

Received: 2005.03.29
 Accepted: 2005.06.21
 Published: 2005.07.11

Udział transglutaminazy 2 w chorobach autoimmunologicznych

The involvement of transglutaminase 2 in autoimmune diseases

Maciej Ostrowski¹, Magdalena Izdebska¹, Alina Grzanka¹, Agnieszka Żuryń¹, Dariusz Grzanka²

¹ Katedra i Zakład Histologii i Embriologii Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu Collegium Medicum im. L. Rydygiera w Bydgoszczy

² Katedra i Zakład Patomorfologii Klinicznej Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu Collegium Medicum im. L. Rydygiera w Bydgoszczy

Streszczenie

Transglutaminaza 2 jest enzymem katalizującym procesy transacylacji i dezaminacji białek. Przeniesienie reszty acylowej glutaminy na grupę aminową lizyny białka akceptorowego jest jedną z kowalencyjnych posttranslacyjnych modyfikacji białek regulujących aktywność pewnych polipeptydów. Oligomeryzacja białek kontrolowana przez TG2 jest przyczyną powstawania nierozpuszczalnych w detergentach wielkocząsteczkowych agregatów. Inkluzje te są obecne w komórkach ulegających degeneracji np. choroba Parkinsona czy Alzheimer. Wysoka ekspresja TG2 jest notowana w komórkach apoptotycznych. Białka zapasowe nasion zbóż są bogate w glutaminę – aminokwas będący substratem TG2. Deaminacja glutaminy jest najważniejszą reakcją inicjacji procesu zapalnego podczas glutenozależnej enteropatii (celiakii). Produkty zbożowe zawierające gluten są przyczyną występowania odczynu zapalnego u dzieci z predyspozycją do celiakii. Oddziaływanie kwasu glutaminowego – produktu aktywności TG-azy, z antygenami głównego kompleksu zgodności tkankowej klasy II (MHC II) wywołuje odpowiedź autoimmunologiczną z udziałem limfocytów T CD4⁺. Poznanie charakterystyki kinetycznej i molekularnej transglutaminazy 2, przyczyniło się do znalezienia peptydu, który zastępuje gliadynę i nie wywołuje odpowiedzi immunologicznej.

Słowa kluczowe:

transglutaminaza • choroby autoimmunologiczne • celiakia • proces zapalny • apoptoza

Summary

Transglutaminase 2 (TG-ase 2) is one of the enzymes which catalyzes the deamination and transacylation of proteins. The transfer of a glutamine acyl residue to a lysine amine group of the acceptor protein is one of the posttranslational covalent modifications regulating some polypeptide activities. The control of protein oligomerization by TG-ase 2 is a cause of the formation of detergent-insoluble macromolecular aggregates. These inclusions are present in degenerating cells during, for example, Alzheimer's and Parkinson's disease. Overexpression of TG-ase 2 has been noted in apoptotic cells. Protein reserves in cereals are rich in glutamine, a substrate of TG-ase 2. Deamination of glutamine is the most important reaction for the initiation of the inflammatory process during gluten-dependent disease of the gut (celiac disease). Grains that contain gliadin are a cause of inflammatory reaction in children with intolerance to glutene. Interactions of the TG-ase product-glutamate with antigens of the major histocompatibility complex type II (MHC II, or HLA DQ) cause autoimmune reaction by CD4⁺ T lymphocytes. Knowledge of the

kinetic and molecular character of TG-ase 2 has contributed to finding peptides to replace gliadin. These molecules do not evoke immunological events.

Key words: transglutaminase • autoimmunological diseases • celiac disease • inflammatory process • apoptosis

Full-text PDF: http://www.phmd.pl/pub/phmd/vol_59/7730.pdf

Word count: 1809

Tables: –

Figures: 2

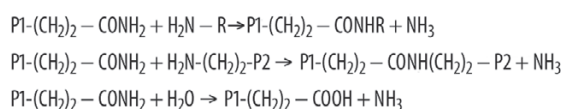
References: 54

Adres autora/ autorki: mgr Maciej Ostrowski, Katedra i Zakład Histologii i Embriologii, Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu Collegium Medicum im. L. Rydygiera w Bydgoszczy, ul. Karłowicza 24, 85-092 Bydgoszcz; e-mail: macost2@wp.pl

Wykaz skrótów: **CAG** – kodon glutaminy; **COX** – cyklooksigenaza; **HLA** – antygen leukocytów człowieka (human leukocyte antigen); **IFN-γ** – gamma interferon; **IL** – interleukina; **KVLD** – lizyna-walina-leucyna – kwas asparaginowy; **LOX** – lipooksygenaza; **MHC** – główny kompleks zgodności tkankowej (major histocompatibility complex); **PLA** – fosfolipaza A; **PLC** – fosfolipaza C; **TG** – transglutaminaza (transglutaminase); **tTG** – transglutaminaza tkankowa; **TGF-β** – czynnik wzrostu guza

1. WSTĘP

Transglutaminaza 2 (EC 2.3.2.13) – TG 2, zwana też transglutaminazą tkankową (tTG) należy do licznej rodziny enzymów katalizujących procesy transacylacji i dezaminacji różnych substratów. Do rodziny tej należą: TG1, TG2, TG3, TG5, TG6, TG7, a także czynnik krzepnięcia krwi XIII A oraz transglutaminaza gruczołu krokowego [45]. Pierwsze cztery izoformy tego białka ulegają ekspresji podczas końcowych etapów różnicowania komórek nabłonka oraz w trakcie apoptozy keratynocytów [45]. Niezależnie od tego aktywna funkcjonalnie TG2 jest obecna we wszystkich tkankach. Enzym ten katalizuje następujące reakcje:



P1 – białko 1

P2 – białko 2

R – reszta aminokwasowa

Ryc. 1. Równania reakcji katalizowanych przez transglutaminazę 2

Transglutaminaza 2 jest odpowiedzialna za zależne od jonów Ca^{2+} utworzenie wiązania izopeptydowego między γ -amidową grupą glutaminy (donor), a ϵ -aminową grupą lizyny (akceptor reszty acylowej). Następstwem tej reakcji jest przeniesienie reszty acylowej z jednego substratu na drugi, czemu towarzyszy uwolnienie amoniaku. Akceptorami grupy acylowej są przeważnie grupy aminowe aminokwasów lub amin (np: histaminy). Substratami mogą być także poliaminy: putrescyna lub spermidyna – wówczas produktem jest np.: N^7-N^8 – (γ -glutamylspermidyna). Jeżeli akceptorem grupy acylowej jest grupa aminowa lizyny innego białka, wówczas powstają nierozpuszczalne w detergentach agregaty białek spotykane w komórkach

ulegających degeneracji. Substratem grupy γ -amidowej może być cząsteczka wody, podczas tej reakcji hydrolizie ulega wiązanie amidowe, a produktami są amoniak oraz kwas glutaminowy eksponujący ujemnie naładowaną grupę COO^- . Reakcja transacylacji jest jedną z kowalencyjnych posttranslacyjnych modyfikacji białek. Owa modyfikacja odpowiada również za oddziaływania białek macierzy zewnątrzkomórkowej z powierzchnią błony [46,47] oraz za regulację aktywności niektórych enzymów [3,44]. TG2 jest jednym z czynników kontrolujących oligomeryzację białek. Według niektórych badaczy tworzenie nierozpuszczalnych cząsteczek białek uniemożliwia wypływ makromolekuł z komórek realizujących proces apoptozy [13,47]. Prace eksperymentalne z początku lat dziewięćdziesiątych XX wieku oraz ostatnie wyniki Bernasolli i wsp. [3] wskazują na transglutaminazę 2 jako jeden z ważniejszych enzymów kontrolujących klatrynozę niezależną internalizację receptorów insuliny. Wiadomo również, że transglutaminaza 2 ma aktywność podjednostki α białek G. Nakaoka i wsp. [33] przedstawili udział TG 2 w transdukcji sygnału odbieranego przez receptory $\alpha 1$ -adrenergiczne. Transglutaminaza stymuluje w tym przypadku szlak z udziałem fosfolipazy C (PLC).

Wynikiem deaminacji glutaminy jest kwas glutaminowy, który oddziałuje z przedstawicielami drugiej klasy białek głównego kompleksu zgodności tkankowej MHC, do których zaliczono HLA-DQ2. Antygeny te obecne na powierzchni makrofagów i komórek prezentujących antygen są rozpoznawane przez receptory limfocytów T CD4⁺ naciekających śluzówkę jelit dzieci chorych na celiakię (glutenozależną chorobę trzewną). Inny antygen tej klasy HLA-DQ8 ma zdolność wiązania formy amidowej aminokwasu i w tej postaci aktywuje reakcje autoimmunologiczne [19,26,50]. Zjawiska autoimmunologiczne są regulowane m.in. autologicznie z udziałem HLA. Odpowiedź ta opiera się na oddziaływaniach tego samego fenotypu antygenowego na powierzchni limfocyty i komórki prezentującej antygen.

Prolaminy i gluteliny są białkami zapasowymi ziarniaków zbóż. Nazwy tych polipeptydów wywodzą się od gatunków roślin, z których pochodzą. Gliadyny są prolaminami pszenicy i wyróżnia się wśród nich trzy frakcje różniące się masą cząsteczkową: 30, 40, 100 kDa. Białka te są zdolne do tworzenia wielkocząsteczkowych agregatów za pomocą wiązań jonowych, hydrofobowych i wodorowych. Cząsteczka gliadyny obfituje w glutaminę – aminokwas będący substratem transglutaminazy 2. Badacze zwrócili uwagę, iż produkt deaminacji glutaminy pochodzącej z glutenu, odpowiada za uruchomienie odpowiedzi autoimmunologicznej organizmu prowadzącej do rozwoju enteropatii. Stężenie przeciwciał anti t-TG w surowicy chorych dzieci jest jednym z czynników diagnostycznych tej choroby [1,2,6,9,21,27,29,30,38,48,49].

2. CHARAKTERYSTYKA KATALIZY ENZYMATYCZNEJ Z UDZIAŁEM TG-AZY 2

Badacze wyjaśniający patogenezę celiakii oraz innych chorób, których podstawą są zjawiska autoimmunologiczne, zwrócili uwagę na mechanizmy reakcji katalizowanych przez transglutaminazę. Prace Liu i wsp. [24] oraz Fleckensteina i jego zespołu [12] dowiodły udziału triady aminokwasów: Cys²⁷⁷, His³³⁵, Asp³⁵⁸ obecnych w centrum aktywnym enzymu w katalizie enzymatycznej. Glutamina zostaje przyłączona do cząsteczki enzymu przez wytworzenie wiązania tioestrowego z resztą Cys²⁷⁷ jako acyloenzym. Jednocześnie uwalnia się amoniak. W drugim etapie powstaje wiązanie izopeptydowe między resztą kwasu glutaminowego, a grupą aminową lizyny substratu białkowego. Dane kinetyczne wykazały znacznie wolniejszy przebieg reakcji deaminacji niż transacylacji [24,34]. Wiadomo, że produkty aktywności transglutaminazy 2 biorą udział w powstawaniu choroby autoimmunologicznej jaką jest celiakia. Doświadczenia przeprowadzone przez Fleckensteina [12], a także wcześniejsze badania wykazały istnienie mechanizmu odpowiadającego za wybór jednej z dróg reakcji – hydrolizy lub transacylacji. Grupa imidazolowa histydyny 335 „ściąga” proton z cysteiny 277 zwiększając jej charakter nukleofilowy. Dzięki temu jest możliwe powstanie wiązania tioestrowego między substratem, a resztą cysteiny centrum aktywnego. Uprotonowana postać histydyny jest stabilizowana oddziaływaniami elektrostatycznymi z resztą kwasu asparaginowego 358. Reakcja acylacji może zatem zachodzić w pH alkalicznym lub obojętnym, a optymalne warunki dla tego procesu zanotowano w pH 7,3 [31,51]. Środowisko takie występuje tuż pod błoną podstawną, na której znajdują się enterocyty. Wnętrze lizosomów na skutek aktywności pompy protonowej, ma pH kwaśne. Transglutaminaza 2, która trafia do tego przedziału za pośrednictwem klatrynozależnej endocytozy z przestrzeni pozakomórkowej, wykazuje większą aktywność w deaminacji gliadyny. Powodem tego jest uprotonowanie grupy aminowej akceptora. W tych warunkach cząsteczka wody dokonuje ataku na acyloenzym uwalniając kwas glutaminowy. Nie bez znaczenia jest także reszta histydyny 335. Protonacja pierścienia imidazolowego tego aminokwasu znosi aktywność transacylacji [25]. Wyniki innych badań wskazują na istnienie pary jonowej między resztą sulfhydrylową Cys²⁷⁷, a pierścieniem imidazolowym His³³⁵, stabilizującej konformację grup centrum aktywnego enzymu. Iismaa i wsp. [16] zwrócili uwagę na zachowaną w proce-

sie ewolucji resztę tryptofanu w pozycji 241. Wcześniejsze badania kinetyczne dowiodły, iż najwolniejszym etapem procesu katalizowanego przez TG2, jest reakcja acylacji [15]. Stan przejściowy tej reakcji polega na wytworzeniu acyloenzymu. Dokładniejsze obserwacje pozwoliły ustalić, iż stan ten charakteryzuje tetraedryczna konformacja [32,34]. Za stabilizację tego kompleksu odpowiadają oddziaływania natury hydrofobowej i wiązań wodorowych między resztą Trp²⁴¹, a substratem. Substytucja tryptofanu w tym miejscu innym aminokwasem aromatycznym: fenyloalaniną lub tyrozyną, wywoływała obniżenie stabilizacji stanu przejściowego reakcji. Konserwatyzm występowania tryptofanu w pozycji 241 przemawia za wyborem pierścienia indolowego jako gwaranta regulacji struktury stanu przejściowego [16,32]. Istniejące podobieństwo między strukturą centrum aktywnego i mechanizmem reakcji proteaz cysteinowych, takich jak: katepsyna B, papaina czy kaspazy oraz funkcjonowaniem TG2, sugeruje genetycznie wspólne pochodzenie tych enzymów [4,10,25,31,32].

3. ROLA PRODUKTÓW AKTYWNOŚCI TG-AZY 2 W PATOGENEZIE CELIAKII

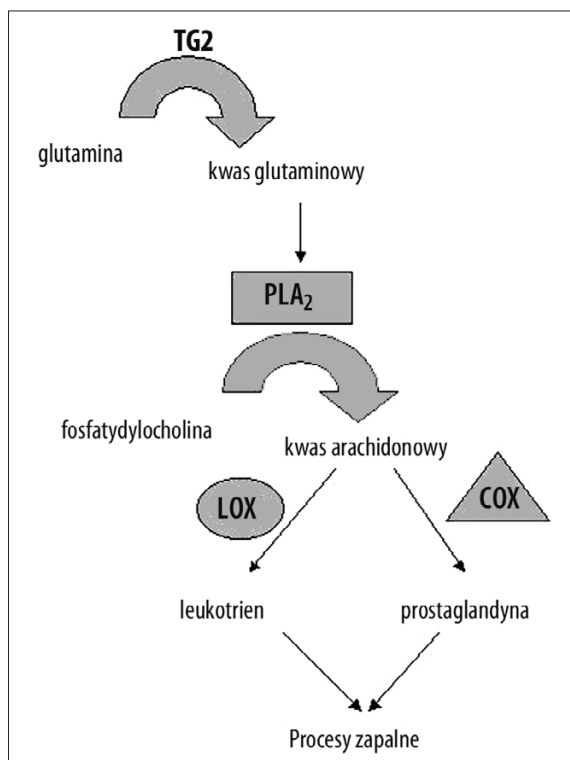
Wyniki badań z użyciem rekombinowanych fragmentów gliadyny, wykazały zróżnicowaną zdolność do wiązania się produktów deaminacji glutaminy z antygenami HLA-DQ2. Badacze zwrócili uwagę na rolę dwóch frakcji gliadyn: α -2 (zawierająca fragment natywnej gliadyny od 62 do 75 aminokwasu) oraz α -9 (57-68). Glutamina w obu immunizujących fragmentach była obecna w pozycji 65. Obie cząsteczki zawierały duże ilości proliny. W izoformie α -2 były to miejsca: 62,64,66,69; a w cząsteczce α -9 odpowiednio: 57,59,62,64. Iminokwas ten oskrzydla krytyczną resztę glutaminy i chroni peptyd przed aktywnością żołądkowych i trzustkowych proteaz [2]. Reszty proliny stabilizują oddziaływania pomiędzy glutaminianem a resztą Lys⁶⁷¹ w cząsteczce HLA-DQ2. Oddziaływania te mają charakter wiązań wodorowych. Obie izoformy antygenów HLA-DQ2 i DQ8 wykazują względem siebie podobny stopień identyczności aminokwasów. Układ poliprolinowy determinuje w cząsteczce gliadyny swoistą strukturę drugorzędową faworyzowaną przez antygeny głównego kompleksu zgodności tkankowej typu II (MHC II). Płaskie ułożenie pierścienia piperolidynowego i grupy aminowej hamuje rotację atomów wokół wiązania C α – N, uniemożliwiając przyjęcie przez peptyd struktury α [2,19]. Obecność sekwencji poliprolinowej okazała się niezbędna podczas wiązania gliadyny przez grupy centrum aktywnego TG2 [12,38,51]. Produkt deaminacji glutaminy w cząsteczce gliadyny wykazywał 25-krotnie większe powinowactwo do HLA-DQ2 niż natywna postać zawierająca glutaminę [2,19]. Badania z zastosowaniem dyfrakcji promieni X wskazały na rolę jednego z atomów tlenu grupy γ -karboksylowej glutaminianu w tworzeniu wiązania wodorowego z antygenem poprzez resztę seryny 30 lub tyrozyny 9. Drugi z tych atomów jest zaangażowany w powstawanie wspomnianego już wiązania wodorowego z udziałem lizyny 71 [11]. Ciekawej obserwacji dostarczyły prace Johansena i wsp [17,52]. Wykazały one mianowicie, iż zastąpienie proliny innym iminokwasem – hydroksyproliną wcale nie zmniejsza powinowactwa DQ2 do gliadyny. Jednak tak powstający kompleks nie wykazywał zdolności aktywowania limfocytów T CD4⁺.

4. TG2 – ENZYM REGULUJĄCY PROCES APOPTOZY

Transglutaminaza 2, jak wspomniano wcześniej, jest jednym z wielu enzymów regulujących proces apoptozy. W procesie zostaje wykorzystana zdolność enzymu do tworzenia kowalencyjnych połączeń o charakterze wiązań izopeptydowych między różnymi białkami. Obecność takich wielkocząsteczkowych agregatów w późnych stadiach apoptozy tłumaczona jest zabezpieczeniem sąsiednich zdrowych komórek przed działaniem szkodliwych cząsteczek wydostających się z komórek apoptotycznych. Apoptozie inicjującej przez czynniki, takie jak: kwas retinowy, prostaglandyna E2, interleukina 6 czy TGF- β , towarzyszył wzrost ekspresji TG 2 [16,28,35,36]. Apoptoza indukowana etopozydem lub deksametazonem w tymocytach pozbawionych genu *tg2* (TG 2^{-/-}) realizowana była bez przeszkód. Podobne wyniki otrzymano inkubując mysie fibroblasty TG 2^{-/-} z retinoidami lub naświetlając je światłem ultrafioletowym [39,40,53]. Wyniki te potwierdzają aktywne zaangażowanie TG2 w fazie wykonawczej apoptozy. Substratami tTG są również niektóre polipeptydy obecne w mózgu chorych na choroby neurodegeneracyjne, takie jak płasawica Huntingtona, choroba Alzheimera czy Parkinsona. Cząsteczki te zawierają powyżej czterdziestu reszt glutaminy, będących następstwem amplifikacji kodonu CAG. Reszty ϵ -aminowe lizyny umiejscowione w C-końcowych odcinkach niektórych enzymów np. dehydrogenazy aldehydu 3-fosfoglicerynowego są akceptorami acylowej reszty glutaminy. W efekcie powstają nierozpuszczalne inkluzje obecne w cytosolu i jądrach komórek nerwowych. Agregaty te reorganizują metabolizm i transport w komórkach oraz promują ich śmierć [5,7,14,15,18,20,37,41,43].

5. UDZIAŁ TRANSGLUTAMINAZY 2 W PROCESIE ZAPALNYM

Osobnego krótkiego omówienia wymaga rola TG2 w rozwoju zapalenia. Okazuje się, że enzym ten odpowiada za wzrost aktywności fosfolipazy A₂ (PLA₂). PLA₂ katalizuje uwolnienie kwasu arachidonowego z pozycji C-2 fosfatydylocholiny. Arachidonian jest wyjściową cząsteczką do syntezy prostaglandyn, leukotrienów i innych eikozanoidów. Cząsteczki te są zaangażowane w procesach zapalnych. 5-lipooksygenaza (5-LOX) katalizuje syntezę leukotrienów, a cyklooksigenaza (COX) prostaglandyn. Wykazano, iż kowalencyjna modyfikacja PLA₂ o charakterze transacylacji przyczynia się do wzrostu jej aktywności enzymatycznej. Badania uczonych skupiły się na otrzymaniu rekombinowanego peptydu – analogu substratu TG2, który byłby inhibitorem enzymu i tym samym hamował aktywność PLA₂ [54]. Lipokortyna i uteroglobina są inhibitorami PLA₂. Cząsteczki te są substratami TG2, dzięki którym łączą się z lipidami i białkami błony komórkowej. Prace badaczy zostały skierowane na otrzymanie cząsteczki zawierającej w strukturze motyw KVLVD, który jest kompetywnym inhibitorem TG2. Peptydy te będące donorami i akceptorami reszty acylowej konkurują z fosfolipazą A₂. Zastosowanie tych cząsteczek w terapii powodowało zahamowanie procesu zapalnego [22,23,42,54].



Ryc. 2. Udział TG2 w indukcji procesu zapalnego (objaśnienia w tekście)

6. UWAGI KOŃCOWE

Tkankowa transglutaminaza katalizuje dwie podstawowe reakcje odpowiedzi autoimmunologicznej, jest również czynnie zaangażowana w zjawiska będące następstwami tej odpowiedzi – stan zapalny oraz apoptozę. Regulacja procesów acylacji i deaminacji katalizowanych przez TG2 jest możliwa dzięki kompartmentacji komórki. Produkt deaminacji glutaminy – kwas glutaminowy ze względu na wartość pK w roztworze wodnym ma ujemny ładunek elektryczny i tworzy aktywny immunologicznie kompleks z antygenami MHC II. Faworyzowanie transacylacji skutkuje utworzeniem agregatów białkowych umożliwiających oddziaływanie cząsteczek z macierzą zewnątrzkomórkową, a jednocześnie jest jednym ze sposobów regulacji aktywności białek. Często reakcja ta promuje dalszą agregację polipeptydów prowadzącą do powstania nierozpuszczalnych w detergentach makromolekuł [5,18,41,45,51].

Pomimo iż wiele wiadomo na temat szczegółów związanych z mechanizmami działania TG2, ciągle trwają poszukiwania skutecznego leku chroniącego przed rozwojem chorób autoimmunologicznych. Obszar tych poszukiwań obejmuje głównie badania genetycznie uwarunkowanej zmienności cząsteczek uczestniczących w reakcjach: antygen–przeciwciała oraz regulacji funkcjonowania transglutaminazy 2 [17,19,26,27,30,31,32].

PIŚMIENICTWO

- [1] Aleanzi M., Demonte A.M., Esper C., Garcilazo S., Waggner M.: Celiac disease: antibody recognition against native and selectively deamidated gliadin peptides. *Clin. Chem.*, 2001; 47: 2023–2028
- [2] Arentz-Hansen H., Korner R., Molberg O., Quarsten H., Vader W., Kooy Y.M.C., Lundin K.E.A., Koning F., Roepstorff P., Sollid L.M., McAdam S.N.: The intestinal T cell response to α -gliadin in adult celiac disease is focused on a single deamidated glutamine targeted by tissue transglutaminase. *J. Exp. Med.*, 2000; 191: 603–612
- [3] Bernassola F., Federici M., Corazzari M., Terrinoni A., Hribal M.L., De Laurenzi V., Ranalli M., Massa O., Sesti G., McLean W.H., Citro G., Barbetti F., Melino G.: Role of transglutaminase 2 in glucose tolerance: knockout mice studies and a putative mutation in a MODY patient. *FASEB J.*, 2002; 16: 1371–1378
- [4] Brown C.K., Madauss K., Lian W., Beck M.R., Tolbert W.D., Rodgers D.W.: Structure of neurolysin reveals a deep channel that limits substrate access. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2001; 98: 3127–3132
- [5] Chen S., Wetzel R.: Solubilization and disaggregation of polyglutamine peptides. *Protein Sci.*, 2001; 10: 887–891
- [6] Clemente M.G., Virgiliis S., Kang J.S., Macatagney R., Musu M.P., Di Piero M.R., Drago S., Congia M., Fasano A.: Early effects of gliadin on enterocyte intracellular signalling involved in intestinal barrier function. *Gut*, 2003; 52: 218–223
- [7] Cooper A.J., Sheu K.F., Burke J.R., Strittmatter W.J., Gentile V., Peluso G., Blass J.P.: Pathogenesis of inclusion bodies in (CAG)_n/Qn-expansion diseases with special reference to the role of tissue transglutaminase and to selective vulnerability. *J. Neurochem.*, 1999; 72: 889–899
- [8] De Laurenzi V., Melino G.: Gene disruption of tissue transglutaminase. *Mol. Cell. Biol.*, 2001; 21: 148–155
- [9] Esposito C., Paparo F., Caputo I., Rossi M., Maglio M., Sblattero D., Not T., Porta R., Auricchio S., Marzari R., Troncone R.: Anti-tissue transglutaminase antibodies from coeliac patients inhibit transglutaminase activity both *in vitro* and *in situ*. *Gut*, 2002; 51: 177–181
- [10] Fernandez M., Liu X., Wouters M.A., Heyberger S., Husain A.: Angiotensin I-converting enzyme transition state stabilization by HIS1089: evidence for a catalytic mechanism distinct from other zincin metalloproteinases. *J. Biol. Chem.*, 2001; 276: 4998–5004
- [11] Fersth A.R., Serrano L.: Principles of protein stability derived from protein engineering experiments. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 1993; 3: 75–83
- [12] Fleckenstein B., Molberg O., Qiao S.W., Schmid D.G., von der Mülbe F., Elgstoen K., Jung G., Sollid L.M.: Gliadin T cell epitope selection by tissue transglutaminase in celiac disease. *J. Biol. Chem.*, 2002; 277: 34109–34116
- [13] Gaudry C.A., Verderio E., Aeschlimann D., Cox A., Smith C., Griffin M.: Cell surface localization of tissue transglutaminase is dependent on a fibronectin-binding site in its N-terminal beta-sandwich domain. *J. Biol. Chem.*, 1999; 274: 30707–30714
- [14] Grenard P., Bates M.K., Aeschlimann D.: Evolution of transglutaminase genes: Identification of a transglutaminase gene cluster on human chromosome 15q15. *J. Biol. Chem.*, 2001; 276: 33066–33078
- [15] Grootjans J.J., Groenen P.J., de Jong W.W.: Substrate requirements for transglutaminases. Influence of the amino acid residue preceding the amine donor lysine in a native protein. *J. Biol. Chem.*, 1995; 270: 22855–22858
- [16] Iismaa S.E., Holman S., Wouters M.A., Lorand L., Graham R.M., Husain A.: Evolutionary specialization of a tryptophan indole group for transition-state stabilization by eukaryotic transglutaminases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2003; 100: 12636–12641
- [17] Johansen B.H., Vardtal F., Eriksen J.A., Thorsby E., Sollid L.M.: Identification of a putative motif for binding of peptides to HLA-DQ2. *Int. Immunol.*, 1996; 8: 177–182
- [18] Kahlem P., Terre C., Green H., Djian P.: Peptides containing glutamine repeats as substrates for transglutaminase-catalyzed cross-linking: relevance to diseases of the nervous system. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1996; 93: 14580–14585
- [19] Kim C.Y., Quarsten H., Bergseng E., Khosla C., Sollid L.M.: Structural basis for HLA-DQ2-mediated presentation of gluten epitopes in celiac disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2004; 101: 4175–4179
- [20] Kim S.Y., Jeong E.J., Steinert P.M.: IFN- γ induces transglutaminase 2 expression in rat small intestinal cells. *J. Interferon Cytokine Res.*, 2002; 22: 677–682
- [21] Korponay-Szabó I.R., Haltunen T., Szalai Z., Laurila K., Király R., Kovács J.B., Fésüs L., Mäki M.: *In vivo* targeting of intestinal and extraintestinal transglutaminase 2 by coeliac autoantibodies. *Gut*, 2004; 53: 641–648
- [22] Krig S.R., Chandraratna R.A., Chang M.M., Wu R., Rice R.H.: Gene-specific TCDD suppression of RAR α - and RXR-mediated induction of tissue transglutaminase. *Toxicol. Sci.*, 2002; 68: 102–108
- [23] Lee J., Kim Y.S., Choi D.H., Bang M.S., Han T.R., Joh T.H., Kim S.Y.: Transglutaminase 2 induces nuclear factor-kappaB activation via a novel pathway in BV-2 microglia. *J. Biol. Chem.*, 2004; 279: 53725–53735
- [24] Liu S., Cerione R.A., Clardy J.: Structural basis for the guanine nucleotide-binding activity of tissue transglutaminase and its regulation of transamidation activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2002; 99: 2743–2747
- [25] Liu T., Ryan M., Dahlquist F.W., Griffith O.H.: Determination of pKa values of the histidine side chains of phosphatidylinositol-specific phospholipase C from *Bacillus cereus* by NMR spectroscopy and site-directed mutagenesis. *Protein Sci.*, 1997; 6: 1937–1944
- [26] Martini S., Mengozzi G., Aimo G., Pagni R., Sategna-Guidetti C.: Diagnostic accuracies for celiac disease of four tissue transglutaminase autoantibody tests using human antigen. *Clin. Chem.*, 2001; 47: 1722–1725
- [27] Marzari R., Sblattero D., Florian F., Tongiorgi E., Not T., Tommasini A., Ventura A., Bradbury A.: Molecular dissection of the tissue transglutaminase autoantibody response in celiac disease. *J. Immunol.*, 2001; 166: 4170–4176
- [28] Micanovic R., Procyk R., Lin W., Matsueda G.R.: Role of histidine 373 in the catalytic activity of coagulation factor XIII. *J. Biol. Chem.*, 1994; 269: 9190–9194
- [29] Mohan K., Pinto D., Issekutz T.B.: Identification of tissue transglutaminase as a novel molecule involved in human CD8⁺ T cell transendothelial migration. *J. Immunol.*, 2003; 171: 3179–3186
- [30] Molberg O., Mc Adam S.N., Korner R.: Tissue transglutaminase selectively modifies gliadin peptides that are recognized by gut-derived T cells in celiac disease. *Nat. Med.*, 1998; 4: 713–717
- [31] Molberg O., McAdam S., Lundin K.E., Kristiansen C., Arentz-Hansen H., Kett K., Sollid L.M.: T cells from celiac disease lesions recognize gliadin epitopes deamidated *in situ* by endogenous tissue transglutaminase. *Eur. J. Immunol.*, 2001; 31: 1317–1323
- [32] Murthy S.N., Iismaa S., Begg G., Freymann D.M., Graham R.M., Lorand L.: Conserved tryptophan in the core domain of transglutaminase is essential for catalytic activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2002; 99: 2738–2742
- [33] Nakaoka H., Perez D.M., Baek K.J., Das T., Husain A., Misono K., Im M.J., Graham R.M.: Gh: a GTP-binding protein with transglutaminase activity and receptor signaling function. *Science*, 1994; 264: 1593–1596
- [34] Noguchi K., Ishikawa K., Yokoyama K., Ohtsuka T., Nio N., Suzuki E.: Crystal structure of red sea bream transglutaminase. *J. Biol. Chem.*, 2001; 276: 12055–12059
- [35] Nagy L., Saydak M., Shiplay N., Lu S., Basilion J.P., Yan Z.H., Syka P., Chandraratna R.A., Stein J.P., Heyman R.A., Davies P.J.: Identification and characterization of a versatile retinoid response element (retinoic acid receptor response element-retinoid X receptor response element) in the mouse tissue transglutaminase gene promoter. *J. Biol. Chem.*, 1996; 271: 4355–4365
- [36] Nagy L., Thomazy V.A., Saydak M.M., Stein J.P., Davies P.J.: The promoter of the mouse tissue transglutaminase gene directs tissue-specific, retinoid-regulated and apoptosis-linked expression. *Cell Death Differ.*, 1997; 4: 534–547
- [37] Orru S., Ruoppolo M., Francese S., Vitagliano L., Marino G., Esposito C.: Identification of tissue transglutaminase-reactive lysine residues in glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *Protein Sci.*, 2002; 11: 137–146
- [38] Parrot I., Huang P.C., Khosla C.: Circular dichroism and nuclear magnetic resonance spectroscopic analysis of immunogenic gluten peptides and their analogs. *J. Biol. Chem.*, 2002; 277: 45572–45578
- [39] Piredda L., Farrace M.G., Lo Bello M., Malorni W., Melino G., Petruzzelli R., Piacentini M.: Identification of 'tissue' transglutaminase binding proteins in neural cells committed to apoptosis. *FASEB J.*, 1999; 13: 355–364
- [40] Ritter S.J., Davies P.J.: Identification of a transforming growth factor-beta1/bone morphogenetic protein 4 (TGF-beta1/BMP4) response element within the mouse tissue transglutaminase gene promoter. *J. Biol. Chem.*, 1998; 273: 12798–12806
- [41] Ruoppolo M., Orru S., Francese S., Caputo I., Esposito C.: Structural characterization of transglutaminase-catalyzed cross-linking between glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase and polyglutamine repeats. *Protein Sci.*, 2003; 12: 170–179

- [42] Schuppan D.: Current concepts of celiac disease pathogenesis. *Gastroenterology*, 2000; 119: 234–242
- [43] Sirover M.A.: New insights into an old protein: the functional diversity of mammalian glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *Biochim. Biophys. Acta*, 1999; 1432: 159–184
- [44] Sohn J., Kim T.I., Yoon Y.H., Kim J.Y., Kim S.Y.: Novel transglutaminase inhibitors reverse the inflammation of allergic conjunctivitis. *J. Clin. Invest.*, 2003; 111: 121–128
- [45] Steinert P.M., Candi E., Tarcsa E., Marekov L.N., Sette M., Paci M., Ciani B., Guerrieri P., Melino G.: Transglutaminase crosslinking and structural studies of the human small proline rich 3 protein. *Cell Death Differ.*, 1999; 6: 916–930
- [46] Szondy Z., Molnar P., Nemes Z., Boyiadzis M., Kedei N., Toth R., Fesus L.: Differential expression of tissue transglutaminase during *in vivo* apoptosis of thymocytes induced via distinct signalling pathways. *FEBS Lett.*, 1997; 404: 307–313
- [47] Szondy Z., Sarang Z., Molnar P., Nemeth T., Piacentini M., Mastroberardino P.G., Falasca L., Aeschlimann D., Kovacs J., Kiss I., Szegezdi E., Lakos G., Rajnavolgyi E., Birckbichler P.J., Melino G., Fesus L.: Transglutaminase 2^{-/-} mice reveal a phagocytosis-associated crosstalk between macrophages and apoptotic cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2003; 100: 7812–7817
- [48] Tommasini A., Not T., Kiren Z., Baldas V., Santon D., Trevisiol C., Berti I., Gerarduzzi T., Bruno I., Lenhardt A., Zamuner E., Spano A., Crovella S., Martellosi S., Torre G., Sblattero D., Marzari R., Bradbury A., Tambulini G., Ventura A.: Mass screening for coeliac disease using antihuman transglutaminase antibody assay. *Arch. Dis. Child*, 2004; 89: 512–515
- [49] Tonutti E., Visentini D., Bizzaro N., Caradonna M., Cerni L., Villalta D., Tozzoli R.: The role of antitissue transglutaminase assay for the diagnosis and monitoring of coeliac disease: a French-Italian multicentre study. *J. Clin. Pathol.*, 2003; 56: 389–393
- [50] Tuncer I., Bayram I., Kaba I., Mercan R., Uğraş S.: Tissue transglutaminase expression in duodenal mucosa of patients with celiac disease and of normal subjects. *Turk J. Gastroenterol.*, 2003; 14: 185–188
- [51] Vader L.W., de Ru A., van der Wal Y., Kooy Y.M., Benckhuijsen W., Mearin M.L., Drijfhout J.W., van Veelen P., Koning F.: Specificity of tissue transglutaminase explains cereal toxicity in celiac disease. *J. Exp. Med.*, 2002; 195: 643–649
- [52] Vartdal F., Johansen B.H., Friede T., Thorpe C.J., Stevanovic S., Eriksen J.E., Sletten K., Thorsby E., Rammensee H.G., Sollid L.M.: The peptide binding motif of the disease associated HLA-DQ (alpha 1* 0501, beta 1* 0201) molecule. *Eur. J. Immunol.*, 1996; 26: 2764–2772
- [53] Zhang L.X., Mills K.J., Dawson M.I., Collins S.J., Jetten A.M.: Evidence for the involvement of retinoic acid receptor RAR alpha-dependent signaling pathway in the induction of tissue transglutaminase and apoptosis by retinoids. *J. Biol. Chem.*, 1995; 270: 6022–6029
- [54] Zouki C., Ouellet S., Filep J.G.: The anti-inflammatory peptides, anti-tflamins, regulate the expression of adhesion molecules on human leukocytes and prevent neutrophil adhesion to endothelial cells. *FASEB J.*, 2000; 14: 572–580