, aby można było zastosować tak zwaną metodę budowania przez homologię [22]. Niemniej jednak enzymy te u przedstawicieli obu królestw pełnią podobne funkcje i mają podobne właściwości biochemiczne, mogą zatem mieć zbliżoną konformację. *AtPng1p* koduje białko zbudowane z 2 łańcuchów polipeptydowych i 721 reszt aminokwasów [5]. Jak już wspomniano enzym ten ma właściwości PNGazy, a jego centrum aktywne ma sekwencję charakterystyczną dla domeny katalitycznej TGaz zwierzęcych (Cys-His-Asp) [10]. Biorąc pod uwagę powyższe fakty, stosując nowoczesne techniki biotechnologiczne i bioinformatyczne zbudowano hipotetyczny model *AtPng1p* [18].

### 3. BIOCHEMICZNA CHARAKTERYSTYKA TRANSGLUTAMINAZ

Transglutaminazy katalizują potranslacyjne modyfikacje białek, wpływając na ich strukturę, rozpuszczalność i zdolność do oddziaływania z innymi cząsteczkami. Wśród substratów TGazy, obok białek, istotne miejsce zajmują poliaminy alifatyczne. Występują one powszechnie w komórkach roślinnych i zwierzęcych, gdzie pełnią rolę czynników wzrostu i rozwoju [25]. Poliaminy te różnią się między sobą liczbą dodatnich ładunków (PU 2, SD 3, SM 4), a także długością łańcucha (PU: 6,5 Å, SD: 11,12 Å, SM: 14,6 Å). Pociąga to za sobą różnice w długości i wytrzymałości utworzonego wiązania. TGazy nie wiążą poliamin z jednakową częstością. Największe powinowactwo AtPng1p zaobserwowano w stosunku do SM, a najmniejsze do PU [5], natomiast w wierzchołku pędu *Helianthus tuberosus* powinowactwo TGazy do aminowych substratów przedstawiało się następująco: SD > SM > PU [23]. Na wiązanie określonej PA wpływa również rodzaj białkowego substratu, do którego PA ma zostać przyłączona [23]. Transglutaminaza katalizuje między innymi reakcję, w której wiązanie powstaje pomiędzy resztą glutaminy w łańcuchu białkowym, a pierwszorzędową grupą aminową PA (ryc.1). W efekcie utworzone zostają mono-( $\gamma$ -glutamylowe) pochodne: N-mono-( $\gamma$ -glutamyl)-putrescyna, N1-mono-( $\gamma$ -glutamyl)-spermidyna, N8-mono-( $\gamma$ -glutamyl)-spermidyna oraz N1/N12-mono-( $\gamma$ -glutamyl)-spermina. Następnie w reakcję może wejść drugorzędowa grupa aminowa PA, dając bis-( $\gamma$ -glutamylowe) pochodne i łącząc w ten sposób dwa łańcuchy białkowe. Przyłączenie poliaminy do białka zmienia również jego ładunek. Mimo różnorodności reakcji katalizowanych przez TGazy, schemat działania tych enzymów jest jednakowy w każdym przypadku [24].

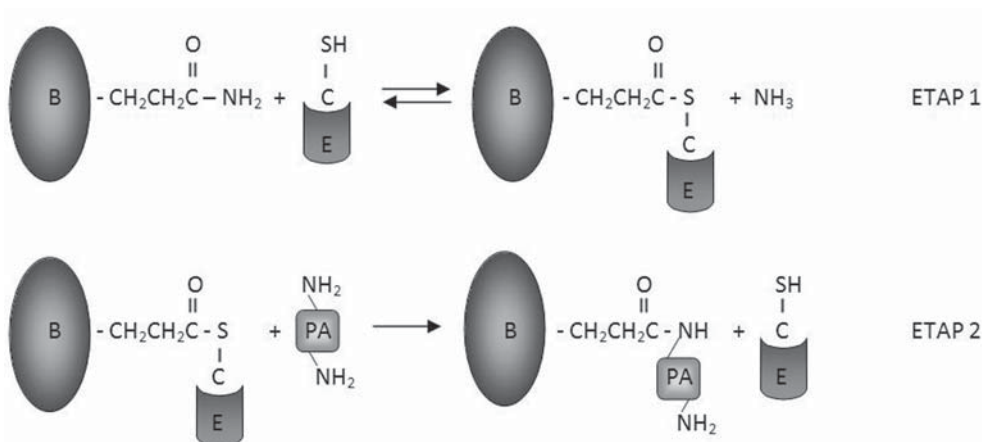
Krzyżowe połączenia formowane są również bezpośrednio, bez udziału poliaminy, między innymi podczas polimeryzacji białek *de novo*. TGazy uczestniczą również w stabilizacji białek już połączonych ze sobą wiązaniami niekowalencyjnymi. W tym przypadku wiązania krzyżowe przyczyniają się jedynie do umocnienia konstrukcji polimeru i często nie zmieniają jego ogólnej struktury [13].

TGazy katalizują także reakcje acylacji, estryfikacji, deamidacji i proteolitycznego cięcia izopeptydu, choć ich biologiczne znaczenie nie jest do końca poznane [19].

W przeciwieństwie do organizmów zwierzęcych, u których występują wszystkie powyższe typy reakcji, w komórkach roślinnych zaobserwowano jedynie reakcje transamidacji, czyli tworzenie wiązań krzyżowych, przyłączanie aminy oraz acylację.

#### 3.1. Zależność od jonów wapnia

Aktywność zarówno roślinnych, jak i zwierzęcych transglutaminaz regulowana jest przez jony  $\text{Ca}^{2+}$ . Przyłączenie  $\text{Ca}^{2+}$  do TGazy powoduje istotną zmianę konformacyjną białka, prowadzącą do odsłonięcia reszty cysteiny w centrum katalitycznym enzymu. Tym samym wyeksponowane zostają reszty aminokwasów, które kontrolują dostęp substratów do miejsca ich wiązania. Badania na korzeniach i liściach grochu [21] dowiodły, że spoczynkowa ilość jonów wapnia w cytozolu jest wystarczająca, aby TGazy mogły pełnić swoją funkcję wewnątrz komórki. Stężenie



RYCINA 1. Schemat dwuetapowej reakcji katalizowanej przez transglutaminazę, polegającej na przyłączeniu aminy do białka. Etap 1: Utworzenie kompleksu białko-enzym w wyniku przyłączenia się TGazy do reszty glutaminy w łańcuchu białkowym. Jednocześnie od reszty tej odłącza się amoniak. Etap 2: Obejmuje on zerwanie wiązania tioesterowego między białkiem a TGazą, przyłączenie pierwszorzędowej grupy aminowej PA do łańcucha białkowego i uwolnienie transglutaminazy. Zostaje utworzona mono-( $\gamma$ -glutamylowa) pochodna poliaminy. B – białko z wolną resztą glutaminy, E – enzym (transglutaminaza), PA – poliaminy (opracowanie własne)

FIGURE 1. The scheme of the two-step reaction, catalysed by transglutaminases. It presents the incorporation of the polyamine to the protein. Step 1: Transglutaminase is being joined to the glutamyl residue in the protein substrate forming the protein-enzyme intermediate and releasing ammonia. Step 2: It consists of breaking the thioester linkage between the protein and TGase, incorporating the primary amine group to the protein chain and releasing TGase. The mono-( $\gamma$ -glutamyl)-PA derivative is being formed. B – protein substrate with free glutamine residue, E – enzyme (transglutaminase), PA – polyamine

$\text{Ca}^{2+}$  (powyżej 3 mM) wydaje się być zasadniczym czynnikiem, niezbędnym dla tworzenia wiązań krzyżowych. Fakt ten sugeruje, że wiązania tego typu będą formowane w środowisku bogatym w  $\text{Ca}^{2+}$ , na przykład w ścianie komórkowej, ale również w przypadku uwolnienia  $\text{Ca}^{2+}$  z wewnątrzkomórkowych rezerwuarów podczas uszkodzenia lub w czasie programowanej śmierci komórki [24]. Wpływ jonów wapnia na aktywność TGaz badany był również u zwierząt. Erytrocyty ludzkie zostały poddane działaniu  $\text{Ca}^{2+}$  w obecności jonoforów. Są to substancje wiążące jony w mieszaninie i ułatwiające ich transport przez bariery lipidowe. Zauważono, że czerwone krwinki nieodwracalnie zmieniły swój kształt, a ich błony zostały trwale zdeformowane. Napływające z zewnątrz jony  $\text{Ca}^{2+}$  powiększyły znacząco ich cytozolową pulę. Ich wysokie stężenie uruchomiło znajdującą się w erytrocytach TG2, która z kolei wzięła udział w formowaniu polimerów o wysokiej masie białkowej. Wiazaniami krzyżowymi połączone zostały białka szkieletu błony erytrocytów, między innymi spektryna i ankiryna [19].

### 3.2. Zależność od pH, jonów magnezu i grup tiolowych

Optymalna dla działania TGaz wartość pH jest podobna u roślin oraz zwierząt i waha się w zakresie 7,5–8,5 [23]. Są jednak enzymy, których optimum wykracza poza ten przedział. TGazy w ścianach komórkowych pyłku funkcjonują w pH

równym 6,5 [9]. Przeciwnie do nich zachowuje się transglutaminaza działająca w stromie chloroplastów. W pH w zakresie 8–9,5 jej aktywność gwałtownie wzrastała. Wynik ten jest zgodny z faktem, że chloroplastowa TGaza jest aktywna w warunkach, w których zachodzi także fotosynteza. pH stromy chloroplastów wzrasta wówczas do wartości około 8,5 w związku z transportem protonów do światła tylakoidów [6].

W badaniach na liściach buraka wykazano hamowanie aktywności TGazy przez jony  $Mg^{2+}$ . Obecność tych jonów hamuje proces tworzenia się wiązań krzyżowych [24].

Zaangażowanie grup tiolowych w funkcjonowanie TGaz ściany komórkowej i chloroplastów uwidacznia użycie inhibitorów blokujących tworzenie się mostków dwusiarczkowych. Zastosowanie ditiotreitolu, silnego reduktora, zrywającego istniejące w białku wiązania dwusiarczkowe, stymulowało aktywność TGazy w liściach soi, jednakże hamowało te enzymy w innych roślinnych ekstraktach. Sugeruje się, że mógł się do tego przyczynić rozpad mostków dwusiarczkowych enzymu lub inhibicja chloroplastowych proteaz [23].

### 3.3. Zależność od światła

Specyficzną cechą, charakteryzującą roślinne transglutaminazy i nieobserwowaną u zwierząt, jest wrażliwość tych enzymów na światło. Właściwość ta dotyczy zwłaszcza chloroplastowych TGaz, co potwierdzają wyniki wielu badań [1, 15, 27, 28]. Także substraty TGaz poliaminy, są obecne w chloroplastach, a ich biosynteza jest również zależna od światła [12, 17].

W chloroplastach kukurydzy zaobserwowano stymulowaną światłem aktywność TGaz. W ciemności wykryto jedynie śladowe ilości tych związków. W indukowanej światłem zmianie konformacyjnej LHCII uczestniczą dwie specyficzne reszty glutaminy. Zmierzono, że odległość między nimi jest zbliżona do molekularnego rozmiaru SM. Poliamina ta mogłaby zatem formować bis-glutamyl-sperminowe mostki, łącząc ze sobą wspomniane reszty i dzięki temu spełniając rolę w stabilizacji kompleksu [6]. W warunkach *in vivo*, glutamylowe reszty są jednak niekorzystnie usytuowane, zwracają się w kierunku światła gran, gdzie pH jest niższe i nie sprzyja aktywności tylakoidowej TGazy. Mimo to sugeruje się, że Thyl TGaza pozostaje w kontakcie z LHCII i jest z nim związana bądź też znajduje się w pobliżu kompleksu [6]. Wskazuje na to obecność w LHCII miejsc o wysokim powinowactwie do wiązania  $Ca^{2+}$ , zaangażowanych w proces formowania się gran i być może mających istotne znaczenie dla aktywności  $Ca^{2+}$ -zależnej TGazy.

## 4. ROŚLINNE I ZWIERZĘCE TRANSGLUTAMINAZY – ICH FUNKCJA W KOMÓRCIE I PRZESTRZENI ZEWNĄTRZKOMÓRKOWEJ

Pleiotropowe działanie transglutaminaz wynika ze zdolności tychże enzymów do przeprowadzania szeregu reakcji z udziałem różnych substratów. Przekłada się to

na mnogość i różnorodność funkcji pełnionych przez TGazy [19, 22, 23]. Enzymy te są obecne zarówno wewnątrz komórki, jak i poza nią, a ich aktywność wykryta została w różnych tkankach roślinnych i zwierzęcych, na różnych etapach rozwoju organizmu, w warunkach sprzyjających rozwojowi oraz w stresie. Ponadto, powszechnie znany jest fakt, że w jednym organizmie zwierzęcym może występować kilka różnych form TGaz. Prawdopodobnie taka sama sytuacja ma miejsce w królestwie roślin, co tłumaczyłoby różnice w charakterystyce TGaz w różnych organach tej samej rośliny [22]. Potwierdzeniem są wyniki badań przeprowadzonych na liściach, bulwach, młodych pędach i pąkach kwiatów słonecznika, które wykazały, że w danym organie możliwe jest działanie kilku form enzymu [11]. Właściwości oraz funkcje roślinnych i zwierzęcych transglutaminaz zostały zebrane i porównane w tabeli (tab. 1).

#### 4.1. Ściana komórkowa

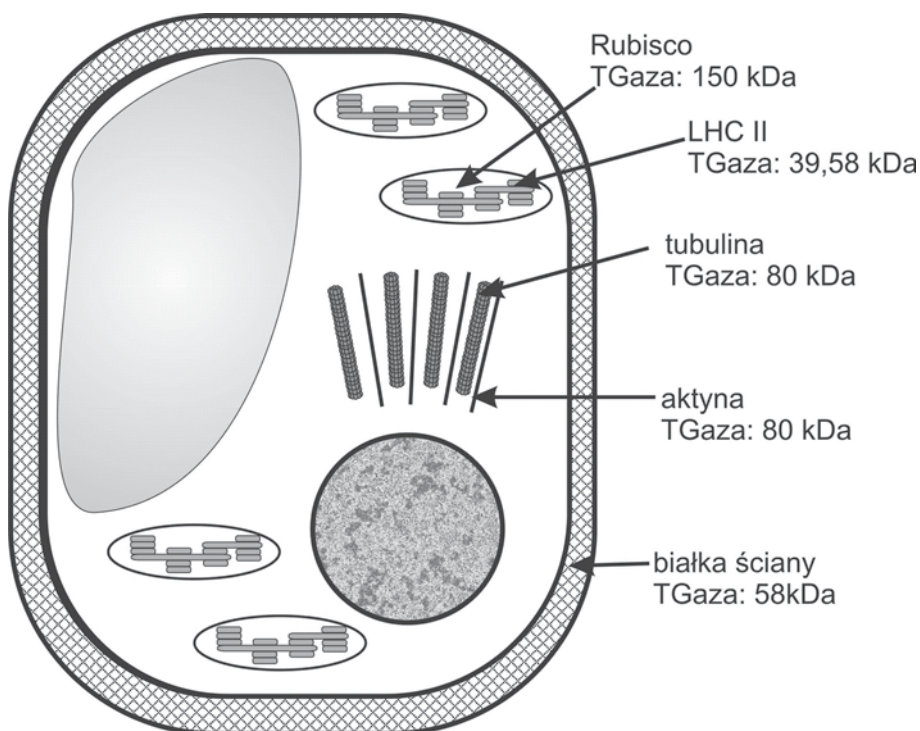
Pierwszych dowodów na obecność produktów katalizy TGaz w ścianach komórek roślinnych dostarczyły badania parenchymatycznych komórek słonecznika. W wyniku trawienia ściany przy użyciu enzymów: celulazy i pektynazy od polisacharydowych komponentów oddzieliły się wysokocząsteczkowe białka, których łańcuchy połączone były ze sobą za pośrednictwem PA. Sugeruje to współzależność pomiędzy tymi dwoma zasadniczymi składnikami ściany [22]. Można zatem przypuszczać, że TGazy w tym zewnątrzkomórkowym przedziale pełnią funkcję strukturalną. Funkcja ta została bardziej szczegółowo opisana na podstawie doświadczeń przeprowadzonych na *Chlamydomonas reinhardtii*. U badanych glonów TGaza zaangażowana była w budowę tak zwanej ściany „wegetatywnej”, bogatej w glikoproteiny rozpuszczalne w środowisku alkalicznym, która chroni zarówno komórki wegetatywne, jak i generatywne [23].

Obecność TGaz wykryto także w ścianie komórkowej ziarna pyłku jabłoni oraz w części proksymalnej i apikalnej łagiewki pyłkowej [16]. Wydaje się bardzo prawdopodobne, że wiązania krzyżowe, których powstawanie katalizują TGazy, wzmacniają ścianę i umożliwiają wzrost łagiewki pyłkowej we wnętrzu słupka. Wykazano, że po użyciu inhibitorów tych enzymów następuje zahamowanie wydłużania łagiewki.

We frakcji zawierającej wyizolowane ściany komórkowe komórek pochodzących z płatków korony tytoniu, zaobserwowano aktywność TGazy o masie 58 kDa. Sugeruje się, że bierze ona udział w programowanej śmierci komórek płatków, która jest procesem złożonym i regulowanym np. przez hormony [7]. Starzenie korony przebiega od proksymalnej do dystalnej części płatków i jest poprzedzone wysoką aktywnością TGazy. Wyszło wniosek sugerujące, że TGaza, prawdopodobnie transportowana do ściany przez pęcherzyki aparatu Golgiego, zaangażowana jest w proces wzmacniania ścian komórkowych, zwłaszcza w części bazalnej oraz podczas zmiany kształtu korony. Enzym ten może także brać udział w formowaniu otoczki chroniącej rozwijającą się zalążnię przed czynnikami zewnętrznymi [7]. Lokalizację TGaz w komórce roślinnej przedstawia rycina 2.

TABELA 1. Porównanie lokalizacji, właściwości i funkcji wybranych zwierzęcych i roślinnych transglutaminaz  
TABLE 1. Animal and plant transglutaminases: localisation, characteristic and role

| Enzym                  | Lokalizacja                                                                     | Funkcja                        | Katalizowane reakcje                                                                                                                          | Właściwości biochemiczne                                                                                                                                                        | Literatura              |
|------------------------|---------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------|
| <b>TGazy zwierzęce</b> |                                                                                 |                                |                                                                                                                                               |                                                                                                                                                                                 |                         |
| TG1                    | Błona komórkowa, cytoplazma                                                     | Formowanie błony komórkowej    | Krzyżowe łączenie białek z udziałem lub bez udziału PA: przyłączanie PA, acylacja, estryfikacja, deamidacja, proteolityczne cięcie izopeptydu | Aktywność uzależniona od: jonów wapnia, pH (dla większości optimum – 7,5–8,5), grup tiolowych, GTP                                                                              | [11, 19]<br>[3, 11, 19] |
| TG2                    | Błona komórkowa, cytoplazma, powierzchnia komórki, przestrzeń zewnątrzkomórkowa | Różnorodność funkcji           |                                                                                                                                               |                                                                                                                                                                                 |                         |
| TG3                    | Cytoplazma                                                                      | Formowanie błony komórkowej    |                                                                                                                                               |                                                                                                                                                                                 | [11, 19]                |
| B4.2                   | Błona komórkowa                                                                 | Element błony erytrocytów      |                                                                                                                                               |                                                                                                                                                                                 | [11, 19]                |
| tXIIIA                 | Cytoplazma, przestrzeń wewnątrzkomórkowa                                        | Krzepnięcie krwi, wzrost kości |                                                                                                                                               |                                                                                                                                                                                 | [11, 20]                |
| <b>TGazy roślinne</b>  |                                                                                 |                                |                                                                                                                                               |                                                                                                                                                                                 |                         |
| 58 kDa, 150 kDa        | Tyłakoidy, stroma (słonecznik)                                                  | Fotosynteza/Fotoprotekcja      | Krzyżowe łączenie białek z udziałem lub bez udziału PA: przyłączanie PA, acylacja                                                             | Aktywność uzależniona od: jonów wapnia, pH (optimum w granicach 7,50–8,5, ale są wyjątki), grup tiolowych, GTP, światła (TGazy chloroplastowe), jonów magnezu (przypuszczalnie) | [22, 24]                |
| 39 kDa                 | Tyłakoidy (kukurydza)                                                           |                                |                                                                                                                                               |                                                                                                                                                                                 | [1, 6]                  |
| 80 kDa                 | Liście i siewki (soja)                                                          |                                |                                                                                                                                               |                                                                                                                                                                                 | [21, 23]                |
| 30 kDa, 50 kDa         | Tyłakoidy, stroma (ogórek)                                                      | Różnicowanie chloroplastów     |                                                                                                                                               |                                                                                                                                                                                 | [27]                    |
| 38 kDa, 58 kDa         | Płatki kwiatów (tytoń)                                                          | Programowana śmierć komórki    |                                                                                                                                               |                                                                                                                                                                                 | [7, 21]                 |
| –                      | Parenchyma, merystem wierzchołkowy (słonecznik)                                 | Podziały komórkowe             |                                                                                                                                               |                                                                                                                                                                                 | [21, 23]                |
| 80 kDa                 | Pylek (jabłoń)                                                                  | Wzrost apikalny                |                                                                                                                                               |                                                                                                                                                                                 | [16]                    |
| –                      | Kalus (słonecznik, kukurydza)                                                   | Rozwój, różnicowanie           |                                                                                                                                               |                                                                                                                                                                                 | [9, 23, 29]             |
| –                      | Liście (soja)                                                                   | Magazynewanie białek           |                                                                                                                                               |                                                                                                                                                                                 | [21, 23]                |



RYCINA 2. Lokalizacja transglutaminaz w komórce roślinnej. Chloroplasty: substratem w stromie jest Rubisco, TGaza 150 kDa, w tylakoidach głównie białka LHC II, TGazy 39 i 58 kDa. Cytoplazma: substratami są tubulina i aktyna, TGaza 80 kDa. Ściana komórkowa: substratami są wysokocząsteczkowe białka, TGaza 58 kDa (opracowanie własne)

FIGURE 2. Location of transglutaminases in plant cell. Chloroplasts: stroma – the substrate is Rubisco, TGase 150 kDa; thylakoids – the substrates are mainly the light-harvesting complexes, TGases 39 and 58 kDa. Cytosol substrates: tubulin and actin, TGase 80 kDa. Cell wall: high molecular mass proteins, TGase 58 kDa

#### 4.2. Cytoszkieleł

W trakcie badania kielkującego pyłku pod kątem obecności TGaz odkryto, że enzym ten nie tylko znajduje się w ścianie komórkowej, ale także jest zaangażowany w reorganizację cytoszkieletu, a jego substratami są między innymi aktyna i tubulina. Wzrost apikalny łagiewki jest bardzo szybki i zachodzi nieprzerwanie dzięki ciągłej przebudowie cytoszkieletu, która umożliwia także przesuwanie się gamet, organelli, oraz pęcherzyków dostarczających materiał do budowy ściany komórkowej. Przyjęcie, że to właśnie aktyna i tubulina są substratami TGaz zostało potwierdzone, gdy po podaniu obu białek do ekstraktów pyłku pozbawionego ścian komórkowych, aktywność enzymu wzrastała [8]. U roślin z rodziny różowatych, podobnie jak u wielu innych taksonów, własny pyłek, który wylądował na znamieniu słupka, podlega programowanej śmierci komórki. Jest to mechanizm chroniący przed samozapyleniem. Zaobserwowano [8] w takim pyłku gromadzenie wysokocząsteczkowych agregatów tubuliny i mniejszych agregatów aktyny. Sugeruje się, że zahamowanie wzrostu

łagiewki pyłkowej w przypadku nieodpowiedniego pyłku jest wynikiem nietypowej organizacji cytoszkieletu, w którą zaangażowane są TGazy.

#### 4.3. Matriks wewnątrzkomórkowa

Cytoplazmatyczne formy TGaz uczestniczą między innymi w organizacji cytoszkieletu, oddziałując z aktyną i tubuliną, jak to zostało opisane powyżej, lub krzyżowo łącząc spektrynę i ankiryne – białka szkieletu błony erytrocytów, o czym wspomniano w rozdziale 3.1. Enzymy te przeprowadzają także, w obrębie wewnątrzkomórkowej matriks, potranslacyjne modyfikacje zsyntetyzowanych białek, które następnie mogą być transportowane do różnych przedziałów wewnątrz komórki, lub pozostają w cytoplazmie i tutaj też pełnią swoją rolę [3, 14].

#### 4.4. Chloroplasty

Główne funkcje chloroplastowych TGaz (ChlTGaz) można scharakteryzować jako: udział w różnicowaniu się chloroplastów, zwłaszcza w procesie formowania gran [1, 15, 25, 26, 29], w formowaniu wielkocząsteczkowego kompleksu Rubisco [27] oraz w stabilizacji LHCP II i innych białek antenowych [1, 6, 15].

W trakcie różnicowania się chloroplastów słonecznika, rosnącego w warunkach laboratoryjnych i poddanego działaniu światła oraz hormonów, zaobserwowano aktywność TGazy. Wzrastał także poziom jej substratów, zwłaszcza białek antenowych fotosystemu II [22]. Sugeruje się zatem, że chloroplastowe formy TGaz uczestniczą w procesie formowania się gran poprzez przyłączanie PA do wspomnianych białek [1, 6, 15, 26, 27]. Związane formy PA wydają się być istotne w rozwoju chloroplastów, gdyż mogą wpływać na tworzenie się błon tylakoidowych, do których są kowalencyjnie przyłączone [1]. Teoria ta została potwierdzona w trakcie analizy stymulowanego przez światło i kinetykę przekształcenia etioplastów liścieni ogórka w chloroplasty [25, 26, 27]. Dane te wskazują, że ChlTGazy prawdopodobnie są zaangażowane w formowanie PSII, a modyfikacja białek przez przyłączenie do nich PA i formowanie „mostków” między różnymi resztami glutamyłowymi może stabilizować chloroplastowe struktury.

#### 4.5. Matriks zewnątrzkomórkowa u zwierząt

Obecność TGaz w zewnątrzkomórkowej matriks warunkuje jej stabilizację, wspomaga adhezję i migrację komórek. Na powierzchni komórek i poza nimi wykazano aktywność TG2, która znacząco przyczynia się do organizacji zewnątrzkomórkowej matriks poprzez [19]:

- pośredniczenie w oddziaływaniach pomiędzy komórką a matriks zewnątrzkomórkową; warunkuje to rozprzestrzenianie i migrację komórek oraz wpływa znacząco na proces gojenia ran;
- przyczynianie się do mineralizacji tkanek;
- stabilizację połączeń umożliwiających zachowanie barierowej funkcji skóry;
- udział w aktywacji transformującego czynnika wzrostu TGF- $\beta$  (ang. *Transforming Growth Factor*) w obrębie matriks zewnątrzkomórkowej.

Część z wyżej wymienionych zadań TG2 wiąże się z niezwykłą zdolnością tego enzymu do przyłączania fibronektyny i formowania trójskładnikowego kompleksu z kolagenem i integryną ( $\beta_1$  i  $\beta_3$ ) [3, 8, 11]. Łączenie ze sobą zawierających  $\text{Ca}^{2+}$  białek matriks jest decydującym momentem w procesie formowania kości [8, 20].

## 5. PODSUMOWANIE

Transglutaminazy roślinne i zwierzęce przejawiają podobną aktywność katalityczną i właściwości biochemiczne, pomimo braku znaczących homologii w składzie aminokwasów. Wspólna dla obu grup enzymów jest budowa centrum katalitycznego [22].

Transglutaminazy zwierząt zostały jednak znacznie lepiej poznane. Enzymy te są zaangażowane w szereg procesów fizjologicznych i rozwojowych, takich jak: formowanie kości i chrząstek, rozwój serca, płuc, gruczołów ślinowych, ośrodkowego i obwodowego układu nerwowego. Ponadto TGazy uczestniczą w spermatogenezie oraz krzepnięciu krwi. Przy takiej mnogości i różnorodności funkcji nie dziwi fakt, że zaburzenia w aktywności tych enzymów są związane z wieloma chorobami, takimi jak: choroba Huntingtona, Alzheimer, Parkinsona [19].

W organizmach roślinnych zidentyfikowano kilka form TGaz o różnych masach cząsteczkowych. Potwierdzono również fakt, że w obrębie tej samej rośliny, a nawet tej samej organelli może funkcjonować więcej niż jedna transglutaminaza [5, 7, 26, 27, 29]. Enzymy te, dzięki swojej specyficznej aktywności, uczestniczą w procesach związanych z rozwojem i wzrostem rośliny, takich jak: podziały komórkowe, różnicowanie chloroplastów, magazynowanie białek, stabilizacja błon komórkowych (w tym błon tylakoidowych) oraz wzrost apikalny łagiewki pyłkowej. Niemniej ważny jest również udział TGaz w fotoprotekcji fotosystemów, odpowiedzi na działanie stresu oraz w programowanej śmierci komórki [7, 15, 27].

Transglutaminazy, w związku z ich zdolnością do modyfikowania fizycznych i chemicznych właściwości białek, znajdują wiele zastosowań w przemyśle spożywczym, kosmetycznym i medycynie [24]. Jak do tej pory, do nadprodukcji TGaz wykorzystuje się głównie bakteryjny system ekspresji, wykorzystujący bakterie *Streptovercillum mobaraensis* [4]. System ten ma jednak wady, związane między innymi z problemami w potranslacyjnej modyfikacji białek [13]. Aktualnie pracuje się nad znacznie tańszym i wydajniejszym systemem roślinnym, który pozwoli na ograniczenie kosztów związanych z dystrybucją, przechowywaniem, ekstrakcją i oczyszczaniem zrekombinowanych białek.

## PODZIĘKOWANIA

Autorki dziękują dr Małgorzacie Adamiec za przygotowanie rycin.

## LITERATURA

- [1] CAMPOS A, CARVAJAL-VALLEJOS PK, VILLALOBOS E, FRANCO CF, ALMEIDAAM, COELHO AV, TORNÉ JM, SANTOS M. Characterisation of *Zea mays* L. plastidial transglutaminase: interactions with thylakoid membrane proteins. *Plant Biology* 2009; doi:10.1111/j.1438-8677.2009.00280.
- [2] CAPELL T, CLAPAROLS I, DEL DUCA L, MIRO B, RODRIGUEZ-MONTESINOS J, CHRISTOU P, SERAFINI-FRACASSINI D. Producing transglutaminases by molecular farming in plants: Minireview article. *Amino Acids* 2004; **26**: 419–423.
- [3] COLLIGHAN RJ, GRIFFIN M. Transglutaminase 2 cross-linking of matrix proteins: biological significance and medical applications. *Amino Acids* 2009; **36**: 659–670.
- [4] CORTEZ JM, BONNER P, GRIFFIN M. A method for enzymatic treatment of textiles such as wool. *World Patent* 2002; W00204739.
- [5] DELLA MEA M, CAPARROS-RUIZ D, CLAPAROLS I, SERAFINI-FRACASSINI D, RIGAU J. AtPng1p: The First Plant Transglutaminase. *Plant Physiol* 2004; **135**: 1–9.
- [6] DELLA MEA M, DI SANDRO A, DONDINI L, DEL DUCA S, VANTINI F, BERGAMINI C, BASSI R, SERAFINI-FRACASSINI D. A *Zea mays* 39-kDa thylakoid transglutaminase catalyses the modification by polyamines of light-harvesting complex II in a light-dependent way. *Planta* 2004; **219**: 754–764.
- [7] DELLA MEA M, DE FILIPPIS F, GENOVESI V, SERAFINI-FRACASSINI D, DEL DUCA S. The acropetal wave of developmental cell death (DCD) of *Nicotiana tabacum* corolla is preceded by activation of transglutaminase in different cell compartments. *Plant Physiol* 2007; **144**: 1–13.
- [8] DI SANDRO A, SERAFINI-FRACASSINI D, DEL DUCA S, DELLA MEA M, DE FRANCESCHI P, DONDINI L, FALERI C, CAI G, SANSAVINI S. Pollen transglutaminase in pear self incompatibility and relationship with S-RNases and S-Allele variability. *Acta Hort* 2008; **800**: 423–429.
- [9] DI SANDRO A. Transglutaminase activity during growth and differentiation processes and applicative aspects. PhD thesis, Università di Bologna 2004.
- [10] DIEPOLD A, LI G, LENNARZ WJ, NURNBERGER T, BRUNNER F. The *Arabidopsis* AtPng1 gene encodes a peptide: N-glycanase. *Plant J* 2007; **52**: 94–104.
- [11] ESPOSITO C, CAPUTO I. Mammalian transglutaminases. Identification of substrates as key to physiological function and physiopathological relevance. *FEBS J* 2005; **272**: 615–631.
- [12] GEMPERLOVÁ L, NOVÁKOVÁ M, VAŇKOVÁ R, EDER J, CVIKROVÁ M. Diurnal changes in polyamine content, arginine and ornithine decarboxylase, and diamine oxidase in tobacco leaves. *J Exp Bot* 2006; **57**: 1413–1421.
- [13] GRIFFIN M, CASADIO R, BERGAMINI CM. Transglutaminase: nature's biological glues. *Biochem J* 2002; **368**: 377–396.
- [14] IENTILE R, CACCAMO D, GRIFFIN M. Tissue transglutaminase and the stress response. *Amino Acids* 2007; **33**: 385–394.
- [15] IOANNIDIS NE, ORTIGOSA SM, VERAMENDI J, PINTÓ-MARIJUAN M, FLECK I, CARVAJAL P, KOTZABASIS K, SANTOS M, TORNÉ JM. Remodeling of tobacco thylakoids by over-expression of maize plastidial transglutaminase. *Biochimica et Biophysica Acta* 2009; **1787**: 1215–1222.
- [16] IORIO RA, DI SANDRO A, SCARPELLINIA, DEL DUCA S, SERAFINI-FRACASSINI D, VERDEIRO EAM. Visualisation of transglutaminase-mediated cross linking activity in germinating pollen by laser confocal microscopy. *Plant Biosys* 2008; **142**: 360–365.
- [17] LEGOCKA J, SOBIESZCZUK-NOWICKA E. Poliaminy w chloroplastach. *Post Biol Kom* 2004; **31**: 143–153.
- [18] LEVIN E, KONDRASHOV D, WESENBERG G, PHILLIPS G. Ensemble refinement of protein crystal structures validation and application. *Structure* 2007; **15**: 1040–1052.
- [19] LORAND L, GRAHAM RM. Transglutaminases: crosslinking enzymes with pleiotropic functions. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2003; **4**: 140–156.
- [20] NAKANO Y, AL-JALLAD HF, MOUSAA, KAARTINEN MT. Expression and localization of plasma transglutaminase factor XIIIa in bone. *J Histochem Cytochem* 2007; **55**: 675–685.
- [21] SERAFINI-FRACASSINI D, DEL DUCA S. Biochemistry and function of plant transglutaminases. *Minerva Biotec* 2002; **14**: 135–141.
- [22] SERAFINI-FRACASSINI D, DEL DUCA S. Transglutaminases: Wide-spread Cross linking Enzymes in Plants. *Ann Bot* 2008; **102**: 145–152.
- [23] SERAFINI-FRACASSINI D, DELLA MEA M, TASCO G, CASADIO R, DEL DUCA S. Plant and animal transglutaminases: do similar functions imply similar structures? *Amino Acids* 2009; **36**: 643–657.

- [24] SOBIESZCZUK-NOWICKA E, SOLIŃSKA M, LEGOCKA J. Roślinne transglutaminazy. *Post Biol Kom* 2005; **32**: 463–476.
- [25] SOBIESZCZUK-NOWICKA, LEGOCKA J. Nowe podejścia w badaniach nad rolą poliamin w komórce roślinnej. *Post Biol Kom* 2007; **34**: 527–540.
- [26] SOBIESZCZUK-NOWICKA E, DI SANDRO A, DEL DUCAS, SERAFINI FRACASSINI D, LEGOCKA J. Plastid-membrane-associated polyamines and thylakoid transglutaminases during etioplast-to-chloroplast transformation stimulated by kinetin. *Physiol Plant* 2007; **130**: 590–600.
- [27] SOBIESZCZUK-NOWICKA E, KRZESŁOWSKA M, LEGOCKA J. Transglutaminases and their substrates in kinetin-stimulated etioplast-to-chloroplast transformation in cucumber cotyledons. *Protoplasma* 2008; **233**: 187–194.
- [28] SOBIESZCZUK-NOWICKA E, WIECZOREK P, LEGOCKA J. Kinetin affects the level of chloroplast polyamines and transglutaminase activity during senescence of barley leaves. *Acta Biochim Pol* 2009; **56**: 1–5.
- [29] VILLALOBOS E, SANTOS M, TALAVERA D, RODRIGUEZ-FALCON M, TORNE JM. Molecular cloning and characterization of a maize transglutaminase complementary DNA. *Gene* 2004; **336**: 93–104.

*Redaktor prowadzący – Maria Olszewska*

*Otrzymano: 13.03.2010,*

*Przyjęto: 19.05.2010*

*Jolanta Legocka*

*Zakład Fizjologii Roślin, Uniwersytet im. A. Mickiewicza*

*ul. Umultowska 89, 61-614 Poznań*

*e-mail: legocka@amu.edu.pl*