

ROŚLINNE TRANSGLUTAMINAZY*

PLANT TRANSGLUTAMINASES

Ewa SOBIESZCZUK-NOWICKA, Małgorzata SOLIŃSKA, Jolanta LEGOCKA

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

Streszczenie: Roślinne transglutaminazy, wciąż dokładnie niesklasyfikowane, są szeroko rozpowszechnione u roślin wyższych i niższych. Ich różne izoformy zlokalizowano w różnych kompartmentach komórki, takich jak: chloroplasty, mitochondria, cytoplazma czy ściana komórkowa. Przypisuje się im udział w procesach związanych z tworzeniem się struktur komórkowych. W chloroplastach i mitochondriach dodatkowo ich rola może być związana ze specyficznym metabolizmem tych organelli. Transglutaminazy wydają się być związane z procesami wzrostowymi (cykl komórkowy, wzrost apikalny, wzrost siewek) i rozwojowymi roślin, programowaną śmiercią komórki oraz w reakcji rośliny na czynniki stresowe.

Słowa kluczowe: enzymy, komórka roślinna, transglutaminazy, wiązania krzyżowe białek.

Summary: Plant TGases, still unclassified, are widespread in higher and lower plants, in several plant organs and probably different isoforms are differently located in various cell compartments: chloroplasts, mitochondria, cytoplasm, cell walls. They probably exert a mainly structural or conformational role; however, in chloroplasts and mitochondria their roles might be related to the organelles' specific metabolisms. Transglutaminases appear related to growth (cell cycle, apical growth, seedling growth), differentiation, programmed cell death and stress.

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

Wykaz skrótów: **Chl-TGaza** – chloroplastowa transglutaminaza, **PA** – poliaminy, **PCD** – programowana śmierć komórki, **PU** – putrescyna, **SD** – spermidyna, **SM** – spermina, **TGaza** – transglutaminaza, **Tyl-TGaza** – tylakoidowa transglutaminaza.

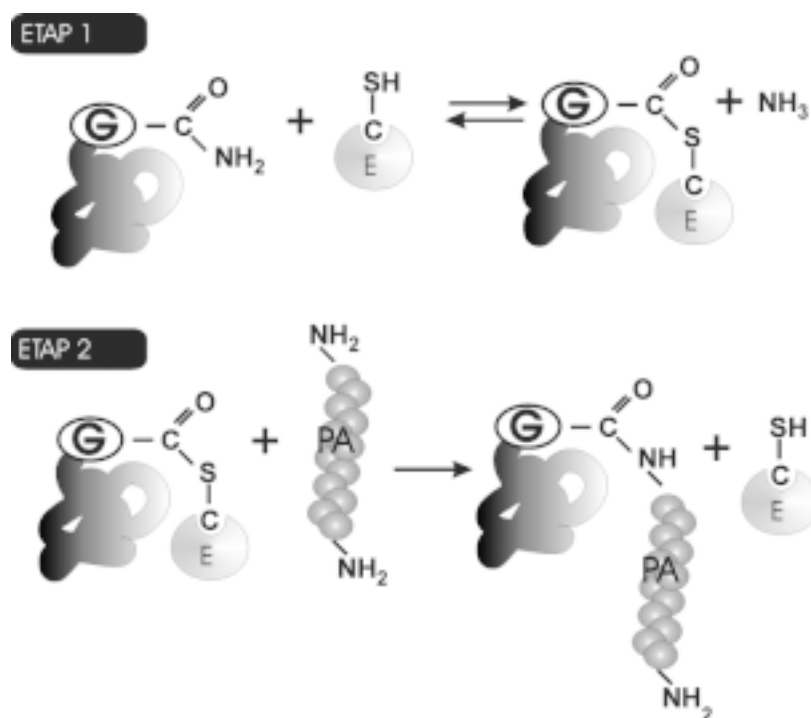
1. WPROWADZENIE

Wiązania krzyżowe białek, które pojawiają się jako modyfikacje potranslacyjne, są jednym z istotnych procesów zaangażowanych w stabilizację makromolekuł. Wśród

*Praca finansowana w ramach grantu KBN nr 2 PO4C 085.

najlepiej poznanych wiązań krzyżowych formowanych w procesie enzymatycznej katalizy są ϵ -(γ -glutamyl)lizynowe i NN-bis(γ -glutamyl)aminowe. Formowanie się wiązań tych dwóch typów jest katalizowane przez zależne od Ca^{2+} -acylotransferazy znane jako transglutaminazy (TGazy) [EC 2.3.2.1.3] [30,32].

Transglutaminazy mają wyjątkowo szeroki zakres działania. Jednym z głównych substratów TGaz są alifatyczne poliaminy (PA), które ze względu na swoje właściwości fizykochemiczne mogą być kowalennie związane do białek w dwuetapowej reakcji [16,30,32,35]. Trzy główne poliaminy (putrescyna PU, spermidyna SD i spermina SM), są powszechnie występującymi czynnikami wzrostu i rozwoju komórki zarówno zwierzęcej, jak i roślinnej [16,27,34]. Charakteryzuje je różna liczba dodatnich ładunków (PU 2, SD 3, SM 4) i długość szkieletu (PU: 6.5Å, SD: 11.12Å, SM: 14.6Å) co wpływa na długość i wytrzymałość wiązania [16]. W pierwszym etapie do reszty glutaminy w łańcuchu białkowym jest przyłączany enzym, tworzy się kompleks enzym-białko, a z grupy γ -karboksamidowej reszty glutaminowej uwalniany jest amoniak. W etapie drugim w miejsce enzymu do cząsteczki białka przyłączona jest pierwszorzędowa grupa aminowa (poliaminy), a enzym jest uwalniany (ryc.1) [30,32]. Rezultatem aktywności



RYCINA 1. Schemat reakcji katalizowanej przez transglutaminazę. Reakcja polega na przyłączaniu poliamin do cząsteczki białka. Przebiega w 2 etapach. W pierwszym etapie do reszty glutaminy w łańcuchu białkowym jest przyłączany enzym, tworzy się kompleks enzym-białko, a z grupy γ -karboksamidowej reszty glutaminowej uwalniany jest amoniak. W etapie drugim w miejsce enzymu do cząsteczki białka przyłączona jest pierwszorzędowa grupa aminowa (poliaminy), a enzym jest uwalniany (na podstawie [32], zmodyfikowane): E – enzym, PA – poliaminy, G – glutamina, C – węgiel

transglutaminaz w komórce przy współudziale PA jest zmiana ładunku białka, a także zmiana jego konformacji poprzez tworzenie połączeń krzyżowych w obrębie tego samego białka (reakcja opisana powyżej) bądź pomiędzy różnymi białkami, czego konsekwencją może być formowanie się koniugatów białkowych o wysokiej masie cząsteczkowej (ryc. 2) [23,30,32].



N-mono (γ -glutamyl)-putrescyny



*N*¹-mono (γ -glutamyl)-spermidyny



*N*⁸-mono (γ -glutamyl)-spermidyny



*N*¹/*N*¹²-mono (γ -glutamyl)-sperminy



N-bis (γ -glutamyl)-putrescyny



*N*¹,*N*⁸-bis (γ -glutamyl)-spermidyny



*N*¹, *N*¹²-bis (γ -glutamyl)-sperminy

RYCINA 2. Putrescyna, spermidyna i spermina mogą być acylowymi akceptorami (substratami) w reakcji katalizowanej przez transglutaminazy. Reakcja z pierwszorzędową grupą aminową poliaminy daje mono-(γ -glutamylowe) pochodne. Kolejno w reakcje wchodzi drugorzędowa grupa aminowa i powstają bis-(γ -glutamylowe) pochodne. W odróżnieniu od putrescyny i sperminy, spermidyna jest asymetryczną molekułą. Spermidyna tworzy dwie konformacyjnie różne mono-(γ -glutamylowe) pochodne (na podstawie [30], zmodyfikowane).

2. BIOCHEMIA ROŚLINNYCH TRANSGLUTAMINAZ

2.1 Charakterystyka pierwszej roślinnej transglutaminazy

Kilku oczyszczonym roślinnym białkom może być przypisana funkcja TGazy. Obecnie jednak tożsamość tych białek jest niepoznana. Dodatkowo, nie znaleziono żadnej sekwencji w bazie dla rzodkiewnika (*Arabidopsis thaliana*), kukurydzy (*Zea mays*), ryżu (*Oryza sativa* L) czy ziemniaka (*Solanum tuberosus*), zbliżonej do sekwencji zwierzęcej TGazy. To utrudnia czy nawet wyklucza możliwość zidentyfikowania roślinnej TGazy poprzez porównanie jej sekwencji z sekwencją dobrze poznanej zwierzęcej TGazy [35].

W latach dziewięćdziesiątych poza częściowo oczyszczonym białkiem o masie 39 kDA pochodzącym z chloroplastów [12] tylko Kang i inni [20] wyizolowali białko o masie 80kDa z liści soi, do tej pory zresztą niezsekwencjonowane, które charakteryzowało się aktywnością TGazy.

Niedawno wykazano u *Arabidopsis thaliana* obecność genu *AtPng1p*, którego sekwencja zbliżona była do N-glikanazy. *AtPng1p* zawiera cysteinę, histydynę, asparaginę (Cys-His-Asp) sekwencję aminokwasów charakterystyczną dla katalitycznej domeny TGazy. W genomie *Arabidopsis thaliana*, tylko *AtPng1p* ma centrum katalityczne o tej sekwencji. Glikanazy są enzymami zaangażowanymi w degradację białek, które nie osiągnęły swojej finalnej struktury. Jako amidazy, glikanazy mają resztę cysteiny, która jest nukleofilną resztą niezbędną do aktywności enzymu [35].

AtPng1p jest pojedynczym genem, który ulega ekspresji na bardzo niskim poziomie, aczkolwiek występuje powszechnie w komórce. W reakcji RT-PCR określono poziom mRNA dla opisywanego genu. W całej roślinie, w różnych jej organach, w różnych stadiach rozwoju, dla różnych przebadanych w pracy warunków świetlnych poziom mRNA był zbliżony [11]. Aby wykazać, czy *AtPng1p* rzeczywiście koduje TGazę, jego sekwencja kodująca została wklonowana do *Escherichia coli*. Rekombinowane białko było następnie oczyszczone przy użyciu chromatografii powinowactwa na kolumnach niklowych. Białko o masie 86 kDA zostało zlokalizowane przy użyciu trzech przeciwciał anti-TGazowych pochodzenia zwierzęcego. Dodatkowo, analiza *Western blot* przy użyciu przeciwciał skierowanych przeciwko rekombinowanemu białku *AtPng1p* wykazała jego obecność we frakcji mikrosomalnej *Arabidopsis thaliana*. Inne białka o niższej masie cząsteczkowej wykryto wykorzystując to samo przeciwciało do identyfikacji białek cytozolowych [11]. Nasunęło się pytanie, czy dodatkowe jednostki białkowe wykryte metodą *Western blot* mogą być wynikiem proteolitycznej degradacji białka *AtPng1p*, która ma miejsce w przypadku ekspresji TGazy pochodzenia zwierzęcego [16,25]. Rekombinowane białko, TGaza z *Arabidopsis thaliana*, włączało poliaminy (sperminę, spermidynę, putrescynę oraz biotyno-kadawerynę) do dimetylokazeiny tylko w obecności wapnia. Dodatkowo, analiza γ -glutamylowych pochodnych potwierdziła, że produkt genu *AtPng1p* ma aktywność Ca^{2+} -zależnej TGazy [11].

Jest to pierwsze białko roślinne, wyizolowane i scharakteryzowane na poziomie molekularnym, które ma właściwości zbliżone do enzymu zwierzęcego. Zatem można wysnuć hipotezę, że oczyszczone białko *AtPng1p*, aczkolwiek różniące się swoją

sekwencją od TGaz zwierzęcych, poza sekwencją aminokwasów w miejscu katalitycznym jest TGaz roślinną z różną historią filogenetyczną [11,35].

2.2. Wpływ wapnia, magnezu i grup tiolowych na aktywność enzymatyczną transglutaminaz

Wydaje się, że wewnątrzkomórkowa pula wapnia może mieć istotny wpływ na aktywność TGazy, czego konsekwencją jest włączanie PA do białek. Wiązanie się PA do białek obserwowano przy 20 nM stężeniu Ca^{2+} w komórce roślinnej [24]. Wcześniej obserwowano, że mikromolarne stężenie wapnia w komórce hamuje wiązanie się PA do białek [9,29]. W tych warunkach, roślinne TGazy mogą brać udział w formowaniu się wiązań typu ϵ -(γ -glutamyl)lizynowych izopeptydów [24]. Lilley i inni [24] wykazali udział TGaz w tworzeniu się wiązań izopeptydowych w komórce roślinnej. Tego typu wiązania będą pojawiać się zatem w środowisku, w którym występuje wyższe stężenie jonów Ca^{2+} np. w komórkach ściany bądź gdy zmagazynowany w komórce Ca^{2+} zostanie uwolniony np. w wyniku śmierci komórki.

Wstępne wyniki badań sugerują [33], że również jony Mg^{2+} mogą być istotnym elementem regulującym aktywność głównie chloroplastowej formy TGazy i wpływają na proces tworzenia wiązań krzyżowych hamująco.

Użycie inhibitorów blokujących tworzenie się mostków dwusiarczkowych podkreśla znaczenie grup tiolowych dla aktywności chloroplastowych i zlokalizowanych w ścianie komórkowej TGaz [19]. Dithiothreitol – czynnik redukujący stymulował aktywność enzymu w liściach soi [19,20].

Podanie inhibitorów proteaz w czasie inkubacji chloroplastów ze znakowaną SD powodowało słabsze wiązanie się tej poliaminy do białek. Próby bez inhibitorów charakteryzowały się jednak lepiej zachowanymi białkami i chlorofilem [19]. Autorzy sugerują, że

- a) częściowa proteoliza substratu, jakim jest kompleks LHCII, może odsłaniać miejsca dla wiązania się produktu lub
- b) być może subtelna proteoliza aktywuje chloroplastową TGazę (Chl-TGazę) albo
- c) inhibitory proteaz inaktywują tiolowe grupy cysteiny zlokalizowane w centrum aktywnym enzymu.

2.3. Wrażliwość na światło

W ostatnich latach pojawiły się pierwsze doniesienia, iż roślinne transglutaminazy są enzymami, których aktywność jest zależna od światła. Zależność tę zaobserwowano głównie w zielonych liściach, ściślej w całych chloroplastach i w ich subfrakcjach (stroma, tylakoidy) [5,9,15]. U zwierząt, u których funkcja i mechanizm reakcji TGaz jest lepiej poznany, nie zauważono, aby aktywność enzymu była regulowana światłem [16].

W różnicujących się chloroplastach, światło stymuluje jednocześnie wzrost poziomu TGazy i pojawianie się produktów reakcji, którą ten enzym katalizuje. Hipotezę tę wspierają doświadczenia prowadzone *in vitro* na etiolowanych tkankach bulwy

Helianthus tuberosus L. Światło zwiększało poziom TGazy w komórce, którą analizowano wykorzystując przeciwciało z prostaty szczura, wykrywające białko o masie 58 kDa [9]. W warunkach *in vivo*, światło wpływało na zwiększoną ekspresję niektórych substratów TGaz m.in. genów alfa i beta tubulin oraz kilku plastydowych białek, takich jak Rubisco czy białek kompleksów (LHCI, LHCII) i innych, co sugerowało udział tego enzymu w procesie ontogenezy plastydu [9].

Postulowano również, że nowa forma enzymu, charakterystyczna dla liści, pojawia się, kiedy etiolowane tkanki poddane są działaniu światła. Efekt ten badano w hodowli *in vitro* eksplantów (parenchyma bulwy *Helianthus tuberosus* L.) pierwotnie nie fotosyntezujących, pozbawionych zielonych plastydów i wykształconego systemu błon tylakoidowych. Eksplanty poddawano działaniu hormonów, które stymulowały lub hamowały różnicowanie się chloroplastów pod wpływem światła [5].

W toku innych badań, przeprowadzanych na kukurydzy, w reakcji z znakowaną PU zarówno oczyszczona frakcja tylakoidów, jak i LHCII były bogate w mono- jak i bis-glutamyl-PU. Pochodne glutamylowe pojawiały się w wymienionych układach na świetle. W ciemności można było wykryć jedynie śladowe ilości tych związków [12]. Wyniki te pozwalają spekulować, że aktywność plastydowych TGaz regulowana jest przez światło. Jak donosi Della Mea i inni [12], znane, zależne od światła zmiany strukturalne LHCII powodują dwie charakterystyczne reszty glutaminy, a odległość, o jaką są oddalone, jest zbliżona do molekularnego rozmiaru SM, która może formować bis-glutamyl-SM-owe mostki.

Wspomniane reszty glutamylu, które mogą wchodzić w reakcje z PA, *in vivo* są zlokalizowane w pętli utworzonej ze światła gran, gdzie pH jest niższe niż to, w którym przebiega proces fotosyntezy i to, które jest optymalne dla aktywności enzymatycznej TGazy [9]. Testowanie TGaz pochodzenia zwierzęcego w materiale roślinnym sugeruje, że nie wszystkie reszty glutamylu LHCII są dostępne dla tych enzymów. TGazy pochodzące zarówno z erytrocytów, jak i wątroby świnki morskiej są głównie enzymami cytoplazmatycznymi, a ich hydrofilność utrudnia im funkcjonowanie w hydrofobowym środowisku LHCII. Kataliza przy użyciu tych enzymów prowadzi jedynie do otrzymania mono-pochodnych [12]. Dla kontrastu tylakoidowa transglutaminaza (Tyl-TGaza) katalizuje znaczną ilość bis-pochodnych, które można zaobserwować we frakcji izolowanych chloroplastów. Tylakoidowy enzym z powodu swojego małego rozmiaru i specyficzności działania może pełnić rolę strukturalną i mieć swój udział w stabilizacji kompleksu LHCII. Della Mea i inni [12] sugerują, że Tyl-TGaza jest zlokalizowana blisko LHCII bądź jest z nim związana. LHCII ma miejsce wiązania Ca^{2+} o wysokim powinowactwie (wapń jest wykorzystywany w procesie formowania się gran) i miejsce wiązania Ca^{2+} o niższym powinowactwie, być może miejsce to jest istotne dla Ca^{2+} -zależnej katalizy przeprowadzanej przez Tyl-TGazę. Podobieństwa zaobserwowane u roślin jedno- i dwuliściennych wskazują na to, że tylakoidowa forma tego enzymu jest częściowo zależna od światła. Ponadto modulowana światłem zmiana konformacji LHCII może wpływać na aktywność enzymu [12,15].

3. FUNKCJE ROŚLINNYCH TRANSGLUTAMINAZ

Różnice, które obserwujemy w charakterystyce TGaz w różnych organach tej samej rośliny, mogą wynikać z faktu, iż być może więcej niż jeden enzym czy różne formy tego samego enzymu są obecne w jednym organizmie [30,32]. U roślin TGazy prawdopodobnie pełnią rolę, jaką przypisuje się im w komórkach zwierzęcych. Jednak ich lokalizacja w konkretnych przedziałach komórkowych i różne substraty, które wykorzystywane są w reakcji enzymatycznej, mogą sugerować, że roślinne TGazy spełniają dodatkowe funkcje w komórce roślinnej, nieznane u zwierząt [10, 30,32]. W tabeli ujęto lokalizację enzymu w obrębie komórki roślinnej i przedstawiono biologiczną funkcję, jaką pełnią w niej TGazy. Występowanie enzymu u roślin zasugerowano wskutek

TABELA. Lokalizacja transglutaminaz i ich udział w procesach morfologicznych i fizjologicznych rośliny (na podstawie [10], zmieniono)

FUNKCJA BIOLOGICZNA	ORGANIZM	ORGAN, TKANKA, ORGANELLA	LITERATURA
Podziały komórkowe	<i>Helianthus tuberosus</i> <i>Dunaliella salina</i>	parenchyma, merystem wierzchołkowy całe komórki	[30] [29] [13,14]
Wzrost apikalny	<i>Malus domestica</i> <i>Candida albicans</i>	pyłek grzybnia	[8] [28]
Rozwój/Różnicowanie	<i>Helianthus tuberosus</i> <i>Zea mays</i> <i>Vicia faba</i> <i>Hordeum vulgare</i> <i>Pisum sativum</i> <i>Arabidopsis thaliana</i> <i>Physarium</i> sp. <i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	kallus jw. liście/korzenie jw. jw. wzrost ściana komórkowa k. wegetatywne, zygota	[5] [1] [24] [11] [21] [36]
Fotosynteza/Fotoprotekcja	<i>Beta vulgaris</i> <i>Medicago sativa</i> <i>Helianthus tuberosus</i> <i>Glycine max</i> <i>Helianthus tuberosus</i> <i>Dunaliella salina</i> <i>Zea mays</i> jw.	liście pączki kwiatów chloroplasty/liście liście/siewki stroma/tylakoidy chloroplasty chloroplasty, grana kompleks LHCII	[33] [26] [6,7,9] [19] [15,] [13,14] [37] [12]
Odpowiedź na stres	<i>Dunaliella salina</i>	komórki	[13]
Magazynowanie białek	<i>Glycine max</i>	liścienie	[21]
Programowana śmierć komórki	<i>Nicotiana tabacum</i> <i>Solanum tuberosum</i> <i>Phaseolus aureus</i>	płatki kwiatów mitochondria jw.	[31] [38]

wykrycia PA związanych z białkami. Bezpośrednim dowodem na to, że TGaza jest odpowiedzialna za tego typu koniugację, była izolacja cząsteczek glutamyl-PA [5].

TGazy roślinne po raz pierwszy zidentyfikowano w dzielących się komórkach, takich jak etiolowany merystem wierzchołkowy, czy podczas analizy cyklu komórkowego [29, 30]. Podczas synchronicznego cyklu komórkowego w komórkach parenchymy *Helianthus tuberosus* L., zaobserwowano niską aktywność TGazy we wczesnej fazie G1 cyklu, która wzrastała podczas fazy S [30]. Równolegle zaobserwowano włączanie PA do białek o wysokiej masie cząsteczkowej (58 kD i 90 kDa) [9].

Lilley i inni [24] opisali aktywność TGaz w korzeniach i tkankach łodyg roślin dwuliściennych (groch, bób) oraz jednoliściennych (pszenica, jęczmień). U wszystkich tych gatunków aktywność tego enzymu była wyższa w korzeniach aniżeli w liściach. Zaobserwowano również związek pomiędzy aktywnością enzymu a wiekiem tkanki roślinnej. W korzeniach aktywność TGazy wzrastała w okresie wczesnego stadium rozwoju, natomiast w liściach, zarówno rozwijających się jak i dojrzałych, utrzymywała się na tym samym poziomie. TGazy „pracujące” w korzeniu, jak i w liściu były enzymami zależnymi od jonów Ca^{2+} , a stężenie wapnia wpływało na wydajność reakcji.

3.1. Udział TGaz w tworzeniu struktur komórkowych

3.1.1. Cytoplazma

TGaza w cytoplazmie bierze udział w tworzeniu jej struktury. Przy wzroście aktywności TGazy zaobserwowano gwałtowną reorganizację cytoszkieletu u tworzącej się łagiewki pyłkowej [8]. Po inkubacji pyłku ze znakowaną PU na autoradiogramie pojawiły się dwa białka o masie 43 i 55 kDa. Białka te zidentyfikowano przy użyciu przeciwciał dla anty-aktyny i anty-tubuliny. Dodatkowo zaobserwować można było agregaty o wyższej masie cząsteczkowej.

3.1.2. Ściana komórkowa

W ścianie komórkowej funkcję strukturalną, jaką może pełnić TGaza, można określić na podstawie doświadczeń wykonanych na glonach *Chlamydomonas reinhardtii* [32,36]. TGazy wpływają na prawidłową strukturę wchodzących w skład ściany glikoprotein. Podczas cyklu komórkowego glon wykształca dwie różniące się składem ściany. Ściana tzw. „wegetatywna”, w której tworzeniu bierze udział TGaza, otacza komórki zarówno wegetatywne, jak i generatywne i jest bogata w glikoproteiny rozpuszczalne w alkalicznym środowisku. *Chlamydomonas reinhardtii* wydziela poza protoplast TGazę o masie 72 kDa. Wzbogacenie ściany w glikoproteiny poprzedza wysoka aktywność enzymu. Zaobserwowano trójstopniowy proces: wzrost aktywności TGazy, poprzedzający syntezę glikoprotein i formowanie się „delikatnej struktury”, która organizuje się stopniowo w samotworzącą się „konstrukcję” ściany oraz oksydacyjną reakcję, w której wyniku tworzona jest finalna struktura ściany typu „wegetatywnego” [36]. Podawanie kadaweryny, SM, SD i PU w wysokim stężeniu do roztworu wpływało na zaburzenia w strukturze ściany. W ścianie komórkowej PA wiążą się do niezidentyfikowanych i zidentyfikowanych jako rozpuszczalne w środowisku alkalicznym glikoproteiny GP2 i GP3.

3.1.3. Chloroplasty

Obecność transglutaminaz stwierdzono w chloroplastach kapusty pekińskiej (*Brassica pekinensis*), w tylakoidach topinamburu (*Helianthus tuberosus*), szpinaku czy w chloroplastach glonu *Dunaliella salina* [30].

Przy zastosowaniu metod immunodetekcji w chloroplastach kalusa kukurydzy, topinamburu, rzodkiewnika (*Arabidopsis thaliana*), ziemniaka (*Solanum tuberosum*) i pomidora (*Lycopersicon esculentum*) wykryto transglutaminazy o masie cząsteczkowej ok. 58 kDa [1,30].

Wzrost poziomu transglutaminaz w trakcie różnicowania się chloroplastów oraz ich lokalizacja w tylakoidach gran (białka antenowe LHCII) sugerują, że TGazy mogą współuczestniczyć w procesie formowania się gran przez wiązanie PA do białek antenowych [12,37].

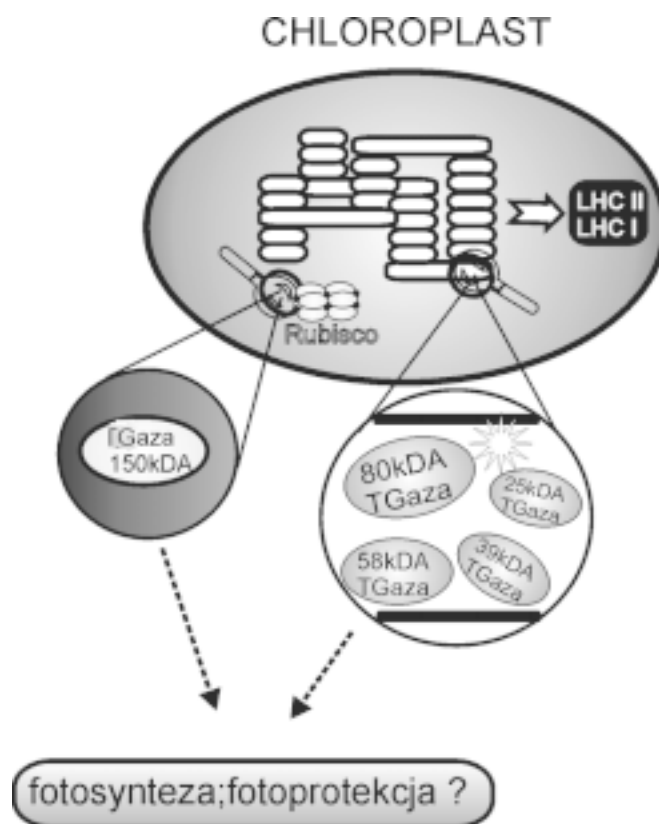
Zidentyfikowano niektóre substraty chloroplastowych transglutaminaz. W izolowanych chloroplastach *Helianthus tuberosus* znakowanych [¹⁴C]PU i [¹⁴C]SD w warunkach aktywności TGazy wiązały się do białek antenowych kompleksu chlorofil a/b-białko zbierającego energię świetlną (LHCII) oraz do białek kompleksów chlorofilowo-białkowych przekazujących energię wzbudzenia: CP24, CP26, CP29 [6,9].

Innym substratem TGazy w chloroplastach *Medicago sativa* i *Helianthus tuberosus* była większa podjednostka Rubisco. Wydaje się, że asocjacja podjednostek Rubisco może odbywać się przy udziale poliamin [6, 15,26]. Egzogenne dodanie poliamin (SD, SM) lub inhibitorów syntezy putrescyny (difluorometyloargininy) do poddanych stresowi osmotycznemu liści owsa hamowało degradację białek i utratę chlorofilu oraz stabilizowało białka tylakoidów D1, D2, cyt f i dużą podjednostkę Rubisco [2].

W chloroplastach *Helianthus tuberosus* przy zastosowaniu metod immunodetekcji zidentyfikowano chloroplastowe TGazy o masach 24 kDa, 58 kDa i 150 kDa [6,9,15]. Analiza PA-glutamyl pochodnych wykazała, że wiązanie PA do białek plastydowych przez TGazy ma miejsce w obydwóch kompartmentach chloroplastu – we frakcji tylakoidowej przez TGazy o masach 24 kDa i 58 kDa, a w stromie przez TGazę o masie 150 kDa [15]. Ponadto synergizm pomiędzy aktywnością enzymu w stromie i tylakoidach obserwowany w czasie doświadczenia był wyraźnie zależny od światła.

TGaza, której charakterystyka jest zbliżona do tej zidentyfikowanej u *Helianthus tuberosus* [15], została zlokalizowana w chloroplastach *Zea mays* L. [1,12]. Chloroplastowa TGaza kukurydzy preferowała wiązanie się SD do białek plastydowych i tworzenie się bis-pochodnych glutamylu [12]. Światło stymulowało aktywność enzymu. Izolacja kompleksu PSII (LHCII) i inkubacja wyizolowanej frakcji ze znakowanymi PU, SD i SM potwierdziły udział SD w potranslacyjnej modyfikacji białek kompleksu. Frakcja LHCII częściowo oczyszczona w gradiencie sacharozy, dodatkowo charakteryzowała się, poza białkami o masie 24 kDa i 58 kDa, białkiem o masie 39 kDa, rozpoznawanym przez przeciwciała anti-TG. Dwie metody oznaczania aktywności TGazy – kolorymetryczna i przy użyciu radioaktywnych poliamin – potwierdziły, że tylakoidowy enzym jest Ca²⁺-zależny [12].

Na rycinie 3 przedstawiono udział różnych transglutaminaz w poszczególnych subfrakcjach chloroplastów, gdzie katalityczna funkcja TGazy jest ściśle zależna od



RYCINA 3. Schemat udziału transglutaminaz (TGaz), w poszczególnych kompartmentach chloroplastów. Substratem TGazy stromy, formy enzymu niewymagającej dla swojej aktywności światła jest głównie Rubisco. Substratem dla zależnych od światła TGaz tylakoidowych są m.in. kompleksy chlorofil a/b-białko stanowiące główną antenę fotosystemu I i II (LHCI i LHCII). Włączanie poliamin w struktury białkowe chloroplastów przy udziale TGaz ma pozytywny wpływ na proces fotosyntezy i fotoprotekcję, co warunkuje prawidłowy wzrost i rozwój komórki (na podstawie [10], zmodyfikowane)

wapnia i prawdopodobnie wpływa na proces fotosyntezy i/lub fotoprotekcję, co ma pozytywny wpływ na wzrost i rozwój rośliny [10].

4. TGAZY W PROGRAMOWANEJ ŚMIERCI KOMÓRKI (PCD)

Badania nad procesem starzenia są istotne z uwagi na ich podstawowy i aplikacyjny charakter. Świeżo zerwane liście sałaty, które spożywamy czy świeżo ścięte kwiaty mają bardzo krótki okres przechowywania. Dlatego badania nad zabezpieczeniem komórki przed przyspieszonym starzeniem się głównym przedmiotem badań aplikacyjnych [39]. Chloroplasty są pierwszymi organellami, które ulegają degradacji w postępującym procesie starzenia. Bardzo szybko stają się nieaktywne, a białka fotosystemów poddane są proteolizie. Degradacji ulega też związany z nimi chlorofil [2].

W starzejących się płatkach kwiatów, obok takich zjawisk, jak rozpad jądra komórkowego, fragmentacja DNA, modyfikacje w strukturze ściany komórkowej, spadek stężenia białka w komórce, obniżenie się zawartości wody i pigmentów, zmniejszenie integralności błon, zaobserwowano wzrost w aktywności TGazy, postrzegany jako wzrost poziomu pochodnych glutamyl-PA oraz wzrost ilości modyfikowanych białek [31]. Być może w PCD zaangażowana jest jedna z form TGazy o masie 58 kDa, którą zlokalizowano przy pomocy metod immunologicznych. Zaobserwowano, że w procesie starzenia płatków kwiatów, po egzogennym podaniu SM, mimo że nastąpiła fragmentacja DNA i uszkodzenia wakuoli, żywotność chloroplastów została zauważalnie przedłużona. Zahamowanie procesu degradacji chloroplastów może być związane z kowalentnym wiązaniem się SM do substratów TGaz zlokalizowanych w różnych kompartmentach komórki, nie tylko w chloroplastach [31].

PA znane są jako czynnik anty-starzeniowy w liściach: opóźniają ten proces poprzez tymczasowe zabezpieczenie błon przed rozpadem, opóźniają degradację kwasów nukleinowych i białek wchodzących w skład fotosystemów [2,23,27].

Votyakova i inni [38] badali włączanie się PA do białek roślinnych mitochondriów. Organelle izolowano z ziemniaków (*Solanum tuberosus* L.) i fasoli (*Phaseolus aureus* Roxb.). Aktywność TGaz wykazano poprzez oznaczenie przy użyciu radioaktywnych poliamin ich glutamylowych pochodnych. Aktywność enzymu była zależna od temperatury (brak włączania przy 0°C). Aktywność TGazy we frakcji matriks mitochondrialnej nie wzrastała proporcjonalnie do czasu, podczas gdy we frakcji błon obserwowano znaczny wzrost radioaktywności w czasie inkubacji. Zatrzymanie reakcji na różnych etapach włączania się radioaktywnych PA pokazało, że spójność struktury błon jest nierozdzielnie związana z włączaniem się PA w te struktury podczas translacji bądź w wyniku modyfikacji potranslacyjnej. Jedno z białek, które uległo modyfikacji, zidentyfikowano jako białko błonowe charakteryzujące się sekwencją zbliżoną do katalazy (katalaza jest rozpuszczalnym białkiem matriks mitochondrialnego). To spostrzeżenie pozwoliło autorom na wysunięcie hipotezy, że poliaminy wiązane do białek prawdopodobnie poprzez TGazy mogą mieć swój udział w oksydatywnym metabolizmie w czasie apoptozy.

5. ASPEKT BIOTECHNOLOGICZNY

Wykorzystanie TGaz z uwagi na ich udział w tworzeniu „sieci” połączeń białkowych i powstawanie tzw. supramolekuł może mieć znaczenie aplikacyjne. Powszechnie stosuje się TGazy w przemyśle spożywczym. Dodawane są do mięs, ryb, chleba i przetworów mlecznych w celu ulepszenia ich jakości poprzez uzyskanie odpowiedniej konsystencji produktu [16].

To szerokie zastosowanie TGaz wpłynęło na opracowanie niedrogiego, wydajnego i bezpiecznego źródła do produkcji rekombinowanych białek. Bakteria *Streptococcus mobaraensis* [4,17,18,22] jest obecnie głównym systemem ekspresji, produkującym rekombinowane białko TGazy. Aczkolwiek białka produkowane w kulturach bakteryjnych nie są poddawane glikozylacji (brak glikozylacji, może prowadzić enzym do utraty stabilności bądź utraty funkcji biologicznej). Z dużo mniejszą wydajnością niż u eukariotów tworzone też są mostki dwusiarczkowe, co może wpływać na wadliwe

fałdowanie się białka bądź strącanie w formie ciał inkluzyjnych. Niektóre z tych problemów, głównie związane z modyfikacją potranslacyjną białek, mogą być rozwiązane poprzez użycie drożdżowego systemu ekspresji [40]. Jednak mechanizm glikozylacji u drożdży i u eukariotów jest różny.

Większość ludzkich białek produkuje się w liniach komórkowych ssaków. Ma to duże znaczenie dla zachowania prawidłowego przebiegu posttranslacyjnych modyfikacji. Jednak koszty, jakie wiążą się z założeniem i utrzymaniem takich sterylnych linii, są czynnikiem ograniczającym [16,40].

Roślinny system ekspresji jest znacznie tańszy, bezpieczniejszy, wydajny i wygodny. Rośliny wyższe są atrakcyjnym gospodarzem do ekspresji białek wykorzystywanych w produkcji farmaceutyków, pasz dla zwierząt, w przemyśle spożywczym, przy diagnostyce medycznej i terapii. Rekombinowane białka mogą być deponowane w nasionach, przechowywane w ciałach białkowych endospermy, gdzie chronione są przed cytoplazmatyczną proteolizą i późniejszą programowaną śmiercią komórki. Nasionie jest stabilne przez miesiące, a nawet lata. Zastosowanie systemu roślinnego pozwala również na redukcję kosztów dystrybucji i przechowywania. W przypadku białek, które są wykorzystywane w przemyśle, materiał roślinny może być bezpośrednio dodany na jednym z etapów produkcji, co dodatkowo eliminuje koszty ekstrakcji i oczyszczania [40].

Claparos i inni [3] zaproponowali system produkcji TGazy pozyskanej z prostaty szczura w roślinnym systemie ekspresji. W dojrzały zarodek ryżu wstrzyknięto konstrukt zawierający gen szczurzej TGazy działający pod konstytutywnym promotorem genu ubikwityny. Wprowadzony gen ulegał transkrypcji i translacji. Aktywność TGaz w materiale potwierdzono przy użyciu metody kolorymetrycznej *in vitro*. Enzym produkowany jest w nieaktywnej formie, co zabezpiecza komórki przed niekontrolowanym i bezcelowym tworzeniem się koniugatów białkowych. TGaza naturalnie występująca w gruczole ma formę nieaktywną, która zostaje uaktywniona w momencie wydzielania dokrewnego. Ryż mógłby zatem stać się alternatywnym systemem ekspresji rekombinowanej TGazy dla bakteryjnego *Streptococcus thermophilus*.

6. WNIOSKI

Badania nad roślinnymi TGazami opóźniają trudności związane z oczyszczeniem i z sekwencjonowaniem tych enzymów. Trudność stanowi także znalezienie sekwencji homologicznej pomiędzy TGazami pochodzenia zwierzęcego a jakąkolwiek sekwencją peptydów dostępną w roślinnej bazie danych, nawet jeśli baza ta zawiera w przypadku niektórych gatunków w pełni zsekwencjonowany genom. Kilka doniesień potwierdza jednak obecność i aktywność TGaz w komórce roślinnej:

- ◆ zidentyfikowano w ekstraktach roślinnych typowe produkty katalizy, pochodne glutamylowe poliamin,
- ◆ potwierdzono, że koniugacja grup aminowych wymaga jonów Ca^{2+} ,
- ◆ rozdzielone na żelu SDS-PAGE roślinne preparaty białkowe immunolokalizowano z pozytywnym efektem przy użyciu specyficznych przeciwciał anty-TGaz pochodzenia zwierzęcego,

- ◆ enzym roślinny prawdopodobnie zawierał cysteinę w swym centrum aktywnym, a jego aktywność zależna była od DTT,
- ◆ rekombinowane białko zawierające Cys-His-Asp obecne w domenie katalitycznej TGazy, pochodzące z *Arabidopsis thaliana* L., wykazywało typową aktywność TGazy.

LITERATURA

- [1] BERNET E, CLAPAROS I, DONDINI L, SANTOS M, SERAFINI-FRACASSINI D, TORNE JM. Changes in polyamine content, arginine and ornithine decarboxylases, and transglutaminase activities during light/dark phases (of initial differentiation) in maize callus and their chloroplasts. *Plant Physiol Biochem* 1999; **37**: 1–11.
- [2] BESFORD RD, RICHARDSON CM, CAMPOS JL, TIBURCIO AF. Effect of polyamines on stabilization complexes in thylakoid membranes of osmotically stressed oat leaves. *Planta* 1993; **189**: 201–206.
- [3] CLAPAROLS M I, BASSIE L, MIRO B, DEL DUCA S, RODRIGUEZ-MONTESINOS J, CHRISTOU P, SERAFINI-FRACASSINI D, CAPELL T. Transgenic rice as a vehicle for the production of the industrial enzyme transglutaminase. *Transgenic Res* 2004; **13**: 195–199.
- [4] CORTEZ JM, BONNER P, GRIFFIN M. A method for enzymatic treatment of textiles such as wool. World Patent 2002; W00204739.
- [5] DEL DUCA S, FAVALI A, SERAFINI-FRACASSINI D, PEDRAZZINI R. Transglutaminase-like activity during greening and growth of *Helianthus tuberosus* explants. *Protoplasma* 1993; **174**: 1–9.
- [6] DEL DUCA S, TIDU V, BASSI R, ESPOSITO C, SERAFINI-FRACASSINI D. Identification of chlorophyll-a/b proteins as substrates of transglutaminase activity in isolated chloroplasts of *Helianthus tuberosus* L. *Planta* 1994; **193**: 283–289.
- [7] DEL DUCA S, BENINATI S, SERAFINI-FRACASSINI D. Polyamines in chloroplasts: identification of their glutamyl- and acetyl-derivatives. *Biochem J* 1995; **305**: 233–237.
- [8] DEL DUCA S, BREGOLI AM, BERGAMINI C, SERAFINI-FRACASSINI D. Transglutaminase-catalyzed modification of cytoskeletal proteins by polyamines during the germination of *Malus domestica* pollen. *Sex Plant Reprod* 1997; **10**: 89–95.
- [9] DEL DUCA S, DONDINI L, DELLA MEA M, MUNOZ DE RUEDA P, SERAFINI-FRACASSINI D. Factors affecting transglutaminase activity catalysing polyamine conjugation to endogenous substrates in entire chloroplasts. *Plant Physiol Biochem* 2000; **38**(6): 429–439.
- [10] DEL DUCA S, SERAFINI-FRACASSINI D. Transglutaminases of Plant. [W] Metha K, [ed.]. Transglutaminases. Family of enzyme with diverse functions. Cleveland Ohio, USA, Eckert (in press).
- [11] DELLA MEA M, CAPARROS-RUIZ D, CLAPAROS I, SERAFINI-FRACASSINI D, RIGAU J. AtPnglp: The First Plant Transglutaminase. *Plant Physiol* 2004; **135**: 1–9.
- [12] 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 Light Harvesting Complex II by polyamines in a light-dependent way. *Planta* 2004; DOI: 10.1007/s00425-004-1278-6.
- [13] DONDINI L, BONAZZI S, SERAFINI-FRACASSINI D. Recovery of growth capacity and of chloroplast transglutaminase activity induced by polyamines in a polyamine-deficient variant strain of *Dunaliella salina*. *J Plant Physiol* 2000; **157**: 473–480.
- [14] DONDINI L, BONAZZI S, DEL DUCA S, BREGOLI AM, SERAFINI-FRACASSINI D. Acclimation of chloroplast transglutaminase to high NaCl concentration in a polyamine-deficient variant strain of *Dunaliella salina* and in its wild type. *J Plant Physiol* 2001; **158**: 185–197.
- [15] DONDINI L, DEL DUCA S, DALL'AGATA L, BASSI R, GASTALDELLI, DELLA MEA M., DI SANDRO A, CLAPAROS I, SERAFINI-FRACASSINI D. Suborganellar localisation and effect of light on *Helianthus tuberosus* chloroplast transglutaminases and their substrates. *Planta* 2003; **217**: 84–95.
- [16] GRIFFIN M, CASADIO R, BERGAMINI CM. Transglutaminase: nature's biological glues. *Biochem J* 2002; **368**: 377–396.
- [17] IRANZO M, AGUADO C, PALLOTTI C, CANIZARES JV, MORMENEO S. Transglutaminase activity is involved in *Saccharomyces cerevisiae* wall construction. *Microbiology* 2002; **148**: 1329–1334.
- [18] ISHII C, SOEDA T, YAMAKAZI K. Method for the production of yoghurt. Eur Patent 1994; EP0610649.
- [19] KANG H, CHO YD. Purification and properties of transaminase from soybean (*Glycine max*) leaves. *Biochem Biophys Res Commun* 1996; **223**: 288–292.

- [20] KANG H, LEE SG, CHO YD. Identification of glycinin *in vivo* as a polyamine-conjugated protein via a γ -glutamyl linkage. *Biochem J* 1998; **332**: 467–73.
- [21] KLEIN JD, GUZMAN E, KUEHN GD. Purification and partial characterization of transglutaminase from *Physarum polycephalum*. *J Bacteriol* 1992; **174**: 2599–2605.
- [22] KURALSHI C, SAKAMOTO J, YAMAZAKI M, SUSU Y, KUHARA C, SOEDA T. Production of restructured meat using microbial transglutaminase without salt or cooking. *J Food Sci* 1997; **62**: 488–497.
- [23] LEGOCKA J, SOBIESZCZUK-NOWICKA E. Poliaminy w chloroplastach. *Post Biol Kom* 2004; **31(1)**: 143–153.
- [24] LILLEY G, SKILL J, GRIFFIN M, BONNER PL. Detection of Ca^{2+} -dependent transglutaminase activity in root and leaf tissue of monocotyledoneous and dicotyledoneous plants. *Plant Physiol* 1998; **17**: 1115–1123.
- [25] LORAND L, GRAHAM RM. Transglutaminases: crosslinking enzymes with pleiotropic functions. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2003; **4**: 140–156.
- [26] MARGOSIAK SA, DHARMA A, BRUCE-CAVER MR, GONZALES AP, LOUIE D, KOEHN GD. Identification of the large subunit of ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase as a substrate for transglutaminase in *Medicago sativa* L. (alfalfa). *Plant Physiol* 1990; **92**: 88–96.
- [27] NIKLAS A, BUTOWIT R, JAŹDŻEWSKA E, MAJEWSKA-SAWKA A. Poliaminy w komórce roślinnej: synteza, mechanizm działania i funkcja. *Post Biol Kom* 1998; **25**: 33–49.
- [28] RUIZ-HERRERA J, IRANZOM, ELORZA MV, SENTANDREU R, MORMENOS S. Involvement of transglutaminase in the formation of covalent cross-links in the cell wall of *Candida albicans*. *Arch Microbiol* 1995; **164**: 186–193.
- [29] SERAFINI-FRACASSINI D, DEL DUCA S, D'ORAZI D. First evidence for polyamine conjugation mediated by an enzymic activity in plant. *Plant Physiol* 1988; **87**: 757–761.
- [30] SERAFINI-FRACASSINI D, DEL DUCA S, BENINATI S. Plant Transglutaminases. *Phytochem* 1995; **40(2)**: 355–365.
- [31] SERAFINI-FRACASSINI D, DEL DUCA S, MONTI F, POLI F, SACCHETTI G, BREGOLI AM, BIONDI S, DELIA MEA. Transglutaminase activity during senescence and programmed cell death in the corolla of tobacco (*Nicotiana tabacum*) flowers. *Cell Death Differ* 2001; **9**: 309–321.
- [32] SERAFINI-FRACASSINI D, DEL DUCA S. Biochemistry and function of plant transglutaminases. *Minerva Biotech* 2002; **14**: 135–141.
- [33] SIGNORINI M, BENINATI S, BERGAMINI C. Identification of transglutaminase activity in the leaves of silver beet (*Beta vulgaris* L.). *J Plant Physiol* 1991; **137**: 547–552.
- [34] SIŃSKA I. Poliaminy i aminy aromatyczne. [w] Jankiewicz LS. [red.]. Regulatory wzrostu i rozwoju roślin. Właściwości i działanie. Warszawa, Wydaw. Nauk. PWN 1997; 150–166.
- [35] SUZUKI T, PARK H, ANDERSON TILL E, LENNARZ WJ. The PUB domain: a putative protein-protein interaction domain implicated in the ubiquitin-proteasome pathway. *Biochem Biophys Res Commun* 2001; **287**: 1083–1087.
- [36] WAFENSCHMIDT S, KUSCH T, WOESSNER JP. A transglutaminase immunologically related to tissue transglutaminase catalyzes cross-linking of cell wall proteins in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiol* 1999; **121**: 1003–1015.
- [37] VILLALOBOS JM, TORNE J, RIGAU I, OLLES I, CLAPAROS M, SANTOS V. Immunogold localization of transglutaminase related to grana development in different maize cell types. *Protoplasma* 2001; **216**: 155–163.
- [38] VOTYAKOVA VT, WALLACE HM, DUNBAR B, WILSON SB. The covalent attachment of polyamines to proteins in plant mitochondria. *Eur J Biochem* 1999; **260**: 250–257.
- [39] ZABEL M. Uszkodzenie i śmierć komórki. [w] Kawiak J, Mirecka J, Olszewska M, Warchoła J. [red.]. Podstawy Cytofizjologii. Warszawa, Wydaw. Nauk. PWN 1997; 374–391.
- [40] ZENKTELER E, BACH A, SKUCIŃSKA B. Zastosowanie praktyczne biotechnologii. [w] Malepszy S. [red.]. Biotechnologia roślin. Warszawa, Wydaw. Nauk. PWN 2001; 261–306.

Redaktor prowadzący – Maria Olszewska

Otrzymano: 07.04.2005 r.

Przyjęto: 23.05.2005 r.

Al. Niepodległości 14, 61-713 Poznań

e-mail: legocka@amu.edu.pl