

## CYKLICZNE NUKLEOTYDY U ROŚLIN WYŻSZYCH

### CYCLIC NUCLEOTIDES IN HIGHER PLANTS

Adriana SZMIDT-JAWORSKA, Krzysztof JAWORSKI, Jan KOPCEWICZ

Zakład Fizjologii i Biologii Molekularnej Roślin, Instytut Biologii Ogólnej  
i Molekularnej, Uniwersytet Mikołaja Kopernika, Toruń

*Streszczenie:* Cykliczny adenozy-no-3':5'-monofosforan i cykliczny guanozy-no-3':5'-monofosforan, potocznie znane jako cAMP i cGMP, są wtórnymi przekaźnikami informacji, których obecność została opisana u wielu organizmów rozpoczynając od bakterii, a na człowieku kończąc. Cykliczny AMP i GMP są produkowane z ATP i GTP w wyniku działania cyklaz adenylnowych i guanylnowych, natomiast ich dezaktywacja związana jest z fosfodiesterazami cyklicznych nukleotydów. W ostatnich latach udokumentowano obecność cyklicznych nukleotydów w tkankach roślinnych, jak również opisano obecność enzymów związanych z ich metabolizmem. W niniejszej pracy przedstawiliśmy dane dotyczące obecności i przemian metabolicznych, jakim podlegają cykliczne nukleotydy w komórkach roślinnych, równocześnie opisaliśmy główne procesy, w których one uczestniczą.

*Słowa kluczowe:* cykliczne nukleotydy, cAMP, cGMP.

*Summary:* Cyclic adenosine 3':5'-monophosphate and cyclic guanosine 3':5'-monophosphate, commonly known as cAMP and cGMP, are key second messengers in living organisms ranging from bacteria to *Homo sapiens*. Cyclic AMP and cyclic GMP are produced from ATP and GTP by the action of adenylyl cyclase and guanylyl cyclase and are hydrolyzed to AMP and GMP by the cyclic nucleotide phosphodiesterase. The natural occurrence of cyclic nucleotides in higher plants is now established, as is the presence of enzymes involved in their metabolism. Accumulating evidence suggests crucial roles for both cyclic nucleotides in plant cellular homeostasis. Here we review the past and recent evidence establishing the presence of these compounds, their metabolism and role in plants.

*Key words:* cyclic nucleotides, cAMP, cGMP.

## WPROWADZENIE

Prawie 50 lat temu odkrycie pojedynczej cząsteczki cyklicznego adenozy-no-3':5'-monofosforanu zmieniło sposób myślenia dotyczący regulacji procesów komórkowych. Zapoczątkowało również zakrojone na szeroką skalę badania dotyczące wtórnych przekaźników informacji. Badania trwają po dzień dzisiejszy, a

uzyskiwane wyniki wskazują na niezwykle kompleksowość i zróżnicowanie układów generujących cykliczne nukleotydy.

Cykliczne monofosforany nukleotydów (cNMP) są określane jako cząsteczki sygnałowe zarówno u mikroorganizmów, jak i u zwierząt. Badania nad roślinnymi cyklicznymi nukleotydami są prowadzone ze zmiennym powodzeniem od kilku lat. Chociaż początkowe wątpliwości i niepewności odnośnie roli cyklicznych nukleotydów w sygnalizacji komórkowej u roślin zostały już wyjaśnione, ciągle istnieje wiele pytań, które pozostają bez odpowiedzi. Cykliczny 3':5'-guanozynomonofosforan (cGMP) i cykliczny 3':5'-adenozynomonofosforan (cAMP) zostały opisane u kilku gatunków roślin [23, 57, 69, 76], lecz liczba prac poruszająca problem cyklicznych nukleotydów u roślin ciągle jest znikoma.

W pracy podsumowano stan wiedzy na temat cyklicznych nukleotydów, podano krótką charakterystykę enzymów związanych z metabolizmem tych związków, ich roli, jak również poszukiwano analogii między światem roślin, zwierząt i bakterii.

## WYSTĘPOWANIE CYKLICZNYCH NUKLEOTYDÓW U ROŚLIN

Do chwili obecnej występowanie cAMP i cGMP zostało udokumentowane u wielu organizmów zarówno zwierzęcych, jak i roślinnych.

Początkowe prace dotyczące ilościowej analizy cAMP określały jego poziom w bardzo szerokim zakresie od 1 do 1500 pmol/g świeżej tkanki [8, 27]. Z biegiem czasu techniki pomiaru stały się bardziej czułe, skutkiem czego ilość cAMP w badanych tkankach była już bardziej precyzyjnie określona. W pędzie *Torenia* wykazano 36 pmoli cAMP/g świeżej tkanki [39], zaś w zawieszynie komórkowej fasoli (*Phaseolus vulgaris*) – 5 pmoli/g świeżej tkanki [5]. Gangwani i inni [29] stwierdzili, że w kulturach rzęsy garbatej (*Lemna gibba*) ilość cAMP waha się w granicach 70–80 pmoli/g świeżej tkanki.

Prawdopodobnie pierwszym doniesieniem dotyczącym występowania cGMP u roślin była analiza zmian jego stężenia podczas podziałów oraz wzrostu komórek tytoniu (*Nicotiana tabacum*) [53]. Obecność cGMP opisano także w korzeniach fasoli i w pyłku sosny [42]. Zaobserwowano także znaczące różnice w stężeniu tego związku, szczególnie pod wpływem czynników środowiskowych. I tak w liściach tytoniu jego ilość wynosi od 0,05 pmol/g do 0,3 pmol/g świeżej tkanki po potraktowaniu ich NO [23]. W przypadku wilca wielkokwiatowego (*Pharbitis nil*) ilość cGMP u roślin rosnących na świetle wynosi 11 pmoli/g świeżej tkanki, a umieszczenie roślin w ciemności powoduje pojawianie się fal cGMP [76].

Uzyskane wyniki wskazują także, że stężenia cyklicznych nukleotydów mogą różnić się znacząco w zależności od analizowanego gatunku i badanej tkanki. Także warunki środowiska, w których uprawia się rośliny, wywierają duży wpływ na zawartość nukleotydów. Oczywiście stężenie nukleotydu może być wyższe tylko w pewnych partiach tkanek czy określonym typie komórek, tak więc lokalne stężenie

może różnić się od tzw. średniego stężenia cyklicznego nukleotydu występującego w obrębie organu czy całego organizmu.

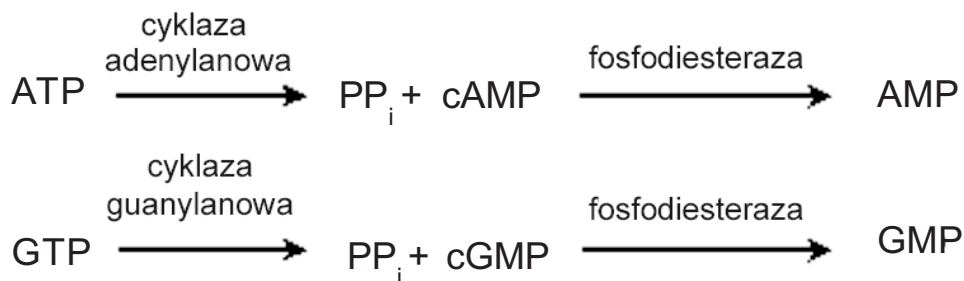
Informacje dotyczące cyklicznych nukleotydów innych niż cAMP i cGMP są znikome zarówno w przypadku materiału zwierzęcego, jak i roślinnego. U ssaków odkryto cCMP, cIMP, cTMP i cUMP oraz enzymy związane z ich syntezą i hydrolizą [63]. Funkcja tych nukleotydów nie została opisana. Istnieją jednak dane wskazujące, że ich działania nie można modulować agonistami i antagonistami cAMP i cGMP [10]. Tak więc te cztery dodatkowe nukleotydy wydają się mieć inne działanie.

Przykładowo obecność cCMP, cUMP, cIMP i cTMP została wykryta w korzeniach grochu (*Pisum sativum*) za pomocą spektrometrii masowej [62]. Poziom nukleotydów w tkankach merystematycznych i stałych wykazywał znaczące różnice. W tkance merystematycznej występują cAMP, cCMP, cGMP i cUMP, z których w najwyższym stężeniu występował cCMP, co może odzwierciedlać jego rolę w podziałach komórkowych, analogicznie do tej, jaką stwierdzono w komórkach ssaków. W tkankach stałych zidentyfikowano cAMP, cGMP, cCMP, cIMP, cUMP i cTMP, z czego cUMP występuje w najwyższym stężeniu. Obecność dużej ilości cUMP oraz występowanie cIMP i cTMP świadczą o różnicach w mechanizmach proliferacji tkanek stałych i merystematycznych.

## METABOLIZM CYKLICZNYCH NUKLEOTYDÓW

Cykliczne nukleotydy są syntetyzowane przez cyklazy, a inaktywacja zachodzi przy współudziale specyficznych fosfodiesteraz. Biosynteza i inaktywacja przebiegają w przypadku cAMP i cGMP podobnie według schematu przedstawionego na rycinie 1.

Schemat ten sugeruje podobieństwa w mechanizmach regulujących syntezę i inaktywację obu cyklicznych nukleotydów. W komórkach zwierzęcych synteza jest regulowana przez szereg izoenzymów cyklazy adenylanowej i guanylanowej, które różnią się rozmieszczeniem, właściwościami biochemicznymi i funkcjonalnymi. Procesy te są regulowane przez mechanizmy zachodzące zarówno w błonie plazmatycznej, jak i cytozolu.



RYCINA 1. Biosynteza i inaktywacja cyklicznego AMP i cyklicznego GMP (wg [58], zmienione)

Cykliczny AMP powstaje z ATP w wyniku reakcji katalizowanej przez cyklazę adenylanową (AC). Substratem enzymu jest kompleks ATP z jonami magnezu. U zwierząt AC jest enzymem działającym w obrębie błony komórkowej. Cyklaza adenylanowa związana z błonami została wyizolowana i oczyszczona z materiału zwierzęcego m.in. z komórek szczura. Domena katalityczna tego białka jest podobna do cyklazy adenylanowej z cyjanobakterii i myksobakterii [11, 13], co wskazuje na duże rozprzestrzenienie i różnorodność w rodzinie cyklaz. Rozpuszczalna cyklaza adenylanowa, której sekwencja różni się od tej oznaczonej dla klasycznej cyklazy ssaków, była opisana u glonów i grzybów [88]. Jest więc wielce prawdopodobne, że cyklazy te istnieją powszechnie również w komórkach roślinnych.

U organizmów prokariotycznych cyklazy adenylanowe są podzielone na 4 klasy, na podstawie struktury pierwszorzędowej ich domen katalitycznych. Klasa 1 obejmuje AC spotykane u enterobakterii. Klasa 2 została odkryta u bakterii patogennych i jest aktywowana przez kalmodulinę. Klasa 3 jest najszerszej rozpowszechniona od bakterii do ssaków. Klasę 4 opisano u archebakterii. Każda z klas wykazuje wysoką specyficzność i brak jest wzajemnej homologii pomiędzy nimi [64].

U cyjanobakterii (*Spirulina platensis*) wyizolowano 6 genów kodujących cyklazę adenylanową. Jednocześnie określono, że *CYA A* koduje AC związaną z błonami, podczas gdy *CYA C* koduje AC, która jest aktywowana przez fosforylację. *CYA G* ma homologię do domeny katalitycznej klasy 3 cyklaz adenylanowych i guanylanowych. *CYA G* jest cyklazą adenylanową, którą przekształcić można w cyklazę guanylanową po zastąpieniu 3 kluczowych aminokwasów w miejscu wiązania substratu [64].

Istnieje niewiele dowodów na istnienie tej grupy enzymów w komórkach roślinnych. Występowanie w komórkach roślinnych cyklicznych nukleotydów wskazuje na istnienie enzymów odpowiedzialnych za ich syntezę. Potwierdzone jest to przez wyniki uzyskane przy zastosowaniu różnych agonistów i antagonistów zwierzęcych cyklaz. Ich egzogenna aplikacja powoduje zmiany w poziomie cyklicznych nukleotydów i różne odpowiedzi fizjologiczne: wzrost łagiewki pyłkowej u *Agapanthus umbellatus* [57], regulację otwierania szparek u rzodkiewnika (*Arabidopsis thaliana*) [19], podziały komórkowe u tytoniu [26], ekspresję genów w warstwie aleuronowej u jęczmienia (*Hordeum vulgare*) [69], rozwój korzeni u komeliny zwyczajnej (*Commelina communis*), akumulację fitoaleksyn u *Cupressus lusitanica* [91] i regulację kwitnienia u wilca wielkokwiatowego (*Pharbitis nil*) [76].

Aktywność enzymu o właściwościach cyklazy adenylanowej opisano w ekstraktach korzeniowych lucerny (*Medicago sativa*), rącznika (*Ricinus max*), grochu (*Pisum*) [12, 54, 67] i tytoniu [86]. Carricarte i inni [12] opisali rozpuszczalną cyklazę adenylanową w korzeniach lucerny. Ma ona masę ok. 84 kDa i jest aktywowana przez  $Ca^{2+}$  i  $Mg^{2+}$ . Enzym produkuje 204 pmole cAMP/min/mg białka w obecności wapnia, a aktywność jest stymulowana 15-krotnie po podaniu kalmoduliny z wołu. Stymulacja jest hamowana po dodaniu EGTA i chlorpromazyny (inhibitora działania CaM). Podawanie substancji związanych z działaniem białek G nie daje pozytywnych wyników, co sugeruje, że enzym nie jest zależny od białek G. Inna grupa badaczy

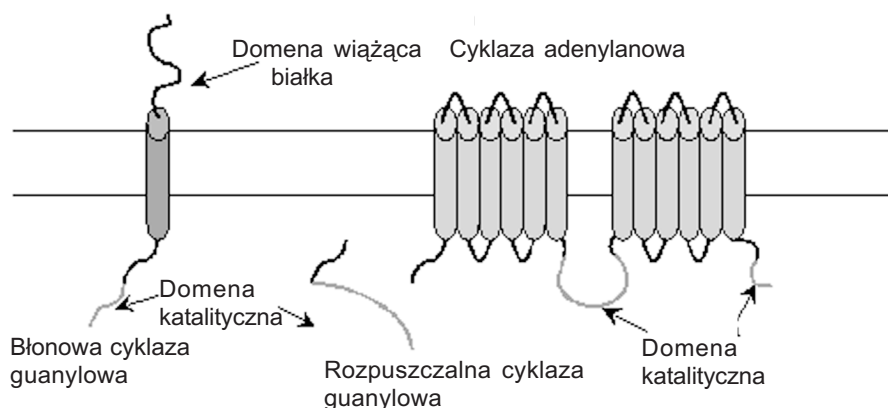
[54] opisała błonową cyklazę adenylanową z korzeni rącznika. Enzym produkuje ok. 20 pmoli cAMP/min/mg białka w obecności  $MnCl_2$ . W przeciwieństwie do enzymu z lucerny ta cyklaza jest czuła na GTP, co sugeruje jej regulację przez białka G.

Pośrednim dowodem na istnienie cyklazy adenylanowej u roślin jest występowanie w komórkach bawełny (*Gossypium hirsutum*) genu kodującego białko CAP, które jest związane z cyklazą adenylanową (ang. *Adenylyl cyclase-associated protein*) [43]. Ogólnie białka CAP regulują remodelowanie aktyny w odpowiedzi na sygnały komórkowe, a ich koniec N odgrywa rolę w sygnalizacji białek Ras i wiązaniu cyklazy adenylanowej. Ekspresja genu *CAP* jest najwyższa w młodych komórkach, tak więc przypuszcza się, że mogą one i cyklaza adenylanowa odgrywać rolę we wzroście elongacyjnym komórki, prawdopodobnie poprzez wpływ na cytoszkielet.

Przez dłuższy czas wyniki dotyczące oznaczania aktywności cyklazy adenylanowej były traktowane krytycznie, ponieważ wszelkie próby zidentyfikowania sekwencji DNA w roślinnym genomie o homologii do zwierzęcych cyklaz adenylanowych kończyły się niepowodzeniem. Obecnie istnieją doniesienia o sklonowaniu takiej cyklazy. Jest nią *PSiP* (ang. *Pollen-Signalling Protein*) będąca cyklazą adenylanową w komórkach pyłku *Agapanthus* [57]. Stwierdzono, że *PSiP* wykazuje homologię nie tylko do grzybowej cyklazy adenylanowej (z *Neurospora crassa*), lecz także do białek odporności na choroby, co może stanowić wskazówkę, że enzymy te odgrywają rolę w sygnalizacji ataku patogena [77, 91]. Gen uzyskany z cDNA pyłku ulegając ekspresji w komórkach *E. coli* powoduje jednocześnie akumulację cAMP, w wyniku czego dochodzi do zniesienia defektu w fermentacji węglowodanów u mutantu *cyaA E. coli* [57]. Zarówno transformacja antysensownym fragmentem, jak też traktowanie antagonistami cyklazy adenylanowej przerywa wzrost łagiewki pyłkowej, sugerując tym samym, że proces ten wymaga ciągłej syntezy cAMP. Ta hipoteza była potwierdzona poprzez monitorowanie poziomu cAMP w rosnących łagiewkach pyłkowych. Podawany forskolin, aktywator cyklazy adenylanowej, wywoływał przejściowy wzrost poziomu cAMP, podczas gdy dideoksyadenozyna, inhibitor cyklazy, powodował chwilowe obniżenie stężenia tego wtórnego przekazywnika. Czasowe zmiany w stężeniach cAMP, wskazują także na obecność w łagiewkach pyłkowych enzymów, takich jak fosfodiesterazy, biorących udział w inaktywacji cyklicznych nukleotydów.

Cyklazy guanylanowe (GC) katalizują proces konwersji GTP do cGMP [58]. W komórkach zwierzęcych enzym ten występuje w dwóch głównych formach, w formie rozpuszczalnej (sGC; frakcja cytozolowa) i formie związanej (pGC; frakcja błonowa oraz elementów cytoszkieletu) (ryc. 2).

W komórkach zwierzęcych cząsteczka sGC jest hemoproteina o strukturze heterodimeru, o łącznej masie cząsteczkowej ok. 150 kDa. Tworzą je dwie podjednostki a (m.cz. 73–82 kDa) i b (m.cz. 70–74), mogące, w zależności od tkanki/gatunku, wykazywać różnice w składzie aminokwasowym. Doświadczenia przeprowadzone ze sklonowanymi podjednostkami a i b wskazują, że wyrażenie pełnej aktywności katalitycznej enzymu wiąże się z koniecznością dimeryzacji łańcuchów polipeptydowych podjednostek. Podjednostki te są kodowane w odrębnych genach,



RYCINA 2. Organizacja przestrzenna cząsteczek cyklazy adenylnowej i cyklaz guanylanowych (wg <http://vivo.colostate.edu> oraz <http://www.fz-juelich.de>, zmienione)

stwarzając tym samym możliwość zróżnicowanej regulacji ich ekspresji. Centrum katalityczne sGC, zbudowane z 250 reszt aminokwasowych, znajduje się w pobliżu C-końca łańcucha białkowego i wykazuje niezwykle duże podobieństwo w różnych formach cyklazy guanylanowej (łącznie z enzymem błonowym).

U zwierząt istnieje wiele form enzymu błonowego (związanego, pGC), które podzielono na 2 kategorie: enzym związany z błoną komórkową będący jednocześnie receptorem powierzchniowym i efektem oraz enzym regulowany przez  $Ca^{2+}$ , występujący w rzęskach pierwotniaków oraz w segmentach zewnętrznych fotoreceptorów kręgowców.

Błonowa cyklaza guanylanowa jest glikoproteiną zbudowaną z pojedynczego łańcucha polipeptydowego o masie cząsteczkowej 115–180 kDa. Wysoką aktywność katalityczną obserwuje się w stanie ufosforylowanym enzymu. Cząsteczka enzymu tworzy jedną domenę wewnątrzbłonową, z N-końcem zlokalizowanym na zewnątrz i C-końcem występującym we wnętrzu komórki.

U bakterii oznaczono tylko jeden gen kodujący ten enzym. W przeciwieństwie do zróżnicowanej natury domen katalitycznych AC domeny katalityczne GC są homologiczne do tych opisanych w klasie 3 AC. Tak więc uważa się, że klasa 3 AC i GC miały wspólnego przodka. Analiza aminokwasowa wykazała, że miejsce tworzenia wiązania wodorowego z adeniną lub guaniną jest zachowywane w klasie 3 AC i GC. Poprzez zamianę tych reszt GC mogą być przekształcane w AC [51, 80].

Region na końcu N, znajdujący się obok domeny katalitycznej (ok. 50 aa), jest wysoce konserwacyjny wśród wszystkich opisanych do tej pory GC, a klasa 3 AC nie wykazuje takiej zależności. Region ten prawdopodobnie bierze udział w tworzeniu  $\alpha$ -helisy i funkcjonuje jako domena dimeryzacyjna [84]. Poza rolę w procesie dimeryzacji, wykazano, że ma ona znaczenie w stymulacji aktywności katalitycznej w ludzkiej GC z siatkówki [81].



Pośrednie dowody dotyczące występowania cyklazy guanylanowej w tkankach roślinnych pochodzą z doświadczeń ilościowego oznaczania cGMP. Jest oczywiste, że skoro w komórkach poziom cGMP ulega wahaniom, to musi istnieć w pełni sprawny układ metaboliczny, który generuje te zmiany.

W doświadczeniach prowadzonych na wilcu wielkokwiatowym (*Pharbitis nil*) wykazano oscylacje poziomu cGMP podczas nocy. Dodatkowo zastosowanie nitroprusydku sodu – związku, który uwalniając NO jest w stanie wpływać na aktywność rozpuszczalnych cyklaz guanylanowych, wykazało znaczący wzrost poziomu cGMP w komórce. Analogicznie podanie inhibitora cyklazy guanylanowej (NS 2028) spowodowało drastyczny spadek jego poziomu, co może wskazywać na istnienie w komórkach *P. nil* enzymu, którego aktywność podlega regulacji podobnej do tej, jaką zaobserwowano w przypadku zwierzęcych cyklaz guanylanowych [76].

Istnieją także bezpośrednie dowody na obecność cyklazy u roślin. Spektrometria masowa została użyta do scharakteryzowania aktywności cyklazy w chloroplastach u szpinaku (*S. oleracea*) [63] i tytoniu (*Nicotiana tabacum*) [85]. Aktywność w komórkach szpinaku jest zlokalizowana w błonach, a analizy kinetyczne wskazują na obecność 2 cyklaz: jedna o aktywności odpowiadającej cyklazie guanylanowej, wykazująca wysoką specyficzność substratową oraz druga odpowiadająca cyklazie adenylanowej stymulowanej przez analog GTP (GMPPNP), co wskazuje na interakcję tego enzymu z białkiem G.

Istnieje także doniesienie o syntezie cGMP w komórkach owsa (*Avena sativa*), a proces ten jest pod kontrolą fitochromu [83]. U owsa aktywność enzymu we frakcjach błonowych wynosi 55 fmol cGMP/min/mg białka i jest dwukrotnie wyższa od tej opisaną w chloroplastach fasoli [61].

Cyklaza z *Arabidopsis* została zidentyfikowana po przeszukaniu genomu tej rośliny z motywem bazującym na zachowywalnej sekwencji znajdującej się w domenie katalitycznej cyklaz guanylanowych z kręgowców, niższych eukariontów i organizmów prokariotycznych [52]. Zidentyfikowano 2 fragmenty (AtGC1 i AtGC2), które podlegają ekspresji w komórkach *E. coli*, powodując znaczący wzrost wewnątrzkomórkowego stężenia cyklicznych nukleotydów, a sekwencja aminokwasowa wykazała, że są to białka rozpuszczalne. Domena katalityczna zawiera odcinek bogaty w glicynę, co jest cechą charakterystyczną cyklaz guanylanowych. Kiedy *AtGC1* uległ ekspresji w komórkach *E. coli*, komórki te zawierały 2,5 raza więcej cGMP niż komórki kontrolne.

AtGC1 nie wykazuje podobieństw w sekwencji z hemową domeną wiążącą, która jest obecna w pozostałych cyklazach guanylanowych i odpowiada za oddziaływanie z NO. W rzeczywistości aktywność rekombinowanej cyklazy guanylanowej nie zwiększa się po aplikacji donoru tlenu azotu (nitroprusydku sodu). AtGC1 jest pierwszą tego typu cyklazą opisaną u roślin, lecz jej niezwykła budowa wskazuje, że jest to nowa klasa cyklaz.

## MECHANIZM DZIAŁANIA CYKLICZNYCH NUKLEOTYDÓW

W komórkach zarówno roślinnych, jak i zwierzęcych istnieją elementy zdolne do odbioru informacji zawartych w zmianach stężenia cyklicznych nukleotydów. Są to kanały jonowe bramkowane przez cNMP-, cAMP- lub cGMP-zależne kinazy (PKA i PKG) i fosfodiesterazy (PDE).

Do tej pory opisano dwie grupy kanałów, których działanie jest łączone z funkcją cNMP. Są to kanały jonowe bezpośrednio aktywowane (CNGC) oraz kanały modulowane (CNMC) przez cykliczne nukleotydy. Kanały CNGC zostały zidentyfikowane zarówno w komórkach zwierzęcych, jak i roślinnych, natomiast kanały modulowane przez cNMP znaleziono jedynie w komórkach ssaków, a ich aktywacja następuje poprzez zmianę napięcia elektrycznego na błonie komórkowej, przyłączenie cyklicznego nukleotydu zmienia jedynie prawdopodobieństwo, że kanał zostanie otwarty [3].

Kanały CNGC są grupą białek transportujących jony, których aktywność jest jednocześnie regulowana poprzez  $\text{Ca}^{2+}$ . Zostały one znalezione w błonach warstwy aleuronowej jęczmienia [71], w błonach komórek tytoniu [2], rzodkiewnika [89] i ryżu [77].

U *Arabidopsis*, CNGC tworzą rodzinę sześciu kanałów (AtCNGC 1-6) i ponad 20 genów z nimi spokrewnionych [49]. U tej rośliny opisano także wysoko specyficzne kanały potasowe KAT1 i AKT1, których aktywność jest modulowana poprzez cGMP [30].

Analiza przypuszczalnej funkcji jednego z białek kanałowych CNGC, tj. AtCNGC2 z *Arabidopsis* wykazała, że może on brać udział w przepływie jonów  $\text{K}^+$  oraz innych jednowartościowych kationów, jak również jonów  $\text{Ca}^{2+}$ . Transport  $\text{K}^+$  i  $\text{Ca}^{2+}$  zależny jest od obecności cAMP lub cGMP, jednocześnie wysokie zewnątrzkomórkowe stężenie  $\text{Ca}^{2+}$  hamuje przepływ  $\text{K}^+$  [49]. Doświadczenia z wykorzystaniem techniki „patch-clamp” prowadzone na komórkach mezofilu wykazały, że wpływ  $\text{K}^+$  na zewnątrz może być zwiększony poprzez podniesienie poziomu cAMP pod warunkiem, że inhibitor fosfodiesterazy jest obecny w badanym układzie. Specyficzny, białkowy inhibitor kinazy białkowej A hamował ten przepływ.

CNGC zawierają 6 domen (S1-6), potencjalny region tworzący por pomiędzy S5 i S6 oraz miejsce wiązania cyklicznych nukleotydów, które częściowo pokrywa się w sekwencji z domeną wiążącą kalmodulinę w cytoplazmatycznym regionie końca C [2]. Przyłączenie CaM do AtCNGC2, odwraca aktywację kanału wywołaną przez cAMP. Tak więc zależna od  $\text{Ca}^{2+}$  interakcja pomiędzy wiązaniem CaM i cyklicznych nukleotydów może być bardzo istotna, zaś same CNGCs mogą być elementami integrującymi sygnał zawarty w zmianach stężenia cyklicznych nukleotydów i wapnia na szlaku transdukcji sygnału.

Niewiele wiadomo o subkomórkowej lokalizacji CNGCs. Wykazano jedynie, że HvCBT1 z jęczmienia [71] i NtCBP4 z tytoniu [2] są zlokalizowane w plazmolemie.

Jeżeli weźmie się pod uwagę liczebność rodziny CNGC oraz możliwość, że są one rozmieszczone w błonach komórkowych, jak również że podlegają różnej



ekspresji w tkankach *Arabidopsis*, wydaje się wielce prawdopodobne przyporządkowanie odpowiedniej izoformy do danego procesu fizjologicznego.

Niezwykłym przykładem kanału, który jest regulowany przez cykliczne nukleotydy, jest kanał wykryty podczas badania zależnego od aluminium napływu jabłczanu do komórek w korzeniach pszenicy [90]. W prowadzonych doświadczeniach glin ( $Al^{3+}$ ) stymulował zmianę potencjału elektrycznego błony przez oddziaływanie na przepływ anionów przez błonę. W protoplastach uzyskanych z roślin wykazujących tolerancję na  $Al^{3+}$  przepływ  $K^+$  był wzmożony w obecności tych jonów jedynie, gdy cAMP był obecny w środowisku.

Białka kinazowe zależne od cyklicznych nukleotydów nie były do tej pory intensywnie u roślin badane. Chociaż grupa białek, w skład której wchodzi kinazy zależne od cyklicznych nukleotydów, tzw. grupa AGC, została opisana w komórkach roślinnych, to jednak literatura dotycząca szczegółowej charakterystyki tych białek jest bardzo skąpa.

Do tej pory nie pojawiły się prace dotyczące oczyszczenia do homogenności z tkanek roślinnych kinaz zależnych od cAMP. Istnieją jedynie doniesienia o kinazach, których aktywność ulegała zmianie w obecności cyklicznych nukleotydów u rzęsy (*Lemna paucicostata*), kukurydzy (*Zea mays*), palmy kokosowej (*Cocos nucifera*), ryżu i petunii (*Petunia*) [40, 41, 44, 70].

Polya i współpracownicy [70] częściowo oczyścili enzym z petunii, który fosforylował Kemtide (LRRASLG), syntetyczny substrat dla PKA. Jest jednak ciekawe, że kinaza ta nie była stymulowana przez cAMP, jedynie zahamowanie aktywności kinazy przez podjednostkę regulacyjną PKA było odwracane przez cAMP.

Dodanie zwierzęcej PKA do ekstraktów roślinnych spowodowało fosforylację niektórych białek; np. fosforylacji ulegały fitochrom zarówno forma  $P_r$ , jak i  $P_{fr}$  [87], karboksylaza fosfoenolopirogronianowa [78] i syntaza fosfosacharozy [38].

Dodatkowo istnieją dane dotyczące zależnej od cAMP fosforylacji w etioplastach i chloroplastach pszenicy oraz w komórkach szparkowych u bobu (*Vicia faba*), co wskazuje na istnienie kinazy zależnej od cAMP u tych roślin [64]. Badania prowadzone na fasoli wskazały natomiast, że forskolin, podobnie jak aplikacja mikromolowych stężeń cAMP, zwiększał fosforylację. Inhibitor PKA hamował zaindukowane przez forskolin zwiększenie fosforylacji [28]. Jednakże w badaniach tych nie wyizolowano samej kinazy.

Inhibitor Pk-A częściowo hamował także indukowaną przez ABA aktywność  $\beta$ -glukuronidazy (GUS) w komórkach tytoniu transformowanych konstruktem zawierającym wrażliwy na ABA promotor (rd29A-GUS). Interesujące jest, że ABA indukował aktywność kinazy A (PKABA1), która następnie hamowała indukcję syntezy amylaz w warstwie aleuronowej jęczmienia [33].

O obecności w komórkach roślinnych kinazy zależnej od cGMP początkowo świadczyły jedynie dowody pośrednie. W komórkach komeliny zwyczajnej inhibitor kinazy G zapobiegał indukowanemu przez auksyny otwieraniu aparatów szparkowych, sugerując tym samym istnienie PKG [20]. Aktywność enzymu regulowanego przez cGMP została także zaobserwowana we frakcjach białkowych z owsa [21]. Autorzy wykazali wiązanie znakowanego  $^3H$ -cGMP do składników strukturalnych

frakcji subkomórkowych siewek owsa. Wiązanie jest zależne od warunków inkubacji i naświetlania rosnących roślin. W zielonych siewkach wiązanie jest słabsze niż w siewkach etiolowanych. Najsilniejsze wiązanie wystąpiło we frakcji cytozolowej. Białko z tej frakcji ma 2 miejsca wiązania, jedno o wysokim, a drugie o niskim powinowactwie do cGMP, a wiązanie nukleotydu wzrasta po naświetleniu światłem czerwonym i po podaniu  $\text{Ca}^{2+}$ .

Aktywność kinazy zależnej od cGMP zaobserwowano we frakcjach wyizolowanych z *Pharbitis nil* [75], stosując kombinację chromatografii jonowymiennej i powinowactwa. Wyizolowane białko jest polipeptydem o masie cząsteczkowej 70 kDa i jest stymulowane przez mikromolowe stężenia cGMP. Reaguje ono także z przeciwciałami skierowanymi na domenę katalityczną PKG ze świnki morskiej.

Dowody z zakresu biologii molekularnej ujawniły obecność białka kinazowego o homologii do kinaz białkowych zależnych od cyklicznych nukleotydów u fasoli (*Phaseolus vulgaris*), ryżu (*Oryza sativa*), kukurydzy (*Zea mays*), grochu (*Pisum sativum*) i rzodkiewnika (*Arabidopsis thaliana*) [4, 47, 50, 56]. Jednakże homologia w sekwencji DNA nie daje pewności, czy istnieje funkcjonalne białko i czy produkty tych genów faktycznie funkcjonują *in vivo* jako kinazy regulowane przez cykliczne nukleotydy.

W pracy Newtona i Smitha [64] można znaleźć informacje o odkryciu nowych sekwencji kinazy zawierających miejsca wiązania cyklicznych nukleotydów. Pełna sekwencja cDNA białek wiążących cykliczne nukleotydy została poznana u rzodkiewnika i tytoniu.

Istnieją także doniesienia o występowaniu u roślin genów kodujących białka o sekwencji charakterystycznej dla drożdżowych i zwierzęcych kinaz zależnych od cyklicznych nukleotydów [35]. Gen *SBPK*, z kiełkującego pyłku *Solanum berthaultii* koduje białko o bardzo wysokiej homologii do kinaz zależnych od cAMP i cGMP [17]. SBPK nie ma domeny regulatorowej, co wskazuje, że SBPK zyskuje tę funkcję w połączeniu z innymi, regulacyjnymi podjednostkami, w sposób podobny do tego, jaki został opisany dla wielu zwierzęcych PKA. Inaktywacja ekspresji genu poprzez zastosowanie anty-sensownej ekspresji spowodowała, że rośliny wytwarzały w dużych ilościach zmienione ziarna pyłku. Mając powyższe na uwadze można założyć, że białko to bierze udział w transdukcji sygnału podczas tworzenia ziaren pyłku.

Cykliczne nukleotydy w komórkach roślinnych, podobnie jak w innych komórkach eukariotycznych, przejawiają swoje działanie jako wewnątrzkomórkowe przekaźniki, tak więc muszą istnieć enzymy zdolne do szybkiego obniżania stężenia cyklicznych nukleotydów.

W komórkach zwierzęcych fosfodiesteraza cyklicznych nukleotydów katalizuje hydrolizę 3',5'-monofosforanu nukleotydów (cAMP i cGMP), przekształcając je do monofosforanu 5'-nukleotydów. Fosfodiesterazy te są zwykle regulowane przez kalmodulinę. Do tej pory ponad 40 różnych izoform PDE zostało zidentyfikowanych i sklasyfikowanych w 11 rodzinach (PDE 1-11). Są one produktami różnych genów kodujących białka o masach od 60 do 130 kDa [17, 74].

Wśród różnych izoform PDE enzymy należące do 3 rodzin (PDE 3,7,8) są cAMP-specyficzne; trzy (PDE 5,6,9) – cGMP-specyficzne, a 5 (PDE 1,2,4,10,11) wykazują podwójną specyficzność. Wszystkie z tych enzymów są dimerami, lecz

rola tej dimeryzacji w samym działaniu enzymu nie jest znana. U zwierząt enzymy te zawierają domenę katalityczną w okolicy końca C o wysokiej homologii wśród wszystkich PDE i domenę lub motyw regulatorowy na końcu N. Domeny katalityczne wszystkich znanych PDE zawierają 2 sekwencje połączone w tandem, a w każdej z nich znajduje się motyw biorący udział w wiązaniu jonów  $Zn^{2+}$ . Mechanizm rozrywania wiązania fosfodiesterowego w cyklicznych nukleotydach przez PDE może przypominać mechanizm spotykany w pewnych proteazach, lecz obecność jonów cynku wymagana do tego procesu została po raz pierwszy opisana dopiero przy charakterystyce PDE [17].

Początkowo badania dotyczące cyklicznych nukleotydów u roślin koncentrowały się na cyklazach i kinazach cyklicznych nukleotydów, natomiast PDE były uważane za mało ciekawe. Trwało to do czasu, kiedy zauważono jak wiele izoform PDE znajduje się w komórkach i jak różnią się one działaniem i wrażliwością.

Obecnie istnieją liczne dowody na aktywność fosfodiesteraz cyklicznych nukleotydów u roślin. Część doświadczeń była prowadzona kilka lat temu, lecz można znaleźć także niedawno uzyskane wyniki jak np. dotyczące *Arabidopsis thaliana* [37]. Badania te wykazały, że roślinne fosfodiesterazy można podzielić na 2 klasy: (1) o aktywności fosfodiesterazy 2':3'-cyklicznych nukleotydów i tworzeniu 2'-NMP jako produktu hydrolizy oraz (2) o aktywności fosfodiesterazy 3':5'-cyklicznych nukleotydów i tworzeniu mieszaniny 3'-NMP i 5'-NMP.

Fosfodiesteraza zdolna do hydrolizy 3':5'-cyklicznych nukleotydów została oznaczona w surowych ekstraktach z różnych tkanek roślinnych [64]. Enzymy te działają w kwaśnym pH, nie wymagają kationów dwuwartościowych do swojego działania i są niewrażliwe na metylksantynę. Produktem hydrolizy 3':5'-cNMP są 3'-NMP i 5'-NMP, podczas gdy produktem działania zwierzęcych PDE jest tylko 5'-NMP [1]. Tak więc właściwości roślinnych PDE są różne od tych, jakie zostały określone w przypadku PDE z innych organizmów eukariotycznych.

Fosfodiesteraza zdolna do hydrolizy cAMP do AMP została opisana w siewkach grochu jeszcze przed pojawieniem się pierwszego doniesienia o występowaniu cyklicznych nukleotydów w tkankach roślinnych. Zauważono, że w przeciwieństwie do PDE ssaków, fosfodiesteraza z siewek grochu wykazuje większą aktywność względem 2',3'-cyklicznej AMP (produktu rozpadu RNA) niż do wtórnego przekaźnika, jakim jest 3',5'-cAMP. Jednakże późniejsze badania z bardziej oczyszczoną PDE wykazały, że w ekstraktach istnieje więcej niż jedna forma PDE [64]. Występowanie szeregu izoform fosfodiesteraz pozwala na wyjaśnienie różnic w wynikach uzyskiwanych przez różne grupy badawcze.

Spektrometrię masową wykorzystano do badania w fasoli (*Phaseolus vulgaris*) wpływu różnych kationów na kompleks fosfodiesteraz z chloroplastów. Uzyskane wyniki wskazały, że preferowanym substratem są 3',5'-cykliczne nukleotydy oraz że jony  $Fe^{3+}$  stymulują hydrolizę cCMP [73]. Prowadzono także badania nad wpływem różnych izoform CaM na regulację aktywności PDE. Wykazano, że 2 izoformy z soi (*Glycine max*) mają różne wymagania w stosunku do jonów wapniowych, a tym samym różnie oddziałują z PDE [48].

Dla szpinaku (*Spinacia oleracea*) opisano 3 izoformy PDE [7], z których dwie scharakteryzowano bardziej szczegółowo. Pierwsza odpowiada enzymowi opisanemu przez Lin i Warner [64], natomiast druga ma większą aktywność względem 3',5'-cGMP i 3',5'-cAMP oraz bardzo niską aktywność względem 2',3'-cNMP. Dodatkowo przejawia ona wrażliwość na endogenne białka efektorowe i jest aktywowana przez  $\text{Ca}^{2+}$  [22]. Enzym ten tworzył też kompleksy z kwaśnymi fosfatazami, rybonukleazami, nukleotydzami i ATPazami. Fosfodiesterazy zostały także znalezione u ziemniaka (*Solanum tuberosum*), jęczmienia, *Portulaca*, fasoli (*Phaseolus vulgaris*), *Lemna paucicostata* i marchwi (*Daucus carota*) [64]. Fosfodiesteraza opisana u sałaty (*Lactuca sativa*) [14] różni się od pozostałych fosfodiesteraz 3',5'-cyklicznych nukleotydów tym, że wykazuje ona aktywność zarówno do cyklicznych nukleotydów purynowych, jak i pirymidynowych, wykazując tym samym pewne podobieństwo do wielofunkcyjnych fosfodiesteraz wyizolowanych z wątroby świni.

## FIZJOLOGICZNA ROLA CYKLICZNYCH NUKLEOTYDÓW

Nie sposób opisać wszystkie procesy, w których udział cyklicznych nukleotydów został udowodniony. Wybrane przykłady nie tylko mają pokazać, jak szerokie jest spektrum działania tych związków, lecz także zobrazować złożoność powiązań pomiędzy cyklicznymi nukleotydami a innymi elementami biorącymi udział w transdukcji sygnałów.

Mimo że wiele procesów fizjologicznych jest potencjalnie wrażliwych na zmiany stężenia cAMP, rola tego cyklicznego nukleotydu była często kwestionowana. Dopiero od połowy lat dziewięćdziesiątych XX w. zaczęły pojawiać się prace w bardziej przekonujący sposób dokumentujące rolę cAMP u roślin, np. w transporcie jonów u rzodkiewnika i marchwi [46], cyklu komórkowym w komórkach BY-2 tytoniu [25], reakcjach obronnych roślin podczas produkcji fitoaleksyn [45], aktywacji amoniakolizazy fenyloalaniny [5] oraz w reakcjach świetlnych u glonów [34].

Dowody na rolę cAMP w regulacji wzrostu komórek uzyskano w badaniach nad łagiewką pyłkową. Wzrost łagiewki pyłkowej jest ściśle zależny od ciągłego napływu  $\text{K}^+$  i  $\text{Ca}^{2+}$  do szczytu łagiewki, podtrzymującego turgor komórki i kontrolującego orientację łagiewki pyłkowej [88]. Poprzez analizę wewnątrzkomórkowego stężenia cAMP Moutinho i inni [57] odkryli, że dodanie wiążącego się na stałe do błon dību-tyryl-cAMP podnosiło wewnętrzne stężenie cAMP z poziomu spoczynkowego (100 nM) do 220–300 nM. Wywołane światłem uwalnianie uwięzionego na szczycie łagiewki cAMP powodowało natychmiastowe wygięcie łagiewki w kierunku wyższego stężenia cAMP. Przypomina to więc proces uwalniania uwięzionego  $\text{Ca}^{2+}$ . W łagiewkach pyłkowych lili wykazano także, że cAMP bierze udział w procesach samoniezgodności. Tak więc ogólnie wyniki wskazują na udział cyklicznych nukleotydów w procesach rozpoznawania międzykomórkowego [79].

W protoplastach transformowanych akworyną dodanie cAMP prowadzi do podniesienia stężenia cytoplazmatycznego wapnia, łącząc tym samym zmiany w stężeniach cyklicznych nukleotydów i wapnia [82]. Podobne zjawisko zaobserwowano w przypadku wyżej omawianych łagiewek pyłkowych.

Ehsan i współpracownicy [25] donieśli o fluktuacjach w stężeniu cAMP, a zmiany te były ściśle uzależnione od fazy cyklu komórkowego w komórkach tytoniu BY-2. Najwyższe stężenie zaobserwowano podczas fazy S, najniższe natomiast w fazie G1. Zastosowanie związku hamującego aktywność AC powoduje brak wzrostu cAMP w fazie S, a co za tym idzie spadek aktywności mitotycznej. Autorzy postulują jednocześnie istnienie cyklicznej adenylanowej, której aktywność jest regulowana przez prostaglandyny lub związki podobne do prostaglandyn (np. kwas jasmonowy), które odgrywają doniosłą rolę w cyklu komórkowym.

Istnieją także dowody na udział cAMP w procesach obronnych rośliny, podczas produkcji fitoaleksyn. Mechanizm, w którym sygnał odebrany przez receptory błonowe przekłada się na ekspresję genów, obejmuje zmiany w poziomie  $Ca^{2+}$ , kwasu jasmonowego, aktywnych form tlenu, diacyloglicerolu,  $InsP_3$  i cAMP.

Pierwsze dane świadczące o udziale cAMP w komórkowych reakcjach obronnych dotyczyły udziału tego cyklicznego nukleotydu w syntezie fitoaleksyn u *Ipomea* [66]. Podobny efekt został następnie opisany u marchwi [46]. U *Medicago sativa* zaobserwowano znaczący wzrost w aktywności genu *PAL* kodującego amoniakoliазę fenyloalaniny. Enzym ten katalizuje początkowe reakcje na szlaku syntezy fitoaleksyn. Traktowanie siewek roztworem niehydrolizującego analogu cAMP (dibutyryl-cAMP) zwiększa aktywność *PAL* i syntezę fitoaleksyn [16]. Dodatkowo, stymulujący wpływ toksyny cholery na syntezę fitoaleksyn u marchwi i na aktywność *PAL* w kulturach komórkowych fasoli sugeruje udział białek G w tych procesach [5].

Analizowano także możliwość regulacji procesów fizjologicznych przez cykliczny AMP poprzez wpływ na ekspresję genów. Z komórek *Vicia faba* wyizolowano fragment genu o wysokiej homologii do zwierzęcych białek CREB [24]. Także u fasoli zidentyfikowano fragment genu kodujący białko wiążące się do DNA, przypominające w sekwencji i wrażliwości na metylację białko wiążące CRE (CREB) ssaków. Fosforylacja CREB przez PKA naturalnie kontroluje transkrypcję w komórkach zwierzęcych, lecz proces ten nie został dostatecznie udokumentowany u roślin i istnieją jedynie pośrednie dowody na jego istnienie.

Najwięcej badań na temat udziału cGMP w różnych procesach dotyczy określenia ilości samego cGMP oraz jego roli w szlaku zależnym od NO regulującym ekspresję genów kodujących białka reakcji obronnej roślin, roli cGMP jako modulatora otwierania aparatów szparkowych, czy jako wtórnego przekaźnika w szlaku fitochromowym [6, 59]. Cykliczny GMP odgrywa też rolę w regulacji otwierania kanałów jonowych i jest elementem biorącym udział w reakcjach giberelin w warstwie aleuronowej jęczmienia [69]. Ostatnio wykazano, że cGMP jest produkowany w odpowiedzi na stres abiotyczny (stres osmotyczny) oraz że bierze on udział w procesach transkrypcji i transporcie kationów w korzeniach *Arabidopsis thaliana* [55, 64].



Cykliczny GMP uczestniczy w wielu szlakach transdukcji sygnałów hormonalnych. Penson i współpracownicy [69] prowadząc badania na jęczmieniu odkryli, że poziom cGMP zwiększa się czasowo po inkubacji tkanek w kwasie giberelowym. Podobnego zjawiska nie opisano natomiast po podaniu kwasu absycynowego. Ponadto inhibitor cyklazy guanylanowej (LY 83583) blokuje zarówno indukowane przez gibereliny podniesienie poziomu cGMP, jak i syntezę oraz uwalnianie  $\alpha$ -amylazy. Inhibitor ten hamuje indukowaną przez GA syntezę GAMyb, lecz wykazuje o wiele słabszy efekt niż ABA. ABA oraz indukowany kwasem absycynowym kinaza A (PKABA1) silnie hamują indukcję amylazy w ziarniakach jęczmienia mutanta „*slender*” [33]. GAMyb i amylaza ulegają silnej ekspresji u tego mutantu, nawet pod nieobecność GA, natomiast synteza GAMyb jest hamowana przez ABA, PKABA1 i inhibitor syntezy cGMP.

Cousson [18] dostarczył dowody na udział cGMP w indukowanych przez auksyny ruchach komórek szparkowych u *Commelina communis*. Gehring [31] natomiast sugeruje udział cGMP w reakcjach otwierania szparek po zastosowaniu peptydów natriuretycznych.

Oba cykliczne nukleotydy są elementami sygnalizacji obronnej rośliny. Czasowy wzrost wewnątrzkomórkowego poziomu cAMP w odpowiedzi na elicytory odpowiedzi obronnej został zaobserwowany w kulturach komórkowych *Medicago sativa* i komórkach fasoli [16, 64]. Także traktowanie liści tytoniu tlenkiem azotu indukuje czasowy wzrost stężenia cGMP i ekspresję genów związanych z procesami obronnymi [23]. Ponadto opisano chwilowy wzrost poziomu cAMP w odpowiedzi na obecność elicytora [16], tak więc cNMP biorą udział w otwieraniu kanałów jonowych w naturalnej reakcji fizjologicznej podczas infekcji przez patogen.

Obecnie uważa się, że sygnał cGMP u roślin bierze udział w programowanej śmierci komórki (PCD, ang. *Programmed Cell Death*). Clarke i współpracownicy [15] odkryli, że zawiesiny komórkowe *Arabidopsis* generują podniesienie poziomu NO w odpowiedzi na wirulentne bakterie *Pseudomonas syringae* i że poziom ten jest wystarczający do zaindukowania śmierci komórki w sposób niezależny od ROS (ang. *Reactive Oxygen Specieses*). Na podstawie tego zasugerowano, że indukowana przez tlenek azotu śmierć komórki jest formą programowanej śmierci komórki wymagającej ekspresji genu i ma wiele cech wspólnych z PCD komórek ssaków. Specyficzny inhibitor cyklazy guanylanowej (ODQ) blokuje indukowaną przez NO śmierć komórki u *Arabidopsis*, a działanie tego inhibitora można odwrócić poprzez podanie niehydrolizującego analogu cGMP (8-Br-cGMP). Sam niehydrolizujący analog, nie może zastąpić jednak indukowanej przez tlenek azotu śmierci komórki. Tak więc synteza cGMP jest wymagana, lecz nie jest wystarczająca do przeprowadzenia tego procesu w komórkach *Arabidopsis*.

Cykliczny GMP odgrywa także rolę w procesach zależnych od światła. Dibutyryl-cGMP indukuje zmiany w ilości związków terpenowych w plastydach u szpinaku, po wstawieniu roślin do ciemności, co przypomina efekt fitochromowy [9]. U *Lemna* naświetlanie daleką czerwień podnosi poziom cGMP i stymuluje kwitnienie [36]. Cykliczny GMP także bierze udział w fotoperiodycznej indukcji kwitnienia u *Pharbitis nil*. Jego aplikacja powoduje kwitnienie roślin hodowanych w nieindukcyjnych warunkach [76]. Jednak najsilniejsze dowody na udział cGMP w szlaku fitochromo-



wym pochodzą z doświadczeń prowadzonych na mutantach pomidora. Mikroiniekcja cGMP do komórek mutantu *aurea*, mającego znacznie obniżony poziom fitochromu, zastępuje reakcje fitochromowe i prowadzi do ekspresji pewnych genów [6]. Przykładowo aktywność syntazy chalkonowej wydaje się być indukowana przez cGMP, a proces ten jest powszechny wśród genów kodujących fotoprotektanty, ponieważ zidentyfikowano u nich wspólne motywy rozpoznające cGMP. Badacze ci przedstawili także dowody, że wspólna aplikacja  $Ca^{2+}$  i cGMP indukowała pełny rozwój chloroplastów, zastępując w ten sposób działanie fitochromu. Represja syntazy asparaginianowej – kolejny proces, w który włączany jest fitochrom, także wymaga obecności cGMP i  $Ca^{2+}$  [59, 60], a ekspresja pozwoliła zidentyfikować elementy *cis* wewnątrz promotora syntazy asparaginianowej, który jest niezbędny do tej regulacji.

Sugeruje się, że z fitochromową indukcją genów za pośrednictwem cGMP związany jest tlenek azotu. NO jest cząsteczką sygnałową włączoną w szereg procesów zachodzących w komórkach [72]. Wykazano, że donory NO (tj. związki uwalniające NO) mają wpływ na indukcję ekspresji pewnych genów związanych z reakcjami obronnymi [23]. Indukowana przez NO ekspresja genów obronnych jest kierowana przez cGMP i cADPR, co stanowi analogię do procesów kierowanych przez NO w komórkach zwierzęcych. Stwierdzono także, że NO i cGMP są przekazywanymi w indukowanych przez IAA procesach ukorzeniania u *Cucumis sativus* [68]. Ostatnio pojawiły się prace wskazujące na rolę NO w indukowanym przez ABA zamykaniu aparatów szparkowych. Zamykanie aparatów szparkowych indukowane zarówno przez ABA, jak i tlenek azotu wymagało syntezy i działania cGMP [65].

Ponieważ podobny system powiązań między światłem, cyklicznym GMP i tlenkiem azotu opisano także u zwierząt oraz u śluzowca *Physarum polycephalum* [32], jest więc prawdopodobne, że działanie cGMP ma charakter uniwersalny.

## PODSUMOWANIE

Chociaż początkowe wątpliwości dotyczące występowania cyklicznych nukleotydów w komórkach roślinnych zostały całkowicie rozwiane, to jednak wiele zagadnień związanych z ich działaniem u roślin jest ciągle niejasne.

Istnieje wiele dowodów, że enzymy związane z metabolizmem cyklicznych nukleotydów są obecne w komórkach roślinnych. Istnieją także coraz liczniejsze doniesienia o udziale cyklicznych nukleotydów w wielu procesach. Jest to jednak niewiele w porównaniu z tym, co do tej pory wiadomo o cyklicznych nukleotydach u zwierząt. Kolejne doświadczenia polegające na monitorowaniu zmian w ilości tych nukleotydów oraz analiza aktywności enzymów związanych z ich syntezą i dezaktywacją w procesach fizjologicznych powinna pozwolić na precyzyjniejsze określenie ich roli u roślin.

Obecność cyklicznych nukleotydów u roślin sugeruje, że podobnie jak u innych Eukaryota, funkcjonuje u nich system transdukcji sygnałów, w których uczestniczą cNMP. Konieczne są jednak dalsze badania, które określą rolę, jaką cGMP odgrywa w systemie przekazywania informacji u roślin.

## LITERATURA

- [1] APPLEMAN MM, THOMPSON WJ, RUSSELL TR. Cyclic nucleotide phosphodiesterases. *Adv Cyclic Nucleotide Res* 1973; **3**: 65–98.
- [2] ARAZI T, KAPLAN B, FROMM H. A high-affinity calmodulin-binding site in a tobacco plasma-membrane channel protein coincides with characteristic element of cyclic nucleotide-binding domains. *Plant Mol Biol* 2000; **42**: 591–601.
- [3] BIEL M, ZONG X, DISTLER M, BOSSE E, KLUGBAUSER N, MURAKAMI M, FLOCKERZI V, HOFMAN F. Another member of cyclic nucleotide-gated channel family express in testis, kidney and hart. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; **91**: 3505–3509.
- [4] BIERMANN B, JOHNSON EM, FELDMAN LJ. Characterisation and distribution of a maize cDNA encoding a peptide similar to the catalytic region of second messenger dependent protein kinase. *Plant Physiol* 1990; **94**: 1609–1615.
- [5] BOLWELL GP. A role for phosphorylation in the down-regulation of phenylalanine ammonia lyase in suspension culture cells of French bean. *Phytochem* 1992; **31**: 4081–4086.
- [6] BOWLER C, NEUHAUS G, YAMAGATA H, CHUA NH. Cyclic GMP and calcium mediate phytochrome transduction. *Cell* 1994; **77**: 73–81.
- [7] BROWN EG, EDWARDS MJ, NEWTON RP, SMITH CJ. Plurality of cyclic nucleotide phosphodiesterases in *Spinacia oleracea* L.; subcellular distribution, partial purification and properties. *Phytochem* 1979; **18**: 1943–1948.
- [8] BROWN EG, NEWTON RP. Cyclic AMP and higher plants. *Phytochem* 1981; **20**: 2453–2463.
- [9] BROWN EG, NEWTON RP, EVANS DE, WALTON TJ, YOUNIS LM, VAUGHAN JM. Influence of light on cyclic nucleotide metabolism in plants: effect of dibutyl cyclic nucleotides on chloroplast components. *Phytochem* 1989; **28**: 2559–2563.
- [10] BRUS R, HERMAN Z, JURASZCZYK Z, KRZEMINSKI T, TRZECIAK H, JUZCOK A. Central action of cyclic-3', 5'-thymidine, 3',5'-uridine and 3',5'- cytidine monophosphates. *Acta Medica Polon* 1984; **15**: 1–4.
- [11] BUCK J, SINCLAIR ML, SCHAPAL L, CANN MJ, LEVIN LR. Cytosolic adenylyl cyclase defines a unique signaling molecule in mammals. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; **96**: 79–84.
- [12] CARRICARTE VC, BIANCHINI GM, MUSCHIETTI JP, TÉLLEZ-ÍNÓN, PERTICARI A, TORRES N, FLAWIA MM. Adenylate cyclase activity in a higher plant, alfalfa (*Medicago sativa*). *Biochem J* 1988; **249**: 807–811.
- [13] CHEN Y, CANN MJ, LITVIN TN, IOURGENKO V, SINCLAIR ML, LEVIN L, BUCK J. Soluble adenylyl cyclase as an evolutionarily conserved bicarbonate sensor. *Science* 2000; **289**: 625–628.
- [14] CHIATANTE D, NEWTON RP, CRIGNOLA S, LEVI M, BROWN EG. The 3',5'-cyclic nucleotide phosphodiesterase of meristematic and differentiated tissues of pea roots. *Phytochem* 1990; **29**: 2815–2820.
- [15] CLARKE A, DESIKAN R, HIRST RD, HANCOCK JT, NIELL SJ. NO way back: nitric oxide and programmed cell death in *Arabidopsis thaliana* suspension culture. *Plant J* 2000; **24**: 667–677.
- [16] COOK CJ, SMITH CJ, WALTON TJ, NEWTON RP. Evidence that cyclic AMP is involved in the hypersensitive response of *Medicago sativa* to a fungal elicitor. *Phytochem* 1994; **35**: 899–995.
- [17] CORBIN JD, FRANCIS SH. Cyclic GMP phosphodiesterase-5:target of sildenafil. *J Biol Chem* 1999; **274**: 13729–13732.
- [18] COUSSON A. Pharmacological evidence for the implication of both cyclic GMP-dependent and -independent transduction pathways within auxin-induced stomatal opening in *Commelina communis*. *Plant Sci* 2001; **161**: 249–258.
- [19] COUSSON A. Two potential Ca<sup>2+</sup>-mobilizing processes depend on the abscisic acid concentration and growth temperature in the *Arabidopsis* stomatal guard cell. *J Plant Physiol* 2003; **160**: 493–501.
- [20] COUSSON A, VAVASSEUR A. Putative involvement of cytosolic Ca<sup>2+</sup> and GTP-binding proteins in cyclic GMP-mediated induction of stomatal opening by auxin in *Commelina communis* L. *Planta* 1998; **206**: 308–314.
- [21] DUBOVSKAYA LV, MOLCHAN OV, VOLOTOVSKY ID. Cyclic GMP-binding activity in *Avena sativa* seedlings. *Russian J Plant Physiol* 2002; **2**: 216–220.
- [22] DUPON M, VAN ONCKELEN HA, DE GREEK JA. Characterisation of cyclic nucleotide phosphodiesterase activity in *Phaseolus vulgaris*. *Physiol Plant* 1987; **69**: 361–365.
- [23] DURNER J, WENDEHENNE D, KLESSIG D. Defense gene induction in tobacco by nitric oxide, cyclic GMP and cyclic ADP-ribose. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; **95**: 10328–10333.

- [24] EHRlich KC, CARY JW, EHRlich M. A broad bean cDNA clone encoding a DNA-binding protein resembling mammalian CREB in its sequence specificity and DNA methylation sensitivity. *Gene* 1992; **117**: 169–178.
- [25] EHSAN H, REICHHELD JP, ROEF L, WITTERS E, LARDON F, VAN BOCKSTAELE D, VAN MONTAGU M, INZÉ D, VAN ONCKELEN H. Effect of indomethacin on cell cycle dependent cyclic AMP fluxes in tobacco BY-2 cells. *FEBS Lett* 1998; **442**: 165–169.
- [26] EHSAN H, ROEF L, WIRRERS E, REICHHELD JP, VAN BOCKSTAELE D, INZÉ D, VAN ONCKELEN H. Indomethacin-induced G1/S phase arrest of the plant cell cycle. *FEBS Lett* 1999; **458**: 349–353.
- [27] FRANCO DA. Cyclic AMP in photosynthetic organisms: recent developments. *Adv Cyclic Nucl Res* 1983; **15**: 97–117.
- [28] FRIEDRICH P, CURVETTO N, GIUSTO N. Cyclic AMP-dependent protein phosphorylation in guard cell protoplasts of *Vicia faba* L. *Biocell* 1999; **23**: 203–210.
- [29] GANGWANI L, MIKRUT M, GALCHEVA-GARGOVA Z, DAVIS RJ. Identification of 3',5'-cyclic AMP in axenic cultures of *Lemna paucicostata* by high-performance liquid chromatography. *Biochem Biophys Res Commun* 1991; **178**: 1113–1119.
- [30] GAYMARD F, CERUTTI M, HOREAU C, LEMAILLE G, URBACH S, RAVALLEC M, DECHAUVELLE G, SENTENAC H, THIBAUD JB. The baculovirus/insect cell system as an alternative to *Xenopus* oocytes. First characterization of the AKT1 K<sup>+</sup>-channel from *Arabidopsis thaliana*. *J Biol Chem* 1996; **271**: 22863–22870.
- [31] GEHRING CA. Natriuretic peptides – A new class of plant hormones? *Ann Bot* 1999; **83**: 329–334.
- [32] GOLDERER G, WERNER ER, LEITNER S, GRÖBNER P, WERNER-FELMAYER G. Nitric oxide synthesis is induced in sporulation of *Physarum polycephalum*. *Genes Dev* 2001; **15**: 1299–1309.
- [33] GOMEZ-CADENAS A, ZENTELLA A, WALKER-SIMMONS M, HO THD. Gibberellin/abscisic acid antagonism in barley aleuronic cells: site of action of the protein kinase PKABAI in relation to gibberellin signaling molecules. *Plant Cell* 2001; **13**: 667–679.
- [34] GORDILLO FJ, SEGOVIA M, LOPEZ-FIGUEROA F. Cyclic AMP levels in several macroalgae and their relation to light quantity and quality. *J Plant Physiol* 2004; **161**: 211–217.
- [35] HAMMOND RW, ZHAO Y. Characterisation of a tomato protein kinase gene induced by infection by potato spindle tuber viroid. *Mol Plant Microbe Interact* 2000; **13**: 903–910.
- [36] HASUNUMA K, FUNADERA K, FURUKAWA K, MIYAMOTO-SHINOYAMA H. Rhythmic oscillation of cyclic 3',5'-guanosine monophosphate concentration and stimulation of flowering by cyclic GMP in *Lemna paucicostata*. *Photochem Photobiol* 1988; **48**: 89–92.
- [37] HOFMANN A, TARASOV S, GRELLA RUVINOV S, NASIF, FILIPOWICZ W, WLODAWERA A. Biophysical characterisation of cyclic nucleotide phosphodiesterases. *Biochem Biophys Res Commun* 2002; **291**: 875–883.
- [38] HUBER SC, HUBER JL. Regulation of maize leaf sucrose-phosphate synthase by protein phosphorylation. *Plant Cell Physiol* 1991; **32**: 91–97.
- [39] ISHIOKA N, TANIMOTO S. Involvement of cyclic AMP in adventitious bud initiation of *Torenia* stem segments. *Plant Cell Physiol* 1990; **31**: 91–97.
- [40] JANISTYN B. cAMP promoted protein phosphorylation of dialysed coconut milk. *Phytochem* 1989; **28**: 329–331.
- [41] KATO R, UNO L, ISHIKAWA T, FUJII T. Effects of cAMP on the activity of soluble protein kinases in *Lemna paucicostata*. *Plant Cell Physiol* 1983; **24**: 841–848.
- [42] KATSUMATA T, TAKAHASHI N, EJIRI S. Changes of cyclic AMP level and adenylate cyclase activity during germination of pine pollen. *Agric Biol Chem* 1978; **42**: 2161–2162.
- [43] KAWAI M, AOTSUKA S, UCHINIYA H. Isolation of the cotton CAP gene: a homologue of adenylyl cyclase-associated protein highly expressed during fiber elongation. *Plant Cell Physiol* 1998; **39**: 1380–1383.
- [44] KOMATSU S, HIRANO H. Protein kinase activity and protein phosphorylation in rice (*Oryza sativa* L.) leaf. *Plant Sci* 1993; **94**: 127–137.
- [45] KUROSAKI F, TSURUSAWA Y, NISHI A. The elicitation of phytoalexins by Ca<sup>2+</sup> and cyclic AMP in cultured carrot cells. *Phytochem* 1987; **26**: 1919–1923.
- [46] KUROSAKI F, NISHI A. Stimulation of calcium influx and calcium cascade by cyclic AMP in cultured carrot cells. *Arch Biochem Biophys* 1993; **302**: 144–151.
- [47] LAWTON MA, YAMAMOTO RT, HANKS SK, LAMB CJ. Molecular cloning of plant transcripts encoding protein kinase homologs. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; **86**: 3140–3144.
- [48] LEE SH, JOHNSON JD, WLASH MP, VAN LIEROP JE, SUTHERLAND C, XU AD, SNEDDEN WA, KOSK-KOSISKA D, FROMM H, NARAYANAN N, CHO MJ. Differential regulation of Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent enzymes by plant calmodulin isoforms and free Ca<sup>2+</sup> concentration. *Biochem J* 2000; **350**: 299–306.

- [49] LENG Q, MERCIER RW, YAO WZ, BERKOWITZ GA. Cloning and first functional characterisation of a plant cyclic nucleotide-gated cation channel. *Plant Physiol* 2002; **121**: 753–761.
- [50] LIN X, FENG XH, WATSON JC. Differential accumulation of transcripts encoding protein kinase homologs in greening pea seedlings. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; **88**: 6951–6955.
- [51] LIU Y, RUOHO AE, RAO VD, HURLEY JH. Catalytic mechanism of the adenylyl and guanylyl cyclase: Modeling and mutational analysis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; **94**: 13414–13419.
- [52] LUDIDI N, GEHRING C. Identification of a novel protein with guanylyl cyclase activity in *Arabidopsis thaliana*. *J Biol Chem* 2003; **278**: 6490–6494.
- [53] LUNDEEN CV, WOOD NH, BRAUN AC. Intracellular levels of cyclic nucleotides during cell enlargement and cell division in excised tobacco piths. *Differentiation* 1973; **1**: 255–260.
- [54] LUSINI P, TRABALZINI L, FRANCHI GG, BOVALINI L, MARTELLI P. Adenylate cyclase in roots of *Ricinus communis*; stimulation by GTP and  $Mn^{2+}$ . *Phytochem* 1991; **30**: 109–111.
- [55] MAATHUIS FJ. cGMP modulates gene transcription and cation transport in *Arabidopsis* roots. *Plant J* 2006; **45**: 700–711.
- [56] MIZOGUCHI T, HAYASHIDA N, SHINOZAKI KY, HARADA H, SHINOZAKI K. Nucleotide sequence of cDNA encoding a protein kinase homologue in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol Biol* 1992; **18**: 809–812.
- [57] MOUNTINHO A, HUDDEY PJ, TREWAVAS AJ, MALHÓ R. cAMP acts as a second messenger in pollen tube growth and reorientation. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; **18**: 10481–10486.
- [58] MURAD F. Regulation of cytosolic guanylyl cyclase by nitric oxide: the NO-cyclic GMP signal transduction system. W: Murad F [red.] Cyclic GMP: synthesis, metabolism and function. *Adv Pharmacol Vol. 26*, Academic Press San Diego, California, USA, 1994: 19–33.
- [59] NEUHAUS G, BOWLER C, HIRATSUKA K, YAMAGATA H, CHUA NH. Phytochrome-regulated regression of gene expression requires calcium and cyclic GMP. *EMBO J* 1997; **16**: 2554–2564.
- [60] NEUHAUS G, BOWLER C, KERN R, CHUA NH. Calcium/calmodulin-dependent and -independent phytochrome signal transduction pathways. *Cell* 1993; **73**: 937–952.
- [61] NEWTON RP, KINGSTON EE, EVANS DE, YOUNIS LM, BROWN EG. Occurrence of guanosine 3',5'-cyclic monophosphate (cyclic GMP) and associated enzyme systems in *Phaseolus vulgaris* L. *Phytochem* 1984; **23**: 1367–1372.
- [62] NEWTON RP, KINGSTON EE, OVERTON A. Mass spectrometric identification of cyclic nucleotides released by the bacterium *Corynebacterium murisepticum* into the culture medium. *Mass Spectrom* 1998; **12**: 729–735.
- [63] NEWTON RP, ROEF L, WITTERS E, VAN ONCKELEN H. Cyclic nucleotides in higher plants: the enduring paradox. *New Phytol* 1999; **143**: 427–455.
- [64] NEWTON RP, SMITH CJ. Cyclic nucleotides. *Phytochem* 2004; **65**: 2423–2437.
- [65] NIELL SJ, DESIKAN R, CLARKE A, HANCOCK JT. Nitric oxide is a novel component of abscisic acid signaling in stomatal guard cells. *Plant Physiol* 2002; **128**: 13–16.
- [66] OGUNI I, SUZUKI K, URITANI I. Terpenoid induction in sweet potato roots by adenosine 3',5'-cyclic monophosphate. *Agric Biol Chem* 1976; **40**: 1251–1252.
- [67] PACICI B, PETRIGLIANO A, DIFFEY P, PAFFETTI A, BROWN EG, MARTELLI P, TRABALZINI L, BOVALINI L, LUSINI P, NEWTON RP. Adenylyl cyclase activity in roots of *Pisum sativum*. *Phytochem* 1993; **34**: 899–903.
- [68] PAGNUSSAT GC, LANTERI ML, LAMATTINA L. Nitric oxide and cyclic GMP are messengers in the indole acetic acid-induced adventitious rooting process. *Plant Physiol* 2003; **132**: 1241–1248.
- [69] PENSON SP, SCHUURINK RC, FATH A, GUBLER F, JACOBSEN JV, JONES RL. cGMP is required for gibberellic acid-induced gene expression in barley aleurone. *Plant Cell* 1996; **8**: 2325–2333.
- [70] POLYA GM, CHUNG R, MENTING J. Resolution of a higher plant protein kinase similar to the catalytic subunit of cyclic AMP-dependent protein kinase. *Plant Sci* 1991; **79**: 37–45.
- [71] SCHUURINK RC, SHARTZER SF, FATH A, JONES RL. Characterization of a calmodulin-binding transporter from the plasma membrane of barley aleurone. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; **19A**: 153.
- [72] SHAPIRO AD. Nitric oxide signaling in plants. *Vitam Horm* 2005; **72**: 339–398.
- [73] SMITH CJ, ROEF L, WALTON TJ, GAMES DE, BAYLISS M, WILKINS A, OLIVER M, WITTERS E, GEISBRECHT A, VAN GEYSCHER J, VAUGHAN JM, DIFFLEY PE, VAN ONCKELEN H, VAN CLEEF J, HARRIS FM, BRENTON AG, NEWTON RP. Variation in isomeric products-of a phosphodiesterase from the chloroplasts of *Phaseolus vulgaris* in response to cations. *Plant Biosyst* 2001; **135**: 143–156.

- [74] SODERLING SH, BEAVO JA. Regulation of cAMP and cGMP signaling: new phosphodiesterases and new functions. *Curr Opin Cell Biol* 2000; **12**: 174–179.
- [75] SZMIDT-JAWORSKA A, JAWORSKI K, TRETYN A, KOPCEWICZ J. Biochemical evidence for a cGMP-regulated protein kinase in *Pharbitis nil*. *Phytochem* 2003; **63**: 635–642.
- [76] SZMIDT-JAWORSKA A, JAWORSKI K, TRETYN A, KOPCEWICZ J. The involvement of cyclic GMP in the photoperiodic flower induction of *Pharbitis nil*. *J Plant Physiol* 2004; **161**: 277–284.
- [77] TALKE LN, BLAUDEZ D, MAATHUIS FJM, SANDERS D. CNGCs: prima targets of plant cyclic nucleotide signalling? *Trends Plant Sci* 2003; **8**: 286–293.
- [78] TERADA K, KAI T, OKUNO S, FUJISAWA H, KATSURA I. Maize leaf phosphoenolpyruvate carboxylase: phosphorylation of Ser 15 with a mammalian cycle AMP-dependent protein kinase diminishes sensitivity to inhibition by malate. *FEBS Lett* 1990; **259**: 241–244.
- [79] TSURUHARA A, TEEZUKA T. The relationship between the self-incompatibility and cAMP level in *Lilium longiflorum*. *Plant Cell Physiol* 2001; **42**: 1234–1238.
- [80] TUCKER CL, HURLEY JH, MILLER TR, HURLEY JB. Two amino acid substitution convert a guanylyl cyclase, RetGC-1, into an adenylyl cyclase. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; **95**: 5993–5997.
- [81] TUCKER CL, WOODCOCK SC, KELSELL RE, RAMAMURTHY V, HUNT DM, HURLEY JB. Biochemical analysis of a dimerization domain mutation in RetGC-1 associated with dominant cone-rod dystrophy. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; **96**: 9039–9044.
- [82] VOLOTOVSKI LD, SOKOLOVSKY SG, MOLCHAN OV, KNIGHT MR. Second messenger mediate increases in cytosolic calcium in tobacco protoplasts. *Plant Physiol* 1998; **117**: 1023–1030.
- [83] VOLOTOVSKI ID, DUBOVSKAYA LV, MOLCHAN OV. Photoreceptor phytochrome regulates the cyclic guanosine 3',5'-monophosphate synthesis in *Avena sativa* L. cells. *Bulg J Plant Physiol* 2003; **29**: 3–12.
- [84] WILSON EM, CHINKERS M. Identification of sequences mediating guanylyl cyclase dimerization. *Biochem* 1995; **34**: 4696–4701.
- [85] WITTERS E, QUANTEN L, BLOEMEN J, VALCKE R, VAN ONCKELEN, H. Product identification and adenylyl cyclase activity in chloroplasts of *Nicotiana tabacum*. *Rapid Commun Mass Spectrom* 2004; **18**: 499–504.
- [86] WITTERS E, VALCKE R, VAN ONCKELEN H. Cytoenzymological analysis of adenylyl cyclase activity and 3':5'-cAMP immunolocalization in chloroplasts of *Nicotiana tabacum*. *New Phytol* 2005; **168**: 99–108.
- [87] WONG YS, CHENG HC, WALSH DA, LAGARIAS JC. Phosphorylation of *Avena* phytochrome *in vitro* as a probe of light-induced conformational changes. *J Biol Chem* 1986; **261**: 12089–12097.
- [88] YASHIRO K, SAKAMOTO T, OHMONI M. Molecular characterization of an adenylyl cyclase gene of the cyanobacterium *Spirulina platensis*. *Plant Mol Biol* 1996; **31**: 175–181.
- [89] YOSHIOKA K, MOEDER W, KANG HG, KACHROO P, MASMOUDI K, BERKOWITZ G, KLESSIG DF. The chimeric *Arabidopsis* cyclic nucleotide-gated ion channel 11/12 activates multiple pathogen resistance responses. *Plant Cell* 2006; **18**: 747–763.
- [90] ZHANG WH, RYAN PR, TYERMAN SD. Malate-permeable channels and cation channels activated by aluminium in the apical cells of wheat roots. *Plant Physiol* 2001; **125**: 1459–1472.
- [91] ZHAO J, GUO YQ, FUJITA K, SAKAI K. Involvement of cAMP signalling in elicitor-induced phytoalexin accumulation in *Cupressus lusitanica* cell cultures. *New Phytol* 2004; **161**: 723–733.

Redaktor prowadzący – Maria Olszewska

Otrzymano: 24.09. 2006 r.

Przyjęto: 09.11. 2006 r.

ul. Gagarina 9, 87-100 Toruń

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