

HANNA FABCZAK, MIROŚLAWA WALERCZYK i STANISŁAW FABCZAK
Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN
Pasteura 3, 02-093 Warszawa

ROLA WAPNIA I CYKLICZNYCH NUKLEOTYDÓW W REGULACJI RUCHU ORZĘSKÓW

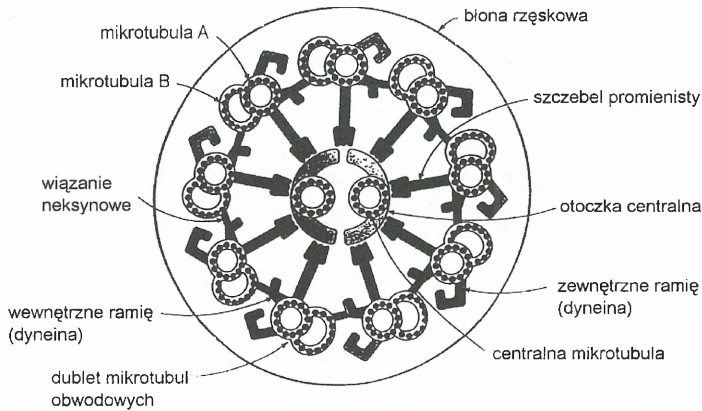
WPROWADZENIE

Orzęski — organizmy jednokomórkowe, podobnie jak i inne pierwotniaki, w odpowiedzi na różnorodne oddziaływania zewnętrzne wytwarzają specyficzne reakcje ruchowe. Takie zachowanie orzęsków, będące jedną z ważniejszych funkcji fizjologicznych komórek, umożliwia im znajdowanie optymalnych warunków do wzrostu i rozmnażania się.

Orzęski poruszają się w środowisku wodnym w wyniku skoordynowanego uderzenia tysięcy rzęsek pokrywających ich powierzchnię. Typowy dla eukarionta schemat budowy rzęski, w której 2 mikrotubule centralne otoczone przez 9 par mikrotubul obwodowych stanowią podstawę aksonemy (rys. 1), jest również charakterystyczny dla orzęsków. Mikrotubule obwodowe połączone ze sobą wiązaniami neksynowymi są sprzężone również z otoczką centralną za pośrednictwem szczebli promienistych, zaś całość jest otoczona błoną rzęskową będącą przedłużeniem błony plazmatycznej. Zaznaczone na rysunku ramiona odchodzące od podfilamentu A to białko — dyneina posiadające aktywność ATP-az. Ślizg mikrotubul względem siebie jest podstawą ruchu rzęski, a energia niezbędna dla tego mechanochemicznego procesu jest uwalniana podczas hydrolizy ATP przez dyneinę (SATIR 1985, BONINI i współaut. 1991, FABCZAK i FABCZAK 1994). Jeden cykl uderzenia rzęski można podzielić na dwie fazy: fazę uderzenia efektywnego i fazę powrotną. Częstotliwość i kierunek efektywnego uderzenia rzęsek reguluje charakter ruchu orzęsków. Oba te parametry podlegają modulacji, gdy komórka reaguje na różnego rodzaju bodźce, w tym bodźce mechaniczne, świetlne, chemiczne i grawitacyjne (KUNG i SAIMI 1982, MACHEMER i DEITMER 1985, WOOD 1982, 1991, HELLUNG-LARSEN i współaut. 1986, VAN HOUTEN 1988, MATSUOKA i współaut. 1991, 1992, MACHEMER i BRAUCKER 1992, FABCZAK i FABCZAK 1993, 1995). Rzęski są więc ostatnim elementem, efektem, w skomplikowanym procesie, jaki zostaje zainicjowany w momencie zadziałania bodźca i kończy się zmianą charakteru ruchu.

Komórka orzęska reprezentuje wyjątkowo interesujący obiekt do analizy wewnątrzkomórkowych zjawisk zachodzących podczas procesu transdukcji syg-

nału biorąc pod uwagę możliwość prowadzenia badań interdyscyplinarnych z zakresu genetyki, biochemii i elektrofizjologii (SCHULTZ i współaut. 1990, BONINI i współaut. 1991, SCHULTZ i KLUMPP 1993, PECH 1995).



Rys. 1. Schematyczny diagram przedstawiający strukturę aksonemy.

Ca²⁺ W REGULACJI RUCHU I ELEKTROGENEZY

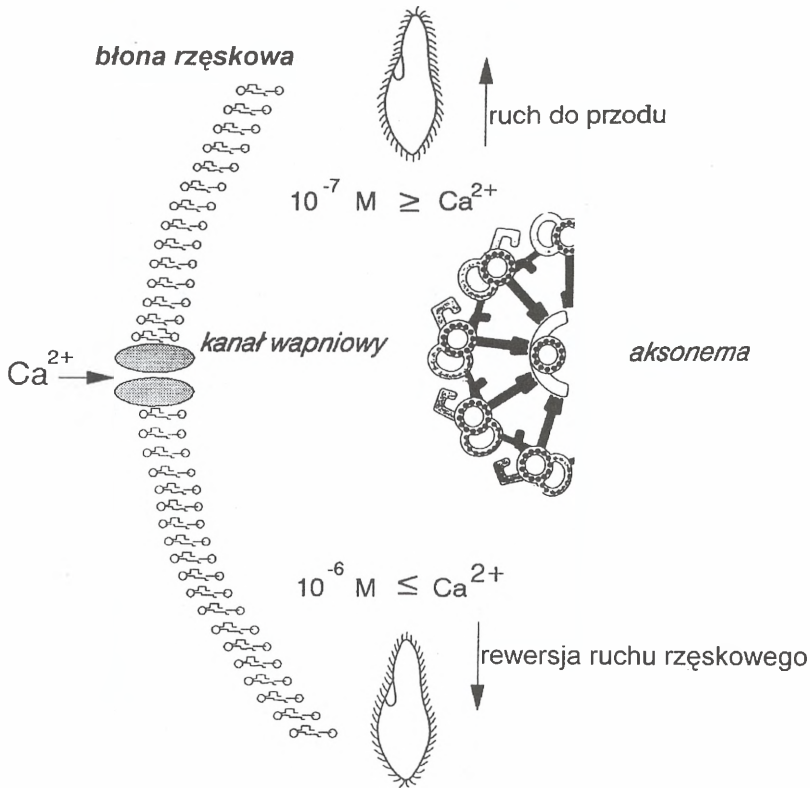
KANAŁY WAPNIOWE REGULOWANE NAPIĘCIEM BŁONOWYM

Badania elektrofizjologiczne wykazały, że zmiany kierunku i częstotliwości efektywnego uderzenia rzęski są ściśle skorelowane ze zmianami elektrycznego potencjału błonowego komórki (KINOSITA i współaut. 1964)

Mechanicznej stymulacji przedniej części orzęska, działaniu bodźców chemicznych (np. *Paramecium*, *Stylonychia*, *Stentor*) lub świetlnych (np. *Blepharisma*, *Stentor*) towarzyszy wzrost częstotliwości uderzenia rzęsek, a kierunek efektywnego uderzenia rzęsek zmienia się na przeciwny (rewersja ruchu rzęskowego), w konsekwencji czego komórka porusza się do tyłu. Ta modyfikacja ruchu jest ściśle związana z generowaniem potencjału czynnościowego, poprzedzonego wstępną depolaryzacją błony komórkowej (potencjał receptorowy) (ECKERT 1972, DOUGHTY i DRYL 1981, FABCZAK i FABCZAK 1993, 1995). Potencjały receptorowe po stymulacji mechanicznej u orzęsków powstają w wyniku aktywacji kanałów wapniowych rozmieszczonych w błonie komórkowej i wpływie jonów wapnia do komórki (OGURA i MACHEMER 1980, KUNG i SAIMI 1982). Generacja potencjału czynnościowego zachodzi na skutek otwarcia, w wyniku depolaryzacji błony, kanałów wapniowych regulowanych napięciem i umiejscowionych w błonie otaczającej rzęski. Lokalizację tych kanałów w błonie rzęskowej stwierdzono na podstawie klasycznych już dziś rejestracji prądów wapniowych w komórkach kontrolnych i braku tych prądów w komórkach odrzęsionych. Typową odpowiedź elektryczną (potencjał czynnościowy) na odpowiednio silną stymulację uzyskano dopiero po upływie czasu wymaganego do regeneracji aparatu rzęskowego (DUNLAP 1977).

W regulację potencjału czynnościowego u *Paramecium*, oprócz wpływającego prądu wapniowego, jest zaangażowanych wiele prądów jonowych. Należy do nich pojawiający się podczas depolaryzacji, w obecności jonów sodu w środowisku, wpływający prąd sodowy regulowany jonami wapnia i napięciem. Ten wolno aktywowany kanał jonowy jest odpowiedzialny za przedłużenie potencjału czynnościowego i czasu trwania rewर्सji rzęskowej (SAIMI i KUNG 1980, HENNESSEY i KUNG 1985). Druga grupa kanałów zaangażowanych podczas potencjału czynnościowego to kanały potasowe biorące udział w repolaryzacji potencjału błonowego. Są to: zależny od napięcia wpływający prąd potasowy (outward delayed rectifying K^+ current) (KUNG i SAIMI 1982) i wpływający prąd potasowy zależny od wapnia (outward Ca^{2+} -dependent K^+ current) (SATOW i KUNG 1980).

Następstwem aktywacji kanałów wapniowych, czułych na napięcie w wyniku depolaryzacji błony komórkowej, jest wpływ jonów wapnia do wnętrza komórki. Ze wzrostem stężenia tego jonu w cytoplazmie z 10^{-7} M do 10^{-6} M jest skorelowane odwrócenie kierunku efektywnego uderzenia rzęsek (rys. 2). Zjawisko rewर्सji ruchu rzęskowego jest przejściowe. Po krótkim czasie poruszania się do



Rys. 2. Schemat przedstawiający wpływ jonów wapnia na zachowanie orzęsków. Gdy wewnątrzkomórkowe stężenie jonów wapnia nie przekracza wartości 10^{-7} M orzęski poruszają się do przodu. Wzrost stężenia wapnia powyżej 10^{-6} M w wyniku otwarcia napięciowo-czułych kanałów wapniowych i po zadziałaniu bodźca depolaryzacyjnego powoduje zmianę orientacji bicia rząski, komórka zaczyna pływać do tyłu (rewर्सja ruchu rzęskowego).

tyłu orzęski ponownie rozpoczynają ruch do przodu, a wewnątrzkomórkowo poziom jonów wapnia wraca dzięki działaniu ATP-azy wapniowej do wartości spoczynkowej (NAITOH 1968, ECKERT 1972, MACHEMER i ECKERT 1975, ECKERT i BREHM 1979, KUNG i SAIMI 1982, HINRICHSEN i współaut. 1985).

Kluczową rolę jonów Ca^{2+} w regulacji ruchu rzęski i generacji potencjału czynnościowego potwierdzają doświadczenia przeprowadzone na komórkach zmutowanych. Jednym z przykładów mogą być eksperymenty z niepobudliwymi mutantami *Paramecium* typu *Pawn*. Mutanty te charakteryzują się brakiem występowania wapniowego potencjału czynnościowego i w związku z tym nie posiadają zdolności pływania do tyłu. Nie obserwuje się u nich również zmiany częstotliwości uderzania rzęsek pomimo tego, że generują wapniowy potencjał receptorowy (SATOW i KUNG 1980).

Wapń wpływa niezależnie na dwa parametry; zarówno na kierunek, jak i reguluje częstotliwość pracy rzęsek u *Paramecium*. Otóż komórkowe modele *Paramecium*, to jest orzęski, które pozbawiono błony komórkowej w wyniku traktowania ich detergentem, w obecności jonów wapnia w stężeniu poniżej 10^{-6} M, jonów magnezu i ATP pływają do przodu, natomiast w środowisku, gdzie stężenie jonów wapnia jest wyższe niż 10^{-6} M, następuje zmiana orientacji uderzenia rzęski i pantofelki zaczynają poruszać się do tyłu, bez wzrostu częstotliwości ich bicia (NAITOH i KANEKO 1972, NAKAOKA i współaut. 1983). Te doświadczenia wykazują dodatkowo, że regulacja funkcji aksonemy u orzęsków następuje bezpośrednio w odpowiedzi na wzrost stężenia wapnia wewnątrz rzęski, a nie poprzez zmiany potencjału błonowego (sygnał elektryczny). W mutantach behawioralnych *Paramecium* typu *Atalanta*, które posiadają funkcjonalne kanały wapniowe lecz w wyniku mutacji struktury szkieletu aksonemy nie mogą pływać do tyłu, wykazano, że wapń może powodować przyspieszenie bicia rzęsek bez rewersji ruchu rzęskowego w odpowiedzi na bodziec depolaryzujący błonę (HINRICHSEN i KUNG 1984, HINRICHSEN i współaut. 1984).

Na podstawie dotychczasowych badań trudno jest ustalić molekularne procesy regulujące ruch aksonemy i rolę jaką jony wapnia odgrywają w tych zjawiskach. Można przypuszczać, że jedną z form regulacji ruchu rzęski jest zmiana stopnia fosforylacji białek aksonemy.

Dwie immunologicznie różne, zależne od wapnia, kinazy białkowe (CaPK-1 i CaPK-2) zlokalizowano u *Paramecium*. Pierwsza z nich o masie cząsteczkowej 52 kDa jest niezależna od kalmoduliny i diacyloglicerolu. Obecność drugiej stwierdzono w rozpuszczalnej frakcji komórkowej, jest ona aktywowana przez mikromolarne stężenie wapnia i również nie wymaga obecności kalmoduliny, diacyloglicerolu oraz fosfatydyloseryny (BONINI i współaut. 1991). Zależna od wapnia fosforylacja białek (155 kDa, 58 kDa, 25 kDa, 14 kDa) ma miejsce zarówno w rzęskach, jak i w komórkach poddanych działaniu Tritonu X-100 (TRAVIS i NELSON 1988, BONINI i współaut. 1991).

ROLA KALMODULINY W REGULACJI RUCHU RZĘSKI

Pisząc o roli wapnia w regulacji ruchu rzęski nie można pominąć roli, jaką pełnią w tym procesie białka wiążące wapń, a szczególnie kalmodulina. Kalmodulina — niskocząsteczkowe, kwaśne i monomeryczne białko o masie cząstecz-

kowej około 16,7 kDa posiada 4 miejsca wiązania wapnia. Lokalizacja tego białka na zewnętrznym dublecie mikrotubul w rzęskach *Paramecium* i *Tetrahymena* (WALTER i SCHULTZ 1981, OHNISHI i współaut. 1982, EVANS i NELSON 1989, TAKEMASA i współaut. 1989, 1990) sugeruje, że białko to może być zaangażowane w regulację i kontrolę ruchu aksonemy. Obserwowany wpływ działania inhibitorów kalmoduliny na modele komórkowe orzęsków oraz trójfluoroperazyny (TFP), antagonisty kalmoduliny, potwierdza to przypuszczenie (RAUH i współaut. 1980, OTTER i współaut. 1984, IZUMI i NAKAOKA 1987). W rzęskach *Tetrahymena* stwierdzono aż 36 białek wiążących kalmodulinę w obecności wapnia (HIRANO i WATANABE 1985, HIRANO-OHNISHI i WATANABE 1988). U *Paramecium* wykazano obecność 9 białek specyficznie wiążących kalmodulinę z *Paramecium* z wysokim nanomolarnym powinowactwem (EVANS i NELSON 1989). Wśród tych białek wiele jest ściśle związanych z aksonemą, a dwa z nich 95 kDa i 105 kDa wiążą kalmodulinę w stężeniu wapnia poniżej 10^{-6} M.

Kalmodulina jest białkiem regulatorowym, po związaniu co najmniej trzech jonów wapnia zmienia swoją konformację i łączy się z białkami docelowymi (często enzymami) modyfikując ich aktywność. Przykładem takiego działania może być, zależna od kalmoduliny, fosforylacja białek w aksonemie *Tetrahymena*. Spośród 200 polipeptydów, których obecność była wykazana w aksonemie *Tetrahymena*, 60 z nich było fosforylowanych niezależnie od obecności kalmoduliny i wapnia z wyjątkiem jednej β -tubuliny, która wydaje się być specyficznym substratem dla kinazy białkowej zależnej od kalmoduliny i wapnia (WATANABE i współaut. 1990).

Ponadto kalmodulina może pełnić funkcję antagonisty w procesie zależnej od cAMP fosforylacji białek aksonemy poprzez aktywację fosfatazy białkowej (kalcyneuryny) (IZUMI i NAKAOKA 1987, HIRANO-OHNISHI i WATANABE 1989). U *Paramecium* i *Tetrahymena* wapń i kalmodulina stymulują aktywność cykazy guanylanowej (NAGAO i współaut. 1979, SCHULTZ i KLUMPP 1980, KLUMPP i współaut. 1983).

Ponadto kalmodulina u *Paramecium* pełni rolę regulatora aktywności kanałów sodowych zależnych od wapnia (SAIMI i LING 1990). Natomiast w mutancie *Paramecium*, *Pantofobiak* (*pntA*¹), w którym nie rejestruje się zależnego od wapnia prądu potasowego, badania wykazały, że mutacja (tzw. single gene mutation) dotyczy zamiany jednego aminokwasu w trzeciej domenie wiążącej wapń w cząsteczce kalmoduliny (HINRICHSSEN i współaut. 1986). Wstrzyknięcie kalmoduliny z dzikiego szczepu przywraca zarówno zależny od wapnia prąd potasowy, jak również typowe dla dzikiego szczepu zachowanie mutantu *pntA*¹.

ROLA CYKLICZNYCH NUKLEOTYDÓW W REGULACJI AKTYWNOŚCI AKSONEMY

CYKLICZNY AMP JAKO WTÓRNY PRZEKAŹNIK

Wiele doświadczeń przeprowadzonych na orzęskach pokazuje, że cykliczne nukleotydy w szerokim zakresie mogą modulować zachowanie tych komórek. U *Paramecium* wzrostowi stężenia cAMP (cykliczny adenozynomonofosforan) towarzyszy znaczne zwiększenie szybkości poruszania się do przodu. Szybkość pływania komórek jest 2-3-krotnie podwyższona po dodaniu pochodnych cAMP,

dla których błona komórkowa jest przepuszczalna (8-Br-cAMP, dwumaślan-cAMP) lub po dodaniu IBMX (inhibitora fosfodiesterazy cyklicznych nukleotydów) (GUSTIN i współaut. 1983, BONINI i współaut. 1986). Z drugiej strony wiadomo, że w następstwie mechanicznej stymulacji tylnego końca komórki (np. *Paramecium*, *Stylonychia*, *Stentor*) obserwuje się skurcz komórki, wzrost częstotliwości bicia rzęsek oraz zmianę orientacji ich uderzenia na bardziej efektywną, co w sumie daje znaczny wzrost szybkości poruszania się orzęska (NAITOH 1968, ECKERT 1972, NAKAOKA i współaut. 1983, BONINI i współaut. 1986, WOOD 1993). Takie zmiany w zachowaniu się orzęsków są związane z hiperpolaryzacją błony komórkowej w wyniku aktywacji kanałów potasowych (inward K^+ currents), zlokalizowanych w błonie komórkowej (OGURA i MACHEMER 1980). Na podstawie przedstawionych danych nasuwa się wniosek, że u orzęsków hiperpolaryzacja błony komórkowej jest ściśle skorelowana z przyspieszeniem ruchu do przodu i wzrostem stężenia cAMP w komórce (BONINI i NELSON 1988, BONINI i współaut. 1991). Według SCHULTZA i jego współpracowników (SCHULTZ i współaut. 1992, SCHULTZ i KLUMPP 1993) hiperpolaryzacja błony komórkowej inicjuje syntezę cAMP. Enzym syntetyzujący ten nukleotyd, cyklaza adenylnowa, jest regulowany napięciem błony i pełni równocześnie funkcje czułego na napięcie kanału jonowego. Nie można jednak wykluczyć odwrotnej sytuacji popartej również danymi eksperymentalnymi, że wzrost poziomu cAMP w komórce orzęsków powoduje hiperpolaryzację błony komórkowej (HENNESSEY i współaut. 1985, PECH 1995).

Cyklaza adenylnowa (96 kDa), jak stwierdzono niedawno, występuje w komórkach orzęsków i jest zlokalizowana głównie w błonie rzęskowej (SCHULTZ i KLUMPP 1983, BONINI i współaut. 1991). Stymulowana jest ona 20–30-krotnie w zakresie stężeń 0,1–1 μM Ca^{2+} , wyższe stężenia wapnia (powyżej 5 μM) hamują aktywność tego enzymu (BONINI i współaut. 1991, SCHULTZ i KLUMPP 1993). Zahamowanie aktywności tej cyklazy przez antagonistów kalmoduliny, calmidazolium, W-7 i TFP może sugerować, że kalmodulina lub inne białka wiążące wapń są odpowiedzialne za tę dwustopniową, zależną od wapnia regulację aktywności (GUSTIN i NELSON 1987).

Oczyszczona cyklaza adenylnowa po rekonstytucji w dwuwarstwie lipidowej posiada własności poru przewodzącego jony potasu. Wydaje się natomiast, że jej aktywność *in vivo* jest regulowana zarówno przez przewodnictwo spoczynkowe dla jonów potasu oraz że sam ten enzym pełni funkcję kanału jonowego, który reguluje potencjał spoczynkowy dla jonów K^+ (SCHULTZ i KLUMPP 1993).

CYKLICZNY GMP JAKO WTÓRNY PRZEKAŹNIK

W przeciwieństwie do cAMP wzrost stężenia cGMP (cykliczny guanozynomonofosforan) w komórce orzęsków jest związany z depolaryzacją błony komórkowej (MAJIMA i współaut. 1986, SCHULTZ i współaut. 1986, SCHULTZ i KLUMPP 1993). Korelację pomiędzy stopniem depolaryzacji błony komórkowej, a wzrostem stężenia cGMP potwierdzają badania przeprowadzone na mutantach. W mutancie *Paramecium*, *Dancer*, charakteryzującym się przedłużoną depolaryzacją błony komórkowej, spowodowaną zwolnioną inaktywacją kanałów Ca^{2+} zależnych od napięcia; również podwyższony poziom cGMP utrzymuje się dłużej (BONINI

i współaut. 1991). Natomiast niewielkim wzrostem stężenia cGMP w następstwie działania bodźca wywołującego depolaryzację charakteryzują się mutanty z grupy *Pawn*, które mają obniżony lub w ogóle nie posiadają prądu Ca^{2+} zależnego od napięcia; a tym samym nie są zdolne do generowania potencjału czynnościowego (SCHULTZ i współaut. 1990).

Nieco odmienny przebieg mają zmiany poziomu cGMP w przypadku innego, wrażliwego na światło orzęska, *Stentor*, podczas działania bodźców świetlnych. Różnica polega na tym, że impuls świetlny powoduje początkowo gwałtowny spadek stężenia cGMP, po którym następuje znaczny wzrost poziomu tego cyklicznego nukleotydu (FABCZAK i współaut., w przygotowaniu). Stymulacja światłem orzęska wywołuje również przejściową, wstępną depolaryzację błony komórkowej (potencjał receptorowy), po której może być generowany potencjał czynnościowy i rewersja ruchu rzęskowego (reakcja fotofobowa) (FABCZAK i FABCZAK 1993, 1995). Wydaje się więc, że wstępny spadek poziomu cGMP u *Stentor* jest skorelowany z wytworzeniem potencjału receptorowego (FABCZAK i współaut., w przygotowaniu), natomiast generacji potencjału czynnościowego towarzyszyłby wzrost poziomu cGMP, jak ma to również miejsce u *Paramecium* (SCHULTZ i współaut. 1990, SCHULTZ i KLUMPP 1993).

Badania behawioralne, w których sprawdzono wpływ 8-Br-cGMP i IBMX — inhibitora fosfodiesterazy cyklicznych nukleotydów na reakcję *Stentor* na światło (reakcja fotofobowa) potwierdzają istnienie związku pomiędzy zmianami poziomu cGMP u *Stentor*, a zjawiskami ruchowymi i stanem depolaryzacji błony komórkowej (FABCZAK i współaut. 1993).

Cyklaza guanylanowa, podobnie jak cyklaza adenylanowa, została zlokalizowana w błonie rzęskowej *Paramecium* (SCHULTZ i KLUMPP 1980), jest ona również regulowana przez Ca^{2+} (SCHULTZ i KLUMPP 1988, SCHULTZ i współaut. 1986, 1990, PRESTON i SAIMI 1990, BONINI i współaut. 1991). W przeciwieństwie jednak do cyklazy adenylanowej, cyklaza guanylanowa jest stymulowana przez wysokie stężenia jonów wapnia (5–100 μM). Dopiero wapń w stężeniu powyżej 100 μM hamuje aktywność tego enzymu (SCHULTZ i KLUMPP 1984, 1988, SCHULTZ i współaut. 1990, BONINI i współaut. 1991). Połowa maksymalnej aktywności tego enzymu występuje przy 3,1 μM Ca^{2+} , podczas gdy cyklazy adenylanowej przy 0,88 μM wolnego Ca^{2+} . Chociaż więc obie te cyklazy regulowane są przez Ca^{2+} , to tak zasadnicza różnica w stężeniu, przy którym następuje stymulacja tych enzymów, wskazuje na to, że enzymy i syntetyzowane przez nie cykliczne nukleotydy biorą udział w regulacji odmiennych zjawisk fizjologicznych. Aktywacja cyklazy guanylanowej wysokim stężeniem Ca^{2+} potwierdza potencjalną rolę cGMP jako regulatora podczas depolaryzacji i rewersji ruchu rzęskowego (BONINI i współaut. 1991).

Podobnie jak w przypadku cyklazy adenylanowej, cyklaza guanylanowa jest również aktywowana przez białko regulatorowe, kalmodulinę (KLUMPP i współaut. 1983, 1984, SCHULTZ i KLUMPP 1984, 1988, SCHULTZ i współaut. 1990, BONINI i współaut. 1991). Kalmodulina jest ściśle związana z cyklazą guanylanową i występuje jako jej podjednostka. Badania grupy Schultz'a (KLUMPP i współaut. 1983, 1984, SCHULTZ i KLUMPP 1984) wykazały, że całkowite i nieodwracalne zahamowanie aktywności cyklazy guanylanowej następuje po traktowaniu błony rzęskowej niskimi stężeniami jonów La^{3+} , które wypierając jony Ca^{2+} , powodują

oddysocjowanie kalmoduliny od enzymu. Dopiero dodanie kalmoduliny przywraca pełną aktywność cyklicznej guanylanowej (SCHULTZ i KLUMPP 1982).

KINAZY BIAŁKOWE ZALEŻNE OD CYKLICZNYCH NUKLEOTYDÓW

Wzrost stężenia cAMP i cGMP w komórce często stymuluje kinazy białkowe zależne od cyklicznych nukleotydów. U *Paramecium* występują trzy takie enzymy: dwa z nich zależne od cAMP (cAPK I i II) i jeden regulowany przez cGMP (cGPK). W całych komórkach stwierdzono występowanie cAPK I i cGPK, natomiast typ II kinazy regulowanej cAMP jest charakterystyczny tylko dla rzęsek. Kinazy zależne od cAMP różnią się wielkością podjednostek regulatorowych R (MASON i NELSON 1989a, BONINI i współaut. 1991). Rzęskowa cAPK I o ciężarze molekularnym 70 kDa jest prawdopodobnie dimerem złożonym z podjednostki regulatorowej R i katalitycznej C, natomiast cAPK II jest enzymem o masie cząsteczkowej 220 kDa i prawdopodobnie jest tetramerem R_2C_2 , podobnym do białka występującego u ssaków. Typ I ma podjednostkę regulatorową o masie 44 kDa, a typ II — o masie 48 kDa. Podjednostka katalityczna jest prawdopodobnie wspólna dla obu kinaz i ma masę cząsteczkową 40 kDa (BONINI i współaut. 1991).

Kinaza zależna od cGMP jest monomerem (77 kDa) i może używać zarówno GTP i ATP jako donorów fosforu, właściwość ta wyróżnia tę kinazę spośród wszystkich innych scharakteryzowanych kinaz białkowych, zależnych od cyklicznych nukleotydów (MIGLIETTA i NELSON 1988, MASON i NELSON 1989a, b).

WAPŃ I cAMP GŁÓWNE REGULATORY DYNEINY

Dyneina, jak wspomniano we wstępie, jest molekularnym motorem odpowiedzialnym za ruch aksonemy. W związku z tym wtórne przekaźniki modyfikujące aktywność ruchową komórki muszą mieć wpływ na działanie aksonemalnej dyneiny. Aksonema zawiera wiele enzymów o aktywności ATP-azowej występujących w zewnętrznych i wewnętrznych ramionach mikrotubuli A (rys. 1). Każda oczyszczona dyneina zawiera przynajmniej jeden ciężki łańcuch o masie cząsteczkowej powyżej 300 kDa, 1 do 10 łańcuchów pośrednich oraz kilka łańcuchów o niskiej masie cząsteczkowej. U *Paramecium* traktowanie dyneiny roztworami o wysokiej sile jonowej prowadzi do wyizolowania trzech głównych ATP-az, które sedymentują w gradiencie sacharozy przy 22S, 19S i 12S. Dyneina 22S może być częścią zewnętrznego ramienia, podobnie jak ma to miejsce w przypadku *Tetrahymena* i *Chlamydomonas*. Badania na mutantach *Chlamydomonas* pozbawionych zewnętrznego ramienia wykazały, że komórki te nie są zdolne do pływania do tyłu, natomiast mutanty bez wewnętrznych ramion dyneinowych całkowicie nie są zdolne do ruchu. Wydaje się więc, że to właśnie wewnętrzne ramię dyneiny pełni fundamentalną rolę w regulacji aktywności aksonemy (BONINI i współaut. 1991).

U *Paramecium* cykliczne nukleotydy stymulują wzrost aktywności ATP-azowej dyneiny. Natomiast modele komórkowe, które zachowały zdolność reakcji na działanie cyklicznych nukleotydów wykazują wzrost stopnia fosforylacji niektórych białek w obecności cAMP i cGMP (HAMASAKI i współaut. 1989, BONINI i NELSON 1990) oraz wapnia (BONINI i NELSON 1990). Wzór fosforylacji białek

aksonemy *in vitro* w obecności cAMP jest taki sam, jak w przypadku cGMP z tą różnicą, że używano jednak znacznie wyższych stężeń tego ostatniego nukleotydu (WALCZAK i NELSON 1994). HAMASAKI i współpracownicy (1989) wykazali, że w izolowanej aksonemie z rzęsek *Paramecium* tylko jedno białko (29 kDa), którego wiązanie z aksonemą jest zależne od ATP, jest fosforylowane po dodaniu cAMP wyłącznie w niskich stężeniach wapnia (10^{-7} M). Białko to nazwane „regulatorem dyneiny” i związane z dyneiną 22S jest prawdopodobnie regulatorem indukowanego przez cAMP wzrostu prędkości ruchu do przodu. Wydaje się więc, że jest to jedno z możliwych miejsc integracji działania wapnia i cAMP jako wtórnych przekaźników w regulacji ruchu aksonemy.

Mimo licznych doniesień na temat lokalizacji w rzęskach polipeptydów, związanych z dyneiną i będących specyficznymi substratami dla kinaz białkowych zależnych od cyklicznych nukleotydów nie stwierdzono, aby dyneina była bezpośrednim celem takiej fosforylacji (TRAVIS i NELSON 1988, HAMASAKI i współaut. 1989, BONINI i NELSON 1990).

Szczegółowy proces molekularny, który łączy wzajemnie ze sobą regulację ruchową aksonemy oraz działanie wtórnych przekaźników jest bardzo skomplikowany. Dalsze intensywnie prowadzone badania z pewnością pogłębią naszą wiedzę w tym zakresie. Aktualny stan wiedzy na ten temat przedstawiono w powyższej pracy.

Tabela 1

Enzymy i białka, zależne od wapnia i cyklicznych nukleotydów, zaangażowane w regulacji ruchu orzęsków

Enzym	Masa cząsteczkowa	Aktywator	Inhibitor	Lokalizacja	Referencje
AC — cyklaza adenylanowa	96 kDa	Ca ²⁺ 0.1–1 μM K ⁺ (pol. max ef. przy 3 mM)	Ca ²⁺ > 5 μM antagoniści kalmoduliny: calmidazolom, W-7, TFP	blona rząskowa	BONINI i współaut. 1991 GUSTIN i NELSON 1987 SCHULTZ i KLUMPP 1983 SCHULTZ i współaut. 1987 KLUMPP i współaut. 1984 PRESTON i SAIMI 1990 SCHULTZ i współaut. 1990 SCHULTZ i KLUMPP 1983
GC — cyklaza guanylanowa		Ca ²⁺ 5–100 μM kalmodulina	Ca ²⁺ 300–500 μM antagoniści kalmoduliny są słabymi inhibitorami	blona rząskowa	GUSTIN i NELSON 1987 SCHULTZ i KLUMPP 1982 SCHULTZ i KLUMPP 1984 BONINI i współaut. 1991 SCHULTZ i KLUMPP 1980 PRESTON i SAIMI 1990 SCHULTZ i współaut. 1990 SCHULTZ i KLUMPP 1993
PDE — fosfodiesteraza			IBMX i papaweryna przy milimolarnych stężeniach teofilina*	blona rząskowa blona rząskowa-cAPDE cytoplazma rząskowa - cGPDE	GUSTIN i NELSON 1987 BONINI i współaut. 1991 SCHULTZ i współaut. 1990 PRESTON i SAIMI 1990 KUDO i współaut. 1986

cAPK I — cAMP - zależna kinaza białkowa typ I	70 kDa (RC dimer) R-44 kDa C-40 kDa	cAMP	Ca ²⁺ (pol. max. ef. przy 2 μM)	blona rzęskowa aksonema cytoplazma rzęskowa cytoplazma komórkowa	LEWIS i NELSON 1980 HOCHSTRASSER i NELSON 1989 MASON i NELSON 1989 MASON i NELSON 1989 SCHULTZ i JANTZEN 1980 BONINI i współaut. 1991 PRESTON i SAIMI 1990
cAPK II — cAMP- zależna kinaza białkowa typ II	220 kDa (R ₂ C ₂ tetramer) R-48 kDa C-40 kDa	cAMP	ssaczy inhibitor Walsh'a- częściowa inhibicja tylko przy bardzo wysokich stężeniach inhibitora	blona rzęskowa aksonema cytoplazma rzęskowa	LEWIS i NELSON 1980 HOCHSTRASSER i NELSON 1989 MASON i NELSON 1989a MASON i NELSON 1989b SCHULTZ i JANTZEN 1980 BONINI i współaut. 1991 PRESTON i SAIMI 1990
cGPK — cGMP- zależna kinaza białkowa	77 kDa monomer	cGMP	Ca ²⁺ (mikromolarne stężenia)	cytoplazma rzęskowa cytoplazma komórkowa	LEWIS i NELSON 1980 MACHEMER 1988 SCHULTZ i JANTZEN 1980 MIGLIETTA i NELSON 1988 BONINI i współaut. 1991 PRESTON i SAIMI 1990 KLUMPP i współaut. 1983
CaPK 1 — Ca ²⁺ - zależna kinaza białkowa 1	52 kDa	Ca ²⁺ (pol. max. ef. przy 1 μM)		cytoplazma komórkowa	GUNDERSEN i NELSON 1987 BONINI i współaut. 1991 PRESTON i SAIMI 1990 SCHULTZ i współaut. 1990
CaPK 2 — Ca ²⁺ - zależna kinaza białkowa 2	50 kDa monomer	Ca ²⁺ (mikromolarne stężenia)		cytoplazma komórkowa	GUNDERSEN i NELSON 1987 BONINI i współaut. 1991 PRESTON i SAIMI 1990
Ca ²⁺ CaMPK- Ca ²⁺ - zależna kinaza białkowa*		Ca ²⁺ — kalmodulina	antagoniści kalmoduliny: TFP i W-7	aksonema	IZUMI i NAKAOKA 1987 SATIR 1985 WATANABE i współaut. 1990
CaM — kalmodulina	17 kDa	Ca ²⁺	antagoniści kalmoduliny: TFP i W-7	cytoplazma rzęskowa cytoplazma komórkowa	SCHAEFER i współaut. 1987 WALLEN-FRIEDMAN i współaut. 1988 WALTER i SCHULTZ 1981 BONINI i współaut. 1991 KLUMPP i współaut. 1983 MAHLE i współaut. 1981
Ca ²⁺ — kalmodulino- zależna fosfataza białkowa (kalcyne- uryna)		Ca ²⁺ — kalmodulina	antagoniści kalmoduliny: TFP i W-7	rzęska	KLUMPP i współaut. 1983 BONINI i współaut. 1991 IZUMI i NAKAOKA 1987

*tetrahymena

PODSUMOWANIE

Cykliczne nukleotydy i jony wapnia są podstawowymi czynnikami regulującymi aktywność aksonemy u orzęsków. Te wtórne przekazywniki łączą zmiany potencjału błonowego z modyfikacją ruchu aksonemy, co w konsekwencji daje

zmiany w częstotliwości i orientacji bicia rzęsek, a to z kolei wpływa na modyfikację ruchu komórki.

Wzrost stężenia wapnia w wyniku działania bodźca wywołującego depolaryzację wiąże się z rewersją ruchu rzęski. Bodziec wywołujący hiperpolaryzację błony komórkowej przyspiesza ruch orzęsków do przodu, towarzyszy temu wzrost stężenia cAMP. Fizjologiczna rola cGMP nie jest znana. Swierdzono jednak, że zmiany poziomu tego nukleotydu są konsekwencją depolaryzacji błony komórkowej.

Wapń i cykliczne nukleotydy współdziałają w różnych punktach procesu transdukcji sygnału. Obie cykazy guanylanowa i adenylanowa są zlokalizowane w błonie rzęskowej, ich aktywność jest zależna od wapnia. Oba nukleotydy mają wpływ na funkcjonowanie aksonemy. Zmiany poziomu wewnątrzkomórkowego wapnia modyfikują przewodnictwo błony komórkowej dla różnych jonów, również cykliczne nukleotydy mogą modulować jonowe przewodnictwo błonowe. Takie działanie przypomina kontrolę stanu pobudzenia błony w innych organizmach, sugerując uniwersalny mechanizm, zgodnie z którym wtórne przekaźniki poprzez wzajemną regulację i koordynację kontrolują różnorodne funkcje komórki.

THE REGULATION OF MOTILITY IN CILIATES BY Ca^{2+} AND CYCLIC NUCLEOTIDES

Summary

Ciliates are an useful model for studying signal transduction mechanisms, which couple membrane potential changes with ciliary motility alterations. Increasing evidence indicates that, in the regulatory pathway which controls ciliary activity, second messengers including calcium ions and cyclic nucleotides, cAMP or cGMP, are involved. As a consequence of the cell membrane depolarization an increase of free calcium level in the cell cytoplasm and modification of the frequency and direction of ciliary beating (ciliary reversal) take place. These events in the cell are correlated with changes in the cytoplasmic cGMP level. In contrast to membrane depolarization, hyperpolarizing stimuli cause faster forward swimming of the cell as a result of more effectively oriented and faster ciliary beating. For this kind of ciliate responses cAMP appears to be the second messenger.

Cilium axoneme is tightly coupled with the membrane, therefore communication between these cellular structures may occur by means of second messengers. Changes of intracellular calcium level modify the membrane excitability by modulating of the activity of several ion channels in the membrane. Cyclic nucleotides may also affect membrane ion conductance. In addition calcium, cAMP or cGMP may interact with each other at several points of the signal transduction pathway. The action of these messengers in ciliates resembles the control of membrane excitability in higher organisms. Thus it seems highly probable that there is an universal system where by second messengers are involved in the control of cell function by regulating and coordinating several cellular activities.

LITERATURA

- BONINI N. M., NELSON D. L., 1988. *Differential regulation of Paramecium ciliary motility by cAMP and cGMP*. J. Cell Biol. 106, 1615-1623.
- BONINI N. M., NELSON D. L., 1990. *Phosphoproteins associated with cyclic nucleotide stimulation of ciliary motility in Paramecium*. J. Cell Sci. 95, 219-230.
- BONINI N. M., GUSTIN M. C., NELSON D. L., 1986. *Regulation of ciliary motility by membrane potential in Paramecium, a role for cyclic AMP*. Cell Motil. Cytoskeleton, 6, 256-272.

- BONINI N. M., EVANS T. C., MIGLIETTA L. A. P., NELSON D. L., 1991. *The regulation of ciliary motility in Paramecium by Ca²⁺ and cyclic nucleotides*. [W:] *Adv. Second Messenger Phosphoprotein Res.*, GREENGARD P. i ROBINSON G. A. (red.) Ravell Press, Ltd., New York., 23, 227-272.
- DOUGHTY M. J., DRYL S., 1981. *Control and ciliary activity in Paramecium. An analysis of chemosensory transduction in eukaryotic unicellular organism*. *Progress in Neurobiol.* 16, 1-115.
- DUNLAP K., 1977. *Localization of calcium channels in Paramecium caudatum*. *J. Physiol.* 271, 119-133.
- ECKERT R., 1972. *Bioelectric control of ciliary activity*. *Science* 176, 473-481.
- ECKERT R., BREHM P., 1979. *Ionic mechanisms of excitation in Paramecium*. *Ann. Rev. Biophys. Bioeng.* 8, 353-83.
- EVANS T. C., NELSON D. L., 1989. *The cilia of Paramecium contain both Ca²⁺-dependent and Ca²⁺-inhibitable calmodulin-binding proteins*. *Biochem. J.* 259, 385-396.
- FABCZAK S., FABCZAK H., 1993. *Fotoreakcje u orzęsków Blepharisma i Stentor*. *Postępy Biol. Kom.* 20, suplement 2, 155-163.
- FABCZAK S., FABCZAK H., 1995. *Phototransduction in Blepharisma and Stentor ciliates*. *Acta Protozool.* 34, 1-11.
- FABCZAK H., FABCZAK S., 1994. *Rzęski i wici*. *Biologia w Szkole* 237, 5-12.
- FABCZAK H., PARK P. B., FABCZAK S., SONG P-S., 1993. *Photosensory transduction in ciliates. II. Possible role of G-protein and cGMP in Stentor coeruleus*. *Photochem. Photobiol.* 57(4), 702-706.
- GUNDERSEN R. E., NELSON D. L., 1987. *A novel Ca²⁺-dependent protein kinase from Paramecium tetraurelia*. *J. Biol. Chem.* 262, 4602-4609.
- GUSTIN M. C., NELSON D. L., 1987. *Regulation of ciliary adenylate cyclase by Ca²⁺ in Paramecium*. *Biochem. J.* 246, 337-345.
- GUSTIN M. C., BONINI N. M., NELSON D. L., 1983. *Membrane potential regulation of cAMP, control mechanism for swimming behavior in the ciliate Paramecium*. *Soc. Neurosci. Abst.* 9, 167.
- HAMASAKI T., MURTAUGH T. J., SATIR B. H., SATIR P., 1989. *In vitro phosphorylation of Paramecium axonemes and permeabilized cells*. *Cell Motil. Cytoskeleton* 12, 1-11.
- HELLUNG-LARSEN P., LEICK V., TOMMERUP N., 1986. *Chemoattraction in Tetrahymena, on the role of chemokinesis*. *Biol. Bull.* 170, 357-367.
- HENNESSEY T., KUNG C., 1985. *Slow inactivation of the calcium current of Paramecium is dependent on voltage and not internal calcium*. *J. Physiol. (London)*, 365, 165-179.
- HENNESSEY T., MACHEMER H., NELSON D. L., 1985. *Injected cyclic AMP increases ciliary beat frequency in conjunction with membrane hyperpolarization*. *Eur. J. Cell Biol.* 36, 153-156.
- HINRICHSEN R. D., KUNG C., 1984. *Genetic analysis of axonemal mutants in Paramecium tetraurelia defective in their response to calcium*. *Genet. Res.* 43, 11-20.
- HINRICHSEN R. D., SAIMI Y., KUNG C., 1984. *Mutants with altered Ca²⁺-channel properties in Paramecium tetraurelia, isolation, characterization and genetic analysis*. *Genetics* 108, 545-558.
- HINRICHSEN R. D., SAIMI Y., RAMANATHAN R., BURGESS-CASSLER A., KUNG C., 1985. *A genetic and biochemical analysis of behavior in Paramecium*. [W:] *Sensing and Responses in Microorganisms*, EISENBACH M. i BALABAN M. (red.) Elsevier Science Publishers, New York, 145-157.
- HINRICHSEN R. D., BURGESS-CASSLER A., SOLTVEDT B. C., HENNESSEY T., KUNG C., 1986. *Restoration by calmodulin of a Ca²⁺-dependent K⁺ current missing in a mutant of Paramecium*. *Science* 232, 503-506.
- HIRANO J., WATANABE Y., 1985. *Studies on calmodulin-binding proteins (CaMBPs) in the cilia of Tetrahymena*. *Exp. Cell Res.* 157, 441-450.
- HIRANO-OHNISHI J., WATANABE Y., 1988. *Target molecules of calmodulin on microtubules of Tetrahymena cilia*. *Exp. Cell Res.* 178, 18-24.
- HIRANO-OHNISHI J., WATANABE Y., 1989. *Ca²⁺/calmodulin-dependent phosphorylation of ciliary β -tubulin in Tetrahymena*. *J. Biochem. (Tokyo)* 105, 858-860.
- HOCHSTRASSER M., NELSON D. L., 1989. *Cyclic AMP-dependent protein kinase in Paramecium tetraurelia, its purification and the production of monoclonal antibodies against both subunits*. *J. Biol. Chem.* 264, 14510-14518.
- IZUMI A., NAKAOKA Y., 1987. *cAMP-mediated inhibitory effect of calmodulin antagonist on ciliary reversal of Paramecium*. *Cell Motil. Cytoskeleton* 7, 154-159.
- KINOSITA H., DRYL S., NAITOH Y., 1964. *Relation between the magnitude of membrane potential and ciliary activity in Paramecium*. *J. Fac. Sci. Univ. Tokyo Sect. IV.* 10, 303-309.
- KLUMPP S., KLEEFELD G., SCHULTZ J. E., 1983. *Calcium/calmodulin-regulated guanylate cyclase of the excitable ciliary membrane from Paramecium. Dissociation of calmodulin by La³⁺, Calmodulin specificity and properties of the reconstituted guanylate cyclase*. *J. Biol. Chem.* 258, 12455-12459.

- KLUMPP S., GIERLICH D., SCHULTZ J. E., 1984. *Adenylate cyclase and guanylate cyclase in the excitable ciliary membrane from Paramecium, Separation and regulation.* FEBS Lett. 171, 95–99.
- KUDO S., NAGAO S., MUTO Y., TAKANASHI M., NOZAWA Y., 1986. *Characterization of cyclic AMP and cyclic GMP phosphodiesterases in Tetrahymena cilia.* Comp. Biochem. Physiol. 83B, 99–102.
- KUNG C., SAIMI Y., 1982. *The physiological basis of taxes in Paramecium.* Annu. Rev. Physiol. 44, 519–534.
- LEWIS R. M., NELSON D. L., 1980. *Biochemical studies of the excitable membrane of Paramecium. IV. Protein kinase activities of cilia and ciliary membrane.* Biochim. Biophys. Acta 615, 341–353.
- MACHEMER H., 1988. *Motor control of cilia.* [W:] *Paramecium*, (red.) GORTZ H. D. Springer-Verlag, Berlin, 216–235
- MACHEMER H., BRAUCKER R., 1992. *Gravireception and graviresponses in ciliates.* Acta Protozool. 31, 185–214.
- MACHEMER H., DEITMER J. W., 1985. *Mechanoreception in ciliates.* Progress in Sensory Physiology 5, 81–118.
- MACHEMER H., ECKERT R., 1975. *Ciliary frequency and orientational responses to clamped voltage steps in Paramecium.* J. Comp. Physiol. 104, 247–260.
- MAIHLE N. J., DEDMAN J. R., MEANS A. R., CHAFOULEAS J. G., SATIR B. H., 1981. *Presence and indirect immunofluorescent localization of calmodulin in Paramecium tetraurelia.* J. Cell Boil. 89, 695–699.
- MAJIMA T., HAMASAKI T., ARAI T., 1986. *Increase in cellular cyclic GMP level by potassium stimulation and its relation to ciliary orientation in Paramecium.* Experientia 42, 62–64.
- MASON P. A., NELSON D. L., 1989a. *Cyclic AMP-dependent protein kinases of Paramecium. I. Chromatographic and physical properties of the enzymes from cilia.* Biochim. Biophys. Acta 1010, 108–115.
- MASON P. A., NELSON D. L., 1989b. *Cyclic AMP-dependent protein kinases of Paramecium. II. Catalytic and regulatory properties of type II kinase from cilia.* Biochim. Biophys. Acta 1010, 116–121.
- MATSUOKA T., IMANAKA T., ARITA T., TANEDA K., 1991. *Localization of thermoreceptor systems that induce step-up and step-down thermophobic responses and switching in the dominance of these systems in Blepharisma.* J. Protozool. 38, 335–338.
- MATSUOKA T., TAKAHASHI M., WADA K., TANEDA K., 1992. *Chemosensory response in Blepharisma. I. Accumulation of cells in products of bacterial metabolism.* J. Protozool. 39, 329–333.
- MIGLIETTA L. A. P., NELSON D. L., 1988. *A novel cGMP-dependent protein kinase from Paramecium.* J. Biol. Chem. 263, 16096–16105.
- NAGAO S., SUZUKI Y., WATANABE Y., NOZAWA Y., 1979. *Activation by a calcium-binding protein of guanylate cyclase in Tetrahymena pyriformis.* Biochem. Biophys. Res. Commun. 90, 261–268.
- NAITOH Y., 1968. *Ionic control of the reversal response of cilia in Paramecium caudatum, a calcium hypothesis.* J. Gen. Physiol. 51, 85–103.
- NAITOH Y., KANEKO H., 1972. *Reactivated Triton-extracted models of Paramecium, modification of ciliary movement by calcium ions.* Science 176, 523–524.
- NAKAOKA Y., OKA T., SERIZAWA K., TOYOTAMA H., OOSAWA F., 1983. *Acceleration of Paramecium swimming velocity is effected by various cations.* Cell Struct. Funct. 8, 77–84.
- OGURA A., MACHEMER H., 1980. *Distribution of mechanoreceptor channels in the Paramecium surface membrane.* J. Comp. Physiol. 135, 233–242.
- OHNISHI K., SUZUKI Y., WATANABE Y., 1982. *Studies on calmodulin isolated from Tetrahymena cilia and its localization within cilium.* Exp. Cell Res. 137, 217–227.
- OTTER T., SATIR B. H., SATIR P., 1984. *Trifluoperazine-induced changes in swimming behavior of Paramecium, evidence for two sites of drug action.* Cell Motil. 4, 249–267.
- PECH L. L., 1995. *Regulation of ciliary motility in Paramecium by cAMP and cGMP.* Comp. Biochem. Physiol. 111A, 31–37.
- PRESTON R. R., SAIMI Y., 1990. *Calcium ions and the regulation of motility in Paramecium.* [W:] *Ciliary and Flagellar Membranes*, BLOODGOOD R. A. (red.) Plenum Publishing Corporation, 173–200.
- RAUH J., LEVIN A. E., NELSON D. L., 1980. *Evidence that calmodulin mediates calcium-dependent ciliary reversal in Paramecium.* [W:] *Calcium-Binding Proteins, Structure and Function*, SIEGEL F. L., CARAFOLI E., KRETSINGER R. H., MACLENNAN D. H., WASSERMAN R. H. (red.) Elsevier North Holland, New York. 231–232.
- SAIMI Y., KUNG C., 1980. *A Ca-induced Na-current in Paramecium.* J. Exp. Biol. 88, 305–325.
- SAIMI Y., KUNG C., 1987. *Behavioral genetics of Paramecium.* Annu. Rev. Genet. 21, 47–65.
- SAIMI Y., LING K. -Y., 1990. *Calmodulin activation calcium-dependent sodium channels in excised membrane patches of Paramecium.* Science 249, 1441–1444.

- SATIR P., 1985. *Switching mechanisms in the control of ciliary motility*. [W:] *Modern Cell Biol.* (red.) A. R. Liss, Inc. 4, 1-46.
- SATOW Y., KUNG C., 1980. *Membrane currents of pawn mutants of the pwA group in Paramecium tetraurelia*. *J. Exp. Biol.* 84, 57-71.
- SCHAEFER W. H., LUKAS T. J., BLAIR I. A., SCHULTZ J. E., WATTERSON D. M., 1987. *Amino acid sequence of a novel calmodulin from Paramecium tetraurelia that contains dimethyllysine in the first domain*. *J. Biol. Chem.* 262, 1025-1029.
- SCHULTZ J. E., JANTZEN H. M., 1980. *Cyclic nucleotide-dependent protein kinases from cilia of Paramecium tetraurelia*. *FEBS Lett.* 116, 75-78.
- SCHULTZ J. E., KLUMPP S., 1980. *Guanylate cyclase in the excitable ciliary membrane of Paramecium*. *FEBS Lett.* 122, 64-66.
- SCHULTZ J. E., KLUMPP S., 1982. *Lanthanum dissociates calmodulin from the guanylate cyclase of the excitable membrane from Paramecium*. *FEMS Microbiol. Lett.* 13, 303-306.
- SCHULTZ J. E., KLUMPP S., 1983. *Adenylate cyclase in cilia from Paramecium. Localization and partial characterization*. *FEBS Lett.* 154, 347-350.
- SCHULTZ J. E., KLUMPP S., 1984. *Calcium/ calmodulin- regulated guanylate cyclases in the ciliary membranes from Paramecium and Tetrahymena*. [W:] *Adv. Cyclic Nucleotide Protein Phosphorylation Res.*, GREENGARD P., ROBINSON G. A., PAOLETTI R., NICOSIA S. (red.) Raven Press, Ltd, New York, 17, 275-283.
- SCHULTZ J. E., KLUMPP S., 1988. *Biochemistry of cilia* [W:] *Paramecium*. GORTZ H. D. (red), Springer-Verlag, Berlin, 254-270.
- SCHULTZ J. E., KLUMPP S., 1993. *Cyclic nucleotides and calcium signalling in Paramecium*. [W:] *Advances in Second Messenger and Phosphoprotein Res.*, SHENOLIKAR S., NAIRN A. C. (red.), Raven Press, Ltd., New York, 27, 25-46.
- SCHULTZ J. E., POHL T., KLUMPP S., 1986. *Voltage-gated Ca²⁺ entry into Paramecium linked to intraciliary increase of cyclic GMP*. *Nature (London)* 322, 271-273.
- SCHULTZ J. E., UHL D. G., KLUMPP S., 1987. *Ionic regulation of adenylate cyclase from the cilia of Paramecium tetraurelia*. *Biochem. J.* 246, 187-192.
- SCHULTZ J. E., KLUMPP S., HINRICHSSEN R. D., 1990. *Calcium and membrane excitation in Paramecium*. [W:] *Calcium as an Intracellular Messenger in Eucaryotic Microbes*. O'DAY D. H. (red.) American Society for Microbiology, Washington, D. C., 124-150.
- SCHULTZ J. E., KLUMPP S., BENZ R., SCHURHOFF- GOETERS W. J. Ch., SCHMID A., 1992. *Regulation of adenylate cyclase from Paramecium by an intrinsic potassium conductance*. *Science* 255, 600-602.
- TAKEMASA T., OHNISHI K., KOBAYASHI T., TAKAGI T., KONISHI K., WATANABE Y., 1989. *Cloning and sequencing of the gene for Tetrahymena calcium-binding protein 25-kDa (TCBP-25)*. *J. Biol. Chem.* 264, 19239-19301.
- TAKEMASA T., TAKAGI T., KOBAYASHI T., KONISHI K., WATANABE Y., 1990. *The third calmodulin family protein in Tetrahymena, cloning of the cDNA for Tetrahymena calcium-binding protein of 23 kDa (TCBP-23)*. *J. Biol. Chem.* 265, 2514-2517.
- TRAVIS S. M., NELSON D. L., 1988. *Regulation of axonemal Mg²⁺-ATP-ase from Paramecium cilia, effects of Ca²⁺ and cyclic nucleotides*. *Biochim. Biophys. Acta* 966, 84-93.
- VAN HOUTEN J., 1988. *Chemoresponse mechanisms, toward the molecular level*. *J. Protozool.* 35, 241-243.
- WALCZAK C. E., NELSON D. L., 1994. *Regulation of dynein-driven motility in cilia and flagella*. *Cell Motil. Cytoskeleton* 27, 101-107.
- WALLEN-FRIEDMAN M. A., PRESTON R. R., SAIMI Y., KUNG C., 1988. *A possible calmodulin regulatory pathway is revealed in a calmodulin mutant of Paramecium tetraurelia*. *J. Cell Biol.* 107, 287a (Abst.).
- WALTER M. F., SCHULTZ J. E., 1981. *Calcium receptor protein calmodulin isolated from cilia and cells of Paramecium tetraurelia*. *Eur. J. Cell. Biol.* 24, 97-100.
- WATANABE Y., HIRANO-OHNISHI J., TAKEMASA T., 1990. *Calcium-binding proteins and ciliary movement regulation in Tetrahymena*. [W:] *Calcium as an Intracellular Messenger in Eucaryotic Microbes*. O'DAY D. H. (red.) American Society for Microbiology, Washington, D. C., 124-150.
- WOOD D. C., 1982. *Membrane permeabilities determining resting, action and mechanoreceptor potentials in Stentor coeruleus*. *J. Comp. Physiol.* 146, 537-550.
- WOOD D. C., 1991. *Electrophysiology and Photomovement of Stentor*. [W:] *Biophysics of Photoreceptors and Photomovements in Microorganisms*. LENCI F. (red.) Plenum Press, New York, 281-291.
- WOOD D. C., 1993. *Excitation-contraction coupling in Stentor*. *Intern. Congress of Protozool. Berlin. Abstr.*