

KRZYSZTOF JAWORSKI, BRYGIDA ŚWIEŻAWSKA, PIOTR SZEWCZUK,
ADRIANA SZMIDT-JAWORSKA

*Uniwersytet Mikołaja Kopernika
Katedra Fizjologii Roślin i Biotechnologii
Lwowska 1, 87-100 Toruń
E-mail: jaworski@umk.pl
brydzia@doktorant.umk.pl
szewczuk_p@wp.pl
asjawors@umk.pl*

ROŚLINNE EFEKTORY CYKLICZNYCH NUKLEOTYDÓW

WPROWADZENIE

Wszystkie organizmy wykorzystują sieć transdukcji sygnału do regulacji procesów wzrostu i rozwoju oraz odpowiedzi na szereg czynników zewnętrznych, które mogą wywoływać reakcje stresowe. W reakcjach tych znamienne miejsce zajmują wtórne przekąźniki, których pojawienie się jest wymagane do wzmocnienia sygnału oraz aktywacji efektorów wrażliwych na zmiany stężenia tych przekąźników (BOUCHE i współaut. 2005).

Do grupy wtórnych przekąźników informacji należą m.in. cykliczne nukleotydy (cNMP), wśród których cykliczny adenozylo 3',5'-monofosforan (cAMP) i cykliczny guanozylo 3',5'-monofosforan (cGMP) pełnią nadrzedną rolę.

Cykliczny AMP wyizolowany został po raz pierwszy z wątroby psa w trakcie badań nad wpływem epinefryny i glukagonu na aktywność fosforylasy glikogenu (RALL i współaut. 1957). Wkrótce po tym doszło do odkrycia

cGMP (ASHMAN i współaut. 1963). U zwierząt cAMP jest zaangażowany w działanie hormonów i neurotransmiterów oraz regulację szeregu szlaków metabolicznych, np. w percepcję i rozpoznawanie zapachów (NEWTON i SMITH 2004). Cykliczny GMP uczestniczy w procesie przetwarzania impulsu świetlnego na sygnał nerwowy, działa na NO-zależnym szlaku regulacji skurczu mięśni oraz bierze udział w regulacji transportu jonów Na^+ w poprzek błony (NEWTON i SMITH 2004).

Pomimo trwających od 30 lat badań fizjologiczna rola cyklicznych nukleotydów u roślin osiowych jest słabo poznana. Czytelników zainteresowanych tą tematyką, jak również zagadnieniem syntezy tych związków odsyłamy do prac przeglądowych, które ukazały się na łamach *Postępów Biologii Komórki* (SZALATY 2004, SZMIDT-JAWORSKA i współaut. 2007) i *Postępów Biochemii* (SZMIDT-JAWORSKA 2011).

EFEKTORY CYKLICZNYCH NUKLEOTYDÓW

Ważnym etapem z punktu widzenia zrozumienia transdukcji sygnału z udziałem cyklicznych nukleotydów jest identyfikacja i charakterystyka efektorów cNMP. W komór-

kach ssaków aktywność szeregu białek jest warunkowana obecnością cyklicznych nukleotydów. Należą do nich kinazy zależne od cyklicznych nukleotydów: kinaza zależna

od cAMP (ang. protein kinase A, PKA) oraz kinaza zależna od cGMP (ang. protein kinase G, PKG), kanały bramkowane cyklicznymi nukleotydami (ang. cyclic nucleotide gated channel, CNGC) oraz fosfodiesterazy cyklicznych nukleotydów (ang. phosphodiesterases, PDE).

U roślin mechanizmy transdukcji sygnałów z udziałem cyklicznych nukleotydów są nadal owiane tajemnicą. Badania bioinformatyczne genomów roślinnych ukierunkowane na znalezienie białek efektorowych dla cNMP, bazują na ewolucyjnej konserwowalności domen wiążących cykliczne nukleotydy wśród organizmów prokariotycznych i

eukariotycznych (BRIDGES i współaut. 2005). Poznane zostały 2 typy domen wiążących cykliczne nukleotydy: GAF oraz CNBD. Domena GAF występuje w fosfodiesterazach hydrolizujących cykliczne nukleotydy, w fitochromie oraz receptorach etylenu. Należy jednak zaznaczyć, że do chwili obecnej, z wyjątkiem PDE, nie ma dowodów na zaangażowanie tych domen w sygnalizację wywołowaną przez cNMP. Powszechniej spotykana domena CNBD występuje w roślinnych kanałach kationowych bramkowanych cyklicznymi nukleotydami (CNGC), w 5 grupach kanałów potasowych typu Shaker oraz w tioesterazie acetylo CoA (PILOT i współaut. 2003).

FOSFODIESTERAZY CYKLICZNYCH NUKLEOTYDÓW

W komórkach zwierzęcych fosfodiesterazy cyklicznych nukleotydów hydrolizują cykliczne 3',5'-monofosforany nukleotydów do 5'-monofosforanów nukleotydów. Ich aktywność jest zwykle regulowana poprzez przyłączenie uaktywnionej jonami wapnia kalmoduliny. Fosfodiesterazy zgrupowano w 11 rodzinach (PDE 1-11). Są one produktami różnych genów kodujących białka o masach od 60 do 130 kDa (BEAVO 1995, CORBIN i FRANCIS 1999). Izoformy PDE charakteryzuje odmienna specyficzność. Enzymy należące do trzech rodzin (PDE 3, 7, 8) są specyficzne względem cAMP, trzy kolejne (PDE 5, 6, 9) względem cGMP, a ostatnie 5 (PDE 1, 2, 4, 10, 11) wykazuje podwójną specyficzność. Wszystkie PDE są dimerami. Zlokalizowane na końcu karboksylowym domeny katalitycznej zawierają dwie sekwencje połączone w tandem, a w każdej z nich znajduje się motyw odpowiedzialny za wiązanie jonów cynku.

Prowadzone od szeregu lat badania dostarczyły dowodów wskazujących na istnienie tej grupy enzymów w komórkach roślinnych. PDE odpowiedzialną za hydrolizę cNMP opisano po raz pierwszy w siewkach grochu, jeszcze przed pojawieniem się informacji o występowaniu w komórkach roślinnych cyklicznych nukleotydów. Kolejne badania potwierdziły ich występowanie np. u ziemniaka (*Solanum tuberosum*), portulaki

(*Portulaca oleracea*), marchwi (*Daucus carota*) i rzodkiewnika (*Arabidopsis thaliana*) (NEWTON i SMITH 2004). Roślinne PDE można podzielić na dwie klasy: (1) o aktywności fosfodiesterazy 3':5'-cyklicznych nukleotydów i tworzeniu 3'-NMP oraz 5'-NMP, jako produktów reakcji oraz (2) o aktywności fosfodiesterazy 2':3'-cyklicznych nukleotydów i tworzeniu 2'-NMP, jako produktu hydrolizy.

Roślinne PDE różnią się od ich zwierzęcych odpowiedników m.in. tym, że występują w izoformach, które podlegają odmiennej regulacji. Wykazano, że dwie izoformy z soi (*Glycine max*) mają różne wymagania w stosunku do jonów wapniowych, przez co charakteryzuje je zróżnicowany mechanizm regulacji (LEE i współaut. 2000). U szpinaku (*Spinacia* sp.) istnieje kilka izoform PDE, z których tylko jedna wykazuje selektywność względem 3':5'-cNMP. Dodatkowo przejawia ona wrażliwość na endogenne białka efektorowe i jest aktywowana przez jony wapnia (DUPON i współaut. 1987). Enzym ten tworzy kompleksy z kwaśnymi fosfatazami, rybonukleazami i ATP-azami.

Opisano także odmienne fosfodiesterazy, które wykazują aktywność zarówno względem cyklicznych nukleotydów purynowych, jak i pirymidynowych, wskazując tym samym na podobieństwo do wielofunkcyjnych fosfodiesteraz wyizolowanych z tkanek ssaków (CHIATANTE i współaut. 1990).

KINAZY ZALEŻNE OD CYKLICZNYCH NUKLEOTYDÓW

W komórkach zwierzęcych transdukcja sygnału z udziałem cyklicznych nukleoty-

dów opiera się głównie na aktywacji kinaz i procesie fosforylacji. Przykładowo, zależna

od cNMP modulacja transkrypcji u zwierząt związana jest z fosforylacją zależnych od cAMP i cGMP czynników transkrypcyjnych takich jak CREB, które regulują aktywność wielu genów. Podobny mechanizm regulacji został także scharakteryzowany w komórkach grzybów, u których odkryto izoformy PKA (MARTINEM-ATIENZA i współaut. 2007).

Do chwili obecnej istnieją sprzeczne dowody na istnienie takich enzymów w komórkach roślinnych.

Część badań wskazuje na ich niską aktywność np. u rzęsy (*Lemna paucicostata*), kukurydzy (*Zea mays*), palmy kokosowej (*Cocos nucifera*), ryżu (*Oryza sativa*) (KATO i współaut. 1983, JANISTYN 1989, POLYA i współaut. 1991, KOMATSU i HIRANO 1993). Enzym oczyszczony z petunii (*Petunia hybrida*) fosforylował, w sposób zależny od cAMP, syntetyczny substrat dla PKA – kemptid. U bobu (*Vicia faba*) i pszenicy (*Triticum vulgare*) dochodziło do zależnej od cAMP fosforylacji białek w etioplastach i komórkach szparkowych (NEWTON i SMITH 2004). Badania prowadzone na fasoli (*Phaseolus vulgaris*) wskazały natomiast, że forskolina będąca stymulatorem cykazy adenylanowej i podnosząca endogenne poziomy cAMP, podobnie jak egzogenna aplikacja mikromolowych stężeń cAMP, zwiększała proces fosforylacji, a inhibitor PKA wpływał hamująco na ten proces (FRIEDRICH i współaut. 1999). Inhibitor PKA częściowo hamował także indukowaną przez kwas abscysynowy (ABA) aktywność β -glukuronidazy (GUS) w komórkach tytoniu transformowanych konstruktem zawierającym promotor wrażliwy na ABA (rd29A-GUS). Ciekawe jest, że kwas abscyzynowy stymulował kinazę A (PKABA1), co wpływało na zahamowanie syntezy amylaz w warstwie aleuronowej jęczmienia (GOMEZ-CADENAS i współaut. 2001).

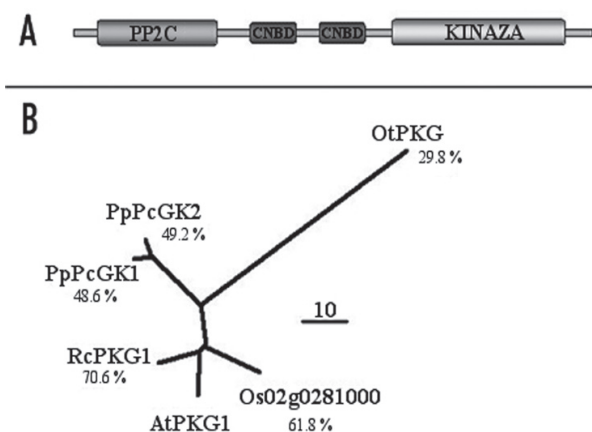
W komórkach komeliny zwyczajnej (*Commelina communis*) inhibitor kinazy G – Rp-8-Br-cGMPS zapobiegał indukowanemu przez auksynę otwieraniu aparatów szparkowych, sugerując tym samym istnienie PKG (COUSSON i VAVASSEUR 1998). Wzrost aktywności tego enzymu w obecności cGMP był natomiast obserwowany we frakcjach białkowych z owsa (DUBOVSKAYA i współaut. 2002). Wykazano wiązanie ^3H -cGMP do składników strukturalnych frakcji subkomórkowych, a proces przyłączania cGMP był zależny od fazy wzrostu i warunków świetlnych, w jakich uprawiano rośliny. Przykładowo, w zielonych siewkach wiązanie było słabsze niż w

siewkach etiolowanych. Białko wyizolowane z frakcji cytozolowej posiadało dwa miejsca wiązania, jedno o niskim, a drugie o wysokim powinowactwie do cGMP. Aktywność kinazy zależnej od cGMP zaobserwowano także we frakcjach wyizolowanych z wilca wielkokwiatowego (*Pharbitis nil*) (SZMIDT-JAWORSKA i współaut. 2003, 2009). W kolejnym etapie wyizolowano białko o masie cząsteczkowej 70kDa, które było stymulowane przez mikromolowe stężenia cGMP. Reagowało ono z przeciwciałami skierowanymi na domenę katalityczną PKG ssaków. Przeprowadzone doświadczenia, które miały na celu scharakteryzowanie genu kodującego PKG z *P. nil* nie dały jednak pozytywnych wyników.

Zastanawiające jest, że wyniki z badań biochemicznych z wykorzystaniem homogenatów lub frakcji białek podczyszczonych świadczą o istnieniu procesu fosforylacji zależnego od obecności cNMP, podczas gdy badania molekularne nie potwierdzają w pełni tych odkryć. Istnieją co prawda doniesienia o istnieniu u roślin genów kodujących białka o sekwencji charakterystycznej dla drożdżowych i zwierzęcych kinaz zależnych od cyklicznych nukleotydów u fasoli (*P. vulgaris*), ryżu (*Oryza sativa*), kukurydzy (*Zea mays*), grochu (*Pisum sativum*), ziemniaka (*Solanum berthaultii*) i rzodkiewnika (*A. thaliana*) (LAWTON i współaut. 1989, BIERMANN i współaut. 1990, LIN i współaut. 1991, CORBIN i FRANCIS 1999), lecz były one przedmiotem krytyki (HAMMOND i ZHAO 2000). Jednakże te pionierskie badania wskazują nie tylko na istnienie tej grupy genów u roślin, lecz również sugerują rolę powstających na ich bazie białek w procesach wzrostu i rozwoju roślin. Przykładowo, gen *SBPK* z kielkującego pyłku *S. berthaultii* koduje białko o bardzo wysokiej homologii do kinaz zależnych od cAMP i cGMP (CORBIN i FRANCIS 1999). *SBPK* nie posiada domeny regulatorowej, co wskazuje, że zyskuje on 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 techniki anty-sens spowodowała, że rośliny wytwarzały zmienione ziarna pyłku, co wskazuje jednocześnie na jego udział w mikrosporogenezie.

Tak więc, nie można wykluczyć istnienia takich kinaz, lecz cechowałyby je niska homologia do ich grzybowych i zwierzęcych odpowiedników.

Istotnych danych dostarczyły prowadzone w ostatnich latach analizy bioinformatyczne.



Ryc. 1. Schemat ilustrujący domenową budowę przypuszczalnej roślinnej kinazy zależnej od cyklicznych nukleotydów (A); pojedyncza kopia genu została zidentyfikowana u *Arabidopsis thaliana*, a geny homologiczne u *Ricinus communis*, *Oryza sativa*, *Physcomitrella patens* i *Ostreococcus tauri* (B) (wg MARTINEZ-ATIENZA i współaut. 2007, zmodyfikowana).

Wskazały one na obecność w genomach roślinnych unikalnych genów, które w swojej budowie zawierają zarówno domenę wiążącą cykliczne nukleotydy (CNBD), jak i domenę kinazową (Ryc. 1) (KRUPA i współaut. 2006). U *Arabidopsis* ta przypuszczalna kinaza zależna od cyklicznych nukleotydów (At2g20040) wykazuje 48% podobieństwo do PKG typu

II z komórek ssaków. W swojej budowie domena regulatorowa CNBD B wydaje się być zdegenerowana, natomiast CNBD A cechuje bardzo wysoki stopień konserwowalności. Problemem jest brak pętli bogatej w glicynę (G50XG52XXG55) w domenie I kinazy. Co ciekawe, część fosfatazy PP2C jest także częścią tej samej ramki odczytu. Czy rzeczywiście gen ten koduje kinazę zależną od cyklicznych nukleotydów i/lub fosfatazę – wymaga dalszych analiz. Pojedyncza kopia tego genu została oznaczona u *A. thaliana*, a geny homologiczne u rącznika (*Ricinus communis*), ryżu (*O. sativa*), mchu *Physcomitrella patens* i glonu *Ostreococcus kauri* (MARTINEZ-ATIENZA i współaut. 2007). Ponadto gen z *A. thaliana* ulega ekspresji w obszarach o wysokiej aktywności mitotycznej, w rozwijających się pędach i kwiatach, a także w elementach tkanki waskularnej. Próby uzyskania białka rekombinowanego w komórkach *E. coli* doprowadziły do uzyskania nieaktywnego białka.

Niedawno pojawiła się praca wskazująca na istnienie w komórkach roślinnych białek podobnych do kinaz (AtWAKL10), które posiadają dwie domeny: o aktywności cykazy guanylanowej i kinazy zależnej od cGMP. Stwierdzono zaangażowanie tego białka w mechanizmy obronne roślin w następstwie infekcji (MEIER i współaut. 2010).

KANAŁY BRAMKOWANE CYKLICZNYMI NUKLEOTYDAMI (CNGC)

BUDOWA I MECHANIZM DZIAŁANIA

CNGC są nieselektywnymi kanałami kationowymi, których aktywność jest regulowana poprzez bezpośrednie wiązanie cyklicznych nukleotydów. Zostały one po raz pierwszy opisane w komórkach węchowych i fotoreceptorach siatkówki oka kręgowców (ZAGOTTA i SIEGELBOUM 1996, CRAVEN i ZAGOTTA 2006).

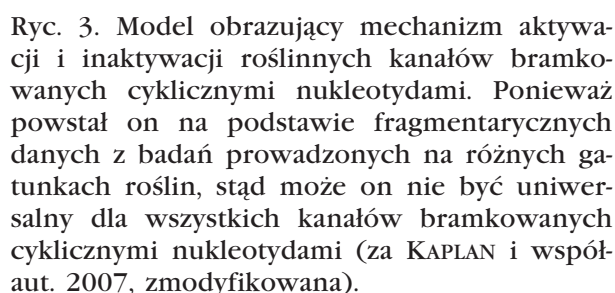
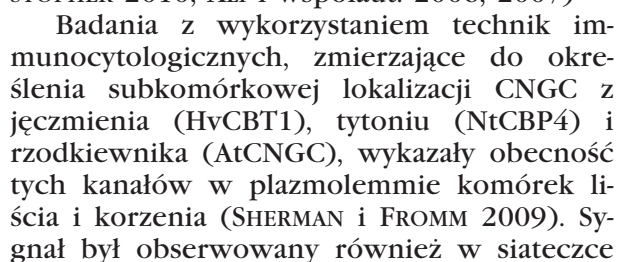
Ograniczona ilość danych literaturowych dotyczących innych efektorów cNMP u roślin powoduje, że CNGC urosły do rangi głównego efektoru cyklicznych nukleotydów, które przenoszą informacje zawarte w zmianach stężenia cNMP na kolejny element łańcucha transdukcji.

Kanały CNGC zostały dobrze scharakteryzowane w komórkach zwierzęcych. Są to kanały kationowe, aktywowane w obecności liganda, które charakteryzuje różny stopień selektywności względem Ca^{2+} i kationów jed-

nowartościowych. Zwierzęce CNGC są aktywowane przez cAMP i/lub cGMP i allosterycznie hamowane przez związanie kalmoduliny. Natywne CNGC są heterotetramerami. Do tej pory w genomie ssaków zlokalizowano 6 podjednostek CNGC (4a i 2β) (MÄSER i współaut. 2001).

Zbudowane są one z 6 domen transbłonowych, a region pora zlokalizowany jest pomiędzy 5 i 6 domeną. Czwarta domena posiada podobieństwo do receptorów typu Shaker (REHMANN i współaut. 2007). Skierowany do cytozolu koniec N jest odpowiedzialny za wiązanie kalmoduliny, podczas gdy na C-końcu zlokalizowany jest odcinek wiążący cNMP (Ryc. 2).

Roślinne CNGC, początkowo odkryte u jęczmienia, zostały następnie scharakteryzowane u innych gatunków np. tytoniu, ryżu i rzodkiewnika (CHIN i współaut. 2009, KAPLAN i współaut. 2007). W genomie *A. thalia-*



śródpłazmatycznej, aparacie Golgiego i pęcherzykach zlokalizowanych w okolicy plazmolemy, co wskazuje na jego syntezę w ER i transport pęcherzykami AG do plazmolemy (CHRISTOPHER i współaut. 2007, YUEN i CHRISTOPHER 2010). Niedawno wykazano, że CNGC20 może być także przenoszony do chloroplastów (SHERMANN i FROMM 2009).

Badania *in silico* sugerują, że kanały te są tetramerami (HUA i współaut. 2003b). Ekspresja roślinnych CNGC w systemie oocytów żaby szponiastej (*Xenopus laevis*) i kulturach ssaczych komórek nerki, wraz z analizami patch-clamp wykazała, że funkcjonalne kanały mogą być utworzone jako kompleks białek homomerycznych. W swojej budowie kanały bramkowane cNMP są podobne do rodziny TM1-6, w skład której wchodzi kanały jonowe posiadające 6 domen transbłonowych typu Shaker.

Do chwili obecnej skonstruowano kilka trójwymiarowych modeli CNGC (BAXTER i współaut. 2008, KAPLAN i współaut. 2007), co pozwoliło jednocześnie na zidentyfikowanie aminokwasów, które mogą być odpowiedzialne za wiązanie liganda.

SELEKTYWNOŚĆ JONOWA

Tradycyjnie badanie właściwości kanałów jonowych jest prowadzone z wykorzystaniem metod elektrofizjologicznych z użyciem oocytów żaby szponiastej oraz ludzkich komórek embrionalnych nerek (HEK). Już w 1999 r. LENG i współaut. zademonstrowali, że ekspresja *AtCNGC2* w oocytach *Xenopus laevis* warunkuje przepływ K^+ w obecności cAMP lub cGMP. Kolejne analizy wykonane na plazmolemie komórek szparkowych wykazały, że obecność cAMP jest niezbędna do uzyskania przepływu jonów Na^+ , K^+ , Li^+ , Cs^+ , Rb^+ przez błonę u roślin typu dzikiego, przy czym kanał ten wykazywał najwyższe powinowactwo do jonów Na^+ (LENG i współaut. 2002). U mutantów *dnd1* (ang. defence not dead), u których nie stwierdzono obecności *AtCNGC2*, nie zanotowano takiego przepływu (ALI i współaut. 2007). Odmienną specyficzność odnotowano w przypadku *AtCNGC1*, który przewodzi w takim samym stopniu jony K^+ , jak i Na^+ (HUA i współaut. 2003a).

W komórkach zwierzęcych za selektywność kanałów CNGC i rozróżnienie jonów odpowiadają motywy aminokwasowe GYG oraz GET. Jednakże sama ich obecność nie warunkuje rozróżniania jonów jedno- i dwuwartościowych (KAPLAN i współaut. 2007). U roślin nie stwierdzono istnienia analogicznych sekwencji. Przeprowadzone analizy wykazały, że kanały CNG z rzodkiewnika posiadają odpowiednio trójki GQN i AND. Motyw GQN jest obecny w 16 spośród 20 CNGC *Arabidopsis* (KAPLAN i współaut. 2007), podczas gdy AND jest charakterystyczny tylko dla *AtCNGC2*. Wykazano ponadto, że zamiana AND na AET, powodująca, że roślinny *AtCNGC2* bardziej przypomina jego zwierzęcy odpowiednik, przywraca kanałowi możliwość przewodzenia Na^+ zarówno w oocytach *X. laevis*, jak i komórkach HEK. Wnioskowano więc, że motyw AND w *AtCNGC2* warunkuje przewodzenie K^+ , bez możliwości przewodzenia Na^+ (HUA i współaut. 2003a). Podobną zależność zaobserwowano także w przypadku *AtCNGC4* (BALAGUÉ i współaut. 2003).

Z powodu niestabilności CNGC w układach roślinnych tylko kilka z nich scharakteryzowano z wykorzystaniem metod elektrofizjologicznych. Z tego też powodu analizy funkcjonalne CNGC wykonywano z wykorzystaniem tzw. systemów heterologicznych, to znaczy mutantów drożdżowych i *E. coli* posiadających uszkodzony mechanizm pobierania kationów.

Powszechnie wykorzystywanym mutantem drożdżowym jest szczep CV163, który pozbawiony jest *trk1* i *trk2*, dwóch najważniejszych kanałów potasowych. Nie może on przetrwać w środowisku bez dostarczenia mu takich kanałów z zewnątrz. W 1998 r. SCHUURINK i współaut. wykazali, że komplementacja mutantów CNGC z jęczmienia (*HvCBT1*) nie przywraca im możliwości pobierania jonów K^+ ze środowiska. Poszukując wyjaśnienia tego braku pozytywnego efektu przeprowadzono bardziej szczegółowe analizy, które wskazały na istotne różnice w budowie tego kanału. *HvCBT1* posiada co prawda 6 domen transbłonowych podobnych do tych spotykanych w kanałach K^+ typu Shaker i zwierzęcych CNGC, ale z sekwencją GQN zamiast konserwowalnej GYG w miejscu pora. Ponieważ sekwencja GYG determinuje selektywność kanałów, jej brak spowodował anomalię w funkcjonowaniu *HvCBT1*. Wprowadzenie tej sekwencji umożliwiło komórkom drożdży wzrost na pożywce zawierającej K^+ (SCHUURINK i współaut. 1998).

Podobne analizy zostały wykonane także dla *AtCNGC10* rzodkiewnika, które doprowadziły do tych samych wniosków (LI i współaut. 2005).

Prowadzone w ostatnich latach badania pokazały, że także *AtCNGC1*, *AtCNGC3*, *AtCNGC4* i *AtCNGC10* są zdolne do komplementacji nadwrażliwości mutantów drożdżowych WD3 (*trk1/trk2*-deficient) na niskie stężenie K^+ , w obecności nie ulegającego hydrolizie analogu cAMP (LI i współaut. 2005). Podobne rezultaty uzyskano dla *AtCNGC11* i *AtCNGC12* oraz białka chimerycznego *AtCNGC11/12* (YOSHIOKA i współaut. 2006). Jednakże w przeciwieństwie do *AtCNGC2*, w przypadku *AtCNGC11/12* stymulacja wzrostu drożdży następowała jedynie w obecności cAMP. Badania te zostały potwierdzone w kolejnych latach, kiedy BAXTER i współaut. (2008) stwierdzili bezpośrednie wiązanie cAMP do *AtCNGC12* i *AtCNGC11/12*.

Ponieważ już wstępne analizy wykazały, że CNGC nie są kanałami selektywnymi, badano ich zaangażowanie w transport także

innych jonów. W doświadczeniach wykorzystano mutanty z zaburzonym transportem jonów wapniowych (MID1 i CCH1/ELY151). Kanały te są zaangażowane w odpowiedź haploidalnych komórek drożdży na czynnik α (feromon MAT α), który umożliwia tym komórkom koniugację. Wykazano, że suplementacja szczepu zmutowanego dodaniem jednego z roślinnych kanałów CNGC (AtCNGC1, 11, 12 lub 11/12) umożliwia ten proces (ALI i współaut. 2005, URQUHART i współaut. 2007).

W przypadku jonów sodowych, do analiz wykorzystano drożdżowy szczep G-19 wrażliwy na zasolenie. Wrażliwość ta wynika z delecji w genie kodującym białko pompy sodowej (ENA1-4). Mutant drożdżowy z wprowadzonym *AtCNGC3* jest wrażliwy jedynie na bardzo wysokie stężenie soli i jest w stanie gromadzić nadmiar jonów Na^+ w znacznie wyższym stężeniu niż organizmy kontrolne, do których wprowadzono pusty wektor. Wskazuje to jednoznacznie, że *AtCNGC3* działa jako kanał Na^+ (GOBERT i współaut. 2006).

ROLA CNGC W PROCESACH (PATO) FIZJOLOGICZNYCH

Badania prowadzone na mutantach rzodkiewnika, zmierzające do określenia roli, jaką odgrywają poszczególne jony w procesach zachodzących w komórkach roślinnych, leżą u podstaw określenia funkcji poszczególnych kanałów bramkowanych cyklicznymi nukleotydami. Badania fenotypowe mutantów pozbawionych czynnych CNGC wykazały ich udział w procesach uzyskiwania tolerancji na metale ciężkie, odporności na stres solny, programowanej śmierci komórki czy odporności na infekcje (Tabela 1) (CHRISTOPHER i współaut. 2007). Ponadto, zarówno selektywność, jak i profil ekspresji różnych *CNGC* wskazuje, że odgrywają one rolę w regulacji różnych procesów związanych ze wzrostem i rozwojem roślin (Ryc. 4). O znaczącej roli białek kodowanych przez *CNGC* świadczy m.in. fakt, że bardzo trudno jest uzyskać linie mutantów homozygotycznych z insercją T-DNA, zaś wydajność pozyskiwania roślin z genem w pozycji anty-sens jest bardzo niska.

ARAZI i współaut. (1999) jako pierwsi wykazali, że nadekspresja genu kodującego CNGC, który został oznaczony *NtCBP4*, prowadzi do tolerancji tytoniu na Ni^{2+} , a nadwrażliwości na Pb^{2+} . Kolejne badania pokazały, że u transgenicznego tytoniu ekspresja fragmentu genu *NtCBP4* poprawia tolerancję

na jony ołowiu i prowadzi do osłabienia akumulacji tych jonów, w porównaniu do roślin, w których dochodziło do ekspresji pełnego genu (SUNKAR i współaut. 2000).

Mutant *Arabidopsis* posiadający insercję w *AtCNGC1* wykazuje tolerancję na Pb^{2+} , co objawia się równocześnie obniżonym poziomem akumulacji tego kationu. W tym przypadku nie zaobserwowano tolerancji na nikiel, co sugeruje, iż *AtCNGC1* jest specyficzny jedynie dla jonów Pb^{2+} . Powyższe wyniki pozwalają stwierdzić, że *NtCBP4* i *AtCNGC1* są zaangażowane w przepływ jonów metali ciężkich. Jednocześnie pojawiły się prace wskazujące, że mutanty pozbawione *AtCNGC1* charakteryzują się obniżonym przepływem także jonów wapnia, co może sugerować, że *AtCNGC1* jest zaangażowany w przepuszczanie jonów dwuwartościowych. Ponieważ do ekspresji *AtCNGC1* dochodzi przede wszystkim w korzeniach (SUNKAR i współaut. 2000, MA i współaut. 2006), sugeruje się zaangażowanie tego kanału w pobieranie jonów ze środowiska.

Z kolei izoforma *AtCNGC2* była analizowana pod kątem wrażliwości na zmiany pH oraz stężenia K^+ , Na^+ oraz Mg^{2+} , Ca^{2+} . W tym przypadku mutant pozbawiony tego kanału wykazywał nadwrażliwość na Ca^{2+} . W porównaniu do roślin typu dzikiego charakteryzował się on zmianą w ogólnym pokroju rośliny, mniejszą rozetą liściową oraz redukcją ilości korzeni (CHAN i współaut. 2003). Kolejne badania dowiodły, że nadwrażliwość mutantu *cngc2* na jony wapnia nie wynika z akumulacji tego jonu, lecz jest związana z zaburzeniem transdukcji sygnału na szlaku, w którym jony wapnia odgrywają kluczową rolę. Co ciekawe, wykazano jednocześnie podobieństwa we wzorze ekspresji *CNGC2* przy wyższym stężeniu Ca^{2+} i pojawieniu się stresorów biotycznych i abiotycznych. Wskazuje to na udział Ca^{2+} /CNGC w transdukcji informacji uruchamianej w momencie pojawienia się stresora (CHAN i współaut. 2008).

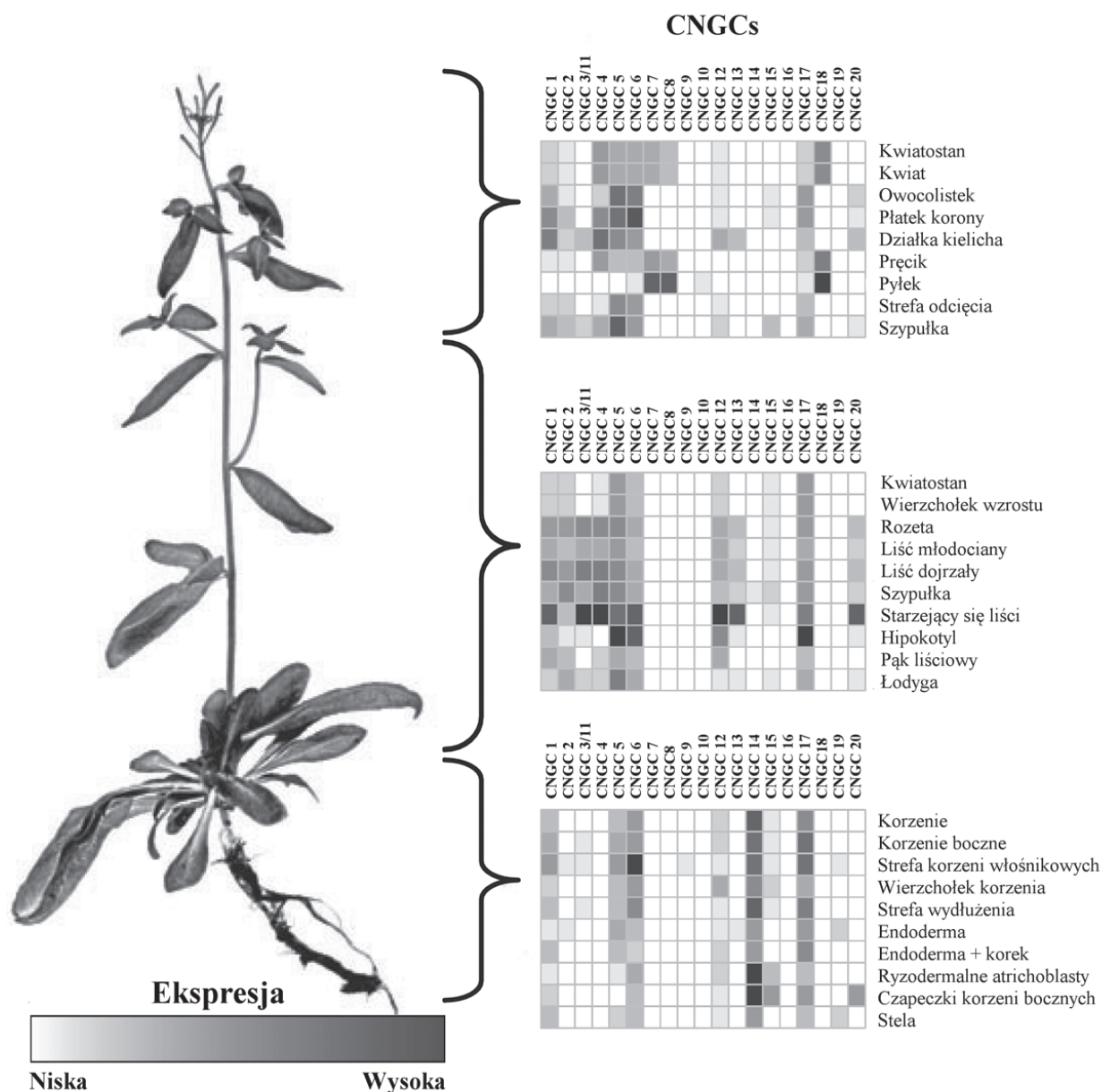
Także *AtCNGC3* jest zaangażowany w homeostazę jonów u roślin. Mutanta *cngc3* cechuje osłabiony proces kiełkowania w odpowiedzi na wysokie, zewnętrzne stężenie jonów Na^+ , przy braku reakcji na podniesienie stężenia K^+ i NH_4^+ . Analizując ten proces wykazano, że *AtCNGC3* nie bierze udziału w pobieraniu jonów, lecz raczej jest zaangażowany w mechanizm transportu toksycznych w nadmiarze jonów Na^+ z wrażliwych do bardziej tolerancyjnych tkanek w zarodku (GOBERT i współaut. 2006).

Tabela 1. Selektywność jonowa oraz proponowana rola fizjologiczna wybranych roślinnych kanałów bramkowanych cyklicznymi nukleotydami (CNGC ang. Cyclic Nucleotide Gated Channels (za DIETRICH i współaut. 2010 i CHIN i współaut. 2009)

Gen	ID genu	Selektywność względem jonów	Sugerowana rola fizjologiczna	Publikacje
<i>Arabidopsis thaliana</i>				
AtCNGC1	AT5G53130	K ⁺ , Na ⁺ , Ca ²⁺ , Pb ²⁺	Absorpcja kationów z gleby Absorpcja metali ciężkich	HUA i współaut., 2003a SUNKAR i współaut., 2000, ALI i współaut., 2007
AtCNGC2	AT5G15410	K ⁺ , Ca ²⁺ , Li ²⁺ , Cs ⁺ , Rb ⁺	Starzenie się i śmierć komórek Wzrost i rozwój Odporność na atak patogena	LENG i współaut., 2002 CHAN i współaut., 2003 ALI i współaut., 2007, CLOUGH i współaut., 2000
AtCNGC3	AT2G46430	K ⁺ , Na ⁺	Transport jonów z ksylemu Dystrybucja jonów Na ⁺ w obrębie zarodka	GOBERT i współaut., 2006
AtCNGC4	AT5G54250	K ⁺ , Na ⁺	Odporność na atak patogena	BALAGUÉ i współaut., 2003, JURKOWSKI i współaut., 2007
AtCNGC10	AT1G01340	K ⁺	Procesy fotomorfogenetyczne	CHRISTOPHER i współaut., 2007
AtCNGC11	AT2G46440	K ⁺ , Ca ²⁺	Odporność na atak patogena	YOSHIOKA i współaut., 2006, URQUHART i współaut., 2007
AtCNGC12	AT2G46450	K ⁺ , Ca ²⁺	Odporność na atak patogena	YOSHIOKA et al. 2006, URQUHART et al. 2007
AtCNGC18	AT5G14870	Ca ²⁺	Polarny wzrost łagiewki pyłkowej	FRIETSCH i współaut., 2007
<i>Nicotiana tabacum</i>				
NtCPB4	AF079872	Pb ²⁺	Absorpcja metali ciężkich	ARAZI i współaut., 1999
<i>Hordeum vulgare</i>				
HvCBT1	AJ002610	nieznane	Transport jonów w warstwie aleuronowej	SCHUURINK i współaut., 1998
NEC1	AY972627	nieznane	Odporność na atak patogena	MA i współaut., 2009

Ostatnio pojawiły się kolejne dowody na zaangażowanie CNGC w homeostazę jonową. Badania dotyczyły *AtCNGC11* i *12* (CHIN i współaut. 2008). Analiza wzrostu korzeni mutantów typu knock-out zarówno *AtCNGC11*, jak i *12* wykazała, że są one wrażliwe na zwiększenie stężenia Ca²⁺ i K⁺ w takim samym stopniu, jak rośliny typu dzikiego. Natomiast podwójny mutant *cngc11/12* charakteryzował się zwiększoną wrażliwością tylko na jony Ca²⁺ (CHIN i współaut. 2009). Sugeruje to, że eliminacja obu genów i powstających na ich bazie białek może prowadzić do gwałtownej próby naprawy tej straty poprzez wywołanie nadekspresji genów kodujących inne kanały jonowe.

W wyniku przeprowadzonych analiz wykazano znaczący wzrost poziomu ekspresji *AtCNGC2* zarówno w liściach, w rozwiniętych liściach, jak również we wczesnych etapach starzenia się rzodkiewnika, co wskazuje, że gen ten podlega ekspresji podczas całego cyklu życiowego *A. thaliana*. Mutant *cngc2* różni się fenotypowo od roślin typu dzikiego. Rośliny są znacz-



Ryc. 4. Wzór ekspresji dwudziestu kanałów bramkowanych cyklicznymi nukleotydami (CNGC ang. Cyclic Nucleotide Gated Channels) w organach *Arabidopsis thaliana* (wg DIETRICH i współaut. 2010).

nie mniejsze i cechuje je osłabiona płodność oraz nadwrażliwość na wzrost stężenia Ca^{2+} (CHAN i współaut. 2003).

Z kolei rośliny z nieczynnym AtCNGC10 odznaczają się 20% redukcją powierzchni i grubości blaszki liściowej oraz znaczną redukcją długości komórek miękiszu palisadowego. Ponadto, w liściach tych roślin dochodziło do znaczącego nagromadzenia skrobi, a kwitnienie zachodziło około 10 dni wcześniej. Następuje także redukcja długości korzeni, której towarzyszą zaburzenia w proce-

sie grawitropizmu (CHRISTOPHER i współaut. 2007).

W przypadku AtCNGC18 stwierdzono jego zaangażowanie w proces wzrostu łagiewki pyłkowej (FRIETSCH i współaut. 2007). Analizy genu reporterowego *GUS* wykazały, że AtCNGC18 ulega ekspresji jedynie w ziarnach pyłku. Unieczynnienie tego genu wywołuje zmiany w morfologii i procesach fizjologicznych zachodzących podczas kiełkowania ziaren pyłku i tworzenia łagiewki pyłkowej. Łagiewki pyłkowe takich mutantów są krót-

kie i cienkie, przedwcześnie kończą wzrost i charakteryzują się brakiem ukierunkowania. Ekspresja *AtCNGC18* w *E.coli* powoduje akumulację Ca^{2+} , co dodatkowo potwierdza zaangażowanie tego kanału w proces wzrostu łagiewki pyłkowej, gdyż obecność jonów wapniowych jest niezbędna do jej wzrostu i reorientacji (MOUTINHO i współaut. 2001). Kontynuowanie tych badań pozwoliło na potwierdzenie zaangażowania w ten proces trzech kolejnych kanałów: *AtCNGC7*, *8* i *18* (BOCK i współaut. 2006).

Do chwili obecnej wykazano udział szeregu CNGC w generowaniu reakcji obronnej podczas infekcji patogena. Kluczowe w tych badaniach były doświadczenia YOSHIOKA i współaut. (2001, 2006), którzy wytworzyli mutantą *cpr22* (ang. constitutive expression of PR gene 22). Powstał on poprzez 3 kb delecję, która połączyła część 5' *AtCNGC11* i część 3' *AtCNGC12* tworząc chimeryczny gen *AtCNGC11/12*. Mutacja ta prowadzi do szeregu zmian zarówno fenotypowych, m. in. zahamowania wzrostu, skręcenia liści, oraz biochemicznych, takich jak akumulacja salicylanów i pojawienie się reaktywnych form tlenu, co skutkuje zwiększeniem odporności na czynniki stresowe. Mutanty typu knock-out wykazują, w porównaniu do roślin typu dzikiego, częściowy spadek odporności na infekcję wirulentnym *Hyaloperonospora parasitica*. Szczegółowe analizy wykazały jednak, że obserwowany fenotyp *cpr22* nie jest wynikiem aktywności *AtCNGC11* i *12*, lecz związany jest z pojawieniem się chimery *AtCNGC11/12*. *AtCNGC11/12*, podobnie jak w przypadku niezmienionych *AtCNGC11* i *12*, przewodzi z równą intensywnością zarówno jony Ca^{2+} , jak i K^+ . Jednakże inhibitory kanałów wapniowych, do których należą jony Gd^{3+} i La^{3+} , hamowały aktywność *AtCNGC11/12*, podczas gdy inhibitor kanałów K^+ nie powodował takiej reakcji. Suge-

rować to może, że napływ Ca^{2+} wymagany do indukcji programowanej śmierci komórki (PCD) jest przynajmniej częściowo kierowany przez CNGCs. Ponadto, w procesie tym wymagana jest aktywność podobna do kaspaz. Kaspazy są proteazami cysteinowymi, które u zwierząt biorą udział w PCD. Do tej pory nie odkryto ortologów kaspaz u roślin, a białkiem, które w swojej budowie najbardziej przypomina kaspazy jest enzym VPE (ang. vacuolar processing enzymem). W przypadku omawianego mutantą traktowanie wyciszaczem i inhibitorem kaspazy 1 (Ac-YVAD-CHO i Ac-YVADCMK) prowadzi do zahamowania procesu programowanej śmierci komórki (URQUHART i współaut. 2007).

Innymi mutantami, które wykorzystano do ustalenia roli CNGC u roślin, są mutanty *dnd1*, *dnd2/hlm1* o zaburzonej odpowiedzi na pewne wirulentne szczepy patogenów (CLOUGH i współaut. 2000, BALAGUÉ i współaut. 2003, JURKOWSKI i współaut. 2004). W przypadku obu mutantów dochodzi do zaburzeń w funkcjonowaniu *AtCNGC2* i *AtCNGC4*. Charakteryzują się one konstytutywną ekspresją genów *PR*, kodujących białka związane z patogenezą (ang. pathogenesis-related), podniesionym poziomem salicylanów i zwiększoną odpornością na patogeny wirulentne, podobnie jak ma to miejsce w przypadku *cpr22* (CLOUGH i współaut. 2000, JURKOWSKI i współaut. 2004). Przeprowadzone analizy elektrofizjologiczne dowiodły, że otwarcie kanału *AtCNGC2* prowadzi do wzrostu stężenia jonów Ca^{2+} i tlenu azotu (ALI i współaut. 2007).

Powyższe dane wskazują, że obserwowane u *cpr22* nabycie odporności, przejawiające się akumulacją salicylanów i ekspresją genu *PR*, jest związane z ekspresją *AtCNGC11/12* i brakiem *AtCNGC2* i *4*. Co sugeruje, że do aktywacji reakcji nadwrażliwości wymagana jest precyzyjna homeostaza kationów.

PODSUMOWANIE

Istnieje duża ilość dowodów potwierdzająca obecność oraz precyzująca rolę cAMP i cGMP u roślin. W chwili obecnej najmniej informacji posiadamy o efektorach zdolnych do odbioru informacji zawartych w zmianach stężenia cyklicznych nukleotydów. Spośród białek posiadających domeny zdolne do wiązania cyklicznych nukleotydów na szczególną uwagę zasługują dwa najważniejsze: kinazy zależne od cNMP oraz kanały

bramkowane ich obecnością. Niewielka ilość danych dotycząca roli kinaz regulowanych cNMP może sugerować, że nie jest to szlak dominujący. Uwagę za to przykuwają coraz liczniejsze doniesienia dotyczące budowy i roli kanałów bramkowanych cNMP. Duża ilość genów kodujących CNGC u roślin, w porównaniu do 6 CNGC w komórkach ssaków, wskazuje na ich znaczenie i prawdopodobną wysoką funkcjonalną i organową

specjalizację w procesach, w które są zaangażowane. Jednakże w celu pełnego zrozumienia funkcji poszczególnych CNGC konieczne są bardziej szczegółowe analizy, co może być trudne zważywszy na fakt dużej ilości CNGC u roślin. Ponadto nie wiadomo czy utrata jednej z podjednostek sprawi, iż pozostałe podjednostki będą nieaktywne. Tak więc kluczem do zrozumienia funkcji CNGC, jak również regulacji ich aktywności, jest określenie które podjednostki oddziałują ze sobą, czy oddziaływanie to jest stałe, czy podjednostki mogą się reorganizować zależnie od rodzaju stymulatora czy fazy wzrostu i rozwoju. Po-

nieważ od kilku lat istnieje spore zainteresowanie zarówno cyklicznymi nukleotydami jak i szlakami sygnalizacyjnymi, w które są one zaangażowane, w najbliższej przyszłości należy spodziewać się odpowiedzi na część z tych pytań.

Zagadnienia związane z kanałami bramkowymi cyklicznymi nukleotydami są warte uwagi także z innego powodu. Od lat badacze szukają zarysowującego się powiązania pomiędzy szlakiem cyklicznych nukleotydów, a szlakiem wapniowym. Wydaje się, że kanały CNGC mogą być miejscem konwersji sygnału cNMP na sygnał Ca^{2+} .

ROŚLINNE EFEKTORY CYKLICZNYCH NUKLEOTYDÓW

Streszczenie

Mechanizmy, za pomocą których sygnały wewnętrzne i zewnątrzkomórkowe wywołują specyficzną odpowiedź biologiczną są istotne dla regulacji funkcji komórek, procesów wzrostu i rozwoju oraz odpowiedzi na zmiany środowiska.

W ostatnich latach dokonał się ogromny postęp w badaniu elementów zaangażowanych w regulację procesów zachodzących w komórkach roślinnych o czym świadczy olbrzymia ilość publikacji poruszających problem sygnalizacji komórkowej.

Cykliczne nukleotydy (cNMP) są cząsteczkami sygnałnymi, których obecność i zaangażowanie w szereg procesów w komórkach roślinnych nie budzą już wątpliwości. Z fizjologicznego punktu widzenia,

stężenie cNMP w miejscu ich działania nie może być ani za wysokie ani za niskie, a jest to normowane przez odpowiednie układy generujące i inaktywujące cykliczne nukleotydy. Ponadto na końcowy efekt biologiczny ma wpływ sprawność systemów efektorowych wrażliwych na zmiany stężenia cyklicznych nukleotydów takich jak fosfodiesterazy, kinazy regulowane lub zależne od cNMP i kanały bramkowane cyklicznymi nukleotydami. W pracy tej podsumowano aktualną wiedzę dotyczącą efektorów cyklicznych nukleotydów, skupiając się zarówno na ich budowie, jak i aspekcie ich funkcjonowania w komórkach roślinnych.

PLANT EFFECTORS OF CYCLIC NUCLEOTIDES

Summary

The mechanisms by which intra- and extracellular signals induce a specific biological response are important for the regulation of cell function, processes of growth and development and responses to environmental changes. In recent years, enormous progress has been made in studies of elements involved in the regulation of processes occurring in plant cells. Cyclic nucleotides (cNMP) are signaling molecules whose presence and involvement in a number of processes in plant cells is well documented. From the physiological point of view, the concentration of cNMP's

at a site of their action could be neither too high nor too low, as it is controlled by the systems that lead to their synthesis or inactivation. In addition, the final biological effect depends on the efficiency of the effector systems such as cyclic nucleotide phosphodiesterases, cNMP-dependent or cNMP-regulated protein kinase and cyclic-nucleotide gated channels, that are sensitive to changes in cNMP concentration. In this paper we summarize the current knowledge on the cyclic nucleotide effectors, focusing both on their structure and functioning in plant cells..

LITERATURA

- ALI R., ZIELINSKI R. E., BERKOWITZ G. A., 2006. *Expression of plant cyclic nucleotide-gated cation channels in yeast*. J. Exp. Bot. 57, 125–138.
- ALI R., MA W., LEMTIRI-CHLIEH F., TSALTAS D., LENG Q., VON BODMAN S., BERKOWITZ G. A., 2007. *Death don't have no mercy and neither does calcium: Arabidopsis cyclic nucleotide gated channel 2 and innate immunity*. Plant Cell 19, 1081–1095.
- ARAZI T., SUNKAR R., KAPLAN B., FROMM H., 1999. *A tobacco plasma membrane calmodulin-binding transporter confers Ni^{2+} tolerance and Pb^{2+} hypersensitivity in transgenic plants*. Plant J. 20, 171–182.
- ASHMAN D. F., LIPTON R., MELICOW M. M., PRICE T. D. 1963. *Isolation of adenosine 3',5'-monophosphate and guanosine 3',5'-monophosphate from*

- rat urine. Biochem. Biophys. Res. Commun. 11, 330–334.
- BALAGUÉ C., LIN B., ALCON C., FLOTTES G., MALMSTRÖM S., KÖHLER C., 2003. *HLM1*, and essential signaling component in the hypersensitive response, is a member of the cyclic nucleotide-gated channel ion channel family. Plant Cell 15, 365–379.
- BAXTER J., MOEDER W., URQUHART W., SHAHINAS D., CHIN K., CHRISTENDAT D., KANG H. G., ANGELOVA M., KATO N., YOSHIOKA K., 2008. Identification of a functionally essential amino acid for *Arabidopsis* cyclic nucleotide gated ion channels using the chimeric *AtCNGC11/12* gene. Plant J. 56, 457–469.
- BEAVO J. A., 1995. Cyclic-nucleotide phosphodiesterases: Functional implications of multiple isoforms. Physiol. Rev. 75, 725–748.
- BIERMANN B., JOHNSON E. M., FELDMAN L. J., 1990. Characterization and distribution of a maize cDNA encoding a peptide similar to the catalytic region of second messenger dependent protein kinase. Plant Physiol. 94, 1609–1615.
- BOCK K. W., HONYNS D., WARD J. M., PADMANABAN S., NAWROCKI E. P., HIRSCHI K. D., TWELL D., SZE H., 2006. Integrating membrane transport with male gametophyte development and function through transcriptomics. Plant Physiol. 140, 1151–1168.
- BOUCHÉ N., YELLIN A., SNEDDEN W. A., FROMM H., 2005. Plant-specific calmodulin-binding proteins. Annu. Rev. Plant Biol. 56, 435–466.
- BRIDGES D., FRASER M. E., MOORHEAD G. B. G., 2005. Cyclic nucleotide binding proteins in the *Arabidopsis thaliana* and *Oryza sativa* genomes. BMC Bioinform. 6, 6.
- CHAN C. W. M., SCHORRAK L. M., SMITH R. K., BENT A. F., SUSSMAN M. R., 2003. A cyclic nucleotide-gated ion channel, *CNGC2*, is crucial for plant development and adaptation to calcium stress. Plant Physiol. 132, 728–731.
- CHAN C. W. M., WOHLBACH D. J., RODESCH M. J., SUSSMAN M. R., 2008. Transcriptional changes in response to growth of *Arabidopsis* in high external calcium. FEBS Lett. 582, 967–976.
- CHIATANTE D., NEWTON R. P., CRIGNOLA S., LEVI M., BROWN E. G., 1990. The 3',5'-cyclic nucleotide phosphodiesterase of meristematic and differentiated tissues of pea roots. Phytochemistry 29, 2815–2820.
- CHIN K., MOEDER W., MOSHER S., URQUHART W., YOSHIOKA K., 2008. The roles of the *Arabidopsis* cyclic nucleotide-gated ion channels, *AtCNGC11* and *12* in abiotic and biotic stress responses. Annual Meeting of the Canadian Society of Plant Physiologists, 14–17 Ottawa.
- CHIN K., MOEDER W., YOSHIOKA K., 2009. Biological roles of cyclic-nucleotide-gated ion channels in plants: What we know and don't know about this 20 members ion channel family. Botany 87, 668–677.
- CHRISTOPHER D. A., BORSICS T., YUEN C. Y., ULLMER W., ANDÈME-ONDZIGHI C., ANDRES M. A., 2007. The cyclic nucleotide gated cation channel *AtCNGC10* traffics from the ER via Golgi vesicles to the plasma membrane of *Arabidopsis* root and leaf cells. BMC Plant Biol. 7, 48.
- CLOUGH S. J., FENGLER K. A., YU I.-C., LIPPOK B., SMITH R. K. JR., BENT A. F., 2000. The *Arabidopsis dnd1* "defense, no death" gene encodes a mutated cyclic nucleotide-gated ion channel. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97, 9323–9328.
- CORBIN J. D., FRANCIS S. H., 1999. Cyclic GMP phosphodiesterase-5: Target of sildenafil. J. Biol. Chem. 274, 13729–13732.
- COUSSON A., VAVASSEUR A., 1998. Putative involvement of cytosolic Ca^{2+} and GTP-binding proteins in cyclic-GMP-mediated induction of stomatal opening by auxin in *Commelina communis* L. Planta 206, 308–314.
- CRAVEN K. B., ZAGOTTA W. N., 2006. *CNG* and *HCN* channels: two peas, one pod. Annu. Rev. Physiol. 68, 375–401.
- DIETRICH P., ANSCHUTZ U., KUGLER A., BECKER D., 2010. Physiology and biophysics of plant ligand-gated ion channels. Plant Biol. 12, 80–93.
- DUBOVSKAYA LV., MOLCHAN OV., VOLOTOVSKI ID., 2001. Photoregulation of the endogenous cGMP content in oat seedlings. J. Plant Physiol. 48, 26–29.
- DUPON M., VAN ONCKELE H. A., DE GREEK J. A., 1987. Characterisation of cyclic nucleotide phosphodiesterase activity in *Phaseolus vulgaris*. Physiol. Plant. 69, 361–365.
- FRIEDRICH P., CURVETTO N., GIUSTO N., 1999. Cyclic AMP-dependent protein phosphorylation in guard cell protoplasts of *Vicia faba* L. Biocell 23, 203–210.
- FRIETSCH S., WANG Y. F., SLADEK C., POULSEN L. R., ROMANOWSKY S. M., SCHROEDER J. I., HARPER J. F., 2007. A cyclic nucleotide-gated channel is essential for polarized tip growth of pollen. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 104, 14531–14536.
- GOBERT A., PARK G., AMTMANN A., SANDERS D., MAATHUIS F. J., 2006. *Arabidopsis thaliana* cyclic nucleotide gated channel 3 forms a non-selective ion transporter involved in germination and cation transport. J. Exp. Bot. 57, 791–800.
- GOMEZ-CADENAS A., ZENTELLA A., WALKER-SIMMONS M., HO T. H. D., 2001. Gibberellin/abscisic acid antagonism in barley aleuronic cells: site of action of the protein kinase PKABAI in relation to gibberellin signaling molecules. Plant Cell 13, 667–679.
- HAMMOND R. W., ZHAO Y., 2000. Characterisation of a tomato protein kinase gene induced by infection by potato spindle tuber viroid. Mol. Plant Microbe Interact. 13, 903–910.
- HUA B. G., MERCIER R. W., LENG Q., BERKOWITZ G. A., 2003a. Plants do it differently. A new basis for potassium/sodium selectivity in the pore of an ion channel. Plant Physiol. 132, 1353–1361.
- HUA B. G., MERCIER R. W., ZIELINSKI R. E., BERKOWITZ G. A., 2003b. Functional interaction of calmodulin with a plant cyclic nucleotide gated cation channel. Plant Physiol. Biochem. 41, 945–954.
- JANISTYN B., 1989. cAMP promoted protein phosphorylation of dialysed coconut milk. Phytochem. 28, 329–331.
- JURKOWSKI G. I., SMITH R. K., YU I. C., HAM J. H., SHARMA S. B., KLESSIG D. F., FENGLER K. A., BENT A. F., 2004. *Arabidopsis DND2*, a second cyclic nucleotide-gated ion channel gene for which mutation causes the "defense, no death" phenotype. Mol. Plant Microbe Interact. 17, 511–520.
- KAPLAN B., HERMAN T., FROMM H., 2007. Cyclic nucleotide-gated channels in plants. FEBS Lett. 581, 2237–2246.
- KATO R., UNO L., ISHIKAWA T., FUJII T., 1983. Effects of cAMP on the activity of soluble protein kinases in *Lemna paucicostata*. Plant Cell Physiol. 24, 841–848.
- KOMATSU S., HIRANO H., 1993. Protein kinase activity and protein phosphorylation in rice (*Oryza sativa* L.) leaf. Plant Sci. 94, 127–137.
- KRUPA A., ANAMIKA A., SRINIVASAN N., 2006. Genome-wide comparative analyses of domain organization of repertoires of protein kinases of *Arabidopsis thaliana* and *Oryza sativa*. Gene 380, 1–13.
- LAWTON M. A., YAMAMOTO R. T., HANKS S. K., LAMB C. J., 1989. Molecular cloning of plant transcripts

- encoding protein kinase homologs. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86, 3140–3144.
- LEE S. H., JOHNSON J. D., WLAH M. P., VAN LIEROP J. E., SUTHERLAND C., XU A. D., SNEDDEN W. A., KOSKOSISKA D., FROMM H., NARAYANAN N., CHO M. J., 2000. Differential regulation of Ca^{2+} /calmodulin-dependent enzymes by plant calmodulin isoforms and free Ca^{2+} concentration. *Biochem. J.* 350, 299–306.
- LEMTIRI-CHLIEH F., BERKOWITZ G. A., 2004. Cyclic adenosine monophosphate regulates calcium channels in the plasma membrane of *Arabidopsis* leaf guard and mesophyll cells. *J. Biol. Chem.* 279, 35306–35312.
- LENG Q., MERCIER R. W., YAO W., BERKOWITZ G. A., 1999. Cloning and first functional characterization of a plant cyclic nucleotide-gated cation channel. *Plant Physiol.* 121, 753–761.
- LENG Q., MERCIER R. W., HUA B. G., FROMM H., BERKOWITZ G. A., 2002. Electrophysiological analysis of cloned cyclic nucleotide-gated ion channels. *Plant Physiol.* 128, 400–408.
- LI X., BORSICS T., HARRINGTON H. M., CHRISTOPHER D. A., 2005. *Arabidopsis* AtCNGC10 rescues potassium channel mutants of *E. coli*, yeast, and *Arabidopsis* and is regulated by calcium/calmodulin and cyclic GMP in *E. coli*. *Funct. Plant Biol.* 32, 643–653.
- LIN X., FENG X. H., WATSON J. C., 1991. Differential accumulation of transcripts encoding protein kinase homologs in greening pea seedlings. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88, 6951–6955.
- MA W., ALI R., BERKOWITZ G. A., 2006. Characterization of plant phenotypes associated with loss-of-function of AtCNGC1, a plant cyclic nucleotide-gated cation channel. *Plant Physiol. Biochem.* 44, 494–505.
- MA W., SMIGEL A., VERMA R., BERKOWITZ G. A., 2009. Cyclic nucleotide-gated channels and related signaling components in plant innate immunity. *Plant Signal. Behav.* 4, 277–282.
- MARTINEZ-ATENZA J., VAN INGELGEM C., ROEF L., MAATHUIS F. J. M., 2007. Plant cyclic nucleotide signaling. *Plant Signal. Behav.* 2, 540–543.
- MÄSER P., THOMINE S., SCHROEDER J. I., WARD J. M., HIRSCHI K., SZE H., 2001. Phylogenetic relationships within cation transporter families of *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 126, 1646–1667.
- MEIER S., RUZVIDZO O., MORSE M., DONALDSON L., KWEZI L., GEHRING C., 2010. The *Arabidopsis* wall associated kinase-like 10 gene encodes a functional guanylyl cyclase and is co-expressed with pathogen defense related genes. *PLoS ONE* 5, e8904.
- MOUTINHO A., HUSSEY P. J., TREWAVAS A. J., MALHÓ R., 2001. cAMP acts as a second messenger in pollen tube growth and reorientation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98, 10481–10486.
- NEWTON R. P., SMITH C. J., 2004. Cyclic nucleotides. *Phytochemistry* 65, 2423–2437.
- PILOT G., PRATELLI R., GAYMARD F., MEYER Y., SENTENAC H., 2003. Five-group distribution of the shaker-like K^{+} channel family in higher plants. *J. Mol. Evol.* 56, 418–434.
- POLYA G. M., CHUNG R., MENTING J., 1991. Resolution of a higher plant protein kinase similar to the catalytic subunit of cyclic AMP-dependent protein kinase. *Plant Sci.* 79, 37–45.
- RALL T. W., SUTHERLAND E. W., BERTHET J., 1957. The relationship of epinephrine and glucagon to liver phosphorylase. IV. Effect of epinephrine and glucagon on the reactivation of phosphorylase in liver homogenates. *J. Biol. Chem.* 224, 463–475.
- REHMANN H., WITTINGHOFFER A., BOS J. L., 2007. Capturing cyclic nucleotides in action: snapshots from crystallographic studies. *Natl. Rev.* 8, 63–73.
- SCHUURINK R. C., SHARTZER S. F., FATH A., JONES R. L., 1998. Characterization of a calmodulin-binding transporter from the plasma membrane of barley aleurone. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 95, 1944–1949.
- SHERMAN T., FROMM H., 2009. Physiological roles of cyclic nucleotide-gated channels in plants. [W:] *Signaling in plants*. BALUSKE F., MANCUSO S. (red.). Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, 91–107.
- SUNKAR R., KAPLAN B., BOUCHÉ N., ARAZI T., DOLEV D., TALKE I. N., MAATHUIS F. J. M., SANDERS D., BOUCHEZ D., FROMM H., 2000. Expression of a truncated tobacco NtCBP4 channel in transgenic plants and disruption of the homologous *Arabidopsis* CNGC1 gene confer Pb^{2+} tolerance. *Plant J.* 24, 533–542.
- SZALATY M., 2004. Udział cGMP w szlakach transdukcji sygnałów w komórkach roślinnych. *Post. Biol. Kom.* 30, 31–46.
- SZMIDT-JAWORSKA A., 2011. Roślinne cyklazy nukleotydów purynowych. *Post. Biochem.* 56, 409–417.
- SZMIDT-JAWORSKA A., JAWORSKI K., TRETYN A., KOPCEWICZ J., 2003. Biochemical evidence for a cGMP-regulated protein kinase in *Pharbitis nil*. *Phytochem.* 63, 635–642.
- SZMIDT-JAWORSKA A., JAWORSKI K., KOPCEWICZ J., 2007. Cykliczne nukleotydy u roślin wyższych. *Post. Biol. Kom.* 34, 49–67.
- SZMIDT-JAWORSKA A., JAWORSKI K., KOPCEWICZ J., 2009. Cyclic GMP stimulates induction of *Pharbitis nil* via its influence on cGMP-regulated protein kinase. *Plant Growth Regul.* 57, 115–126.
- URQUHART W., GUNAWARDENA A. H. L. A. N., MOEDER W., ALI R., BERKOWITZ G. A., YOSHIOKA K., 2007. The chimeric cyclic nucleotide-gated ion channel ATCNGC11/12 constitutively induces programmed cell death in a Ca^{2+} dependent manner. *Plant Mol. Biol.* 65, 747–761.
- YOSHIOKA K., KACHROO P., TSUI F., SHARMA S. B., SHAH J., KLESSIG D. F., 2001. Environmentally sensitive, SA-dependent defense responses in the cpr22 mutant of *Arabidopsis*. *Plant J.* 26, 447–459.
- YOSHIOKA K., MOEDER W., KANG H. G., KACHROO P., MASMOUDI K., BERKOWITZ G., KLESSIG D. F., 2006. The chimeric *Arabidopsis* cyclic nucleotide-gated ion channel 11/12 activates multiple pathogen resistance responses. *Plant Cell* 18, 747–763.
- YUEN C. Y. L., CHRISTOPHER D. A., 2010. The role of cyclic nucleotide-gated channels in cation nutrition and abiotic stress. [W:] *Signaling in plants*. DEMIDCHIK V., MAATHUIS F. (red.). Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, 137–159.
- ZAGOTTA W. N., SIEGELBAUM S. A., 1996. Structure and function of cyclic nucleotide-gated channels. *Annu. Rev. Neurosci.* 19, 235–263.