

KALMODULINA I BIAŁKA Z NIĄ SPOKREWNIONE U ROŚLIN*

CALMODULIN AND CALMODULIN-RELATED PROTEINS IN PLANTS

Krzysztof JAWORSKI, Brygida ŚWIEŻAWSKA,
Adriana SZMIDT-JAWORSKA

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

Streszczenie: Wapń jest wszechobecnym, kluczowym przekaźnikiem, odgrywającym istotną i uniwersalną rolę w sygnalizacji komórkowej. Wykazano, że kation ten działa, jako wewnątrzkomórkowy regulator w wielu aspektach wzrostu i rozwoju roślin, a także odpowiedzi na stres. Pod wpływem bodźców generowane są czaso-przestrzenne fale wapniowe o charakterystycznej częstotliwości i amplitudzie drgań dla działającego bodźca. Takie specyficzne wzrosty stężenia jonów Ca^{2+} w cytozolu zwane „sygnaturą Ca^{2+} ” są odbierane, interpretowane i przenoszone na elementy efektorowe przez specjalne rodzaje białek sensorowych, takich jak: kalmodulina (CaM), białka podobne do kalcyneuryny B (CBL) czy kinazy zależne od wapnia (CDPK) zawierające strukturalne motywy wiążące jony Ca^{2+} zwane motywami dłoni EF. Kalmodulina należy do głównej rodziny wapniowych białek sensorowych, które odgrywają kluczową rolę w komórkowej kaskadzie sygnałowej. Nie ma ona aktywności katalitycznej, ale wiążąc Ca^{2+} ulega konformacyjnym zmianom, przez co jest w stanie aktywować lub modulować wiele białek efektorowych. CaM jest białkiem występującym u wszystkich eukariontów, a sygnalizację z udziałem Ca^{2+} /CaM cechuje pewne podobieństwo. Jednakże, pod kilkoma względami zarówno kalmodulina, jak i jej białka efektorowe wykazują cechy charakterystyczne wyłącznie dla roślin. Podczas gdy drożdże mają tylko pojedynczy gen CaM, zaś typowe genomy zwierzęce zawierają kilka genów kalmodulinowych, to roślinne genomy charakteryzują się obecnością rodziny genów CaM kodujących identyczne białka kalmoduliny lub izoformy o wysokim stopniu podobieństwa. Dodatkowo, rośliny dysponują szczególnym zestawem licznych białek podobnych do kalmoduliny (CML). Pomimo że białka CML wykazują znaczne różnice strukturalne w stosunku do typowej CaM, mają jednak analogiczne domeny EF i co najmniej 15-procentowe podobieństwo. Zarówno kalmodulina, jak i białka CML oddziałują z białkami zawierającymi domeny wiążące CaM. Dotychczas zostało poznanych ponad 80 takich białek. Określono ich funkcje fizjologiczne, a także uczestnictwo w różnorodnych aspektach życia komórki. Przedstawiony artykuł podsumowuje aktualny stan wiedzy dotyczącej udziału białek CaM i CML w procesach rozwojowych i adaptacji roślin do warunków środowiska.

Słowa kluczowe: jony wapnia, kalmodulina, białka kalmodulino-podobne.

*Praca powstała podczas realizacji projektu badawczego nr N N310 141435 finansowanego przez Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego.

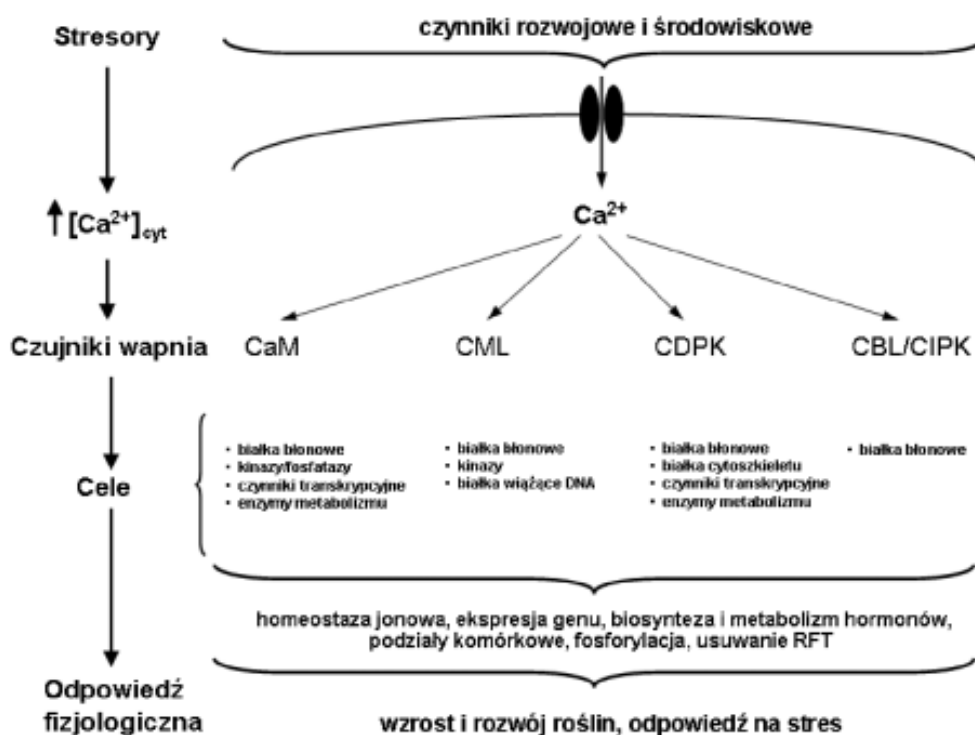
Summary: Calcium is an ubiquitous, crucial second messenger, that plays an essential and versatile role in cellular signaling. It has been shown to act as an intracellular regulator in many aspects of plant growth, development and stress responses. Many distinct signals induce spatial and temporal Ca^{2+} spikes as well as the frequency and amplitude of Ca^{2+} oscillations. Such stimulus-specific elevations in cytosolic Ca^{2+} ions concentration called ' Ca^{2+} signatures' are sensed, interpreted, and transduced to downstream elements by several types of Ca^{2+} sensor proteins such as calmodulins (CaMs), calcineurin B-like proteins (CBLs) or calcium - dependent protein kinases (CDPKs). All of them contain high-affinity Ca^{2+} -binding sites, called the 'EF-hand' motif. The calmodulin family is a major class of calcium sensor proteins, which play a crucial role in cellular signaling cascades. It has no catalytic activity of its own but upon binding Ca^{2+} undergoes conformational changes and complex Ca^{2+} /CaM activates or modulates numerous target proteins. CaM is one of the most conserved proteins in all eukaryotes and there are some similarities in Ca^{2+} /calmodulin-mediated signaling. However, several features of CaM and its downstream effector proteins are unique to plants. While yeasts have only a single CaM gene, and animal genomes typically contain only a few CaM genes, plant ones have multiple CaM genes that encode identical CaMs or highly similar isoforms within a single plant species. A particular set of CaM isoforms and CaM-like proteins (CMLs) are present in plant cells. The family of CaM-related proteins (CMLs), exhibiting significant differences with the typical CaM, was identified as encoding proteins that contain CaM-like EF hand structures and share at least 15% homology with CaM in amino acid residues. Diverse CaM isoforms and CMLs interact with downstream targets containing CaM-binding domains. To date, more than 80 different types of CaM-binding proteins have been identified and their physiological functions are implicated in diverse aspects of cellular processes. This review summarizes recent views on the role of CaM and CML proteins in plant development and adaptation to environmental stimuli.

Key words: calcium ions, calmodulin, CaM-like proteins

WSTĘP

Od wielu lat dyskutowanym problemem jest zdolność komórek do odbioru i właściwej odpowiedzi fizjologicznej na licznie działające czynniki wewnętrzne (rozwojowe) i czynniki zewnętrzne (środowiskowe). Rozchodzenie i wzmacnianie sygnałów angażuje szybkie zmiany poziomu wewnątrzkomórkowych wtórnych przekaźników informacji, takich jak: jony wapnia (Ca^{2+}), cykliczne nukleotydy (cAMP i cGMP) i fosfatydyloinozytole [8]. Te wtórne przekaźniki przenoszą następnie informację na szereg efektorów, takich jak: enzymy, białka cytoszkieletu czy czynniki transkrypcyjne, które wpływają na aktywność metaboliczną czy procesy rozwojowe (ryc. 1).

W komórkach eukariotycznych Ca^{2+} jest uniwersalnym wtórnym przekaźnikiem, elementem, uruchamiającym fizjologiczne zmiany w odpowiedzi na egzogenne i endogenne czynniki stymulujące. Wysokie stężenie wapnia jest toksyczne i zaburza procesy komórkowe. Stąd w niestymulowanych komórkach stężenie jonów Ca^{2+} jest utrzymywane na niskim poziomie (100–200 nM) poprzez ich usuwanie do apoplastu czy organelli komórkowych, takich jak wakuola czy endoplazmatyczne retikulum (1 mM) [8, 43]. Bodźce, takie jak: hormony, światło, grawitacja, abiotyczne czynniki stresowe, a także oddziaływania z organizmami symbiotycznymi i patogenami, wykorzystują jony wapnia w charakterze pośrednika wewnątrzkomórkowego i wszystkie one powodują chwilowy wzrost stężenia Ca^{2+} w cytozolu. Te pulsy Ca^{2+} odgrywają rolę sygnałów komórkowych i wpływają na zmiany funkcjonowania



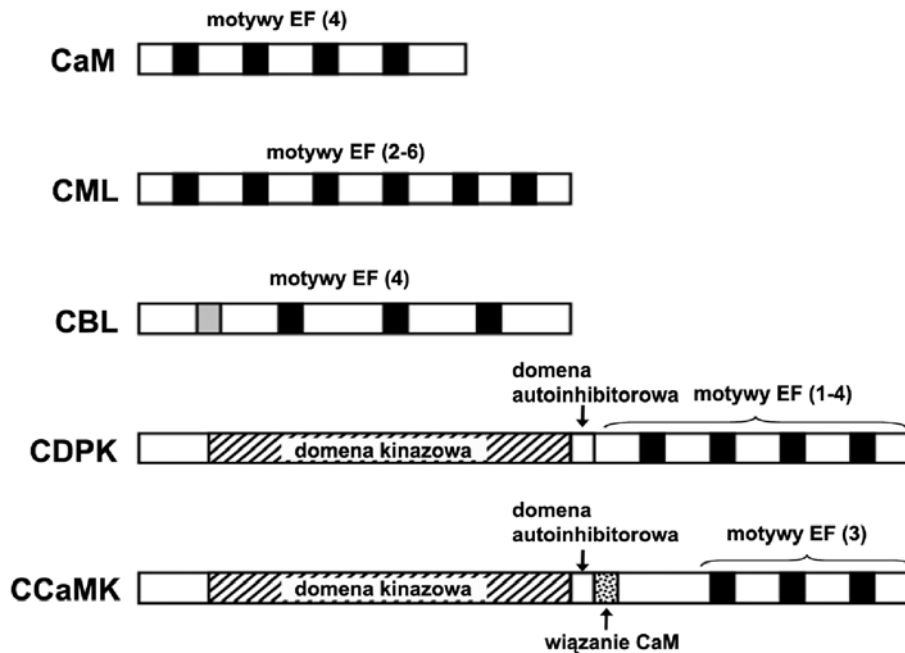
RYCINA 1. Sygnalizacja wapniowa z udziałem białek wiążących wapń. W odpowiedzi na czynniki stymulujące (rozwojowe i środowiskowe) następuje czasowy wzrost stężenia Ca^{2+} w cytoplazmie i organellach komórkowych. Czaso-przestrzenne zmiany wapniowe (sygnatura wapnia) są odczytywane przez szereg czujników wapniowych, takich jak: CaM, CML, CDPK czy CLB/CIPK. Oddziałują one następnie z białkami lub DNA modulując ich aktywność biochemiczną czy transkrypcyjną (na podstawie [8, 43], zmodyfikowane)

FIGURE 1. Calcium signaling involving calcium-binding proteins. Responses to stimulating factors (developmental and environmental), are followed by a temporary increase in Ca^{2+} concentration in the cytoplasm and cell organelles. These spatio-temporal changes in calcium concentration (calcium signature) are then decoded by a suite of Ca^{2+} sensor proteins such as CaM, CML, CDPK or CLB/CIPK. Then they interact with proteins or DNA and modulate their biochemical and transcriptional activity (based on [8, 43], modified)

komórki. Wykonując pomiary stężenia wapnia *in vivo* wykazano, że wzór takiego pulsu, nazywanego sygnaturą wapniową, jest charakterystyczny dla danego bodźca. Wzorce sygnatur różnią się amplitudą, czasem trwania, lokalizacją i częstotliwością oscylacji wapniowych [26, 43]. Dzięki tak zakodowanej informacji możliwy jest jej precyzyjny odbiór przez kolejne elementy w szlaku transdukcji sygnału, co powoduje właściwą odpowiedź komórkową.

Komórki angażują szereg białek wiążących wapń CBP (ang. *Ca²⁺-Binding Protein*), funkcjonujących jako białka sensorowe, zdolnych do odczytywania wiadomości zapisanej w sygnaturze wapnia i zamiany jej na odpowiedź biochemiczną. Białka te po związaniu tego kationu ulegają konformacyjnym zmianom, co umożliwia im interakcję z elementami efektorowymi [17]. Większość z tych białek ma motyw dłoni EF, którego struktura pozwala na wiązanie z wysokim powinow-

wactwem pojedynczego jonu Ca^{2+} . Na podstawie liczby i organizacji motywów dłoni EF oraz obecności innych funkcjonalnych domen białka zdolne do wiązania jonów wapniowych zostały podzielone na kilka klas. Większość naszej wiedzy o białkach z motywem dłoni EF dotyczy kalmoduliny (CaM) i białek podobnych do kalmoduliny – CMLs (ang. *CalModulin Like-proteins*), białek podobnych do kalcyneuryny B – CBLs (ang. *Calcineurin B-Like proteins*) oraz kinaz białkowych zależnych od wapnia – CDPKs (ang. *Calcium-Dependent Protein Kinases*). Białka rodziny CDPK są klasą roślinnych kinaz białkowych, które zawierają domenę kinazową oraz domenę wiążącą wapń z 4 motywami dłoni EF, a ich aktywność jest stymulowana przez mikromolarne stężenie Ca^{2+} . Innym przykładem enzymów, których aktywność jest regulowana przez jony Ca^{2+} , są kinazy zależne od $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ – CCaMK, które w C-końcowej domenie regulatorowej mają 3 motywy dłoni EF, a aktywacja enzymu zachodzi pośrednio przez zawiązanie kompleksu $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$. Obie klasy kinaz są to białka odpowiadające (ang. *sensor responders*), będące zarówno receptorami, jak i przekaźnikami sygnału wapniowego [20]. Pozostałe białka wiążące wapń, wliczając w to CaM, CML i CBL, nie mają właściwości katalitycznych i funkcjonują jako czujniki przekaźnikowe (ang. *sensor relay*), działające poprzez zależne od wapnia interakcje z białkami efektorowymi [8, 20] (ryc. 2).



RYCINA 2. Domenowa budowa głównych klas czujników Ca^{2+} u roślin. Czarne kwadraty stanowią miejsca wiązania wapnia (EF); szary kwadrat oznacza domenę EF o niekonwencjonalnej budowie (na podstawie [8], zmodyfikowane)

FIGURE 2. Domain organization of the main classes of Ca^{2+} sensors in plants. Black boxes represent calcium binding sites (EF), gray box means EF domain of the unconventional building (based on [8], modified)

Należy nadmienić, że podczas gdy CaM jest białkiem uniwersalnym, którego obecność została odkryta u wszystkich eukariontów, to CML, CDPK i CBL występują wyłącznie u roślin i niektórych pierwotniaków.

ROŚLINNA KALMODULINA I BIAŁKA KALMODULINO-PODOBNE

Kalmodulina (CaM), małe kwaśne białko zawierające cztery motywy dłoni EF jest jednym z najlepiej scharakteryzowanych wapniowych białek sensorowych [8, 43]. Wiązanie jonów Ca^{2+} przez CaM indukuje konformacyjne zmiany tego białka, w następstwie których wyeksponowane zostają ujemnie naładowane powierzchnie hydrofobowe zdolne do oddziaływania z białkami docelowymi. Pomimo że kalmodulina nie ma właściwości enzymatycznych, to kompleks Ca^{2+} /CaM kontroluje różnorodne procesy komórkowe regulując aktywność licznych białek.

Do dzisiaj zidentyfikowano i określono fizjologiczną funkcję ponad 50 różnych białek wiążących kalmodulinę. Ich udział stwierdzono w różnych procesach komórkowych obejmujących regulację metabolizmu, funkcjonowanie cytoszkieletu, funkcjonowanie szlaków sygnałowych fitohormonów, transport jonów, fosforylację i defosforylację białek, metabolizm fosfolipidów czy regulację transkrypcji [3, 25].

Jedną z uderzających różnic pomiędzy sygnalizacją wapniową u roślin i zwierząt jest liczba genów kodujących CaM, izoformy CaM i białka kalmodulino-podobne. W przypadku grzybów opisano pojedynczy gen kodujący CaM u *Saccharomyces*, zaś w genomie kręgowców istnieje kilka takich genów (np. 3 geny *CaM* u człowieka). Genomy roślinne natomiast zawierają szereg genów kodujących identyczne kalmoduliny, wiele izoform CaM o wysokim stopniu podobieństwa, jak również białka podobne do kalmoduliny (geny *CML*), wykazujące znaczne rozbieżności strukturalne w odniesieniu do typowych CaM [43].

Analiza genomu *Arabidopsis thaliana* wykazała obecność ok. 250 genów kodujących białka mające przynajmniej jeden motyw dłoni EF. Siedem z nich (*AtCaM1* do 7) zostało zidentyfikowanych jako geny kodujące 4 izoformy białka CaM, których sekwencje aminokwasowe wykazują 97–99% homologię. Nazwane one zostały „typowymi CaM” ze względu na ich wysokie podobieństwo (89%) do białek kalmoduliny obecnych u kręgowców czy owadów [38]. Jednocześnie zidentyfikowano szereg białek spokrewnionych z CaM (CML). W genomie *Arabidopsis thaliana* zidentyfikowano 50 genów kodujących potencjalne białka CML, podczas gdy u ryżu jest ich 26. W przeciwieństwie do kalmoduliny białka CML, o długości od 83 do 330 reszt aminokwasowych, mają od 2 do 6 motywów dłoni EF, nie mają żadnych innych znanych domen funkcjonalnych oraz charakteryzują się przynajmniej 15% podobieństwem do typowej CaM (*AtCaM2*) [2, 38]. Badania zmierzające do poznania genomów roślinnych potwierdziły różnorodność CaM i CML także u innych gatunków roślin, np. luceny siewnej (*Medicago sativa*) i soi (*Glycine max*) [43].

Analizy sekwencji białkowych CML wskazały różnice aminokwasowe w obrębie motywu dłoni EF, które mogą wpływać na koordynację jonów wapnia i w

konsekwencji modyfikować powinowactwo białka do Ca^{2+} . Pozwala to przypuszczalnie białkom CML różnie reagować na sygnał wapniowy. Jednakże dowody doświadczalne, potwierdzające tą hipotezę, zostały przedstawione tylko dla ograniczonej liczby białek [8, 43]. Ponadto, różnice pomiędzy CML nie ograniczają się jedynie do motywów dłoni EF. Wykazano, że różnice w aktywności NtCBK2, kinazy białkowej wiążącej CaM z tytoniu, były spowodowane przyłączeniem różnych izoform kalmoduliny. Trzy izoformy CaM (NtCaM1, NtCaM3 i NtCaM13) wiążące się z NtCBK2, mają inne stałe dysocjacji. NtCBK2 wykazuje najwyższe powinowactwo do NtCaM3 i NtCaM13. W przypadku kinazy NAD (NADK) z *Arabidopsis* zaobserwowano natomiast różną aktywację przez CaM i białka CML. NADK była w pełni aktywowana jedynie przez typową CaM w obecności jonów wapniowych, natomiast w różnym stopniu przez białka CML (AtCML2-3-10-18-39-42-43-47). Pomimo tego, iż AtCML10 wykazuje jedynie 64% podobieństwa do typowej CaM, to jednak właśnie ta izoforma jest w stanie w pełni zaktywować naturalną NADK w warunkach *in vitro*, czego przyczyną może być występowanie na końcu C dodatkowych 42 aminokwasów. Pozostałe z testowanych białek CML aktywują NADK niewiele powyżej poziomu podstawowego. Dane te pokazują, że CaM i CML różnią się zdolnością do wiązania i aktywacji regulowanych przez CaM enzymów w warunkach *in vitro* [49].

Tak duża różnorodność białek CaM i CML w określonych obszarach komórek czy poszczególnych tkankach może wskazywać na ich wysoką specjalizację oraz ich specyficzne rozmieszczenie. Największa pula CaM jest w cytozolu, lecz jej obecność potwierdzono także w jądrze, peroksysomach i w macierzy zewnątrzkomórkowej [8]. Izofорма AtCML18 z *Arabidopsis thaliana*, została zidentyfikowana jako białko wakuolarnie zdolne do interakcji z C końcowym obszarem białka AtNHX1, wakuolarnym wymiennikiem Na^+/H^+ [54]. Dwie izoformy CML, PhCaM53 z petunii oraz OsCaM61 z ryżu, mają dodatkowe aminokwasy na C końcu, które są wymagane do skutecznej prenylacji i subkomórkowej lokalizacji białek [31]. Prenylowana PhCaM53 związana jest z plazmolemmą, podczas gdy nieprenylowana forma jest zlokalizowana w jądrze. Co ważniejsze, ekspresja PhCaM53 u roślin typu dzikiego lub mutanta mającego białko nieprenylowane powoduje wyraźne zmiany morfologiczne [43].

FUNKCJONALNA RÓŻNORODNOŚĆ BIAŁEK WIĄŻĄCYCH KALMODULINĘ

Białka regulowane przez CaM zostały poznane dzięki zastosowaniu techniki interakcji białko-białko. Do roślinnych białek wiążących CaM – CaMBP (ang. *CaM Binding Proteins*), których do chwili obecnej zidentyfikowano około 80, zaliczamy kilka enzymów, białka związane z cytoszkieletem, przekaźniki jonowe, białka opiekuńcze, czynniki transkrypcyjne, kinazy białkowe, fosfatazy oraz białka o nieznanym dotychczas funkcjach. Typowe izoformy CaM są obecne u wszystkich

eukariontów, stąd nie jest zaskoczeniem, że około jedna trzecia białek CaMBP jest homologiczna pomiędzy roślinami a innymi organizmami. Pozostałą część stanowią białka homologiczne występujące zarówno u roślin, jak i u innych organizmów, ale regulacja przez CaM znana jest tylko u roślin oraz białka specyficzne wyłącznie dla roślin [3, 43]. Pomimo istnienia dużej grupy CaMBP, ciągle identyfikowane są nowe białka docelowe dla CaM. Należy także zaznaczyć, że niektóre białka CaMBP, takie jak wakuolarny wymiennik Na^+/H^+ AtNHX1 oraz aktywator transkrypcyjny AtMYB2 z *Arabidopsis* oddziałują z białkami CML [54, 56]. Tak szeroka gama białek aktywowanych przez kalmodulinę sugeruje, że szlaki $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ występujące u roślin są wyraźnie bardziej zróżnicowane niż u innych organizmów.

Dotychczas poszukiwanie roślinnych białek CaMBP prowadzono stosując głównie typowe izoformy CaM, nie używając białek CML, co ograniczyło pole poszukiwań. Obecnie w następstwie poznawania genomów roślinnych, do oszacowania kompletnego zbioru białek wiążących CaM wykorzystuje się sekwencje genomowe i cDNA kodujące potencjalne miejsca białkowych domen wiążących CaM – CaMBD (ang. *CaM-Binding Domain*). Kalmodulina wiąże się do wielu białek poprzez mały obszar składający się z reszt zasadowych i hydrofobowych tworzących zasadową helisę. Kompilacja sekwencji białek docelowych CaM doprowadziła do określenia kilku miejsc CaMBD na podstawie rozmieszczenia reszt hydrofobowych. Sekwencje te należą do tak zwanych motywów 1–10 i 1–14, znanych jako miejsca wiążące CaM w obecności jonów wapniowych. Opisano także CaMBD, z motywami nazywanymi IQ, które specyficznie wiążą CaM przy braku jonów wapniowych, a oddysocjują przy wzroście poziomu cytozolowego Ca^{2+} . Wydaje się, że tylko na podstawie badań *in silico* nie jest możliwe znalezienie wszystkich białek roślinnych będącym celem dla CaM i CML. Rozwiązanie może przynieść rozwój nowych technik monitoringu białkowego, takich jak chipy białkowe zawierające proteom roślinny lub techniki odczytujące mRNA użyte do zidentyfikowania ludzkich CaMBP [43, 45].

FUNKCJE CAM I CML

Badania molekularne, genetyczne oraz biochemiczne dostarczają dowodów na udział CaM, CML oraz ich białek docelowych w kontroli procesów wzrostu i rozwoju rośliny oraz indukowanych biotycznymi i abiotycznymi czynnikami stresowymi szlakach transdukcji sygnału [8, 38, 43].

Procesy rozwojowe

Jednym z procesów rozwojowych, w których udział CaM został dowiedziony, jest cykl komórkowy. Białko Kinezyrna-14, nazywane również KCBP (ang. *Kinesin-like Calmodulin Binding Protein*), jest jednym z białek oddziałujących z kalmoduliną, które uczestniczy w kontroli podziałów komórkowych, kształtowaniu komórki i prawidłowej morfogenezie włosków [44, 51]. Zahamowanie wiązania CaM do białka KCBP powoduje, że komórki wchodzą zbyt wcześnie w fazę podziałową. Białko z rodziny

CML (CML42) oddziałuje natomiast z białkiem KIC (ang. *Kinesin-Interacting Ca²⁺-binding protein*), mającym motyw dłoni EF, które również negatywnie reguluje białko KCBP. Włoski roślin z nieczynnym genem *CML42* charakteryzują się inną budową morfologiczną [10]. Inny członek tej rodziny, białko CLM20 poprzez oddziaływanie z białkiem TONNEAU1 wpływa na organizację mikrotubul. Rośliny transgeniczne *ton1* typu *knock-out* wykazują odmienny fenotyp rozwojowy spowodowany zaburzeniami organizacji mikrotubul, które wpływają na losowy podział komórek [1].

Dobrze udokumentowany jest także udział białek wiążących CaM w procesie rozmnażania. Odkryto, że kinaza białkowa wiążąca Ca²⁺/CaM z tytoniu (*NtCBK1*) funkcjonuje jako negatywny regulator kwitnienia. Gen *NtCBK1* podlega ekspresji w merystemie wierzchołkowym pędu w czasie wzrostu wegetatywnego, a jego ekspresja spada drastycznie po przekształceniu w merystem kwiatowy. Rośliny tytoniu z nadekspresją genu *NtCBK1* mają podwyższony poziom transkrypty *NtCBK1* w merystemie wierzchołkowym pędu, co w efekcie opóźnia kwitnienie [19]. Badania izoform CaM z tytoniu wykazały, że kilka z nich stymuluje aktywność kinazy *NtCBK1 in vitro*. Jednakże znaczenie modulacji aktywności kinazowej przez CaM podczas przejścia ze wzrostu wegetatywnego do generatywnego wciąż pozostaje nieznanne.

Ustalono, że w proces kwitnienia *Arabidopsis* zaangażowane są dwa inne geny z rodziny CML (*CML24* i *CML23*). U mutantów pozbawionych funkcjonalnych genów (*cml24* i *cml23cml24*) kwitnienie w warunkach dnia długiego jest opóźnione. Przeprowadzone analizy sugerują, że *CML23* i *CML24* uczestniczą w kierowanej przez tlenek azotu (NO) regulacji aktywności genu *FLC* (ang. *Flowering Locus C*), co prowadzić może do kwitnienia [9, 48].

Inną kinazą białkową wchodzącą w interakcję z CaM, jest receptor o właściwości kinaz – SRK (ang. *S-locus Receptor Kinase*), który uczestniczy w oddziaływaniu pyłek-słupek [26]. SRK jest zlokalizowany w plazmolemie komórek brodawkowych znamienia i pośredniczy w rozpoznaniu własnego pyłku poprzez przyłączenie się do małego peptydu obecnego w warstwie powlekającej pyłek. CaM w sposób zależny od jonów Ca²⁺ wchodzi w interakcję z domeną kinazową SRK. Ponieważ to oddziaływanie nie ma bezpośredniego wpływu na aktywność kinazową tego enzymu, w chwili obecnej nie wiadomo, jakie jest znaczenie powstawania kompleksu SRK-Ca²⁺/CaM.

Białka NPG1 i ACA9 z *Arabidopsis*, które uczestniczą w kiełkowaniu pyłku i rozwoju łagiewki, to kolejne peptydy docelowe dla CaM. Białko NPG1 (ang. *No Pollen Germination 1*) należy do specyficznych roślinnych białek wiążących CaM, natomiast ACA9 jest członkiem rodziny Ca²⁺-ATPaz aktywowanych przez Ca²⁺/CaM [8]. NPG1 uczestniczy w kontrolowaniu kiełkowania pyłku. Badania na mutantach *Arabidopsis* dowiodły, że pyłek niosący zmutowane allele *NPG1* nie jest zdolny do kiełkowania. Poza domeną wiążącą CaM, białko NPG1 zawiera 34 peptydowe powtórzenia (ang. *tetratricopeptide repeats*), biorące udział w interakcjach białko-białko. Zatem NPG1 prawdopodobnie wchodzi w interakcje z innymi białkami, których identyfikacja umożliwiłaby precyzowanie funkcji NPG1. Z kolei prowadzone badania zmierzające do poznania roli ACA9 wykazały, że delecja *ACA9* prowadziła do uzyskania półsterylnych ziaren pyłku. Ziarna te charakteryzowały się wysokim procentem nieudanych zapłodnień, pomimo że łagiewka pyłkowa osiągała woreczek zalążkowy. Odkrycie to sugeruje, że kontrola ilości

Ca²⁺ przez ACA9 będącej transporterem tych jonów jest niezbędna zarówno do wzrostu łagiewki pyłkowej, jak i zapłodnienia, potwierdzając jednocześnie wcześniejsze doniesienia wykazujące, że tworzenie gradientu Ca²⁺ na szczycie łagiewki pyłkowej jest ważne dla elongacji łagiewki i jej wzrostu kierunkowego [16]. Użycie antagonistów CaM powodowało nieprawidłowy kierunek wzrostu łagiewki pyłkowej. Tak więc, powyższe dowody pokazują, że białka ACA9 i NPG1 są elementami w sygnalizacji wapniowej w czasie rozwoju pyłku.

Obecna w kiełkującym ziarnie pyłku kalmodulina bierze także czynny udział w utrzymywaniu prawidłowego wzrostu łagiewki pyłkowej, regulując białka wiążące aktyne i wpływając tym samym na organizację cytoszkieletu aktynowego. Wykazano, że aktywność białka P-135-ABP – viliny z lili (*Lilium longiflorum*) ulega ujemnej regulacji w obecności Ca²⁺/CaM. Białko to nie było zdolne wiązać się do F-aktyny, hamując w ten sposób wzrost filamentów aktynowych w części podwierzchołkowej i bazalnej łagiewki pyłkowej. Dodatkowo, białko P-135-ABP odpowiedzialne jest także za proces fragmentacji filamentów aktynowych, który w rejonie wierzchołkowym łagiewki również podlegał zahamowaniu w obecności kompleksu Ca²⁺/CaM [55].

Odkryto także interakcje kalmoduliny z cytoplazmatycznymi domenami kinaz receptorowych, takich jak: RLK4, AtCaMRLK i CLV1, ale we wszystkich tych przypadkach rola tych oddziaływań pozostaje nieznana [43].

Kalmodulina może również funkcjonować jako regulator rozwoju poprzez interakcje z licznymi czynnikami transkrypcyjnymi (MYB, NAC i WRKY) [27, 41, 56] oraz może bezpośrednio oddziaływać z DNA regulując ekspresję genów, co promuje zależny od światła wzrost rośliny [28]. Przykładowo, AtCaM7 łączy się elementem Z-box LRE (ang. *Light-Responsive Element*) w promotorze genu *CAB*, a nadekspresja albo wyłączenie genu typu *knock-out AtCaM7* powoduje odpowiednio zwiększenie lub obniżenie poziomu transkrypcji genu *CAB1*.

Sygnalizacja hormonalna

Jak wynika z badań zarówno biochemicznych, jak i genetycznych, białka CaM/CML biorą udział w szlakach sygnałowych aktywowanych przez hormony. Białka SAUR (ang. *Small Auxin Up-regulated RNA*), odgrywające rolę we wzroście elongacyjnym komórki, oddziałują z jonami Ca²⁺ [23]. Sugeruje się, że geny *CML12* mogą funkcjonować w kierowanym przez auksyny ustalaniu polarności komórki. Białka te negatywnie regulują aktywności kinaz serynowo-treoninowych PINOID, które kontrolują polarny transport auksyn określając lokalizację białka PIN [8, 15].

Brasinosteroidy są kolejną klasą hormonów roślinnych odgrywających ważną rolę w procesach wzrostu i rozwoju. Odkryto, że CaM reguluje aktywność DWF1 (DWARF1) z *Arabidopsis*, katalazę podobną do cytochromu P450, uczestniczącą we wczesnym etapie biosyntezy brasinosteroidów. Mutant *Arabidopsis* nie przejawiający aktywności DWF1 charakteryzuje się karłowatym i bezpłodnym fenotypem. Fenotyp ten jest odpowiedzią na obniżony poziom brasinosteroidów, a przywrócenie normalnego fenotypu można osiągnąć poprzez dodanie egzogennych brasinosteroidów bądź stosując nadekspresję pełnej długości DWF1, lecz jedynie wtedy, gdy miejsce wiązania kalmoduliny w DWF1 jest nieuszkodzone. Świadczy to jedno-

znacznie o istotnej roli CaM w funkcjonowaniu DWF1 u roślin [12]. Ortologi DWF1 z innych roślin również zawierają podobne domeny wiążące CaM, co oznacza, że regulacja tych białek za pomocą $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ jest powszechna u roślin. Również u tytoniu w przypadku mutanta dekarboksylazy kwasu glutaminowego – GAD (ang. *Glutamic Acid Decarboxylase*) pozbawionego domeny wiązania kalmoduliny obserwowano karłowaty fenotyp. Powyższe dane wskazują jednoznacznie, jak ważną rolę odgrywają białka regulowane kalmoduliną w rozwoju rośliny [8].

Udział CaM/CML w stresie biotycznym

Sygnalizacja $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ odgrywa istotną rolę w odpowiedziach roślin na czynniki biotyczne, takie jak atak patogena czy symbioza roślin z mikroorganizmami [29]. Szybki wzrost poziomu wolnego, cytozolowego Ca^{2+} jest powszechną odpowiedzią na infekcję przez patogeny, a sygnał Ca^{2+} jest konieczny do aktywacji odpowiedzi obronnych, takich jak indukcja genów związanych z obroną oraz nadwrażliwością czy śmiercią komórki. Zidentyfikowane do chwili obecnej elementy obronnych szlaków sygnałowych zawierają różnorodne CaM, CML i białka wiążące CaM. Pośród wielu genów *CaM* i *CML*, w odpowiedzi na infekcję i elicytory patogenów, ekspresji w pierwszej kolejności podlegają *SCaM4* i *SCaM5* z soi oraz *AtCML9* z rzodkiewnika [38, 43].

Rola CaM w reakcjach obronnych została dobrze udokumentowana dzięki funkcjonalnym badaniom nad roślinami transgenicznymi. Wykazano, że konstytutywna ekspresja sojowych *SCaM4* i *SCaM5* w tytoniu oraz rzodkiewniku powoduje zarówno aktywację genów związanych z patogenezą, jak również wzmacnia odporność na szeroki zakres patogenów, podczas gdy dwie inne wysoce konserwatywne izoformy *SCaM1* i *SCaM2* nie wykazują tej właściwości. Pozwala to wysunąć wnioski, że istnieje wyraźna specjalizacja izoform CaM prowadząca do adekwatnej odpowiedzi na elicytory.

Udokumentowany został także udział kilku białek wiążących CaM w odpowiedzi obronnej. Wykazano, że *AtBAG6*, białko wiążące kalmodulinę, indukuje programowaną śmierć komórki. Liście *Arabidopsis* z nadekspresją *AtBAG6* wykazują rozwijające się zmiany martwicze [22].

Ponadto, mutacje w innych białkach wiążących CaM wywołują poważne modyfikacje w generowaniu reakcji obronnej w następstwie infekcji patogenu. Przykładem takiego białka są kanały bramkowane cyklicznymi nukleotydami – CNGC (ang. *Cyclic Nucleotide-Gated Channels*) zawierające zlokalizowaną w cytoplazmie C-końcową domenę wiążącą cykliczne nukleotydy oraz miejsce wiążące CaM [7]. Kanały te są przepuszczalne dla kationów jedno- i dwuwartościowych, w tym dla Ca^{2+} , a ich aktywacja przez cykliczne nukleotydy jest blokowana przez kompleks $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$. Rośliny mające mutacje w CNGC (np. *Arabidopsis CNGC2*, *11* i *12*) cechuje zmieniona odpowiedź na infekcję oraz konstytutywna aktywacja mechanizmów obronnych. [7].

Jednym z etapów infekcji jest penetracja komórek zaatakowanego organizmu, która w pewnych przypadkach prowadzi do aktywacji specjalnego białka gospodarza. Białko MLO – modulator obrony przed patogenem (ang. *MiLdew-resistance gene O*) jest integralnym białkiem błony plazmatycznej, które wiąże CaM na cytoplazmatycznym ognie karboksylowym. Wykazano, że mutacje upośledzające wiązanie CaM z MLO u

jęczmienia, redukują aktywność tych białek w roślinach, co wskazuje na ważną rolę CaM w funkcjonowaniu MLO. Komórki epidermy liścia *Arabidopsis* i jęczmienia, które nie mają funkcjonalnych białek MLO, są odporne na penetrację przez grzyby pleśniowe, co świadczy o istotnej roli tych białek w podatności rośliny na choroby [40].

Liczne dowody potwierdzają także udział niektórych CML w odpowiedzi na atak patogenu [5, 50]. Jedno z białek CML z tytoniu – rgsCaM (ang. *regulator of gene silencing CaM*) oddziałuje z TEV (ang. *Tabacco Etch Virus*) i HCPro (ang. *TEV Helper Component Protease*). Indukcja ekspresji rgsCaM zachodzi w odpowiedzi na infekcję TEV, natomiast HCPro służy do posttranskrypcyjnego wyciszania genów podczas infekcji wirusowej. Nadekspresja rgsCaM w roślinach transgenicznych powoduje brak wyciszania genów indukowanych atakiem wirusa – VIGS (ang. *Virus-Induced Gene Silencing*), sugerując tym samym rolę rgsCaM jako wewnętrznego supresora VIGS [8]. U pomidora w wyniku działania patogena obserwowana jest ekspresja jednego z genów CML, (*APR134*), a jego wyciszenie prowadzi do braku reakcji [5]. Natomiast nadekspresja genu *AtCML34* z *Arabidopsis*, będącego ortologiem *APR134*, powoduje przyspieszenie reakcji nadwrażliwości, będącej następstwem infekcji patogena avirulentnego. Sugeruje to ochronną rolę tych przedstawicieli CML u roślin.

Udział w reakcjach odpowiedzi na patogeny stwierdzono także w przypadku innych genów rodziny CML, takich jak: *Hra32* z fasoli, *ACRE-31* z tytoniu czy *APR-31* z pomidora [43].

Udział CaM/CML w symbiozie bakterii z korzeniami roślin motylkowych

Aby zapewnić dostawę azotu niezbędnego do wzrostu rośliny, wiele roślin motylkowych wchodzi w symbiotyczne interakcje z bakteriami, które potrafią zredukować azot do jonów amonowych. Powstanie symbiozy pomiędzy rośliną motylkową a bakterią wymaga pojawienia się czynnika sygnalizacyjnego Nod, produkowanego przez bakterię i rozpoznawanego przez komórki włośnikowe gospodarza. Na wczesnym etapie rozpoznawania ważną rolę, jako przekaźnika w transdukcji sygnału czynnika Nod, ogrywają jony Ca^{2+} i białka wiążące ten kation. CaM jest centralnym regulatorem symbiozy u wielu gatunków roślin [8]. Kinazy CCaMK (ang. *Calcium/CalModulin protein Kinase*) zostały zidentyfikowane u kilku gatunków roślin, takich jak: komonica (*Lotus Japonicus*) (LjCCaMK), lucerna (*Medicago trunculata*) (MtDMI3), ryż (*Oryza sativa*) (OsDMI3) i jantar (*Sesbania rostrata*) (StCCaMK) [8]. Ich aktywacja jest niezbędna w tworzeniu zależności symbiotycznych, gdyż wpływa zarówno na organizację brodawki korzeniowej, jak i kolonizację korzeni przez bakterie. Zaburzenie aktywności kinazy LjCCaMK prowadzi do spontanicznego tworzenia brodawek, podczas gdy pojawienie się niefunkcjonalnego białka MtDMI3, całkowicie hamuje ich rozwój [47]. Wykazano także [4], iż mutacja typu *knock-down* CCaMK u *Sesbania rostrata* hamuje powstawanie brodawek, ale nie wpływa na kolonizację korzenia przez *Rhizobium*. Także mutanty *dmi3* z lucerny i ryżu tracą zdolność do tworzenia właściwych symbioz, co wskazuje, że penetracja przez bakterie nie jest zależna od sygnalizacji wapniowej z udziałem CCaMK. Interesujące jest, że ortolog *OsDMI3* z ryżu jest zdolny przywrócić formowanie brodawek u mutantu lucerny, co dowodzi, że CCaMK

zachowuje swoją funkcjonalność pomiędzy gatunkami [18]. Ortologi *DMI3/CCaMK* zostały znalezione u kukurydzy, sorgo czy jęczmienia, ale brak ich u rzodkiewnika. Nie jest to zaskoczeniem, ponieważ ani rzodkiewnik, ani inne gatunki z rodziny kapustnych nie tworzą brodawek korzeniowych, co sugeruje, że określone kinazy CCaMK mogą wykazywać specyficzność funkcjonalną i brać udział w tworzeniu symbiozy typu mikroorganizm-roślina [8, 39].

Analizy, które doprowadziły do stwierdzenia jądrowej lokalizacji *dmi3*, pozwalają także przypuszczać, że endogennymi substratami tej klasy kinaz białkowych mogą być czynniki transkrypcyjne pośredniczące w ekspresji genów indukowanych czynnikiem Nod. Ostatnie badania potwierdziły tę hipotezę [21,46].

W chwili obecnej istnieje niewiele danych wskazujących na udział białek CML w symbiozie. Kilka genów rodziny CML z *Medicago* i *Lotus* podlega ekspresji podczas procesu powstawania brodawek [32]. Wykazano, że białka te mają na N-końcu odcinki odpowiedzialne za ich przekierowywanie z cytoplazmy do obszarów kontaktu komórek roślinnych z bakterią.

Udział CaM/CML w stresie abiotycznym

Poza udziałem w odpowiedzi na stres biotyczny, sygnalizacja wapniowa odgrywa ważną rolę w odpowiedzi na szeroką gamę stresorów abiotycznych, takich jak: wysokie stężenie soli, chłód, szok cieplny i osmotyczny oraz zranienie. U wielu roślin stwierdzono indukcję genów *CaM* oraz *CML* w odpowiedzi na te czynniki [43].

W ciągu kilku ostatnich lat poczyniono także wyraźny postęp w poznaniu roli białek CaM, CML oraz ich białek docelowych podczas stresu osmotycznego i solnego. Przykładowo, czynnik transkrypcyjny (*AtMYB2*), który reguluje ekspresję genów odpowiedzi na stres solny i odwodnienie został zidentyfikowany jako białko wiążące CaM. *ScaM4* – indukowana zasoleniem izoforma CaM z soi podnosi efektywność wiązania DNA do *AtMYB2*, natomiast w przypadku *ScaM1* obserwowano efekt odwrotny. Nie wiadomo jednak, dlaczego wiązanie tych izoform CaM do *AtMYB2* wpływa na tak odmienną reakcję [56].

Kolejnym białkiem wiążącym CaM jest *AtCaMBP25*. Pełni ono funkcję negatywnego efektora w odpowiedzi na stres osmotyczny i solny. *AtCaMBP25* należy do rodziny specyficznych białek roślinnych wiążących czynniki transkrypcyjne, co sugeruje ich udział w ekspresji genów. Kiełkowanie i wzrost elongacyjny korzenia roślin transgenicznych z nadekspresją *AtCaMBP25* były hamowane przez związki osmotycznie czynne i zasolenie. Manipulowanie poziomem tego białka metodami wykorzystującymi techniki antysens zmniejszało wrażliwość roślin na powyższe czynniki stresowe [42].

Dobrze poznanym szlakiem biorącym udział w odpowiedzi na stres abiotyczny jest aktywacja przez CaM dekarboksylazy kwasu glutaminowego (GAD). GAD katalizuje przemianę kwasu glutaminowego do kwasu γ -aminomasłowego (GABA), który ulega szybkiej aktywacji podczas odpowiedzi na stres. Zarówno CaM, jak i Ca^{2+} wymagane są do aktywacji enzymu, o czym świadczą wyniki uzyskane z analizy roślin transgenicznych z formą GDA niezdolną do wiązania CaM. Chociaż rola GABA nie została jeszcze w pełni wyjaśniona, uważa się, że wzrost poziomu GABA jest uniwersalną

odpowiedzią na rozmaite czynniki stresowe, a ścisła kontrola aktywności GAD i CaM jest niezbędna dla prawidłowego przebiegu procesów wzrostu i rozwoju [36].

Wykazano, że również białka z rodziny CML uczestniczą w reakcjach odpowiedzi roślin na stres solny i utrzymywaniu homeostazy jonowej. Gen *CML24* z *Arabidopsis*, który początkowo był identyfikowany jako gen indukowany dotykiem, jest także zaangażowany w stres solny. Rośliny transgeniczne wykazują obniżoną wrażliwość na CoCl_2 , ZnSO_4 i MgCl_2 [9].

Innym przykładem roli sygnalizacji wapniowej w homeostazie jonowej jest regulacja wymienników Na^+/H^+ . Białka te są integralnymi elementami błon odgrywającymi główną rolę w homeostazie Na^+ i H^+ . Należy podkreślić, że w proces aktywacji wymienników Na^+/H^+ zaangażowane są odmienne, zależne od jonów wapnia mechanizmy. Badania mutantów *Arabidopsis*, które wykazują nadmierną wrażliwość na zasolenie – SOS (ang. *Salt Over Sensitive*), doprowadziły do scharakteryzowania szlaków białek SOS (synonim – szlak regulacyjny CBL/CIPK). Pierwszy element stanowi czujnik Ca^{2+} (SOS3 = CBL), białko podobne do kalcyneuryny B, które wchodzi w interakcję i aktywuje kinazę białkową SOS2 (CIPK) w obecności jonów Ca^{2+} . Zaktywowana kinaza SOS2 aktywuje zlokalizowany w plazmolemie wymiennik Na^+/H^+ (SOS1), który warunkuje pojawienie się tolerancji na zasolenie przez usuwanie Na^+ z cytozolu [35]. Wykazano, że obecne w wakuoli białko AtCML18 również oddziałuje z C-końcowym regionem AtNHX1, wakuolarnego wymiennika Na^+/H^+ . Interakcja jest zależna od jonów Ca^{2+} oraz pH i spada wraz ze wzrostem pH. Wiązanie AtCML18 do AtNHX1 modyfikuje selektywność wymiennika Na^+/H^+ obniżając jego aktywność. Sugeruje się, że w warunkach fizjologicznych, niskie pH i wysokie stężenie Ca^{2+} w wakuoli utrzymują AtCML18 i AtNHX1 w formie związanej wpływając hamująco na jego aktywność. Podwyższenie wakuolarnego pH, będącego następstwem stresu solnego, prowadzi do rozpadu kompleksu AtCML18 - AtNHX1 i akumulacji Na^+ [54].

CML9 to kolejne białko uczestniczące w odpowiedzi na stres abiotyczny. Rośliny z nieaktywnym genem charakteryzują się zwiększoną tolerancją na stres solny i suszę [37]. Zaobserwowano, że u mutantów oraz roślin typu dzikiego proces kiełkowania na pożywce bogatej w mannitol przebiegał identycznie. Różnice pojawiające się u roślin z nieczynnym genem *CML9*, dotyczyły zahamowania kiełkowania przy zastosowaniu wysokich stężeń NaCl. Ponadto mutanty *cml9* wykazują nadwrażliwość na ABA, co może wskazywać, że CML9 funkcjonuje jako negatywny regulator zależnej od ABA tolerancji jedynie na zasolenie.

Kalmodulina jest również kluczowym czujnikiem Ca^{2+} podczas odpowiedzi na stres podwyższonej temperatury [34, 52]. AtCaM3 ulega szybkiej akumulacji w warunkach podwyższonej temperatury. Mutanty z genem nieaktywnym cechuje spadek tolerancji na wysoką temperaturę, zaś u roślin z nadekspresją tego genu zaobserwowano zwiększoną tolerancję [57]. AtCaM3 może funkcjonować poprzez oddziaływanie z wiążącą kalmodulinę fosfatazą białkową AtPP7. Mutanty roślinne z nieaktywnym genem *AtPP7*, a także z jego nadekspresją mają fenotyp analogiczny do roślin transgenicznych *AtCaM3* [34]. Podobne uwarunkowania zostały zaobserwowane w przypadku AtCBK3 – białka wiążącego CaM w obecności Ca^{2+} , funkcjonującego

w odpowiedzi roślin na stres gorąca. Udowodniono, iż białko AtCBK3 oddziałuje *in vitro* z AtHSFA1 będącym czynnikiem transkrypcyjnym szoku cieplnego [33].

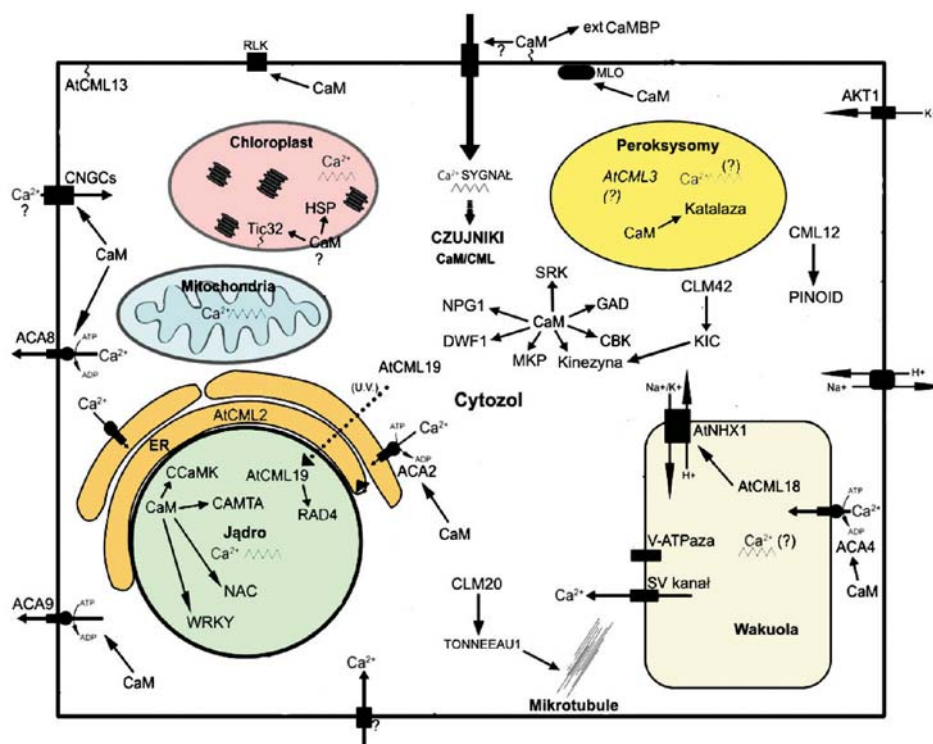
W generowaniu odpowiedzi na pojawienie się czynnika stresowego zaangażowane są kinazy MAP (ang. *Mitogen Activated Protein kinases*). Fosfatazy kinaz MAP (MKP) regulują aktywność tych kinaz, a trzy spośród nich: OsMKP z ryżu, AtMPK z rzodkiewnika i NtMKP z tytoniu oddziałują z CaM [24, 30]. Fosfataza z ryżu OsMKP1 wraz z kinazami OsMPK3 i OsMPK6 ulega silnej indukcji w wyniku zranienia. Utrata funkcji przez OsMKP1 powoduje konstytutywną aktywację OsMPK3 i OsMPK6, wskazując na negatywną rolę regulatorową OsMPK1 w sygnalizacji procesu zranienia [30].

W odpowiedzi na stres abiotyczny uczestniczą także czynniki transkrypcyjne wiążące kalmodulinę w sposób zależny od Ca^{2+} , zwane CAMTA (ang. *CAM-binding Transcriptional Activators*), które u *Arabidopsis* tworzą rodzinę składającą się z 6 członków. Białka CAMTA mają konserwatywną domenę CG-1 na końcu N, przez którą wiążą się do cis-elementów DNA, natomiast za wiązanie kalmoduliny odpowiedzialny jest koniec karboksylowy [13]. Białko CAMTA3 jest modulatorem ekspresji genu *CBF2* przez element regulatorowy CG-1. *CBF2* jest czynnikiem transkrypcyjnym indukującym ekspresję genów indukowanych chłodem. U mutantów *camta3* z genem nieaktywnym czynniki transkrypcyjne indukowane chłodem, tj. *CBF1* i *ZAT12* podlegają silnej inhibicji, co wpływa na spadek tolerancji na chłód [11]. Udowodniono, że CAMTA3 uczestniczą także w odpowiedzi na stres biotyczny. Mutanty *camta3* gromadzą nadtlenuk wodoru (H_2O_2), co zwiększa ich odporność na patogeny bakteryjne i grzybowe. Rośliny te charakteryzuje także konstytutywna indukcja genów, takich jak *PRI*, związanych z obroną [14]. Ponadto atak patogena powodował znacznie szybsze gromadzenie się kwasu salicylowego (SA) u roślin z nieaktywnym białkiem CAMTA, co wskazuje, że białko to jest zaangażowane w regulację poziomu SA [6]. OsCBT z ryżu, wiążąc kalmodulinę, inaktywuje czynniki transkrypcyjne promując odpowiedź immunologiczną roślin. Kalmodulina może także dodatnio wpływać na nagromadzenie się SA i obronę przed patogenem, oddziałując z białkiem CBP60g, które jest związane z akumulacją SA indukowaną przez MAMP (ang. *Microbe-Associated Molecular Pattern*). Udział więc CaM w gromadzeniu SA jest kompleksowy, a kalmodulina spełnia dwie potencjalnie antagonistyczne funkcje: negatywną i pozytywną [8, 53].

WNIOSKI

U roślin istnieje duża rodzina genów *CaM* kodujących blisko spokrewnione izoformy i różnorodne białka podobne do kalmoduliny, jak również niezwykle zróżnicowany zestaw białek docelowych CaM, z których wiele jest specyficznych wyłącznie dla roślin (ryc. 3).

Aktualny stan wiedzy na temat budowy i roli tych białek wzmacnia pogląd, że rodzina CaM wyewoluowała, żeby spełniać wielorakie funkcje w procesach fizjologicznych. Jednakże aby lepiej zrozumieć, kiedy, jak i gdzie rodzina CaM rozpoznaje



RYCINA 3. Ogólny model sygnalizacji wapniowej z udziałem białek CaM i CML i ich elementów docelowych (na podstawie [8], zmodyfikowane)

FIGURE 3. A general model of calcium signaling involving CaM and CML proteins and their diverse downstream targets (based on [8], modified)

i dekoduje sygnatury Ca^{2+} generowane przez wiele różnorodnych bodźców, istnieje potrzeba dalszych badań funkcjonalnych. Postępy w proteomice i technikach wizualizacji elementów komórki oraz badaniach molekularnych będą niewątpliwie pomocne w badaniach dotyczących roli kalmoduliny i białek z nią spokrewnionych w ogólnym systemie sygnalizacji u roślin.

PODZIĘKOWANIE

Autorzy serdecznie dziękują Panu Profesorowi dr hab. Janowi Kopcewiczowi za cenne wskazówki podczas redagowania pracy.

LITERATURA

- [1] AZIMZADEH J, NACRY P, CHRISTODOULIDOU A, DREVENSEK S, CAMILLERI C, AMIOUR N, PARCY F, PASTUGLIA M, BOUCHEZ D. *Arabidopsis* TONNEAU1 proteins are essential for preprophase band formation and interact with centrin. *Plant Cell* 2008; **20**: 2146–2159.

- [2] BOONBURAPONG B, BUABOOCHA T. Genome-wide identification and analyses of the rice calmodulin and related potential calcium sensor proteins. *BMC Plant Biol* 2007; **7**: 4.
- [3] BOUCHE N, YELLIN A, SNEDDEN WA, FROMM H. Plant-specific calmodulin-binding proteins. *Annu Rev Plant Biol* 2005; **56**: 435–466.
- [4] CAPOEN W, DEN HERDER J, SUN J, VERPLANCKE C, DE KEYSERA, DE RYCKE R, GOORMACHTIG S, OLDROYD G, HOLSTERS M. Calcium spiking patterns and the role of the calcium/calmodulin-dependent kinase CCaMK in lateral root base nodulation of *Sesbania rostrata*. *Plant Cell* 2009; **21**: 1526–1540.
- [5] CHAISSON D, EKENGREN SK, MARTIN GB, DOBNEY SL, SNEDDEN WA. Calmodulin-like proteins from *Arabidopsis* and tomato are involved in host defense against *Pseudomonas syringae* pv. tomato. *Plant Mol Biol* 2005; **58**: 887–897.
- [6] CHOI HI, PARK HJ, PARK JH, KIM S, IM MY, SEO HH, KIM YW, HWANG I, KIM SY. *Arabidopsis* calcium-dependent protein kinase AtCPK32 interacts with ABF4, a transcriptional regulator of abscisic acid-responsive gene expression, and modulates its activity. *Plant Physiol* 2005; **139**: 1750–1761.
- [7] CHRISTOPHER DA, BORSICS T, YUEN CY, ULLMER W, ANDEME-ONDZIGGI C, ANDREAS MA, KANG BH, STAEHELIN L. The cyclic nucleotide gated cation channel AtCNGC10 traffics from the ER via Golgi vesicles to the plasma membrane of *Arabidopsis* root and leaf cells. *BCM Plant Biol* 2007; **19**: 7.
- [8] DEFALCO TA, BENDER KW, SNEDDEN WA. Breaking the code: Ca²⁺ sensors in plant signaling. *Biochem J* 2010; **425**: 27–40.
- [9] DELK NA, JOHNSON KA, CHOWDHURY NI, BRAAM J. CML24, regulated in expression by diverse stimuli, encodes a potential Ca²⁺ sensor that functions in responses to abscisic acid, daylength, and ion stress. *Plant Physiol* 2005; **139**: 240–253.
- [10] DOBNEY S, CHAISSON D, LAMP, SMITH SP, SNEDDEN WA. The calmodulin-related calcium sensor CML42 plays a role in trichome branching. *J Biol Chem* 2009; **284**: 31647–31655.
- [11] DOHERTY CJ, VAN BUSKIRK HA, MYERS SJ, THOMASHOW MF. Roles for *Arabidopsis* CAMTA transcription factors in cold-regulated gene expression and freezing tolerance. *Plant Cell* 2009; **21**: 972–984.
- [12] DU L, POOVAIAH BW. Ca²⁺/calmodulin is critical for brassinosteroid biosynthesis and plant growth. *Nature* 2005; **437**: 741–745.
- [13] FINKLER A, ASHERY-PADAN R, FROMM H. CAMTAs: Calmodulin-binding transcription activators from plants to human. *FEBS Lett* 2007; **581**: 3893–3898.
- [14] GALON Y, NAVE R, BOYCE JM, NACHMAIS D, KNIGHT MR, FROMM H. Calmodulin-binding transcription activator (CAMTA) 3 mediates biotic defense response in *Arabidopsis*. *FEBS Lett* 2008; **582**: 943–948.
- [15] GAO X, NAGAWA S, WANG G, YANG Z. Cell polarity signaling focuses on polar auxin transport. *Mol Plant* 2008; **1**: 1899–1909.
- [16] GE LL, XIE CT, TIAN HQ, RUSSELL SD. Distribution of calcium in the stigma and style of tobacco during pollen germination and tube elongation. *Sex Plant Reprod* 2009; **22**: 87–96.
- [17] GIFFORD JL, WALSH MP, VOGEL HJ. Structure and metal-ion-binding properties of the Ca²⁺-binding helix-loop-helix EF-hand motifs. *Biochem J* 2007; **405**: 199–221.
- [18] GODFROY O, DEBELLE F, TIMMERS T, ROSENBERG C. A rice calcium- and calmodulin-dependent protein kinase restores nodulation to a legume mutant. *Mol Plant Microbe Interact* 2006; **19**: 495–501.
- [19] HUA W, ZHANG L, LIANG S, JONES RL, LU Y T. A tobacco calcium/calmodulin-binding protein kinase functions as a negative regulator of flowering. *J Biol Chem* 2004; **279**: 31483–31494.
- [20] JAWORSKI K, SZMIDT-JAWORSKA A, KOPCEWICZ J. Plant protein kinases stimulated by calcium. *Post Bioch* 2005; **51**(2): 188–197.
- [21] KALO P, GLEASON C, EDWARDS A, MARSH J, MITRA RM, HIRSCH S, JAKAB J, SIMS S, LONG SR, ROGERS J, KISS GB, DOWNIE JA, OLDROYD GE. Nodulation signaling in legumes requires NSP2, a member of the GRAS family of transcriptional regulators. *Science* 2005; **308**: 1786–1789.
- [22] KANG CH, JUNG WY, KANG YH, KIM JY, KIM DG, JEONG JC, BAEK DW, JIN JB, LEE JY, KIM MO, CHUNG WS, MENGISTE T, KOIWA H, KWAK SS, BAHK JD, LEE SY, NAM JS, YUN DJ, CHO MJ. AtBAG6, a novel calmodulin-binding protein, induces programmed cell death in yeast and plants. *Cell Death Differ* 2006; **13**: 84–95.
- [23] KANT S, BI Y-M, ZHU T, ROTHSTEIN SJ. *SAUR39*, a small auxin-up RNA gene, acts as a negative regulator of auxin synthesis and transport in rice. *Plant Physiol* 2009; **151**: 691–701.
- [24] KATOU S, KURODA K, SEO S, YANAGAWA Y, TSUGE T, YAMAZAKI M, MIYAO A, HIROCHIKA H, OHASHI Y. A calmodulin-binding mitogen-activated protein kinase phosphatase is induced by wounding and regulates the activities of stress-related mitogen-activated protein kinases in rice. *Plant Cell Physiol* 2007; **48**: 332–344.

- [25] KIM HS, JUNG MS, LEE K, KIM KE, YOO JH, KIM MC, KIM DH, CHO MJ, CHUNG WS. An S-locus receptor-like kinase in plasma membrane interacts with calmodulin in *Arabidopsis*. *FEBS Lett* 2009; **583**: 36–42.
- [26] KIM HS, JUNG MS, LEE SM, KIM KE, BYUN H, CHOI MS, PARK HC, CHO MJ, CHUNG WS. An S-locus receptor-like kinase plays a role as a negative regulator in plant defense responses. *Biochem Biophys Res Commun* 2009; **381**: 424–428.
- [27] KIM HS, PARK BO, YOO JH, JUNG MS, LEE SM, HAN HJ, KIM KE, KIM SH, LIM, CO, YUN DJ. Identification of a calmodulin-binding NAC protein as a transcriptional repressor in *Arabidopsis*. *J Biol Chem* 2007; **282**: 36292–36302.
- [28] KUSHWAHA R, SINGH A, CHATTOPADHYAY S. Calmodulin7 plays an important role as a transcriptional regulator in *Arabidopsis* seedling development. *Plant Cell* 2008; **20**: 1747–1759.
- [29] LECOURIEUX D, RANJEVA R, PUGIN A. Calcium in plant defence-signalling pathways. *New Phytol* 2006; **171**: 249–269.
- [30] LEE K, SONG EH, KIM HS, YOO JH, HAN HJ, JUNG MS, LEE SM, KIM KE, KIM MC, CHO MJ. Regulation of MAPK phosphatase 1 (AtMKP1) by calmodulin in *Arabidopsis*. *J Biol Chem* 2008; **283**: 23581–23588.
- [31] LI DF, LI J, MA L, ZHANG L, LU YT. Calmodulin isoform-specific activator of a rice calmodulin-binding kinase conferred by only three amino-acids of OsCaM61. *FEBS Lett* 2006; **580**: 4325–4331.
- [32] LIU J, MILLER SS, GRAHAM M, BUCCIARELLI B, CATALANO CM, SHERRIER DJ, SAMAC DA, IVASHUTA S, FEDOROVA M, MATSUMOTO P, GANTT JS, VANCE CP. Recruitment of novel calcium-binding proteins for root nodule symbiosis in *Medicago truncatula*. *Plant Physiol* 2006; **141**: 167–177.
- [33] LIU HT, GAO F, LI, GL, HAN JL, LIU DL, SUN DY, ZHOU RG. The calmodulin-binding protein kinase 3 is part of heat-shock signal transduction in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* 2008; **55**: 760–773.
- [34] LIU HT, LI GL, CHANG HUI, SUN DY, ZHOU, RG, LI B. Calmodulin-binding protein phosphatase PP7 is involved in thermotolerance in *Arabidopsis*. *Plant Cell Environ* 2007; **30**: 156–164.
- [35] LUAN S. The CBL-CIPK network in plant calcium signaling. *Trends Plant Sci* 2009; **14**: 37–42.
- [36] LUDEWIG F, HUSER A, FROMM H, BEAUCLAIR L, BOUCHE N. Mutants of GABA transaminase (POP2) suppress the severe phenotype of succinic semialdehyde dehydrogenase (ssadh) mutants in *Arabidopsis*. *PLoS One* 2008 **3** e3383.
- [37] MAGNAN F, RANTY B, CHARPENTEAMU, SOTTA B, GALAUD J, ALDON D. Mutations in AtCML9, a calmodulin-like protein from *Arabidopsis thaliana*, alter plant responses to abiotic stress and abscisic acid. *Plant J* 2008; **56**: 575–589.
- [38] MCCORMACK E, TSAI YC, BRAAM J. Handling calcium signaling: *Arabidopsis* CaMs and CMLs. *Trends Plant Sci* 2005; **10**: 383–389.
- [39] MESSINESE E, MUN JH, YEUN LH, JAYARAMAN D, ROUGE P, BARREA, LOUGNON G, SCHORNACK S, BONO JJ, COOK DR. A novel nuclear protein interacts with the symbiotic DMI3 calcium-and calmodulin-dependent protein kinase of *Medicago truncatula*. *Mol Plant Microbe Interact* 2007; **20**: 912–921.
- [40] PANSTRUGA R. Serpentine plant MLO proteins as entry portals for powdery mildew fungi. *Biochem Soc Trans* 2005; **33**: 389–392.
- [41] PARK CY, LEE JH, YOO JH, MOON BC, CHOI MS, KANG YH, LEE SM, KIM HS, KANG KY, CHUNG WS, LIM CO, CHO MJ. WRKY group IId transcription factors interact with calmodulin. *FEBS Lett* 2005; **579**: 1545–1550.
- [42] PERRUC E, CHARPENTEAMU, RAMIREZ BC, JAUNEAU A, GALAUD JP, RANJEVA R, RANTY B. A novel calmodulin-binding protein functions as a negative regulator of osmotic stress tolerance in *Arabidopsis thaliana* seedlings. *Plant J* 2004; **38**: 410–420.
- [43] RANTY B, ALDON D, GALAUD JP. Plant calmodulins and calmodulin-related proteins. *Plant Signaling & Behavior* 2006; **3**: 96–104.
- [44] REDDY AS. Analysis of calcium/calmodulin regulation of a plant kinesin using co-sedimentation and ATPase assays. *Methods Mol Biol* 2007; **392**: 23–36.
- [45] SHEN X, VALENCIA CA, SZOSTAK JW, DONG B, LIU R. Scanning the human proteome for calmodulin-binding proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; **102**: 5969–5974.
- [46] SMIT P, RAEDTS J, PORTYANKO V, DEBELLE F, GOUGH C, BISSELING T, GEURTS R. NSP1 of the GRAS protein family is essential for rhizobial Nod factor-induced transcription. *Science* 2005; **308**: 1789–1791.
- [47] TIRICHINE L, IMAIZUMI-ANRAKU H, YOSHIDA S, MURAKAMI Y, MADSEN LH, MIWA H, NAKAGAWA T, SANDAL N, ALBREKTSSEN AS, KAWAGUCHI M. Dereglulation of a Ca²⁺/calmodulin-dependent kinase leads to spontaneous nodule development. *Nature* 2006; **441**: 1153–1156.
- [48] TSAI Y, DELK NA, CHOWDHURY NI, BRAAM J. *Arabidopsis* potential calcium sensors regulate nitric oxide levels and the transition to flowering. *Plant Signal Behav* 2007; **2**: 446–454.

- [49] TURNER WL, WALLER JC, SNEDDEN WA. Identification, molecular cloning and functional characterization of a novel NADH kinase from *Arabidopsis thaliana* (thale cress). *Biochem J* 2005; **385**: 217–223.
- [50] VANDERBELD B, SNEDDEN W. Developmental and stimulus-induced expression patterns of *Arabidopsis* calmodulin-like genes *CML37*, *CML38* and *CML39*. *Plant Mol Biol* 2007; **64**: 683–697.
- [51] VINOGRADOVA MV, MALANINAA GG, REDDYB ASN, FLETTERICKA RJ. Structure of the complex of a mitotic kinesin with its calcium binding regulator. *PNAS* 2009; **106**: 8175–8179.
- [52] VIRDIAS, THAKUR A, DUTT S, KUMAR S, SINGH P. A sorghum 85 kDa heat stress-modulated protein shows calmodulin-binding properties and cross-reactivity to anti neurospora crassa-hsp 80 antibodies. *FEBS Lett* 2009; **583**: 767–770.
- [53] WANG L, TSUDA K, SATO M, COHEN JD, KATAGIRI F, GLAZEBROOK J. *Arabidopsis* CaM binding protein CBP60g contributes to MAMP-induced SA accumulation and is involved in disease resistance against *Pseudomonas syringae*. *PLoS Pathog* 2009; **5**, e1000301.
- [54] YAMAGUCHI T, AHARON GS, SOTTOSANTO JB, BLUMWALD E. Vacuolar Na⁺/H⁺ antiporter cation selectivity is regulated by calmodulin from within the vacuole in a Ca²⁺- and pH-dependent manner. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; **102**: 16107–16112.
- [55] YOKOTA E, TOMINAGA M, MABUCHI I, TSUJI Y, STAIGER CJ, OIWA K, SHIMMEN T. Plant villin, lily P-135-ABP, possesses G-actin binding activity and accelerates the polymerization and depolymerization of actin in a Ca²⁺- sensitive manner. *Plant Cell Physiol* 2005; **46**: 1690–1703.
- [56] YOO JH, PARK CY, KIM JC, HEO WD, CHEONG MS, PARK HC, KIM MC, MOON BC, CHOI MS, KANG YH, LEE JH, KIM HS, LEE SM, YOON HW, LIM CO, YUN DJ, LEE SY, CHUNG WS, CHO MJ. Direct interaction of a divergent CaM isoform and the transcription factor, MYB2, enhances salt tolerance in *Arabidopsis*. *J Biol Chem* 2005; **280**: 3697–3706.
- [57] ZHANG W, ZHOU RG, GAO YJ, ZHENG SZ, XU P, ZHANG SQ, SUN DY. Molecular and genetic evidence for the key role of AtCaM3 in heat-shock signal transduction in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 2009; **149**: 1773–1784.

Redaktor prowadzący – Maria Olszewska

Otrzymano: 14.07. 2010 r.

Przyjęto: 29.11. 2010 r.

Krzysztof Jaworski

Instytut Biologii Ogólnej i Molekularnej, Uniwersytet Mikołaja Kopernika

87-100 Toruń, ul. Gagarina 9

e-mail: jaworski@umk.pl