

SYGNATURA WAPNIOWA: GENEROWANIE I SPECYFIKA CYTOPLAZMATYCZNEGO SYGNAŁU WAPNIOWEGO*

CALCIUM SIGNATURE: GENERATION AND CYTOPLASMIC
SPECIFICITY OF CALCIUM SIGNAL

Edyta DEJA, Marcin SIKORA, Andrzej TRETYN*

Zakład Biotechnologii, Instytut Biologii Ogólnej i Molekularnej,
Uniwersytet Mikołaja Kopernika, Toruń

Streszczenie: Jony Ca^{2+} stanowią w komórkach wysoce uniwersalne cząsteczki sygnalizacyjne i są integralnymi składnikami wielu szlaków transdukcji sygnałów. Liczne czynniki środowiskowe i rozwojowe oddziałując na komórkę, indukują wzrost cytoplazmatycznego stężenia jonów wapnia ($[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$). W generowaniu cytoplazmatycznego sygnału wapniowego zaangażowane są liczne kanały wapniowe, które współdziałając z pompami i kotransporterami wapniowymi wpływają na kształt i specyfikę sygnału $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$. Czasowo-przestrzenna charakterystyka sygnału $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$, zwana także sygnaturą wapniową, koduje informacje determinujące kształt ostatecznej odpowiedzi fizjologicznej komórki. W naszej pracy opisaliśmy mechanizmy uczestniczące w generowaniu specyficznych względem określonych bodźców sygnatur $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ oraz sposoby dekodowania przez komórki roślinne sygnałów wapniowych, które są istotne dla uzyskania właściwej odpowiedzi fizjologicznej.

Słowa kluczowe: Ca^{2+} -ATPazy, $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$, fale i oscylacje wapniowe, kanały wapniowe, sensory Ca^{2+} , sygnatura wapniowa, kotransportery $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$.

Summary: Calcium ions are highly universal signaling molecules in cells and participate as integral components of many signal transduction pathways. Cell stimulation by various environmental and developmental cues induces an elevation in cytosolic calcium concentration. Generation of calcium signal engages numerous calcium channels. Their interaction with cellular Ca^{2+} removing mechanisms influences the shape and specificity of $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$. Spatio-temporal characteristics of calcium signal, termed as a calcium signature, encode information, which determine the form and shape of cellular physiological response. The subject of this publication is generation of a stimulus specific calcium signature and the way of encoding specificity in calcium signal to produce an appropriate physiological response of a cell.

*Pracą powstała w trakcie realizacji grantu finansowanego przez Uniwersytet Mikołaja Kopernika (394-B).

Keywords: Ca²⁺-ATPases, calcium channels, [Ca²⁺]_{cyt}, calcium signature, Ca²⁺ sensors, calcium waves and oscillations, Ca²⁺/H⁺ cotransporters.

1. WPROWADZENIE

Pomiędzy każdą żywą komórką a jej otoczeniem zachodzi nieustający przepływ informacji. Wymiana informacji i sygnałów jest możliwa dzięki temu, że każda komórka ma złożone mechanizmy przetwarzające zewnętrzne sygnały na specyficzne odpowiedzi biologiczne. Stąd też procesy sygnalizacji decydują o życiu i śmierci komórki, regulują wzrost, różnicowanie się komórek oraz indukują powstawanie odpowiedzi komórkowych na zmiany zachodzące w środowisku. Odbieranie fizycznych i chemicznych sygnałów umożliwiają receptory – białka zlokalizowane na powierzchni błony komórkowej lub wewnątrz komórki. Receptory wykazują specyficzność względem rozpoznawanych przez nie sygnałów działających indukująco (agoniści) lub hamująco (antagoniści) na ich aktywność. Odbierane przez receptory sygnały wzmacniane są przez różne wewnątrzkomórkowe białka efektorowe i regulatorowe, których aktywność regulowana jest poprzez niskocząsteczkowe związki organiczne (cykliczne nukleotydy, trisfosforan inozytolu) bądź jony Ca²⁺, zwane wtórnymi przekąźnikami informacji (ang. *second messengers*). Wszystkie elementy uczestniczące w przewodzeniu sygnałów od receptora do efektora tworzą tzw. szlaki transdukcji sygnałów [18, 20].

Sygnalizacja wapniowa jest najbardziej powszechnym w komórce mechanizmem transdukcji sygnału [20, 23]. Funkcje sygnałowe spełniają tylko wolne jony wapnia. W komórkach eukariotycznych stężenie jonów Ca²⁺ waha się w granicach od 0,1 do 10 mmol/l, a rozmieszczenie tego kationu w obrębie poszczególnych organelli komórkowych jest nierównomierne [47]. W stanie spoczynkowym, w cytoplazmie podstawowej komórek roślinnych i zwierzęcych, stężenie Ca²⁺ jest bardzo niskie i przyjmuje wartość od kilkudziesięciu do kilkuset nmol/l. W innych przedziałach subkomórkowych koncentracja Ca²⁺ jest dużo wyższa – od 1 mmol/l (w mitochondriach, plastydach i ER) do 10 mmol/l (w wakuoli i ścianie komórek roślinnych). Zewnątrzkomórkowe bodźce aktywujące komórkę, indukują zmiany w poziomie cytoplazmatycznego Ca²⁺. W czasie od kilku do kilkunastu sekund [Ca²⁺]_{cyt} wzrasta z około 200 nmol/l do ponad 1 μmol/l [37].

Generowanie sygnału wapniowego w stymulowanej komórce możliwe jest przez [47]:

- ◆ szybki wzrost cytoplazmatycznego stężenia jonów Ca²⁺ w wyniku ich uwalniania z wewnątrzkomórkowych magazynów (ER, mitochondria, wakuola, jądro komórkowe) i napływu tego kationu z przestrzeni zewnątrzkomórkowej do cytoplazmy;
- ◆ aktywację białek wiążących wapń w cytoplazmie podstawowej, co prowadzi do indukcji procesów biologicznych lub aktywacji dalszych etapów łańcucha transdukcji sygnału;
- ◆ szybki spadek cytoplazmatycznego stężenia Ca²⁺ do poziomu obserwowanego przed stymulacją komórki.

W komórkach roślinnych jony wapnia pełnią rolę uniwersalnego przekaźnika informacji [41]. Wapń zaangażowany jest m.in. w indukcję wielu procesów rozwojowych (np. wzrost łagiewki pyłkowej [19], rozwój włośników [4]), w generowanie odpowiedzi na działanie hormonów, np. indukowany auksyną wzrost wydłużeniowy komórki [12], kontrolowane przez kwas absycynowy zamykanie aparatów szparkowych [1]), w indukcję komórkowych procesów obronnych wywołanych przez patogeny i elicytory (np. produkcja reaktywnych form tlenu, synteza fitoaleksyn i hiperwrażliwość [6, 7, 22]), a także w regulację ekspresji genów indukowanych przez stres abiotyczny [23].

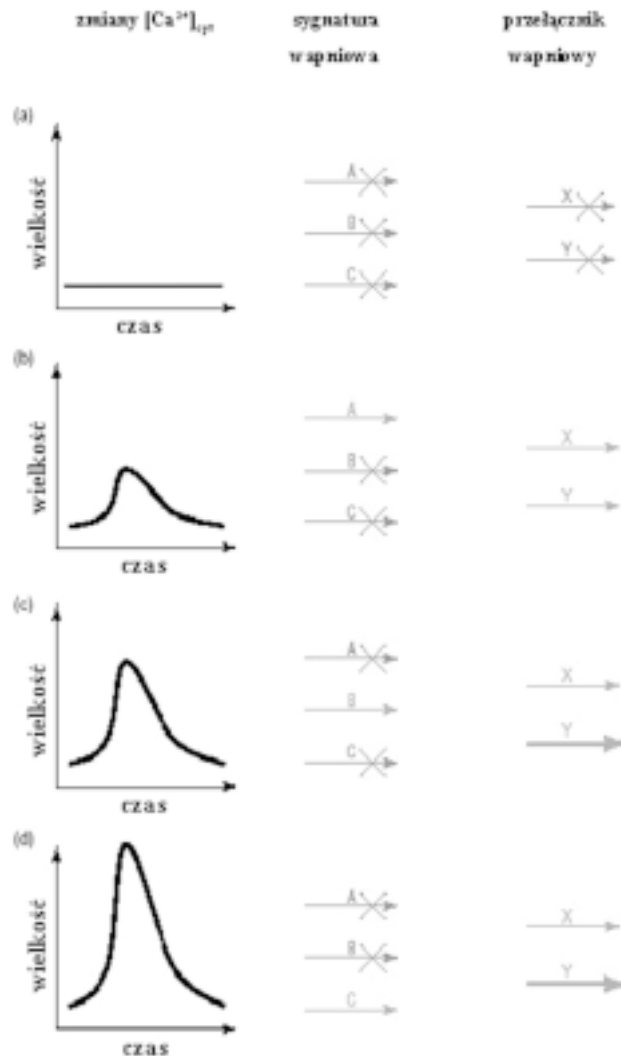
Liczne bodźce biotyczne i abiotyczne oddziałując na komórki roślinne indukują w nich zmiany poziomu $[Ca^{2+}]_{cyt}$, co sugeruje, że wapń jest bardzo powszechnym składnikiem wielu odmiennych szlaków sygnalizacyjnych. Aby zrozumieć mechanizm działania Ca^{2+} w komórkach roślinnych, należy przedstawić informacje, w jaki sposób kształtowana jest specyfika sygnałów wapniowych oraz jak specyficzne względem określonego bodźca sygnały $[Ca^{2+}]_{cyt}$ determinują powstanie właściwej odpowiedzi fizjologicznej.

2. SYGNATURA WAPNIOWA A TEORIA PRZEŁĄCZNIKA WAPNIOWEGO

Złożona czasowo-przestrzenna charakterystyka sygnału $[Ca^{2+}]_{cyt}$, która warunkuje jego specyfikę i w konsekwencji wpływa na wyzwalanie ściśle określonej odpowiedzi komórkowej, nosi miano sygnatury wapniowej.

Badania nad sygnalizacją wapniową w komórkach roślinnych doprowadziły do sformułowania dwóch przeciwstawnych względem siebie hipotez: „sygnatury wapniowej” i „chemicznego przełącznika” [42]. Według pierwszej z nich specyficzne sygnatury wapniowe obserwowane w stymulowanych komórkach, kodują informacje, które modulują końcową odpowiedź fizjologiczną. Natomiast według drugiej z wymienionych hipotez, jony wapnia pełnią jedynie funkcje przełączników aktywujących wrażliwe na Ca^{2+} elementy odpowiednich szlaków sygnalizacyjnych. W tym przypadku powstanie stosownej odpowiedzi komórkowej możliwe jest dzięki współdziałaniu jonów wapnia z innymi składnikami szlaków transdukcji sygnałów [42]. Założenia hipotez „sygnatury wapniowej” i „przełącznika wapniowego” zilustrowano na rycinie 1.

Na wspomnianej rycinie zmiany poziomu $[Ca^{2+}]_{cyt}$ przedstawione zostały dla komórek znajdujących się w stanie spoczynku (a) oraz dla komórek pobudzonych przez trzy różne typy bodźców (b, c, d). W komórkach spoczynkowych, charakteryzujących się niskim poziomem $[Ca^{2+}]_{cyt}$ szlaki sygnalizacyjne zależne od tego jonu są nieaktywne. Zgodnie z hipotezą „sygnatury wapniowej”, gdy poziom $[Ca^{2+}]_{cyt}$ wzrasta od wartości (b) do wartości (d), każda z powstających w ten sposób trzech różnych sygnatur wapniowych prowadzi do aktywacji tylko jednego specyficznego szlaku: A, B lub C. Tym samym każdy z tych szlaków sygnalizacyjnych aktywowany jest przez określoną, specyficzną sygnaturę wapniową (ryc. 1). Natomiast zgodnie z hipotezą „przełącznika wapniowego”, jakakolwiek zmiana poziomu $[Ca^{2+}]_{cyt}$, przekraczająca wartość progową



RYCINA 1. Funkcja sygnalizacyjna wapnia wg teorii „sygnatury wapniowej” i „przełącznika wapniowego”. (na podstawie [42], zmodyfikowane). Wykresy (b–d) przedstawiają różne wzory cytoplazmatycznych sygnałów Ca^{2+} . Czerwone strzałki oznaczają nieaktywne ścieżki sygnalizacyjne, zaś zielone to aktywne szlaki transdukcji informacji. Grubość strzałek wskazuje na „intensywność” uzyskanej odpowiedzi komórkowej; dalszy opis w tekście

(b), aktywuje szlaki X i Y. Jednakże siła uzyskanej odpowiedzi komórkowej zależy jedynie od wielkości wzrostu stężenia $[Ca^{2+}]_{cyt}$ i dla szlaku Y jest ona zdecydowanie większa w przypadku (c) niż (b). Z drugiej strony, sygnatura wapniowa przedstawiona w punkcie (d) nie wpływa już na wielkość odpowiedzi generowanej za pośrednictwem szlaku Y (ryc. 1) [42].

Mimo iż wyżej opisane hipotezy dotyczące mechanizmu działania Ca^{2+} mają przeciwny charakter przypuszcza się, że obie formy sygnalizacji: „sygnatury wapniowej” i „przełącznika wapniowego” mogą równolegle funkcjonować w komórkach roślinnych [42].

3. SYGNATURA WAPNIOWA A ODPOWIEDŹ FIZJOLOGICZNA KOMÓRKI

W komórce roślinnej wywołanie specyficznej względem danego bodźca odpowiedzi fizjologicznej zachodzi przez [38]:

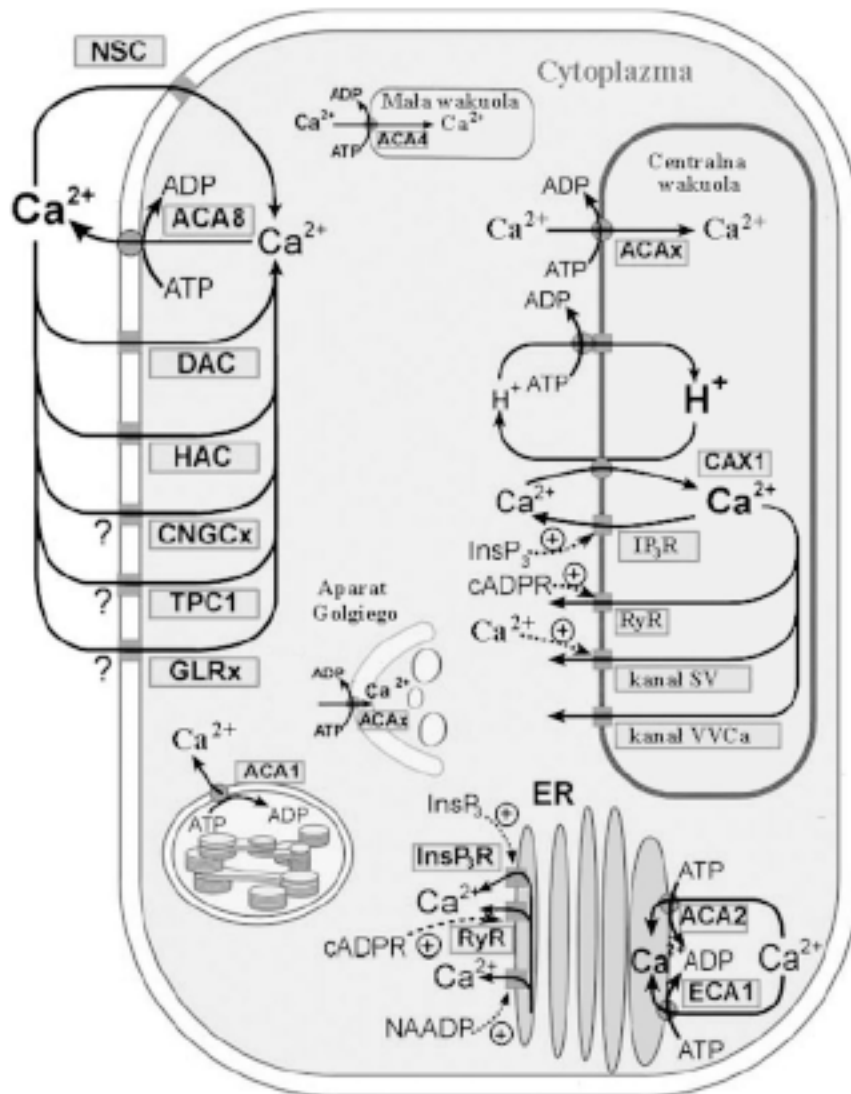
- (1) generowanie w cytoplazmie specyficznej sygnatury wapniowej w odpowiedzi na określony bodziec odebrany przez komórkę;
- (2) dekodowanie sygnatury wapniowej przez sensory Ca^{2+} ;
- (3) transdukcję informacji „zapisanej” w sygnaturze wapniowej do elementów docelowych szlaku, które uczestniczą w powstawaniu fizjologicznej odpowiedzi komórki.

3.1. Generowanie sygnatury wapniowej

Podstawowym warunkiem umożliwiającym generowanie specyficznej względem danego bodźca sygnatury wapniowej jest współdziałanie różnych białek kontrolujących napływ jonów Ca^{2+} z apoplastu do cytoplazmy i ich uwalnianie z wewnątrzkomórkowych magazynów [31] oraz regulujących usuwanie tych kationów z cytoplazmy do apoplastu i do wnętrza różnych organeli [11, 31]. Do wspomnianych białek należą zlokalizowane w błonach kanały i pompy wapniowe oraz kotransportery $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^{+}$ (ryc. 2). W zależności od rodzaju bodźca działającego na komórkę, wzrost $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ indukowany jest przez aktywację różnego typu kanałów wapniowych. Występujące w błonie plazmatycznej roślinne kanały wapniowe sklasyfikowane zostały ze względu na ich wrażliwość na zmiany potencjału błonowego. Na tej podstawie wyróżniono kanały aktywowane przez depolaryzację (DAC) lub hiperpolaryzację (HAC) tej błony oraz kanały kationowe niezależne od napięcia. Do tej ostatniej grupy zaliczono kanały aktywowane przez cykliczne nukleotydy (CNGC) oraz działające jako receptory glutaminianu (GLR) (ryc. 2).

W roślinnych błonach komórkowych bardzo powszechne są także aktywowane przez depolaryzację kanały mające dwa pory (TPC) [41]. Wszystkie wymienione kanały w stanie aktywacji uczestniczą w przewodzeniu jonów wapnia ze środowiska zewnątrzkomórkowego do cytozolu. Sposoby regulacji aktywności tych kanałów, podobnie jak ich komórkowa lokalizacja, wpływają na przestrzenną i czasową charakterystykę sygnałów $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ [20, 41].

Poza jonami wapnia pochodzącymi ze środowiska zewnątrzkomórkowego, w generowanie specyficznych, cytozolowych sygnałów $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ zaangażowane są jony Ca^{2+} zgromadzone w wewnątrzkomórkowych magazynach. W komórce roślinnej podstawowym magazynem Ca^{2+} jest wakuola. Tonoplast wyposażony jest w liczne kanały, uczestniczące w uwalnianiu jonów Ca^{2+} do cytozolu [41]. Są to kanały aktywowane przez depolaryzację błony, z których najbardziej powszechnym typem są kanały SV [49], dwa typy kanałów aktywowanych przez hiperpolaryzację błony oraz



RYCINA 2. Schemat przedstawiający główne mechanizmy transportujące jony Ca²⁺ w komórce roślinnej na przykładzie *Arabidopsis thaliana* (na podstawie [41], zmodyfikowane). Niebieskie okręgi reprezentują systemy transportujące jony Ca: (1) aktywnie: ACA – autoinhibitorowa ATPaza wapniowa, ECA – ATPaza wapniowa występująca w obrębie ER, (2) biernie: CAX – kotransporter wapniowo-protonowy (Ca²⁺/H⁺) zlokalizowany w błonie wakuolarniej. Czerwone kwadraty reprezentują kanały przewodzące jony wapnia: zlokalizowane w błonie plazmatycznej (NCS – nieselektywne kanały kationowe, DAC – kanały aktywowane przez depolaryzację błony, HAC – kanały aktywowane przez hiperpolaryzację błony, TPC – kanały mające dwa pory, CNGCx – kanały aktywowane przez cykliczne nukleotydy, GLRx – receptory glutaminianu) oraz w endomembranach (VVCa – wakuolarnie napięciowozależne kanały Ca²⁺, SV – wolno aktywowane kanały wakuolarnie oraz receptory: IP₃R (nazwa związku), RyR (rianodinowe) i NAADP (nazwa związku)). Dalszy opis w tekście

wysokie selektywne względem Ca^{2+} kanały aktywowane przez cytozolowe wtórne przekaźniki informacji (ryc. 2). Należą do nich: receptory 1,4,5-trisfosfoinozytolu (IP_3R) aktywowane przez IP_3 oraz receptory rianodinowe aktywowane przez cADPR [41, 49]. Poza wakuolą innym magazynem wapniowym jest ER. Uwalnianie Ca^{2+} do cytozolu zachodzi poprzez błonowe kanały aktywowane wtórnymi przekaźnikami informacji – IP_3 [32], cADPR [34] i NAADP [33] (ryc. 2).

Obecność w komórce wielu typów kanałów zaangażowanych w generowanie cytoplazmatycznych sygnałów wapniowych, umożliwia osiągnięcie czasowo-przestrzennej specyfiki wzrostu $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ poprzez rekrutację kanałów o odmiennych właściwościach, odrębnej lokalizacji i różnym sposobie regulacji aktywności (ryc. 2) [50].

W kształtowaniu specyficznej czasowo-przestrzennej charakterystyki sygnału $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ uczestniczą także białka regulujące usuwanie jonów Ca^{2+} z cytozolu, czyli pompy wapniowe i kotransportery $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$. Zlokalizowane są one w różnych błonach komórkowych. Uczestniczą w aktywnym (pompy) i pasywnym (kotransportery) transporcie jonów wapniowych z cytoplazmy do środowiska zewnątrzkomórkowego lub do magazynów Ca^{2+} . Usuwanie jonów wapnia do poziomu obserwowanego w cytoplazmie komórek spoczynkowych umożliwia ponowne generowanie lokalnych sygnałów Ca^{2+} , odnawianie zewnątrz- i wewnątrzkomórkowych magazynów wapniowych, a także kształtuje wielkość, kinetykę i wewnątrzkomórkową lokalizację sygnatur wapniowych [45]. Pompy wapniowe (Ca^{2+} -ATPazy), które mają wysokie powinowactwo ($K_m = 1\text{--}10 \mu\text{M}$), ale niską pojemność transportową względem jonów Ca^{2+} , są odpowiedzialne za utrzymanie homeostazy $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ w komórce w stanie spoczynkowym [21]. Roślinne Ca^{2+} -ATPazy należą do dwóch głównych rodzin IIA i IIB [10]. Rodzinę IIA stanowią zlokalizowane w błonie plazmatycznej, tonoplaście, błonie ER i aparacie Golgiego ATPazy typu P pozbawione N-terminalnej domeny autoregulatorowej. Natomiast w skład rodziny IIB tej grupy ATPaz wchodzi enzymy charakteryzujące się obecnością N-terminalnej domeny autoinhibitorowej, która zawiera miejsce wiązania Ca^{2+} -kalmoduliny (CaM) i ulegającą fosforylacji resztę serynową [10]. Ich aktywność katalityczna może być modulowana przez zmiany $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$, a także poprzez wiązanie kalmoduliny (aktywacja). Inhibicja pomp zachodzi w drodze fosforylacji przeprowadzanej przez zależną od Ca^{2+} kinazę białkową (CDPK) [50]. Pompy wapniowe występują zarówno w błonie komórkowej, jak i błonach otaczających różne organelle (ryc. 2), a ich poszczególne izoformy są funkcjonalnie odmienne i wykazują zróżnicowane powinowactwo względem jonów wapnia [50].

Kotransportery $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$ w porównaniu z pompami wapniowymi mają niższe powinowactwo ($K_m = 10\text{--}15 \mu\text{M}$), ale wysoką pojemność transportową względem jonów wapnia. Występujące w błonie plazmatycznej i tonoplaście kotransportery $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$ (ryc. 2) uczestniczą w usuwaniu nadmiaru jonów Ca^{2+} z cytoplazmy poza komórkę i do wnętrza wakuoli [41]. Stechiometria transportu jonów jest różna dla obu wymienionych typów kotransporterów. I tak usunięciu 1 mola Ca^{2+} z cytoplazmy do wnętrza wakuoli towarzyszy przeniesienie przez tonoplast od 1 do 3 moli H^+ w przeciwnym kierunku. Aktywność wymiennicza $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$ może być regulowana przez autoinhibitorową 10-aminokwasową domenę znajdującą się na końcu N tego białka [36].

3.2. Forma i specyfika sygnatur $[Ca^{2+}]_{cyt}$

Różne bodźce działające na komórkę generują zmiany poziomu $[Ca^{2+}]_{cyt}$ o określonej czasowo-przestrzennej charakterystyce poprzez: uwalnianie jonów wapnia z różnych komórkowych magazynów i aktywację kanałów wapniowych o odmiennych właściwościach i odrębnej komórkowej lokalizacji. Decydujące znaczenie dla kodowania informacji w specyficznej sygnaturze wapniowej mogą mieć różnice wynikające z charakterystycznej dla danego bodźca kinetyki wzrostu cytoplazmatycznego poziomu $[Ca^{2+}]$ [35]. Powstające w wyniku pobudzania komórek roślinnych sygnały wapniowe mogą mieć postać tzw. gorących punktów (ang. *quarks*, *blips*), „pyknięć” (ang. *puffs*), „iskierek” (ang. *sparks*), oscylacji lub fal [35]. Niski poziom stymulacji komórki powoduje aktywację pojedynczych kanałów wapniowych, co prowadzi do małych, lokalnych wzrostów $[Ca^{2+}]_{cyt}$, określanych jako „*quarks*” i „*blips*”. Uwalnianie do cytozolu jonów Ca^{2+} , będące wynikiem wyższego stopnia stymulacji prowadzi do powstania sygnałów mających formę „pyknięć” i „iskierek” wapniowych. Tego typu przestrzennie i czasowo rozdzielone wydarzenia elementarne mogą uczestniczyć w generowaniu globalnych sygnałów, np. fal wapniowych. Przykładem istotnej roli wydarzeń elementarnych w sygnalizacji wapniowej mogą być wyniki badań przeprowadzonych na komórkach jajowych *Fucus serratus* [15]. W komórkach tej brunatnicy stres hiperosmotyczny indukował wzrost $[Ca^{2+}]_{cyt}$ w dyskretnych domenach w obrębie cytozolu. Wzrosty $[Ca^{2+}]_{cyt}$ rzędu 200–300 nM obserwowane przez okres 15–30 ms miały charakter periodyczny i były przestrzennie rozdzielone rejonami cytoplazmy charakteryzującymi się obniżonym poziomem $[Ca^{2+}]$ [15].

Pojedyncze i dwufazowe wzrosty $[Ca^{2+}]_{cyt}$. Czynniki abiotyczne, takie jak: nagłe obniżenie temperatury, stres mechaniczny, oddziałując na różne komórki roślinne (np. *Arabidopsis thaliana* [25]) wywołują nagłe, pojedyncze i krótkotrwałe skoki poziomu $[Ca^{2+}]_{cyt}$, po których w ciągu kilku minut stężenie wolnego cytoplazmatycznego Ca^{2+} powraca do wartości rejestrowanych w komórkach spoczynkowych [25].

W komórkach niektórych roślin, m.in. *Arabidopsis thaliana* [24], w warunkach przedłużonego działania czynnika stresowego obserwuje się pojawienie dwufazowego sygnału $[Ca^{2+}]_{cyt}$. Długie utrzymywanie się niskiej temperatury indukuje sygnał, w którym po inicjalnym, krótkotrwałym (kilkusekundowym) wzroście $[Ca^{2+}]_{cyt}$ następuje drugie, nieco dłuższe (trwające do kilku minut) podwyższenie cytoplazmatycznego stężenia jonów wapnia [24]. Z kolei szok cieplny, stres solny, hiperosmotyczny i oksydacyjny wywołują najpierw kilkuminutowy wzrost $[Ca^{2+}]_{cyt}$, po którym dopiero następuje drugi, zdecydowanie dłuższy i utrzymujący się nawet przez wiele godzin [22, 24]. Dwufazowe zmiany cytoplazmatycznego stężenia Ca^{2+} obserwuje się także w komórkach roślinnych stymulowanych przez patogeny i elicytory [28]. Bodźce te wywołują powolny wzrost $[Ca^{2+}]_{cyt}$, a utrzymującemu się przez dłuższy czas podwyższonemu stężeniu jonów wapnia towarzyszy indukcja odpowiedzi obronnej komórki [28].

Fale wapniowe. Fale wapniowe stanowią formę globalnego sygnału $[Ca^{2+}]_{cyt}$, który wyzwalany jest przez nagromadzenie w obrębie małego regionu cytoplazmy pojedynczych wzrostów $[Ca^{2+}]_{cyt}$, co w następstwie prowadzi do wystąpienia zjawiska nazywanego indukowanym przez wapń uwalnianiem Ca^{2+} (CICR) z jego wewnątrz-

komórkowych magazynów [3]. Powstały w wyniku indukcji tego procesu sygnał może przybierać formę przestrzenne rozchodzącej się fali wapniowej [46]. Powstawanie tego typu fal pozwala na propagowanie specyficznych czasowo-przestrzennych zmian $[Ca^{2+}]_{cyt}$, które różnią się: amplitudą, komórkową lokalizacją i zasięgiem [30]. Różnorodne formy, jakie przybierają fale wapniowe, mogą determinować powstawanie specyficznej dla danego bodźca fizjologicznej odpowiedzi komórki [15].

Oscylacje wapniowe. Oscylacje wapniowe generowane w cytozolu, składają się z regularnych faz wzrostów i spadków $[Ca^{2+}]_{cyt}$. Fazy wzrostu wymagają zarówno napływu Ca^{2+} ze środowiska zewnątrzkomórkowego przez błonę plazmatyczną, jak i uwalniania wapnia z wewnątrzkomórkowych magazynów wapniowych (wakuoli, ER) do cytozolu. Fazy spadku koncentracji $[Ca^{2+}]_{cyt}$ związane są z „pompowaniem” jonów wapnia poza błonę plazmatyczną i jego ponownym gromadzeniem w wewnątrzkomórkowych magazynach Ca^{2+} [5]. Powstawanie oscylacji $[Ca^{2+}]_{cyt}$ zachodzi więc poprzez skoordynowaną interakcję pomiędzy błonowymi kanałami wapniowymi a Ca^{2+} -ATPazami i kotransporterami Ca^{2+}/H^{+} [48]. Uważa się, że oscylacje $[Ca^{2+}]_{cyt}$ umożliwiają kodowanie informacji w postaci ich amplitudy i częstotliwości [11]. Z badań prowadzonych nad sygnalizacją wapniową w komórkach roślinnych wynika, że kilka czynników środowiskowych i rozwojowych, oddziałując na komórkę, indukuje oscylacje $[Ca^{2+}]_{cyt}$, które różnią się: amplitudą, częstotliwością i czasem trwania, zaś ich forma zależy od siły oddziaływania i kombinacji specyficznych bodźców [11]. Periodyczność oscylacji $[Ca^{2+}]_{cyt}$ obserwowanych w komórkach roślinnych zmienia się od: oscylacji powolnych występujących w komórkach kulek na skutek stymulacji auksyną (period = 30 min) [12], poprzez oscylacje indukowane w komórkach aparatów szparkowych stymulowanych przez ABA, egzogenne podawany Ca^{2+} , ozon i elicytory (gdzie period > 3 min) [16], do szybkich oscylacji pojawiających się w wierzchołkowej części rosnącej łagiewki pyłkowej (period = 40–75 s) [30, 40].

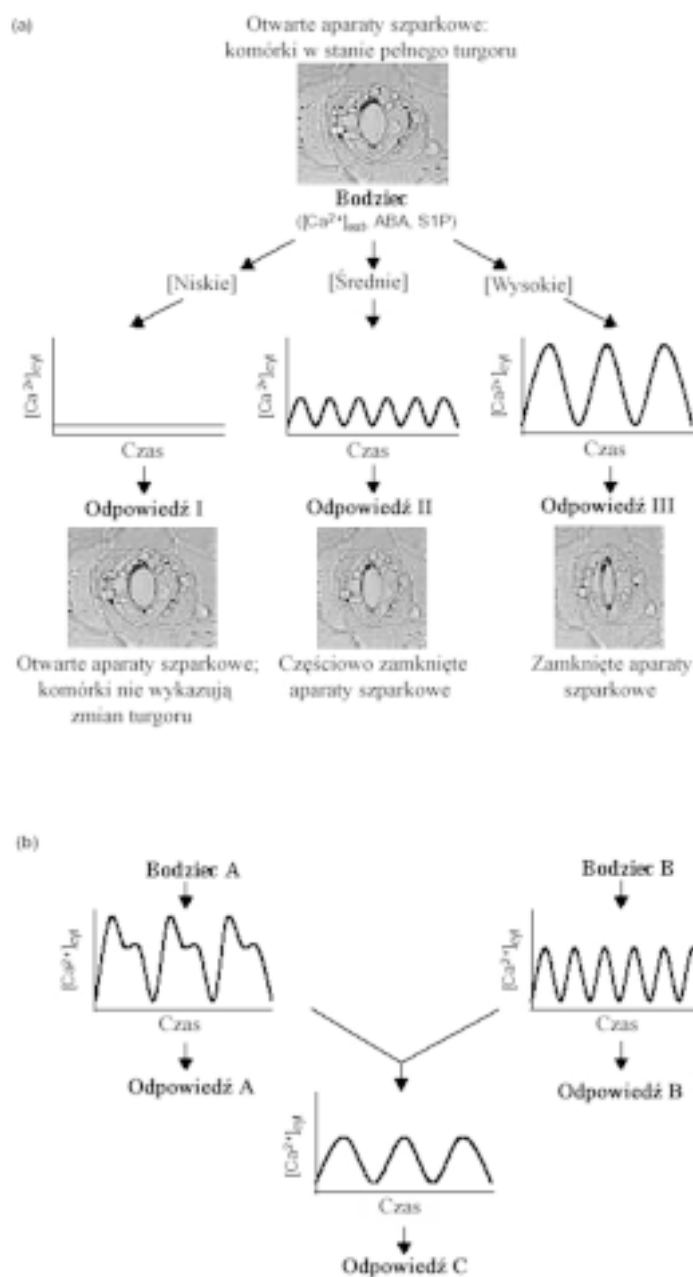
Jak do tej pory najlepiej poznano zjawisko powstawania oscylacji $[Ca^{2+}]_{cyt}$ w komórkach aparatów szparkowych poddawanych działaniu kwasu abscysynowego (ABA) i egzogenne Ca^{2+} . Stwierdzono, że w komórkach szparkowych *Arabidopsis thaliana* i *Vicia faba* oscylacje $[Ca^{2+}]_{cyt}$ pojawiają się w warunkach naturalnych, jednak są one słabe i nieregularne. Oscylacje cytoplazmatycznego Ca^{2+} uzyskują silną i regularną formę dopiero w wyniku działania zewnątrzkomórkowych bodźców [2]. W generowanie oscylacji wapniowych w komórkach szparkowych zaangażowane są: napięciowozależne kanały Ca^{2+} obecne w błonie komórkowej i w błonach otaczających wewnątrzkomórkowe magazyny wapnia (kanały typu VVca i SV) oraz kanały wrażliwe na wtórne przekaźniki informacji (IP_3 , cADPR i NAADP), które uwalniają Ca^{2+} z magazynów wapniowych. Wszystkie te kanały kontrolują napływ jonów wapnia do cytozolu. W usuwaniu podwyższonego stężenia Ca^{2+} z cytoplazmy uczestniczą pompy wapniowe i kotransportery Ca^{2+}/H^{+} , które tym samym odpowiedzialne są za fazę spadku koncentracji $[Ca^{2+}]_{cyt}$ [51].

Złożona czasowo-przestrzenna charakterystyka (sygnatura) oscylacji $[Ca^{2+}]_{cyt}$ koduje specyficzne względem bodźca informacje. Informacje kodowane przez sygnał $[Ca^{2+}]_{cyt}$ zawierają dwie składowe: pierwszą związaną z szybką reakcją i drugą umożliwiającą programowanie fizjologicznej reakcji komórki. W przypadku aparatów szparkowych komponent sygnału $[Ca^{2+}]_{cyt}$ związany z szybką reakcją pojawia się natychmiastowo

po zadziałaniu bodźca (np. ABA) i koduje informacje inicjujące zamykanie aparatów szparkowych. Przybiera on zazwyczaj formę krótkotrwałego wzrostu $[Ca^{2+}]_{cyt}$. Komponent sygnału wapniowego związany z programowaniem reakcji koduje informacje umożliwiające utrzymanie aktualnego stanu aparatu szparkowego (np. stanu zamknięcia) i zazwyczaj przybiera formę serii oscylacji [2]. Wzorzec oscylacji $[Ca^{2+}]_{cyt}$ jest bezpośrednio związany z siłą stymulacji i w efekcie wpływa na siłę wyzwolonej odpowiedzi fizjologicznej, którą w omawianym przypadku jest zamykanie aparatów szparkowych (ryc. 3a). Komórki szparkowe mogą poza tym integrować informacje pochodzące od oscylacji $[Ca^{2+}]_{cyt}$ wyzwalanych w odpowiedzi na kilka bodźców (ryc. 3b). W tego typu komórkach roślinnych dochodzi więc do powstawania jednej ostatecznej sygnatury wapniowej. Reguluje ona uzyskanie odpowiedzi komórkowej, która jest wynikiem dekodowania oscylacyjnych zmian $[Ca^{2+}]_{cyt}$ przez sensory wapniowe – zależne od Ca^{2+} fosfatazy [11]. Obecnie sugeruje się, że w komórkach szparkowych funkcjonować mogą zarówno kinazy zależne (CDPK), jak i niezależne od jonów Ca^{2+} , jednak rola CDPK w procesie kształtowania odpowiedzi komórkowych nie została jeszcze wyjaśniona [50]. Aktywność kinaz i fosfataz białkowych reguluje procesy fosforylacji i defosforylacji białek w komórkach szparkowych. Oscylacje o niskiej częstotliwości warunkują wzrost liczby białek w formie ufosforylowanej, podczas gdy oscylacje $[Ca^{2+}]_{cyt}$ o wyższej częstotliwości utrzymują podwyższony poziom białek zdefosforylowanych. Specyficzna równowaga pomiędzy frakcją białek zdefosforylowanych, a ufosforylowanych wpływa na kształt odpowiedzi fizjologicznej [31].

3.3. Dekodowanie sygnatury $[Ca^{2+}]_{cyt}$

Dekodowanie sygnatury wapniowej i generowanie specyficznej względem sygnału $[Ca^{2+}]_{cyt}$ odpowiedzi komórkowej wymaga aktywacji określonych typów białek wiążących Ca^{2+} [50]. Są to tzw. sensory wapniowe i białka docelowe dla tych sensorów. Odbiór sygnału wapniowego zachodzi poprzez wiązanie Ca^{2+} do sensorów wapniowych: odpowiadających lub przekaźnikowych [41]. Sensory odpowiadające (ang. *sensor responders*) podlegają indukowanym przez Ca^{2+} konformacyjnym zmianom, które wpływają na ich aktywność. Do tego rodzaju sensorów należy zależna od Ca^{2+} kinaza białkowa (CDPK) [18]. Enzym ten stanowi jedno z najbardziej powszechnych i specyficznych dla roślin białek [37]. Aktywowany jest przez mikromolowe stężenie wolnego cytoplazmatycznego wapnia. Składa się z domeny katalitycznej i regulatorowej, które oddzielone są przez region zawierający domenę autoinhibitorową. Podczas nieobecności cytoplazmatycznego sygnału wapniowego autoinhibitorowa domena CDPK hamuje aktywność enzymu [17]. Jony wapnia wiązane są przez domenę regulatorową, tzw. kalmodulino-podobną, która ma cztery motywy *EF-hand* [8]. Związanie Ca^{2+} znosi autoinhibicję i przywraca aktywność CDPK, która przez fosforylację różnych białek docelowych reguluje przebieg licznych procesów biologicznych. Wśród zidentyfikowanych do tej pory substratów CDPK znajdują się: transportery błonowe (np. Ca^{2+} -ATPazy), kanały jonowe (np. w komórkach aparatów szparkowych [51]), oksydazy NADPH, enzymy zaangażowane w metabolizm węgla i azotu, proteazy, białka cytoszkieletu oraz białka wiążące DNA [8,37]. Kinazy zależne od Ca^{2+} regulują u



RYCINA 3. Schemat przedstawia zależność pomiędzy sygnaturą wapniową a specyfiką uzyskanej odpowiedzi fizjologicznej w komórkach aparatów szparkowych (stymulowanych i znajdujących się w stanie spoczynku). (na podstawie [11], zmodyfikowany). (a) Oscylacje $[Ca^{2+}]_{cyt}$ warunkują specyficzną odpowiedź komórkową, przekazując informacje zakodowane w postaci amplitudy i częstotliwości. (b) Komórki aparatów szparkowych zdolne są do integrowania informacji zakodowanych w oscylacjach $[Ca^{2+}]_{cyt}$, indukowanych przez odmienne bodźce komórkowe (A i B). W ten sposób kształtowana jest ostateczna odpowiedź fizjologiczna (C). Dalszy opis w tekście

roślin przebieg takich procesów, jak: grawitropizm, transdukcja sygnałów indukowanych przez fitohormony, aklimatyzacja w warunkach stresu solnego, zimna i suszy oraz odpowiedź roślin na działanie patogenów [8]. W obrębie komórki roślinnej obserwuje się bardzo różną lokalizację kinaz zależnych od Ca^{2+} . Enzymy te dodatkowo wykazują odmienne powinowactwo względem jonów wapniowych. Zarówno powinowactwo, jak i wewnątrzkomórkowa lokalizacja enzymu stanowią czynniki, które prawdopodobnie zaangażowane są w generowanie specyficznej odpowiedzi komórkowej [8,41].

Sensory przekaźnikowe (ang. *sensor relays*) przechodzą indukowaną przez Ca^{2+} konformacyjną przemianę transmitowaną następnie do współdziałającego partnera. Do tej grupy sensorów należy kalmodulina [43]. Jako główny sensor Ca^{2+} , kalmodulina uczestniczy w transdukcji sygnałów generowanych w odpowiedzi na różnorodne bodźce abiotyczne i biotyczne. Jednym z białek docelowych oddziałujących z CaM jest zależna od niej kinaza białkowa II, która pełni funkcje dekodera częstotliwości oscylacji $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ [27]. Inną rodzinę w obrębie wapniowych sensorów przekaźnikowych stanowią białka podobne do kalcyneuryny B - CBL (z ang. *calcineurin B like proteins*), które mogą być zaangażowane w dekodowanie sygnałów $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ indukowanych np. przez stres solny. Białka CBL oddziałują z grupą kinaz białkowych należących do rodziny CIPK (ang. *CBL-interacting protein kinases*), które dekodują informacje zapisane w formie oscylacji $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ [29].

Większość sensorów wapniowych wiąże jony Ca^{2+} przez wysoce konserwatywne motywy typu *EF-hand*, w których skład wchodzi 29 reszt aminokwasowych, tworzących strukturę helisa-pętla-helisa (HLH). Występujące w tych motywach aminokwasy uczestniczą w tworzeniu wiązań koordynacyjnych z jonami wapnia. Motywy *EF-hand* zawierają następujące rodziny sensorów Ca^{2+} : kalmoduliny, białka kalmodulino-podobne (ang. *CaM-like-poteins*), białka podobne do kalcyneuryny B i zależne od Ca^{2+} kinazy białkowe (CDPK) [38].

W sensorach wapniowych zidentyfikowanych u roślin, pojawiają się także dwa inne motywy aminokwasowe, które pośredniczą w zależnym od Ca^{2+} oddziaływaniu białek z błonami lub lipidami błonowymi. Są to: 70-aminokwasowe sekwencje występujące w aneksynach [9] oraz zbudowane z 130–145 aminokwasów domeny typu C2, które tworzą szkielet o formie β -harmonijki, złożony z 8 antyrównoległych pasm połączonych przez pętle. Pętle 1–3 są umiejscowione na szczycie β -harmonijki i koordynują jony Ca^{2+} [44]. Związanie Ca^{2+} z domeną C2 ułatwia interakcję białka z ujemnie naładowanymi fosfolipidami [38].

Sensory wapniowe zaangażowane są w liczne procesy komórkowe [38]:

- ◆ dekodowanie sygnałów $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ i transdukcję informacji do elementów docelowych;
- ◆ kaskady fosforylacji i defosforylacji;
- ◆ transport błonowy;
- ◆ w sygnalizację, w której biorą udział produkty rozpadu różnych fosfolipidów błonowych,
- ◆ transkrypcję i translację;
- ◆ procesy rozwojowe (np. wzrost łagiewki pyłkowej).

Zaktywowane przez jony Ca^{2+} sensory wapniowe wchodzą w interakcję z białkami docelowymi i zmieniają transportowe i enzymatyczne właściwości tych białek, wpływają na orientację cytoszkieletu, kaskady fosforylacji białek oraz ekspresję genów [50]. Kształt odpowiedzi fizjologicznej determinowany jest nie tylko przez zmiany $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$, ale także przez ekspresję sensorów wapniowych, ich powinowactwo względem jonów Ca^{2+} oraz białek docelowych, a także przez wewnątrzkomórkową lokalizację i aktywność białek docelowych [14].

4. MODULOWANIE SYGNATURY WAPNIOWEJ

Cytozolowe sygnały wapniowe, indukowane na skutek stymulacji komórki, podlegają procesowi modulacji, co jest istotne w wytworzeniu najbardziej optymalnej dla komórki odpowiedzi fizjologicznej. Modulacja i kontrola sygnału $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ zachodzi np. na poziomie pewnych elementów sygnalizacyjnych, które są docelowe dla licznych kaskad $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ i mogą one przetwarzać lub blokować docierające do nich sygnały wapniowe [48]. Ekspozycja komórki na specyficzne czynniki lub zmiana dostępności komórkowych komponentów zaangażowanych w sygnalizację wapniową, modyfikuje również formę sygnału $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$.

Sygnatura $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$, indukowana przez określony bodziec, może być kształtowana przez różne sygnały odebrane wcześniej przez tę samą komórkę [48]. W komórkach powszechnie jest zjawisko dyskryminacji sygnałów $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ powstających na skutek powtarzalnej stymulacji lub w czasie refrakcji, gdy wzrost $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ nie może być wywołany przez ten sam czynnik środowiskowy lub rozwojowy. Wielkość zmian $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$, indukowanych np. na skutek powtarzalnej stymulacji przez wiatr, staje się dużo mniejsza, zaś uzyskanie pełnej odpowiedzi fizjologicznej możliwe jest dopiero po okresie refrakcji trwającym kilka minut [26]. Obserwacje te mogą wynikać z desensytyzacji kaskady sygnalizacyjnej lub z opróżnienia magazynów uwalniających Ca^{2+} do cytozolu [50]. Sygnatury wapniowe, wywołane przez jeden czynnik środowiskowy, mogą być modyfikowane przez wcześniejszą ekspozycję roślin na czynniki o odmiennej w stosunku do niego naturze. Przykładowo, zakres zmian poziomu $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ w odpowiedzi na stres oksydacyjny jest redukowany na skutek wcześniejszej ekspozycji komórki na stres hiperosmotyczny [24]. Sugeruje to istnienie oddziaływań typu *cross-talk* pomiędzy kaskadami sygnalizacyjnymi lub kaskadami i magazynami wapniowymi wykorzystywanymi przez oba te czynniki. Oddziaływanie *cross-talk* pomiędzy odrębnymi szlakami sygnalizacyjnymi, odpowiadającymi na różne warunki środowiska, umożliwia optymalizację odpowiedzi komórki roślinnej na określone bodźce [50].

5. PODSUMOWANIE

Od momentu rozpoczęcia badań nad mechanizmami transdukcji sygnałów w komórkach, wiedza o sygnalizacyjnej funkcji jonów Ca^{2+} dynamicznie powiększa się. Identyfikacja wtórnych przekaźników informacji, uczestniczących w mobilizacji wapnia

oraz scharakteryzowanie licznych efektorów wapniowych, regulowanych przez zmiany poziomu $[Ca^{2+}]_{\text{cyt}}$, umożliwiło stopniowe zrozumienie sygnalizacyjnych mechanizmów funkcjonujących w komórce. W ostatnich latach wykazano, że stymulowane poprzez różne bodźce uwalnianie (mobilizacja) jonów wapnia z wewnątrzkomórkowych magazynów do cytoplazmy umożliwia generowanie sygnałów $[Ca^{2+}]_{\text{cyt}}$ o zróżnicowanych charakterystykach czasowych i przestrzennych. Jednocześnie zaobserwowano, że określone wzorce sygnałów wapniowych stymulują odmienne efekторы komórkowe i tym samym warunkują powstawanie specyficznych odpowiedzi fizjologicznych [13].

Obecnie jony Ca^{2+} uważane są za jeden z kluczowych elementów biorących udział w mechanizmie dekodowania zewnętrznych sygnałów, docierających do komórki. Jony wapnia jako przekaźnik informacji odgrywają również istotną rolę w wielu ważnych procesach komórkowych (np. w zapłodnieniu, podczas proliferacji i różnicowania się komórek, a także podczas apoptozy)[39].

Wiedza na temat udziału jonów wapnia w regulacji procesów komórkowych systematycznie powiększa się. Mimo to wiele pytań związanych z tymi zagadnieniami ciągle pozostaje bez odpowiedzi. Dotyczą one między innymi:

- ◆ sposobu regulacji białek uczestniczących w utrzymywaniu wewnątrzkomórkowej homeostazy jonów Ca^{2+} ;
- ◆ biologicznego znaczenia sygnatury wapniowej i sposobu w jaki specyficzne czasowo-przestrzenne zmiany stężenia $[Ca^{2+}]_{\text{cyt}}$ kodują informacje konieczne do powstania specyficznej odpowiedzi komórkowej;
- ◆ elementów (białek) docelowych, podlegających regulacji przez wewnątrzkomórkowe sygnały wapniowe ($[Ca^{2+}]_{\text{cyt}}$);
- ◆ interakcji typu *cross-talk* pomiędzy poszczególnymi szlakami transdukcji sygnału.

Zarówno pytania, jak i wątpliwości wyznaczają obecnie kierunki, którymi podążają dalsze badania nad rolą jonów wapnia w procesach sygnalizacji wewnątrz- i międzykomórkowej.

LITERATURA

- [1] ALLEN GA, KWAK JM, CHU SP, LLOPIS J, TSIEN RY, HARPER JF, SCHROEDER JI. Cameleon calcium indicator reports cytoplasmic calcium dynamics in *Arabidopsis* guard cells. *Plant J* 1999; **19**: 735–747.
- [2] ALLEN GJ, CHU SP, HARRINGTON CL, SCHUMACHER K, HOFFMANN T, TANG YY, GRILL E, SCHROEDER JI. A defined range of guard cell calcium oscillation parameters encodes stomatal movements. *Nature* 2001; **411**: 1053–1057.
- [3] BERRIDGE MJ, LIPP P, BOOTMAN MD. The versatility and universality of calcium signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2000; **1**: 11–21.
- [4] BIBIKOVA TN, ZHIGILEI A, GILROY S. Root hair growth in *Arabidopsis thaliana* is directed by calcium and an endogenous polarity. *Planta* 1997; **203**: 497–505.
- [5] BLATT MR. Ca^{2+} signalling and control of guard-cell volume in stomatal movements. *Curr Opin Plant Biol* 2000; **3**: 196–204.
- [6] BLUME B, NURNBERGER T, NASS N, SCHEEL D. Receptor mediated increase in cytoplasmic free calcium required for activation of pathogen defense in parsley. *Plant Cell* 2000; **12**: 1425–1440.
- [7] CESSNA SG, KIM J, TAYLOR ATS. Cytosolic Ca^{2+} pulses and protein kinase activation in the signal transduction pathways leading to the protein oxidative burst. *J Plant Biol* 2003; **46**: 215–222.

- [8] CHENG SH, WILLMANN MR, CHEN HC, SHEEN J. Calcium signaling through protein kinases. The *Arabidopsis* calcium-dependent protein kinase gene family. *Plant Physiol* 2002; **129**: 469–485.
- [9] CLARK GB, ROUX SJ. Annexins of plant cell. *Plant Physiol* 1995; **109**: 1133–1139.
- [10] EVANS DE, WILLIAMS LE. P-type calcium ATPases in higher plants – biochemical, molecular and functional properties. *Biochim Biophys Acta* 1998; **1376**: 1–25.
- [11] EVANS NH, MCAINSH MR, HETHERINGTON AM. Calcium oscillations in higher plants. *Curr Opin Plant Biol* 2001; **4**: 415–420.
- [12] FELLE H. Auxin causes oscillations of cytosolic free calcium and pH in *Zea mays* coleoptiles. *Planta* 1988; **174**: 495–499.
- [13] GALIONE A, CHURCHILL GC. Interactions between calcium release pathways: multiple messengers and multiple stores. *Cell Calcium* 2002; **32**: 343–354.
- [14] GILROY S, TREWAVAS A. Signal processing and transduction in plant cells: the end of beginning? *Nat Rev Mol Cell Biol* 2001; **2**: 307–314.
- [15] GODDARD H, MANISON NFH, TOMOS D, BROWNLEE C. Elemental propagation of calcium signals in response-specific patterns determined by environmental stimulus strength. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; **97**: 1932–1937.
- [16] GRABOV A, BLATT MR. Membrane voltage initiates Ca²⁺ waves and potentiates Ca²⁺ increases with abscisic acid in stomatal guard cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; **95**: 4778–4783.
- [17] HARMON AC, GRIBSKOV M, HARPER JF. CDPKs – a kinase for every Ca²⁺ signal? *Trends Plant Sci* 2000; **5**: 154–159.
- [18] HARPER JF, BRETON G, HARMON A. Decoding Ca²⁺ signals through plant protein kinases. *Annu Rev Plant Biol* 2004; **55**: 263–268.
- [19] HEPLER PK. Tip growth in pollen tubes: calcium leads the way. *Trends Plant Sci* 1997; **2**: 79–80.
- [20] HETHERINGTON AM, BROWNLEE C. The generation of Ca²⁺ signals in plants. *Annu Rev Plant Biol* 2004; **55**: 401–427.
- [21] HIRSCHI K. Vacuolar H⁺/Ca²⁺ transport: who's directing the traffic? *Trends Plant Sci* 2001; **6**: 100–104.
- [22] KIEGLE E, MOORE CA, HASELOFF J, TESTER MA, KNIGHT MR. Cell-type-specific calcium responses to drought, salt and cold in the *Arabidopsis* root. *Plant J* 2000; **23**: 267–278.
- [23] KNIGHT H, TREWAVAS AJ, KNIGHT MR. Calcium signalling in *Arabidopsis thaliana* responding to drought and salinity. *Plant J* 1997; **12**: 1067–1078.
- [24] KNIGHT H. Calcium signaling during abiotic stress in plants. *Int Rev Cytol* 2000; **195**: 269–324.
- [25] KNIGHT MR, CAMPBELL AK, SMITH SM, TREWAVAS AJ. Transgenic plant aequorin reports the effects of touch and cold-shock and elicitors on cytoplasmic calcium. *Nature* 1991; **352**: 524–526.
- [26] KNIGHT MR, SMITH SM, TREWAVAS AJ. Wind-induced plant motion immediately increases cytosolic calcium. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; **89**: 4967–4971.
- [27] KONINCK P, SCHULMAN H. Sensitivity of CaM kinase II to the frequency of Ca²⁺ oscillations. *Science* 1998; **279**: 227–230.
- [28] LECOURIEUX D, MAZARS C, PAULY N, RANJEVA R, PUGIN A. Analysis and effects of cytosolic free calcium increases in response to elicitors in *Nicotiana plumbago-ginifolia* cells. *Plant Cell* 2002; **14**: 2627–2641.
- [29] LUAN S, KUDLA J, RODRIGUEZ M, YALOWSKY S, GRUISSEM W. Calmodulins and calcineurin B-like proteins: calcium sensors for specific signal response coupling in plants. *Plant Cell* 2002; **14**: S389–S400.
- [30] MALHO R, MOUTINHO A, VAN DER LUIT A, TREWAVAS AJ. Spatial characteristics of calcium signalling: the calcium wave as a basic unit plant cell calcium in signalling. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 1998; **353**: 1463–1473.
- [31] MCAINSH MR. Calcium ions as second messengers in guard cell signal transduction. *Physiol Plant* 1997; **100**: 16–20.
- [32] MUIR SR, SANDERS D. Inositol 1,4,5-trisphosphate-sensitive Ca²⁺ release across nonvacuolar membranes in cauliflower. *Plant Physiol* 1997; **114**: 1511–1521.
- [33] NAVAZIO L, BEWELL MA, SIDDIQUA A, DICKINSON GD, GALIONE A, SANDERS D. Calcium release from the endoplasmic reticulum of higher plants elicited by the NADP metabolite nicotinic acid adenine dinucleotide phosphate. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; **97**: 8693–8698.
- [34] NAVAZIO L, MARIANI P, SANDERS D. Mobilization of Ca²⁺ by cyclic ADP-ribose from the endoplasmic reticulum of cauliflower florets. *Plant Physiol* 2001; **125**: 2129–2138.
- [35] NG CKY, MCAINSH MR. Encoding specificity in plant calcium signalling: hot-spotting the ups and downs and waves. *Ann Bot* 2003; **92**: 477–485.

- [36] PITTMAN JK, SREEVIDYA CS, SHIGAKI T, UEOKA-NAKANISHI H, HIRSCHI KD. Distinct N-terminal regulatory domains of $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^{+}$ antiporters. *Plant Physiol* 2002; **130**: 1054–1062.
- [37] REDDY ASN. Calcium: silver bullet in signaling. *Plant Sci* 2001; **160**: 381–404.
- [38] REDDY VS, REDDY ASN. Proteomics of calcium-signaling components in plant. *Phytochemistry* 2004; **12**: 1745–1776.
- [39] RIZZUTO R, POZZAN T, CARAFOLI E. Ca^{2+} on the move: ways and means to translate a multivarious signal. *Trends Pharmacol Sci* 2002; **8**: 348–350.
- [40] RUDD JJ, FRANKLIN-TONG VE. Unraveling response-specificity in Ca^{2+} signalling pathways in plant cells. *New Phytol* 2001; **151**: 7–33.
- [41] SANDERS D, PELLOUX J, BROWNLEE C, HARPER JF. Calcium at the crossroads of signaling. *Plant Cell* 2002; **14**: S401–S417.
- [42] SCRASE-FIELD SA, KNIGHT MR. Calcium: just a chemical switch? *Curr Opin Plant Biol* 2003; **6**: 500–506.
- [43] SNEDDEN WA, FROMM H. Calmodulin as versatile signal transducer in plants. *New Phytol* 2001; **151**: 35–66.
- [44] SUTTON RB, DAVLETOV BA, BERGHUIS AM, SUDHOF TC, SPRANG SR. Structure of the first C2 domain of synaptogamin I: a novel Ca^{2+} / phospholipid-binding fold. *Cell* 1995; **80**: 929–938.
- [45] SZE H, LIANG F, HWANG I, CURRAN AC, HARPER JF. Diversity and regulation of plant Ca^{2+} pumps: insight from expression in yeast. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 2000; **51**: 433–462.
- [46] TAYLOR AR, MANISON NFH, FERNANDEZ C, WOOD JW, BROWNLEE C. Spatial organization of calcium signalling involved in cell volume control in the *Fucus* rhizoid. *Plant Cell* 1996; **8**: 1935–1949.
- [47] TRETYN A. Wapń w komórkach eukariotycznych. Występowanie, transport, komórkowy mechanizm działania. Warszawa, PWN, 1994.
- [48] TREWAVAS A. Le calcium, c'est la vie: calcium makes waves. *Plant Physiol* 1999; **120**: 1–6.
- [49] WHITE PJ. Calcium channels in higher plants. *Biochim Biophys Acta* 2000; **1465**: 171–183.
- [50] WHITE PJ, BROADLEY MR. Calcium in plants. *Ann Bot* 2003; **92**: 487–511.
- [51] YANG HM, ZHANG XY, WANG GX. Cytosolic calcium oscillation signaling in guard cell. *Plant Sci* 2004; **166**: 549–556.

Redaktor prowadzący – Maria Olszewska

Otrzymano: 16.11.2004 r.

Przyjęto: 09.05.2005 r.

Gagarina 9, 87-100 Toruń,

E-mail: tran@biol.uni.torun.pl