

METODY POMIARU WOLNEGO WAPNIA I ICH PRAKTYCZNE ZASTOSOWANIE W FIZJOLOGII I CYTOLOGII ROŚLIN¹

Methods of free calcium measurement and their practical application in plant physiology and cytology

Andrzej TRETYN*

Summary. In both animals and plants calcium plays a vital role as an intracellular second messenger. Inside resting cells free cytosolic calcium ($[Ca^{2+}]_c$) is maintained at very low levels, being about 10 000 times less concentrated than in the environment. After stimulation of an eukaryotic cell a rapid increase in $[Ca^{2+}]_c$ is reported. The development of new methods for measuring free calcium initiated a revolution in the study of cellular Ca^{2+} homeostasis in animals. In contrast to animal cells in which the measurement of $[Ca^{2+}]_c$ is widely practiced, the determination of free cytosolic calcium in plants is much more difficult. In this paper some of the problems encountered in measuring $[Ca^{2+}]_c$ in plant cells are discussed. There are many different methods used for the determination of free cytosolic Ca^{2+} and photoproteins, calcium fluorescence dyes and Ca^{2+} -sensitive microelectrodes are all commonly used. Over the past two decades photoproteins (especially aequorin) have been applied to the measurement of $[Ca^{2+}]_c$ in animals. In this paper the molecular properties of the photoproteins used and their application for free calcium measurement in plant cells are outlined. More recently calcium fluorescent dyes have proved the most suitable for determining of $[Ca^{2+}]_c$, both in resting and stimulated cells. Detailed information concerning chemical structures and physico-chemical properties of the dyes are also presented in this paper. Finally, the fabrication, calibration and application of calcium-selective microelectrodes in plant science is also described.

Key words: calcium (measurement), calcium-selective microelectrodes, fluorescence indicators, photoproteins

Prof. dr hab. Andrzej Tretyn, Uniwersytet M. Kopernika, Instytut Biologii, Zakład Fizjologii i Morfogenezy Roślin, Gagarina 9, 87–100, Toruń.

WSTĘP

Od wielu lat obserwuje się wzrost zainteresowania botaników udziałem jonów wapnia w regulacji wzrostu i rozwoju roślin. Wykazano, że kation ten może uczestniczyć między innymi w mechanizmie działania hormonów roślinnych [31], reakcjach roślin na światło [56], pole grawitacyjne [29] oraz patogenne mikroorganizmy [32].

W zależności od typu tkanki wewnątrzkomórkowe stężenie Ca^{2+} u roślin wynosi od

0.1 do 10 μM [18]. Kation ten może występować w formie wolnej (oznaczanej jako $[Ca^{2+}]_c$) i soli powstających w połączeniu ze związkami nieorganicznymi (fosforany, węglany) i organicznymi (ATP, szczawiany) oraz związanej z rozpuszczalnymi białkami (np. kalmoduliną) i powierzchnią różnych struktur wewnątrzkomórkowych.

Tylko niewielka ilość całkowitego wapnia uczestniczy w regulacji metabolizmu, wzrostu i rozwoju roślin. Tę pulę biologicznie aktywnego Ca^{2+} określa się jako „wolny cytoplazmatyczny wapń” (ang. free cytosolic calcium, $[Ca^{2+}]_c$).

¹ Praca powstała w trakcie realizacji Grantu 6-6-68-92-03 finansowanego przez Komitet Badań Naukowych (KBN).

W wyniku działania różnych czynników na organizmy roślinne w ich komórkach obserwuje się wzrost zawartości wolnego Ca^{2+} . Po okresie wzbudzenia wapń usuwany jest z cytoplazmy na zewnątrz protoplastu lub „pompowany” do wnętrza różnych struktur komórkowych. Uchwycenie tych przejściowych zmian poziomu $[\text{Ca}^{2+}]$ wymaga stosowania odpowiednio czułych metod pomiarowych. Poniżej omówione zostaną niektóre z nich oraz ich zastosowania w badaniach prowadzonych nad różnymi procesami zachodzącymi u roślin z udziałem jonów wapnia.

METODY POMIARU WOLNEGO Ca^{2+}

Zainteresowanie mechanizmem działania jonów wapnia u zwierząt doprowadziło do opracowania kilku typów metod służących jego pomiarowi *in vivo*, w cytoplazmie żywych komórek. Metody te, po niewielkich modyfikacjach, znalazły zastosowanie, w kilka do kilkanastu lat później w badaniach prowadzonych na materiale roślinnym.

Pierwszego pomiaru wolnego cytoplazmatycznego wapnia ($[\text{Ca}^{2+}]_c$) dokonano w 1967 w komórkach mięśniowych za pomocą tzw. fotoproteiny – akweryny [45]. Pietnaście lat później metodę tę użyto do pomiarów $[\text{Ca}^{2+}]_c$ w komórkach roślinnych; zielenicy *Nitella* [65]. Pod koniec lat siedemdziesiątych Ashley i Campbell (patrz [14]) dokonali pomiaru wolnego cytoplazmatycznego wapnia w komórkach zwierzęcych za pomocą jonoselektywnej mikroelektrody. Metoda ta znalazła stosunkowo szybko, na początku lat osiemdziesiątych, zastosowanie w fizjologii roślin (patrz [21]). Ostatnio do pomiarów $[\text{Ca}^{2+}]$ używa się przede wszystkim różnego typu fluorescencyjnych wskaźników wapnia, takich jak Quin-2 [58–61], Indo-1 i Fura-2 [27] oraz Rhod-2 i Fluo-3 [41] Keith i inni [33], Brownlee i wsp. [5–7, 13] oraz Gilroy i inni [25] jako pierwsi użyli wspomnianych związków do badań prowadzonych na systemach roślinnych.

FOTOPROTEINY – AKWERYNA

Fotoproteiny to grupa białek występujących w komórkach niektórych pierwotniaków i zwie-

rząt bezkręgowych [3–4, 14–15]. U organizmów wielokomórkowych fotoproteiny gromadzone są na terenie tzw. fotocytów. W wyniku aktywacji cząsteczka fotoproteiny emituje fotony o określonej długości fali. Chociaż proces ten obserwuje się w środowisku pozbawionym Ca^{2+} wiązanie się jonów wapnia z fotoproteinami w znaczny sposób podwyższa intensywność bioluminescencji [3]. Ta cecha omawianej grupy białek umożliwiła ich zastosowanie do pomiarów cytoplazmatycznego poziomu wapnia w komórkach pozamacierzystych [3].

Obecnie znanych jest kilka różnych fotoprotein, z których akweryna należy do najczęściej stosowanych w pomiarach $[\text{Ca}^{2+}]_c$. Natywne akweryna jest mieszaniną osmiu izoform, o różnej wrażliwości na działanie wapnia [4]. Omawiana fotoproteina zbudowana jest z pojedynczego, 21 kDa polipeptydu, do którego ściśle przyłączona jest imidazolopirazynowy chromofor. Apoproteina akweryny posiada trzy miejsca, w których zachodzi wiązanie jonów wapnia. Bioluminescencja akweryny indukowana jest w wyniku utleniania grupy chromoforowej. Proces ten może zachodzić w środowisku pozbawionym jonów wapnia. Jednakże w wyniku wzrostu cytoplazmatycznego stężenia Ca^{2+} , z 100 nM do 10 μM , intensywność światła emitowanego przez cząsteczki akweryny wzrasta o pięć rzędów wielkości [4].

Ponieważ potrzebny do utleniania grupy chromoforowej tlen gromadzony jest przez białko akweryny indukowaną wzrostem $[\text{Ca}^{2+}]_c$ bioluminescencję fotoproteiny obserwuje się także w warunkach beztlenowych, jak również w środowisku pozbawionym ATP [3]. Maksimum emisji promieniowania świetlnego akweryny rejestruje się w niebieskim zakresie widma, przy 469 nm, a wydajność kwantowa tego procesu wynosi 0.15 [4]. Energia niezbędna do wzbudzenia emisji fotonów pochodzi z oksydacyjnej degradacji grupy chromoforowej. Z tego powodu każda cząsteczka akweryny może tylko być jednorazowo użyta do pomiaru Ca^{2+} . Przypuszcza się, że w organizmach macierzystych, z których izolowane są fotoproteiny, następuje odnowa tych substancji poprzez wymianę utlenionej grupy chromoforowej na natywną. Usu-

nięciu w warunkach *in vitro* Ca^{2+} z apoproteiny (poprzez inkubację w roztworze EGTA) towarzyszy oddysocjowanie od niej utlenianej grupy chromoforowej. W środowisku pozbawionym jonów wapnia, w obecności tlenu i β -merkaptoetanolu do białka akweryny można wprowadzić sztucznie zsyntetyzowaną grupę chromoforową. Uzyskana tą drogą półsyntetyczna fotoproteina nie różni się swymi luminescencyjnymi właściwościami od białka izolowanej z fotocytów meduzy *Aequorea forskalea* [3–4]. Zastosowanie zmodyfikowanych, syntetycznie wytworzonych grup chromoforowych pozwala na wielokrotny wzrost indukowanej wiązaniem jonów wapnia bioluminescencji półsyntetycznej akweryny [36, 49–51].

WPROWADZANIE AKWERYNY DO KOMÓREK I POMIAR LUMINESCENCJI

Akweryna jest stosunkowo dużym białkiem, posiadającym silny ładunek ujemny. Z tego powodu jej cząsteczkami są niezdolne do przenikania przez błonę komórkową. Cząsteczki tej fotoproteiny można wprowadzać do cytoplazmy badanych komórek jedynie stosując odpowiednie metody (patrz [14]). Najczęściej do tego celu używa się technikę mikroiniekcji. Względnie wysoki ciężar cząsteczkowy akweryny ma też swoje zalety. W porównaniu do innych stosowanych wskaźników wolnego wapnia, fotoproteiny nie dyfundują z cytoplazmy podstawowej do obłonionych struktur subkomórkowych.

Akweryna jest bardzo stabilnym białkiem. Jej roztwór zamrożony do temperatury -70°C może być przechowywany przez wiele miesięcy. Aktywność fotoproteiny nie ulega istotnym zmianom w wyniku wielokrotnego zamrażania i rozmrażania preparatu.

Wprowadzona do obcych komórek akweryna podlega powolnej degradacji. Jest to prawdopodobnie spowodowane brakiem sekwencji aminokwasowych odpowiadających za degradację tego białka przez cytozolowe proteazy [4]. W komórkach spoczynkowych akweryna może utrzymywać się na terenie cytoplazmy nawet przez kilka tygodni [3]. Przy bardzo niskim cytoplazmatycznym poziomie wolnego Ca^{2+} tylko niewielka część jednorazowo wprowadzo-

nej fotoproteiny ulega wysyceniu przez jony wapnia. Po stymulacji komórki, do której wprowadzono akwerynę jedynie niewielka liczba jej cząsteczek wiąże się z uwalnianym do cytoplazmy Ca^{2+} i ulega nieodwracalnej oksydacji [3].

Bioluminescencję akweryny można jedynie mierzyć przy użyciu odpowiednio czułych fotopowielaczy. Ich zastosowanie pozwala na prowadzenie oznaczeń Ca^{2+} w przedziale stężeń tego kationu występującego w cytoplazmie komórek spoczynkowych i poddanych stymulacji: od 0.1 do 10 μM [3–4, 14–15].

ZASTOSOWANIE AKWERYNY DO POMIARÓW WOLNEGO WAPNIA W KOMÓRKACH ROŚLINNYCH

Williamson i Ashley [65] jako pierwsi wykazali, że stymulacji komórek roślinnych towarzyszą zmiany poziomu $[\text{Ca}^{2+}]_c$. W swojej pionierskiej pracy badacze ci wstrzykiwali do komórek glonu *Nitella* akwerynę, a następnie stymulując je elektrycznie wywoływali powstawanie potencjałów czynnościowych. Stwierdzono, że depolaryzacji błony komórkowej *Nitella* towarzyszy szybki wzrost $[\text{Ca}^{2+}]_c$, z około 200–400 nM w stanie spoczynku do 6–40 μM po stymulacji. W następstwie tego procesu obserwowano zwolnienie, a nawet całkowite zahamowanie ruchów cytoplazmy. Po szybkim, skokowym, wzroście Ca^{2+} następował powolny, trwający od 40 do 60 sekund spadek poziomu wolnego cytoplazmatycznego Ca^{2+} [65].

Stosując podobną, do wyżej opisanej, metodę pomiaru $[\text{Ca}^{2+}]_c$ Callahan i Hepler [10] ustalili ostatnio, że wzrost poziomu jonów wapnia w komórkach *Nitella* jest znacznie szybszy niż opisany przez Williamsona i Ashleya [65] i wynosi zaledwie 50–70 milisekund od wyzwolenia potencjału czynnościowego. Spadek $[\text{Ca}^{2+}]_c$ był natomiast powolny i osiągał poziom wyjściowy w przeciągu 60 sekund od chwili stymulacji komórki. Callaghan i Hepler [10] stwierdzili ponadto, że wznowienie ruchu cytoplazmy następuje w 20–30 sekund po zaindukowaniu potencjału czynnościowego, to jest jeszcze przed powrotem $[\text{Ca}^{2+}]_c$ do poziomu wyjściowego.

Od kilku lat Trewavas i wsp. rutynowo stosują akwerynę do pomiarów $[\text{Ca}^{2+}]_c$ w komór-

kach transgenicznego tytoniu [34–36] Wyizolowany z komórek *Aequorea* gen kodujący apoproteinę akweryny wprowadzono za pomocą bakterii *Agrobacterium tumefaciens* do komórek dysków liściowych *Nicotiana plumbaginifolia*. Zregenerowane siewki tytoniu produkowały białko akweryny. Dodanie do pożywki, na której rosły transgeniczne rośliny, syntetycznego chromoforu powodowało pojawienie się w ich komórkach funkcjonalnych cząsteczek akweryny [34]. Uzyskane tą drogą transgeniczne rośliny, zawierające w swych komórkach cząsteczki akweryny, użyto do badania wpływu różnych bodźców na zmiany zawartości wolnego cytoplazmatycznego wapnia.

Stosując pomiary bioluminescencji kompleksu akweryny- Ca^{2+} Knight i inni wykazali, że dotyk, szok termiczny i grzybowe elicytory [34] oraz ruch powietrza [35] powodują skokowy wzrost $[\text{Ca}^{2+}]_c$ w komórkach badanej rośliny. Wysoka temperatura praktycznie nie wpływała na poziom cytoplazmatycznego wapnia [34]. Natomiast niska temperatura stymulowała bardzo szybki wzrost i spadek $[\text{Ca}^{2+}]_c$. Działanie elicytorów grzybowych powodowało, że po szybkim wzroście $[\text{Ca}^{2+}]_c$ następował znacznie powolniejszy jego spadek [34].

Wywołujący ruch rośliny wiatr powodował szybki, kilkusekundowy skok $[\text{Ca}^{2+}]_c$ o amplitudzie zależnej od siły bodźca [35]. W przypadku wielokrotnie powtarzanej stymulacji obserwowano stopniowy spadek amplitudy skoków $[\text{Ca}^{2+}]_c$. Poddawanie rośliny ruchom powietrza nie wpływało na zmiany jej odpowiedzi na szok termiczny. Sugerowało to, że wiatr i niska temperatura uwalniają jony wapnia z odrębnych magazynów [35]. Badania przeprowadzone z użyciem blokerów kanałów wapniowych w pełni potwierdziły tę hipotezę. Blokery plazmalemowych kanałów wapniowych: lantan i gadolin całkowicie hamowały powstawanie stymulowanych szokiem termicznym skoków $[\text{Ca}^{2+}]_c$. Jednakże związki te nie wpływały na przebieg indukowanych przez wiatr skokowych zmian zawartości jonów wapnia w cytoplazmie komórek tytoniu [35]. Działanie czerwieni rutenowej (inhibitora endomembranowych kanałów wapniowych) było odwrotne do opisanego. Na podsta-

wie wyników przedstawionych doświadczeń można przypuszczać, że indukowane niską temperaturą skokowe podwyższenie $[\text{Ca}^{2+}]_c$ wynika z aktywacji plazmalemowych kanałów wapniowych i pobierania jonów wapnia z roztworu zewnątrzkomórkowego. Wiatr może stymulować wzrost cytoplazmatycznego poziomu wapnia poprzez jego mobilizację z wewnątrzkomórkowych magazynów [35].

Ostatnio Knight i inni [36] użyli bardzo czułej fotopowielającej kamery połączonej z mikroskopem świetlnym do obserwacji zmian $[\text{Ca}^{2+}]_c$ zachodzących w indywidualnych komórkach i poszczególnych tkankach transformowanego tytoniu. Stosując tę technikę autorzy wykazali, że w odpowiedzi na obniżenie temperatury podwyższenie poziomu wolnego cytoplazmatycznego wapnia obserwuje się na terenie liścieni i korzeni, przy jednoczesnym braku reakcji na ten bodziec w komórkach hypokotyli [36]. Okazało się, że w wyniku zranienia powstające lokalne zmiany $[\text{Ca}^{2+}]_c$ rozprzestrzeniają się na inne komórki tkanki, często bardzo oddalone od tego miejsca [36]. Zastosowanie różnych syntetycznych grup pozwoliło na podwyższenie czułości akweryny na cytoplazmatyczny wapń i pozwoliło na kalibrację poziomu tego kationu *in situ* [36].

MIKROELEKTRODY WAPNIOWE

W latach siedemdziesiątych do pomiarów wolnego wapnia w komórkach zwierzęcych zaczęto stosować jonoselektywne mikroelektrody wapniowe [1–2, 43]. Stosunkowo szybko ta metoda pomiaru $[\text{Ca}^{2+}]$ znalazła zastosowanie w doświadczeniach prowadzonych na systemach roślinnych (patrz [21]). Mikroelektrody wapniowe można stosować zarówno do badania błonowego transportu Ca^{2+} oraz zawartości tego kationu w cytoplazmie, jak i w przestrzeni pozakomórkowej. Tego typu elektrody mogą być również używane do manipulacji $[\text{Ca}^{2+}]_c$. W pewnych typach doświadczeń jonoselektywne mikroelektrody w dalszym ciągu wydają się być niezastąpione.

Szczyt omawianej elektrody wapniowej wypełniony jest jonoselektywnym ligandem, od-

sforowego (IOPP plus DOPP) lub pod tym względem neutralne związki: ETH 1001 lub ETH 129 [21]. Firma Flucka oferuje gotowe do użycia mieszaniny (tzw. koktajle) sprzedawane pod zastrzeżoną nazwą jako Selectophore. Mikroelektrody wypełnione wspomnianymi nośnikami wykazują dużą specyficzność względem Ca^{2+} w porównaniu do Na^+ i K^+ (IOPP plus DOPP) oraz Mg^{2+} i H^+ (ETK 1001) [1, 2, 21]. W celu podwyższenia stabilności nośnika Ca^{2+} wypełniającego wierzchołek mikroelektrody do lipofilnej mieszaniny dodaje się również chlorku poliwinylu (PVC). Jest to szczególnie wskazane w przypadku badania komórek o dużym turgorze [21].

Wierzchołek mikropipetki najlepiej napełniać wymienionymi mieszaninami za pomocą bardzo cienkiej i długiej kapilary szklanej połączonej ze strzykawką. Najwygodniej jest czynność tę wykonywać pod kontrolą mikroskopu świetlnego.

Przygotowaną mikroelektrodę poddaje się kalibracji dodając do zbuforowanego roztworu o pH 7 i zawierającego 5 mM EGTA (specyficzny chelator Ca^{2+} , kwas etanodioksybisetyloamino – *N, N, N', N'*-czterooctowy) oraz KCl, NaCl, MgCl_2 w ilościach występujących w cytoplazmie podstawowej, odpowiednich ilości CaCl_2 . Przekładając mikroelektrodę do roztworów zawierających odpowiednie ilości wolnego Ca^{2+} wyznacza się krzywą kalibracyjną na podstawie, której odczytywać się będzie wyniki pomiarów $[\text{Ca}^{2+}]_c$. Po zakończeniu tej czynności mikroelektrodę poddaje się rekaliibracji i wprowadza do badanej komórki. Po zakończeniu indywidualnego lub serii pomiarów najlepiej jest powtórzyć czynność kalibracji.

Ponieważ jonoselektywne mikroelektrody charakteryzują się dużą opornością ($> 10^{11}$ oma) mogą być one jedynie połączone z wzmacniaczami charakteryzującymi się dużą opornością wejściową (10^{15} oma) oraz niskim prądem upływu (rzędu 10^{-14} ampera). W celu równoległego rejestrowania aktywności jonowej Ca i potencjału błonowego do badanej komórki należy wprowadzić dodatkową, standardową mikroelektrodę. Stosując tzw. podwójną mikroelektrodę (ang. double-barrelled), zbudowaną z dwu połą-

czonych ze sobą mikroelektrod, przy jednoczesnym ich wprowadzeniu do komórki można równolegle dokonywać pomiar aktywności Ca^{2+} oraz potencjału błonowego [21].

PRZYKŁADY ZASTOSOWAŃ JONOSELEKTYWNYCH ELEKTROD WAPNIOWYCH

Ponieważ mikroelektrody wapniowe były bardzo często używane do badań różnych procesów zachodzących u roślin z udziałem wolnego wapnia ograniczymy się do krótkiego omówienia niektórych z nich.

Omawiana technika pomiaru $[\text{Ca}^{2+}]_c$ była szeroko stosowana w pracowni H. Fellego. Autor ten wykazał, że w epidermalnych komórkach koleoptyli kukurydzy poziom wolnego Ca^{2+} wynosi około 120 nM. Dodanie do środowiska inkubacyjnego 1 μM kwasu indolilo-3-octowego (IAA) powodowało pojawienie się w cytoplazmie oscylacyjnych zmian zawartości tego kationu o fazie wahającej się od 20 do 30 minut. Zmiany w zawartości Ca^{2+} nie były natychmiastowe lecz pojawiały się około 5 minut po potraktowaniu wycinków koleoptyli roztworem auksyny [20]. Tretyn i inni [57] stwierdzili, że stymulowane przez IAA szybkie zmiany potencjału błonowego poprzedzone są zmianami $[\text{Ca}^{2+}]_c$. Użyty fitohormon powodował obniżenie się zawartości wolnego wapnia w cytoplazmie komórek włóśnikowych gorczyicy [57]. Depolaryzacja błony komórkowej włóśników hamowana była przez blokery kanałów wapniowych oraz przez heparynę [54]. Używając wspomniany materiał badawczy, włóśniki korzeni gorczyicy, Felle i inni [22] przeprowadzili rozległe badania na temat homeostazy cytoplazmatycznego Ca^{2+} i roli plazmolemowej ATP-azy wapniowej w regulacji tego procesu.

Za pomocą jonoselektywnej mikroelektrody Brownlee i Wood [7] oraz Tretyn i inni [57] potwierdzili istnienie gradientu jonów wapnia w dwóch typach szczytowo rosnących komórkach, w ryzoidach morskczynu i komórkach włóśnikowych gorczyicy.

FLUORESCENCYJNE WSKAŹNIKI WAPNIA

Fluorescencyjne wskaźniki Ca^{2+} charakteryzują się tym, że w wyniku ich traktowania światłem o długości fal krótszych od tzw. widma wzbudzenia fluorescencji emitują promieniowania o charakterystycznej dla nich długości (widmo emisji fluorescencji). Oddziaływanie wskaźnika z Ca^{2+} prowadzi do zmian intensywności jego fluorescencji lub/i przesunięcia w widmie emisyjnym bądź powoduje przesunięcie w widmie wzbudzenia tego związku. Analiza wymienionych parametrów pozwala na ilościowe oznaczanie Ca^{2+} w cytoplazmie żywych komórek.

QUIN-2, INDO-1, FURA-2

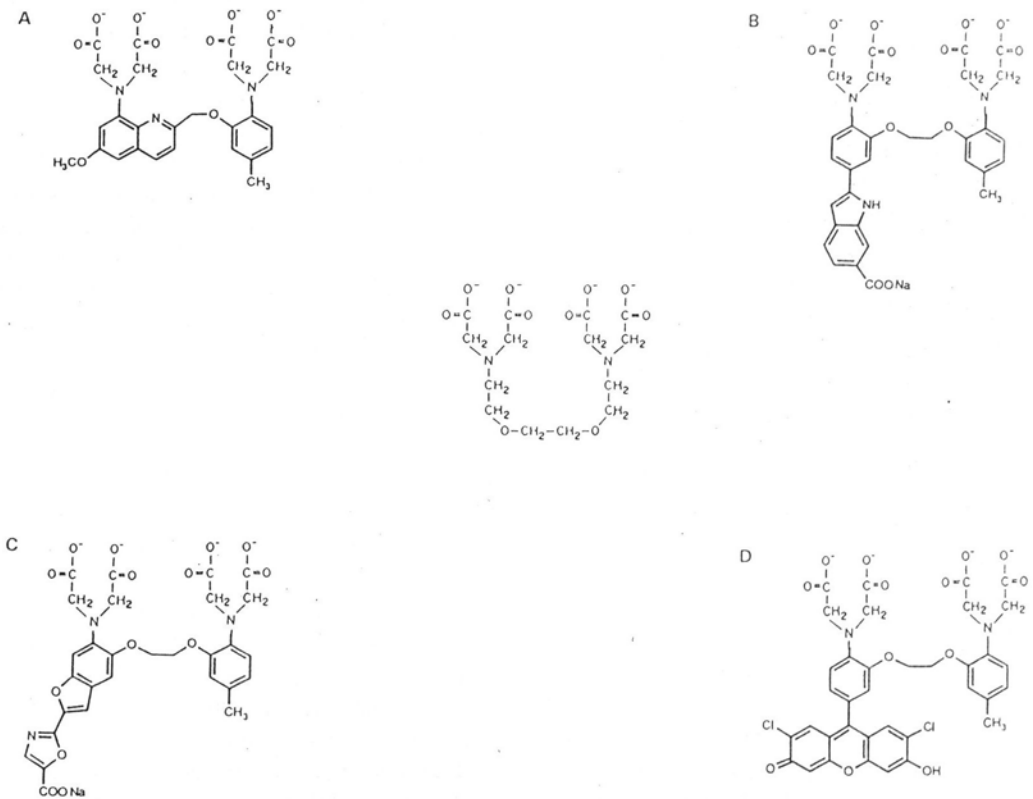
W roku 1980 R. Y. Tsien [58] opublikował pracę, w której opisał syntezę, fizyko-chemiczne właściwości i biologiczne zastosowanie pierwszego fluorescencyjnego wskaźnika wapnia. Związek ten zsyntetyzowany został na bazie chelatora Ca^{2+} , kwasu etanodioksybisetyloamino-*N, N, N', N'*-czterooctowy (EGTA) (Rys. 1). W wyniku zamiany występujących pomiędzy atomami tlenu i azotu wiązań metylenowych przez pierścienie benzenowe uzyskano kwas 1,2-bis-(*o*-aminofenoksy)-etano-*N, N, N', N'*-czterooctowy, BAPTA. Otrzymany związek pod wieloma względami przewyższał EGTA. W stosunku do tego ostatniego BAPTA wykazuje 10-krotnie wyższą selektywność w wiązaniu Ca^{2+} w porównaniu do Mg^{2+} , a na chelatowanie jonów wapnia przez ten związek w małym stopniu ma wpływ pH środowiska pomiarowego. W wyniku wiązania się jonów wapnia z BAPTA następują zmiany w jego widmie fluorescencyjnym. Ponieważ zjawisko to obserwuje się jedynie w ultrafioletowym zakresie fal świetlnych używanie BAPTA do pomiarów wolnego cytoplazmatycznego wapnia jest bardzo ograniczone. Dlatego też do omawianego związku wprowadzono dodatkową grupę chromoforową. W ten sposób uzyskano zbudowany z pierścienia chinolowego i połączonych z nim dwu grup iminodwukarboksylowych pierwszy fluorescencyjny wskaźnik jonów wapnia – Quin-2 (Ryc. 1) [58].

W koordynacyjnym wiązaniu jonów wapnia uczestniczą atomy tlenu grup karboksylowych oraz atomy azotu grup iminodwukarboksylowych Quin-2, które oddziaływując z Ca^{2+} stymulują przenoszenie elektronów z tego kationu na przyległy pierścień chinolowy wskaźnika. Powstające w wyniku wiązania Ca^{2+} zmiany w układzie elektronowym Quin-2 prowadzą do wzbudzenia fluorescencji chinoliny i emisji promieniowania świetlnego. Wzbudzenie kompleksu Quin- Ca^{2+} następuje przy 339 nm, natomiast maksimum emisji fluorescencji obserwuje się przy 492 nm (Tabela 1). Przy 360 nm wzbudzenie fluorescencji omawianego związku nie zależy od obecności wolnego wapnia w środowisku pomiarowym (tzw. punkt izofluorescencyjny). Wiązaniu się jonów wapnia z Quin-2 powoduje 7-krotny wzrost jego fluorescencji. Quin-2 wiąże się z Ca^{2+} w stosunku stechiometrycznym jak 1 : 1 [60–61].

Cechą ograniczającą stosowanie Quin-2 do pomiarów wolnego wapnia jest zarówno niski współczynnik absorpcji tego związku, jak i niska wydajność kwantowa jego fluorescencji. Ponadto niska stała dysocjacji ($K_d = 126 \text{ nM}$) nie pozwala używać Quin-2 do pomiarów $[\text{Ca}^{2+}]$ wyższych od $1 \mu\text{M}$.

Przewagę fluorescencji kompleksu Quin-2- Ca^{2+} nad poziomem tła (autofluorescencji preparatu) obserwuje się jedynie gdy cytoplazmatyczne stężenie wskaźnika przekroczy 0.5 mM [15]. Przy tak wysokim poziomie Quin-2 wewnątrz komórki może dochodzić do buforowania przez ten związek cytoplazmatycznego Ca^{2+} i powstawania efektów ubocznych.

Wprowadzone w połowie lat osiemdziesiątych Indo-1 i Fura-2 (Rys. 1) zsyntetyzowane zostały na bazie Quin-2, lecz posiadały wiele właściwości przewyższających ten fluorescencyjny wskaźnik Ca^{2+} [27]. Znacznie wyższy w porównaniu do Quin-2 współczynnik absorpcji i wydajności kwantowej wymienionych wskaźników powoduje, że intensywność ich fluorescencji jest około 30 razy wyższa w stosunku do Quin-2. Dla uzyskania sygnału przekraczającego poziom autofluorescencji potrzebne jest jedynie 20–30 mikromolowe cytoplazmatyczne stężenie Fura-2 i Indo-1 [15]. Stałe



Ryc. 1. Porównanie struktury chemicznej EGTA (w środku) z podobną strukturą fluorescencyjnych wskaźników wapnia: Quin-2 (A); Fura-2 (B); Indo-1 (C) i Fluo-3 (D).

Fig. 1. Comparison of the chemical structure of EGTA (centre) with the structures of the calcium fluorescent dyes: Quin-2 (A); Fura-2 (B); Indo-1 (C) and Fluo-3 (D).

dysocjacji dla Fluo-2 i Indo-1 wynoszą odpowiednio 224 i 250 nM co umożliwia prowadzenie pomiarów $[Ca^{2+}]$ przekraczających $1 \mu M$. Obydwa te związki, w porównaniu do Quin-2 są mniej wrażliwe na obecność jonów magnezowych w środowisku pomiarowym. Ponadto ich fluorescencja nie podlega tak szybkiemu wygaszaniu jak w przypadku Quin-2. Podobnie do tego wskaźnika, Fura-2 i Indo-1 wiążą Ca^{2+} w stosunku stechiometrycznym 1 : 1 [27].

W porównaniu do wolnej formy związku, chelatowaniu jonów wapnia przez Fura-2, towarzyszy przesunięcie maksimum absorpcji

(wzbudzenia fluorescencji) z 362 do 335 nm i jednocześnie, około 10-krotny spadek tej wartości przy 380 nm. Maksimum emisji wolnego i związanego z Ca^{2+} Fura-2 obserwuje się odpowiednio przy 512 i 505 nm (Tabela 1). Duże różnice w widmie absorpcyjnym i małe w emisyjnym wolnej i związanej z Ca^{2+} formy Fura-2 powodują, że pierwsza z tych cech wykorzystywana jest do pomiarów wolnego wapnia. Dla optymalnego rozgraniczenia fluorescencji wolnej i związanej formy wskaźnika stosuje się dwa pasma wzbudzenia: przy 380 i 340 nm. Punkt izofluorescencji dla Fura-2 rejestruje się przy 360

nm [52]. Fluorescencja Fura-2 ulega wygaszaniu w wyniku wiązania kationów metali ciężkich (najczęściej do tego celu stosuje się Mn^{2+}).

Fura-2 idealnie nadaje się do badań $[Ca^{2+}]_c$ w pojedynczych komórkach, które prowadzi się można na stosunkowo prostych mikroskopach epifluorescencyjnych (umożliwiających szybkie zmiany filtrów wzbudzeniowych). Badania ilościowe i tworzenie imidży (angielskie słowo „image” nie posiada w języku polskim odpowiedniego tłumaczenia) tj. ilościowo-przestrzennieczasowych odwzorowań zmian $[Ca^{2+}]_c$ wymaga dodatkowego, często skomplikowanego i drogiego oprzyrządowania do wspomnianego mikroskopu.

Do badania dynamiki zmian $[Ca^{2+}]_c$ w jednowarstwowych kulturach tkankowych, zawiesinach komórkowych lub zawiesinach protoplastów najlepiej stosować Indo-1. Związek ten idealnie nadaje się do tzw. cytometrii przepływowej. Natomiast jest on mniej przydatny do tworzenia imidży. Wynika to z faktu, że wzbudzeniu formy wolnej i związanej Indo-1 towarzyszy jedynie niewielkie przesunięcie w widmie absorpcyjnym: z 349 i 331 nm (Tabela 1). Natomiast znaczne przesunięcie maksimum emisji fluorescencji Indo-1 (z około 485 nm w

środoisku pozbawionym Ca^{2+} do 405 nm w roztworze zawierającym wysycające stężenie tego kationu) [15, 37] nie zawsze prowadzi do podobnych odwzorowań badanych komórek. Punkt izofluorescencji Indo-1 występuje przy 445 nm.

Szczególne zalety Fura-2 i Indo-1 polega na tym, iż przy ich użyciu nie mierzy się absolutnych zmian fluorescencji lub intensywności widma wzbudzenia lecz jedynie porównuje się te wartości stosując określone długości fal świetlnych (Rys. 2). Pozwala to na prowadzenie pomiarów $[Ca^{2+}]_c$ bez względu na cytoplazmatyczne stężenie wskaźnika (tylko wówczas gdy mierzony sygnał jest silniejszy od autofluorescencji). Ten sposób obliczeń powoduje również, że końcowy wynik pomiaru nie zależy od grubości badanego preparatu, wygaszania fluorescencji i spadku stężenia wskaźnika w środowisku pomiarowym.

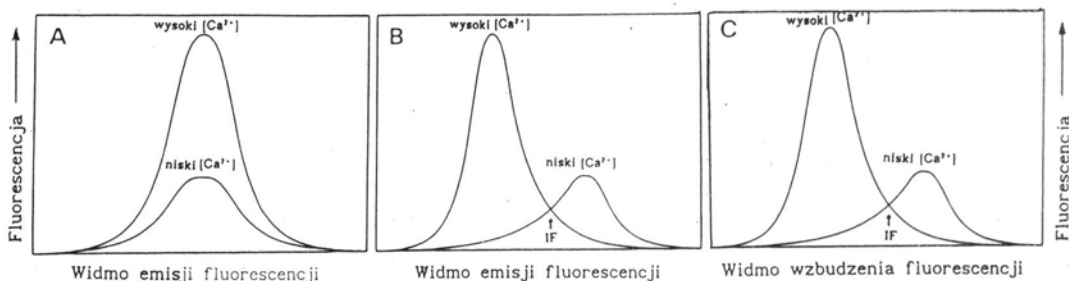
FLUO-3 I RHOD-2, CALCIUM GREEN, CALCIUM ORANGE
ORAZ CALCIUM CRIMSON

Pod koniec lat osiemdziesiątych Tsien i wsp. [41] wprowadzili do badań kolejną generację fluorescencyjnych wskaźników wapnia nazywając je Rhod i Fluo. Podobnie jak w przypadku trzech wyżej omówionych związków w koordy-

Tabela 1. Maksima wzbudzenia i emisji fluorescencji barwników służących do wewnątrzkomórkowego pomiaru jonów wapniowych.

Table 1. Excitation and emission maxima of different fluorescent dyes used for the intracellular measurement of calcium ions

Nazwa barwnika	Wzbudzenie fluorescencji(nm)		Emisja fluorescencji(nm)	
	1	2	1	2
Quin-2	339	350	492	-
Indo-1	349	-	405	485
Fura-2	335	380	512	-
Fura Red	440	490	660	-
Rhod-2	553	-	576	-
Fluo-3	506	-	526	-
Calcium Green	507	-	530	-
Calcium Orange	551	-	574	-
Calcium Crimso	589	-	607	-



Ryc. 2. Wyidealizowane krzywe przedstawiające widma emisyjne i wzbudzeniowe dostępnych wskaźników wapnia. (A) Widmo emisji wskaźników (Quin-2, Fluo-3, Rhod-2 i Calcium Green), których fluorescencja ulega dramatycznemu wzrostowi po związaniu Ca^{2+} . (B) Wskaźnik wykazujący przesunięcie w widmie emisji (Fura-2) lub (C) w widmie wzbudzenia fluorescencji (Indo-1) w środowisku zawierającym wysycające stężenie jonów wapnia. IF – oznacza punkt izofluorescencji barwnika (na podstawie [44], zmodyfikowane).

Fig. 2. Idealized curves showing emission and excitation spectra of the commercially available calcium indicators. (A) Emission spectra of indicators in which fluorescence increases after the binding of Ca^{2+} (Quin-2, Fluo-3, Rhod-2 and Calcium Green). (B) Indicators which show a shift in the emission spectrum (Fura-2) or (C) in the excitation spectrum (Indo-1) of fluorescence in environment containing saturable concentration of Ca^{2+} . IF – iso-fluorescence point of a dye. (After [44], modified).

nacyjnym wiązaniu jonów wapnia przez Rhod-2 i Fluo-3 (Rys. 1) uczestniczą dwie grupy reszt iminodwukarboksylowych BAPTA. W nowej generacji wskaźników w miejsce chromoforu chinolinowego wprowadzono chromofor ksantenowy dający fluofor zbliżony do rodamin (Rhod-2) lub fluoresceiny (Fluo-3)[41].

W przeciwieństwie do pozostałych wskaźników Ca^{2+} fluorescencja Fluo-3 i Rhod-2 podlega wzbudzeniu i emisji w widzialnym zakresie widma, odpowiednio przy 506 i 526 oraz 553 i 576 nm (Tabela 1) [41]. Ta właściwość pozwala na stosowanie obu tych związków do pomiaru $[\text{Ca}^{2+}]_c$ przy pomocy prostych mikroskopów fluorescencyjnych wyposażonych zazwyczaj w zestawy filtrów służących do wzbudzania fluorescencji fluoresceiny i rodamin [52].

W formie wolnej Fluo-3 praktycznie nie fluoryzuje natomiast po związaniu Ca^{2+} przez ten związek następuje około 40-krotny wzrost intensywności fluorescencji powstałego kompleksu (Rys. 2). Stosunkowo wysoka stała dysocjacji (0.4 μM) pozwala na stosowanie Fluo-3 do pomiarów podwyższonego poziomu cytoplazmatycznego wapnia, w granicach 1 μM . Ze względu na fakt, iż stała dysocjacji Fluo-3 dla Mn^{2+} wynosi 9 mM, a intensywność fluorescencji tego związku po związaniu tego kationu

wzrasta jedynie półtorakrotnie obecne w cytoplazmie jony magnezowe nie wywierają istotnego wpływu na prowadzenie pomiarów $[\text{Ca}^{2+}]_c$. Jony metali ciężkich takich jak Mn^{2+} Ni^{2+} lub Zn^{2+} wypierając Ca^{2+} powodują częściowe wygaszanie fluorescencji Fluo-3 (lecz nie prowadzą do jej całkowitego zaniku jak to ma miejsce w przypadku Fura-2) [30, 52].

Rhod-2 posiada wiele podobnych cech jak Fluo-3. Ulega wzbudzeniu w widzialnym zakresie światła i charakteryzuje się wysoką stałą dysocjacji 1 μM , umożliwiającą prowadzenie pomiarów Ca^{2+} w stężeniach dochodzących do 10 μM . Cechą ujemną Rhod-2 jest stosunkowo niska fluorescencja kompleksu z wapniem i kompartmentyzacja barwnika [41, 52].

Zajmująca się sprzedażą m. in. fluorescencyjnych wskaźników wapnia firma Molecular Probes Inc. (Eugene, Oregon, USA) [30] oferuje ostatnio swoim klientom najnowszą generację tych związków określanych nazwami Calcium Green, Calcium Orange i Calcium Crimson [13]. Maksimum wzbudzenia fluorescencji tych związków rejestruje się odpowiednio przy 507, 551 i 589 nm, podczas gdy szczyt emisji ich fluorescencji obserwuje się odpowiednio przy 530, 574 i 607 nm (Tabela 1)[17]. Dzięki tej właściwości wspomniane związki mogą być

używane do pomiarów $[Ca^{2+}]_c$ przy użyciu mikroskopów świetlnych wyposażonych w filtry służące do wzbudzenia fluorescencji rodminy (np. Calcium Orange)[30]. Wymienione wskaźniki posiadają fizyko-chemiczne właściwości zbliżone do Fluo-3 lecz w stosunku do niego charakteryzują się wyższym (4 razy w przypadku Calcium Green) poziomem fluorescencji po związaniu jonów wapnia [30].

Istnieje kilka odmian Calcium Green, różniących się stopniem powinowactwa w stosunku do Ca^{2+} . Umożliwia to ich stosowanie do badań różnych typów odpowiedzi komórkowych wiążących się z przejściowym wzrostem $[Ca^{2+}]_c$. I tak Calcium Green-1 najlepiej używać do pomiarów bardzo niskich stężeń wolnego wapnia, podczas gdy Calcium Green-2, a zwłaszcza Calcium Green-5N do wysokich, przekraczających nawet wartość $10 \mu M$ [30]. Na stałą dysocjacji Calcium Green, Orange i Crimson ma zarówno wpływ temperatura, jak i pH środowiska pomiarowego. W temperaturze $25.7^{\circ} C$ i przy pH 7.4 wielkość ta dla Calcium Green wynosi 235 nM, dla Calcium Orange 403, a dla Calcium Crimson 253 nM [17].

Niezmiernie cenną właściwością barwników z grupy Calcium Green jest fakt, że ich zestryfikowane formy są bezbarwne. Ich naturalna barwa ujawnia się dopiero po rozczepieniu wiązania estrowego przez wewnątrzkomórkowe esterazy. Dodatkowo, ujemna grupa Calcium Green powoduje, że związek ten trudniej, w porównaniu do Fluo-3, dyfunduje poza obręb komórki, tak do różnych struktur cytoplazmatycznych, jak i do środowiska pomiarowego [30]. W środowisku zawierającym wysokie stężenia Ca^{2+} , w porównaniu do Fluo-3 barwniki z grupy Calcium Green wykazują 5-krotnie wyższą intensywność fluorescencji, która ulega również powolniejszemu wygaszaniu [17, 30].

Do badań poziomu i lokalizacji $[Ca^{2+}]_c$ przy użyciu wyżej omówionej grupy fluorescencyjnych wskaźników wapnia idealnie nadają się argonowe współogniskowe laserowe mikroskopy skaningowe (ang. confocal scanning laser microscope)[44, 64]. Charakteryzują się one bardzo wysoką rozdzielczością obrazu co pozwala na tworzenie dokładnych odwzorowań wewnątrz-

komórkowego rozmieszczenia wolnego Ca^{2+} [23, 52, 64].

WPROWADZANIE WSKAŹNIKÓW FLUORESCENCYJNYCH DO KOMÓREK I TKANEK ROŚLINNYCH

Wszystkie fluorescencyjne wskaźniki służące do badania $[Ca^{2+}]_c$ bardzo słabo przenikają do wnętrza żywych komórek. W przypadku materiału zwierzęcego sprawa jest o tyle prosta, że zestryfikowane formy tych związków (AM) stosunkowo łatwo przekraczają barierę błony komórkowej. Zamaskowanie ujemnie naładowanych, zdysocjowanych grup karboksylowych omawianych barwników powoduje wzrost ich hydrofobowości i swobodniejsze przenikanie do wnętrza protoplastu. W cytoplazmie komórek zwierzęcych funkcjonuje wiele esteraz zdolnych do rozszczepiania wspomnianych wiązań estrowych i uwalnianie aktywnej formy wskaźnika.

Pomimo dużej prostoty, wyżej opisany sposób wprowadzania omawianych substancji nie zdał egzaminu w przypadku stosowania materiału roślinnego [10, 44]. Poza nielicznymi wyjątkami [23, 48] większości badaczy nie udało się uzyskać dostatecznie wysokiego do prowadzenia pomiarów $[Ca^{2+}]_c$ cytoplazmatycznego stężenia wskaźnika. Wydaje się, że u roślin, ze względu na obecność w ścianie komórkowej i po zewnętrznej stronie plazmolemy cholinesteraz hydroliza wiązania estrowego następuje przed wniknięciem zestryfikowanych form wskaźników na teren cytoplazmy [55]. Tretyni i inni [55] wykazali, że w wyniku dodania do roztworu inkubacyjnego inhibitora cholinesteraz, eseryny, w komórkach korzeni gorczyca pojawia się barwnik umożliwiający prowadzenie pomiarów wolnego wapnia. Brak tej substancji w środowisku powodował zahamowanie wzrostu komórek włóknikowych. Prawdopodobnie w wyniku enzymatycznej hydrolizy Fluo-3/AM powstający na powierzchni protoplastu formaldehyd hamował normalny wzrost tych komórek [55].

Przed kilku laty Bush i Jones [8–9] opisali prostą i efektywną metodę wprowadzania do komórek roślinnych fluorescencyjnych wskaźników wapnia. W metodzie tej wykorzystano

fakt iż w obniżonym pH (pomiędzy 4–5) dysocjacja grup –COOH omawianych związków jest w znacznym stopniu obniżona. Powoduje to, że znacznie łatwiej przenikają one przez błonę komórkową.

Należy jednak pamiętać, że stosunkowo długa (2–3 godziny) inkubacja komórek i tkanek roślinnych prowadzi do ich uszkodzeń. Stąd też opisana metoda nie znajduje powszechnego zastosowania [10].

Z ostatnich badań Tretyna i innych [55] wynika, że temperatura jest krytycznym czynnikiem decydującym o transporcie Fluo-3 do wnętrza komórek roślinnych. Jej wzrost z 22 do 30°C znacznie skracał czas inkubacji i podwyższał zawartość wskaźnika na terenie cytoplazmy badanych komórek.

W kilku publikacjach donoszono o możliwości używania naturalnych i syntetycznych detergentów wspomagających wprowadzanie wskaźników wapnia do komórek i tkanek roślinnych. W tym celu używano digitoniny [53] lub niejonowego detergentu Pluronic F-127 [30, 31, 53]. W tym samym celu Tretyn i inni [55] użyli syntetycznego estru saponiny, β -escyny. Substancja ta łącząc się z występującymi w błonie komórkowej resztami cholesterolowymi powoduje wzrost jej przepuszczalności dla związków o masie molowej dochodzącej nawet do 10 kDa [62].

Mikroiniekcja jest najskuteczniejszą metodą wprowadzania wskaźników wapnia do indywidualnych komórek [5–7, 24, 26, 38, 39]. Technika ta została szczegółowo opisana w kilku pracach przeglądowych [10, 44, 52]. Niestety wymaga ona stosowania dość skomplikowanego i kosztownego zestawu aparatury.

Dużym problemem pojawiającym się podczas pracy z fluorescencyjnymi wskaźnikami wapnia jest ich niekontrolowane przemieszczanie się poza obręb cytoplazmy, do różnych struktur wewnątrzkomórkowych. Zjawiska te można ograniczyć przyłączając do tych barwników pewne związki zwiększające ich ciężar cząsteczkowy i konfigurację przestrzenną. Obecnie w sprzedaży dostępne są Fura-2, Indo-1 i Calcium Green sprzężone z 10- i 70-kilodaltonowym deksranem [10, 30, 44]. Tego typu związki można

wprowadzać do cytoplazmy badanych komórek jedynie za pomocą niskociśnieniowej mikroiniekcji [44].

WYZNACZANIE POZIOMU $[Ca^{2+}]$ I METODY KALIBRACJI

Poziom wolnego wapnia w badanym materiale oblicza się z przekształcenia wzoru (1)

$$K_d = \frac{[X] \times [Ca^{2+}]}{[CaX]} \quad (1)$$

do

$$[Ca^{2+}] = K_d \times \frac{[CaX]}{[X]} \quad (2)$$

gdzie X to fluorescencyjny wskaźnik, który wiąże Ca^{2+} ze stałą dysocjacji równą K_d [52].

Używając do pomiarów $[Ca^{2+}]$ Quin-2, Fluo-3, Rhod-2 lub Calcium Green, w przypadku których zmiany fluorescencji wolnej i związanej z wapniem formy barwnika mierzy się stosując tę samą długość fal świetlnych (widmo emisji fluorescencji) przedstawiony powyżej wzór przybiera następującą postać:

$$[Ca^{2+}] = \frac{(F - F_{min})}{(F_{min} - F)} \quad (3)$$

gdzie F_{min} oznacza intensywność fluorescencji wskaźnika w środowisku pozbawionym, a F_{max} zawierającym wysycające stężenie Ca^{2+} , natomiast F natężenie fluorescencji zmierzone podczas konkretnego pomiaru. Pierwsze dwie, z trzech wspomnianych wartości wyznacza się w trakcie procedury kalibracji (opisanej poniżej) stosując stałe stężenie wskaźnika dodanego do roztworu pozbawionego i zawierającego wysycające (tę wartość można ustalić na podstawie stałej dysocjacji, K_d dla określonego barwnika) stężenie jonów wapnia [52].

Używanie Fura-2 i Indo-1, które w wyniku związania jonów wapnia wykazują odpowiednio przesunięcie w widmie wzbudzenia i emisji fluorescencji wymaga następującego przekształcenia równania (2):

$$[Ca^{2+}] = K_d \times \frac{(R - R_{min})}{(R_{min} - R)} \times \frac{Sf_2}{Sb_2} \quad (4)$$

gdzie R_{min} i R_{max} odpowiadają wielkości stosunku fluorescencji w środowisku wolnym i za-

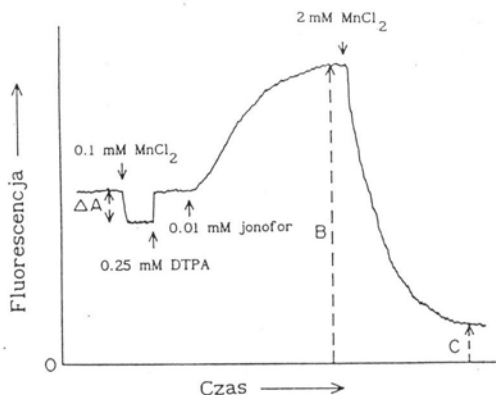
wierającym wysycające stężenie jonów wapnia zaś wielkość $\frac{Sf_2}{Sb_2}$ to stosunek intensywności fluorescencji dla wolnej i związanej z Ca^{2+} formy wskaźnika mierzonej przy długości fali używanej dla pomiaru R_{min} . Wszystkie trzy wymienione wielkości wylicza się eksperymentalnie stosując roztwory pozbawione i zawierające wysycające stężenie jonów wapnia [52].

KALIBRACJA *in vivo* i *in situ*

Przed przystąpieniem do zasadniczych pomiarów wolnego Ca^{2+} należy określić stopień autofluorescencji badanego materiału oraz dokonać niezbędnych kalibracji [63]. Czynność tę można przeprowadzić w warunkach *in vitro*, stosując odpowiednie ilości zbuforowanego Ca^{2+} lub *in situ*, przy użyciu jonoforów, manipulując wewnątrzkomórkowym stężeniem Ca^{2+} [52, 63].

Istnieje szereg metod wyznaczania minimalnej (F_{min}) i maksymalnej (F_{max}) intensywności fluorescencji, wolnej i związanej z wapniem formy wskaźnika, wprowadzonego do cytoplazmy badanych komórek. Najprostsza i najbardziej bezpośrednia z nich polega na lizie komórek, w których uprzednio dokonano pomiaru $[Ca^{2+}]_c$. Proces ten indukuje się dodając do roztworu inkubacyjnego, zawierającej zalkalizowany roztwór EGTA, określonej ilości digitoniny. Przeprowadzenie tego zabiegu pozwala na wyznaczenie F_{min} (lub R_{min} , patrz wzory 3 i 4). Wielkość F_{max} (lub R_{max}) określa się w wyniku dodania do otrzymanej mieszaniny takiej ilości $CaCl_2$, która pozwala na całkowite wysycenie wskaźnika. W trzecim etapie, dodając do roztworu tyle wskaźnika ile wprowadzono do żywych komórek wyznacza się jego fluorescencję własną. Na podstawie trzech w/w wielkości określa się bezwzględny poziom $[Ca^{2+}]_c$ w badanych komórkach [52].

Mimo iż opisana metoda wyznaczania $F(R)$, $F_{min}(R_{min})$ i $F_{max}(R_{max})$ jest prosta, w przypadku materiału roślinnego, stosować ją można jedynie w odniesieniu do izolowanych protoplastów. Obecność ściany komórkowej u roślin znacznie ogranicza przeprowadzenie kalibracji

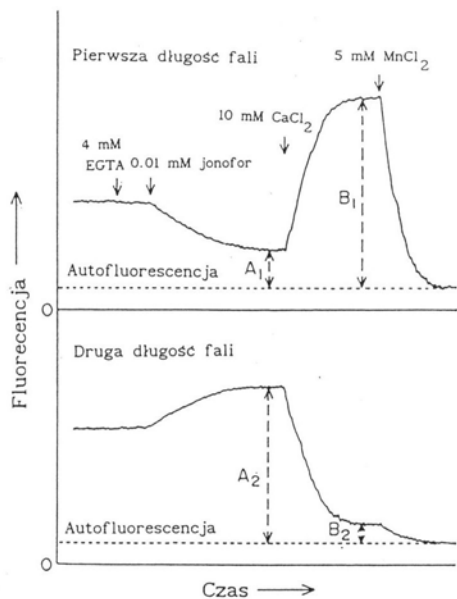


Ryc. 3. Schemat ilustrujący przebieg procedury kalibracji *in situ* przy użyciu jonoforu wapnia (dla Quin-2, Fluo-3, Rhod-2 i Calcium Green). Poziom $[Ca^{2+}]_c$ oblicza się na podstawie wzoru (3) (patrz powyżej) podstawiając wyliczone podczas kalibracji wielkości F_{min} i F_{max} . $F_{min} = (B - \Delta A - C) \times D + C$, gdzie C to poziom autofluorescencji a D procentowy współczynnik niezwiązanej w porównaniu do związanej formy wskaźnika. $F_{max} = (B - \Delta A)$. (Na podstawie [52], zmodyfikowane).

Fig. 3. *In situ* calibration of Ca^{2+} (at a single wavelength) with the aid of a calcium ionophore. This calibration procedure can be used for Quin-2, Fluo-3, Rhod-2 and Calcium Green. The level of $[Ca^{2+}]_c$ is calculated from equation (3) (see above) using F_{min} and F_{max} determined from the calibration. $F_{min} = (B - \Delta A - C) \times D + C$, with C = autofluorescence, D = the fluorescence of the Ca^{2+} free indicator as a percentage of that given by the Ca^{2+} -bound indicator. $F_{max} = (B - \Delta A)$. (After [52], modified).

in vitro. Najlepiej przeprowadzać ją stosując odpowiednie jonofory wapnia i związki wygaszające fluorescencje używanych wskaźników. Poniżej omówione zostaną dwie metody, które można zastosować do kalibracji wszystkich powszechnie stosowanych indykatorów wolnego wapnia w komórkach eukariotycznych.

W obu przypadkach F_{min} (R_{min}) i F_{max} (R_{max}) wyznacza się w oparciu o wskaźnik występujący na terenie badanych komórek. W celu wyznaczenia F_{min} używa się Mn^{2+} , który łącząc się z Quin-2 i Fura-2 powoduje całkowite wygaszenie ich fluorescencji, pozostawiając autofluorescencje badanego preparatu. Jony manganowe jedynie częściowo wygaszają fluorescencje Fluo-3. Drugą z wielkości – F_{max} wyznacza się stosując jonofory wapnia: jonomycynę i Br-



Ryc. 4. Schemat ilustrujący przebieg procedury kalibracji *in situ* dla Fura-2 i Indo-1 przy użyciu jonoforu wapnia. Poziom $[Ca^{2+}]_c$ oblicza się na podstawie wzoru (4) (patrz powyżej) podstawiając wyliczone podczas kalibracji wielkości R_{min} , R_{max} i $Sr2/Sb2$. $R_{min} = C1/C2$, $R_{max} = B1/B2$ natomiast $Sr2/Sb2 = C2/B2$. Wymienione wielkości wylicza się po uprzednim odjęciu od nich autofluorescencji i tłumienia pozakomórkowej fluorescencji stosowanego wskaźnika (ΔA_1 i ΔA_2). (Na podstawie [52], zmodyfikowane).

Fig. 4. *In situ* ratio calibration for Fura-2 and Indo-1 using a calcium ionophore. The level of $[Ca^{2+}]_c$ is calculated from equation (4) (see above) using R_{min} , R_{max} and $Sr2/Sb2$ determined during calibration. $R_{min} = C1/C2$, $R_{max} = B1/B2$, whereas $Sr2/Sb2 = C2/B2$. R_{min} is given by $C1/C2$, R_{max} is given by $B1/B2$ and $Sr2/Sb2$ is given by $C2/B2$. All these parameters are calculated after subtraction of autofluorescence. (After [52], modified).

A23187 (A23187 ze względu na fluorescencję własną nie nadaje się do tego celu).

Rycina 3 ilustruje sposób przeprowadzania procedury kalibracji dla takich wskaźników jak Quin-2, Fluo-3, Rhod-2 czy też Calcium Green.

W wyniku dodania do roztworu inkubacyjnego $MnCl_2$ następuje wygaszenie fluorescencji (ΔF) pozakomórkowej puli stosowanego wskaźnika. Szybkie dodanie do kąpeli chelatora Mn^{2+} , kwasu dietylenotriaminopentaoctowego (DTPA) przeciwdziała wygaszaniu fluorescencji barwnika występującego na terenie cytopla-

zmy. W kolejnym etapie badany materiał traktuje się roztworem jonoforu, w wyniku czego otrzymuje się maksymalny wzrost $[Ca^{2+}]_c$. Dodanie do medium nadmiaru (w stosunku do ciągle obecnego w roztworze DTPA) $MnCl_2$ prowadzi do prawie całkowitego (Quin-2) lub częściowego (Fluo-3) tłumienia fluorescencji cytoplazmatycznej puli wskaźnika. Sposób wyznaczania F_{min} i F_{max} przedstawiono w opisie do Ryciny 3.

Używanie Fura-2 lub Indo-1 wymaga zastosowania odmiennej, od wyżej opisanej, procedury kalibracji. W celu obniżenia poziomu zewnątrzkomórkowego Ca^{2+} w pierwszym jej etapie materiał inkubuje się w zbuforowanym roztworze EGTA, a następnie dodaje się do niego określonej ilości jonoforu. Wprowadzając do środowiska nadmiar $CaCl_2$ otrzymuje się maksymalny wzrost poziomu cytoplazmatycznego Ca^{2+} . Użycie w końcowym etapie kalibracji $MnCl_2$ pozwala na tłumienie fluorescencji barwnika do poziomu autofluorescencji (Rys. 4). Na podstawie otrzymanych wyników określa się niezbędne wielkości: R_{min} , R_{max} oraz $Sr2/Sb2$ (patrz wzór 4) i wyznacza się $[Ca^{2+}]_c$ wcześniej dokonanego pomiaru (patrz również opis do Rys. 4).

ZASTOSOWANIE FLUORESCENCYJNYCH WSKAŹNIKÓW W FIZJOLOGII ROŚLIN

Pierwsze doświadczenia dotyczące pomiarów wolnego wapnia w czasie przebiegu różnych procesów u roślin przeprowadzono stosując Quin-2. Keith i inni [33] badali przy pomocy tego barwnika zmiany wolnego wapnia w izolowanych protoplastach endospermu *Haemanthus* w trakcie ich podziałów mitotycznych. Przy użyciu tego samego wskaźnika Nobiling i Reiss [42] stwierdzili obecność gradientu wolnego wapnia w rosnących łagiewkach pyłkowych *Lilium*. Istnienie podobnego rozmieszczenia wolnego wapnia wykazano stosując Fura-2 w rosnących komórkach włóknikowych korzeni pomidora [13] oraz ryzoidach kiełkujących zygot *Fucus* [5-7].

Stosując Quin-2 Chae i inni [12] stwierdzili, że fitochrom reguluje $[Ca^{2+}]_c$ w izolowanych protoplastach owsa, co zostało następnie po-

twierdzone przez Schacklocka i innych [48] przy użyciu Indo-1 w odniesieniu do protoplastów pszenicy. Wzrost $[Ca^{2+}]_c$ w protoplastach pszenicy zarejestrowano w dwie minuty po ich naświetleniu światłem czerwonym [48]. Podobną dynamikę zmian poziomu cytoplazmatycznego Ca^{2+} obserwowano w wyniku fotolizy wprowadzonego do wnętrza protoplastów „uwięzionego” (ang. caged) trisfosfoinozytolu [24]. Zarówno stymulowanemu przez światło czerwone, jak i przez frisosfoinozytol wzrrostowi poziomu wolnego wapnia towarzyszyło pęcznienie badanych protoplastów [24, 48], jak i fosforylacja pewnych, zawartych w nich białek [19].

Wiele fitohormonów lub substancji fizjologicznie czynnych wywiera bezpośredni wpływ na $[Ca^{2+}]_c$. McAinsh i inni [38] wykryli, że w komórkach szparkowych *Cammelina* kwasy abscysynowy (ABA) powoduje natychmiastowy wzrost wewnątrzkomórkowego $[Ca^{2+}]_c$. Dopiero 6 minut po zmianie zawartości jonów wapnia w komórkach przyszparkowych następowało zamykanie się aparatu szparkowego [38]. Gilroy i inni [26] zakwestionowali te wyniki wykazując, że stymulowanemu przez ABA zamykaniu się aparatów szparkowych nie zawsze towarzyszy wzrost $[Ca^{2+}]_c$. W odpowiedzi na tę publikację McAinsh i inni [39], jak również Irving i inni [31] wykazali, że komórki przyszparkowe, w zależności od ich stanu fizjologicznego, w zróżnicowany sposób reagują na działanie kwasu abscysynowego. Zarówno Gilroy i inni [26], jak i McAinsh i inni [39] stwierdzili, że ABA stymuluje uwalnianie jonów wapnia z jego wewnątrzkomórkowych magazynów, prawdopodobnie siateczki śródplazmatycznej (ER) lub/i wakuoli.

Poza kwasem abscysynowym (ABA) również inne substancje wzrostowe mogą kontrolować ruchy aparatów szparkowych. Z pomiarów dokonanych przez Irvinga i innych [31] wynika, że średni poziom $[Ca^{2+}]_c$ w komórkach przyszparkowych *Paphiopedilum tonsum* wynosi 220 nM. Auksyna (IAA), kinetyna i fizykokcyna, które indukowały otwieranie się uprzednio zamkniętych aparatów szparkowych stymulowały około 2-krotny wzrost cytoplazmatycznego poziomu wolnego wapnia [31].

Przedstawione powyżej przykłady nie wyczerpują możliwości używania fluorescencyjnych wskaźników wapnia w fizjologii roślin. Znalazły one również zastosowanie m. in. w badaniu roli wapnia w regulacji ruchów chloroplastów w komórkach *Mougeotia* [46] lub wpływu stresu solnego na poziom tego kationu w protoplastach izolowanych z korzeni kukurydzy [37].

Gehring i inni, przy użyciu Fluo-3 wykazali natomiast, że fototropiczne i geotropiczne wygięcie koleoptyli kukurydzy są bezpośrednio związane ze zmianami poziomu wolnego cytoplazmatycznego wapnia [23].

PODSUMOWANIE

W ciągu ostatnich kilku lat obserwuje się ciągły wzrost zainteresowania botaników rolą jonów wapnia w regulacji metabolizmu oraz wzrostu i rozwoju roślin. Wykazano, że kation ten podlega podobnej wewnątrzkomórkowej regulacji jak u zwierząt [16, 18, 47]. U obu typów organizmów może on pełnić funkcje wtórne przekaźnika informacji [16, 18, 28–29, 57]. Wzrost zainteresowania regulatorową rolą jonów wapnia w komórkach eukariotycznych doprowadził do opracowania wielu metod lokalizacji [11] i wewnątrzkomórkowego oznaczania wolnego Ca^{2+} [3–4, 11, 14–15, 17, 27, 30, 41, 43–44, 52, 58, 61]. W niniejszej pracy omówione zostały jedynie trzy z nich, najpowszechniej używane. Osoby zainteresowane metodycznymi opracowaniami odsyłam do monografii „Cell Calcium. A Practical Approach [40].

LITERATURA

- [1] AMMANN D. 1985. Ca^{2+} Selective microelectrodes. *Cell Calcium* 6: 39–55.
- [2] AMMANN D. 1986. *Ion-Selective Micro-Electrodes*. Springer-Verlag, Berlin, ss. 346.
- [3] BLINKS J. R. 1990. Use of photoproteins as intracellular calcium indicators. *Environ. Health Perspect* 84: 75–81.
- [4] BLINKS J. R., WIER W. G., HESS P., PRENDERGAST F. G. 1982. Measurement of Ca^{2+} concentrations in living cells. *Prog. Biophys. Molec. Biol* 40: 1–114.
- [5] BROWNEE C. 1989. Visualizing cytoplasmic calcium in polarizing zygotes and growing rhizoids of *Fucus serratus*. *Biol. Bull.*, 176: 14–17.
- [6] BROWNEE C., A. PULSFORD L. 1988. Visualization of

- the cytoplasmic Ca^{2+} gradient in *Fucus serratus* rhizoids: correlation with cell ultrastructure and polarity. *J. Cell Sci.* **91**: 249–256.
- [7] BROWNLEE C., WOOD J. W. 1986. A gradient of cytosolic free calcium in growing rhizoid cells of *Fucus serratus*. *Nature*, **320**: 624–626.
- [8] BUSH D. S., JONES R. L. 1988. Measurement of cytoplasmic calcium in aleurone protoplasts using indo-1 and fura-2. *Cell Calcium*, **8**: 455–472.
- [9] BUSH D. S., JONES R. L. 1990. Measuring intracellular Ca^{2+} levels in plant cells using the fluorescent probes, indo-1 and fura-2. *Plant Physiol* **93**: 841–845.
- [10] CALLAHAN D. A., HEPLER P. K. 1990. Measurement of free calcium in plant cells. W: McCORMACK J. G., COBBOLD P. H. (red.), *Cellular Calcium. A Practical Approach*, Oxford Univ. Press, Oxford, ss. 383–410.
- [11] CASWELL A. Methods for measuring intracellular calcium. *Int. Rev. Cytol.* **56**: 145–181, 1979.
- [12] CHAE Q., PARK H. J., HONG S. D. Loading of quin2 into the oat protoplast and measurement of cytosolic calcium ion concentration changes by phytochrome action. *Biochim. Biophys. Acta* **1051**: 115–122, 1990.
- [13] CLARKSON D. T., BROWNLEE C., AYLING S. M. 1988. Cytoplasmic calcium measurements in intact higher plant cells: results from fluorescence ratio imaging of fura-2. *J. Cell Sci* **91**: 71–80.
- [14] COBBOLD P. H., LEE J. A. C. 1991. Aequorin measurements of cytoplasmic free calcium. (W) *Cellular Calcium. A Practical Approach*. W: McCORMACK J. G., COBBOLD P. H. (red.), *Cellular Calcium. A Practical Approach*, Oxford Univ. Press, Oxford, ss. 55–81.
- [15] COBBOLD P. H., RINK T. J. 1987. Fluorescence and bioluminescence measurement of cytoplasmic free calcium. *Biochem. J.* **248**: 313–328.
- [16] DRBAK B. K. 1992. The plant phosphoinositide system. *Biochem. J.* **288**: 697–712, 1992.
- [17] EBERHARD M., ERNE P. 1991. Calcium binding to fluorescent and calcium indicators: calcium green, calcium orange and calcium crimson. *Biochem. Biophys. Res. Comm* **180**: 209–215.
- [18] EVANS D. E., BRIARS S.-A., WILLIAMS L. E. 1991. Active calcium transport by plant cell membranes. *J. Exp. Bot.* **42**: 285–303.
- [19] FALLON K. M., SHACKLOCK P. S., TREWAVAS A. J. 1993. Detection *in vivo* of very rapid lightinduced calciumsensitive protein phosphorylation in etiolated wheat (*Triticum aestivum*) leaf protoplasts. *Plant Physiol* **101**: 1039–1045.
- [20] FELLE H. 1988. Auxins causes oscillations of cytoplasmic free calcium and pH in *Zea mays* coleoptiles. *Planta* **174**: 495–499.
- [21] FELLE H. 1989. Ca^{2+} Sensitive microelectrodes and their application to plant cells and tissues. *Plant Physiol.* **91**: 1239–1242.
- [22] FELLE H., TRETYN A., WAGNER G. 1991. The role of the plasma-membrane Ca^{2+} -ATPase in Ca^{2+} homeostasis in *Sinapis alba* root hairs. *Planta* **188**: 306–313.
- [23] GEHRING C. A., WILLIAMS D. A., CODY S. H., PARISH R. W. 1990. Phototropism and geotropism in maize coleoptiles are spatially correlated with increases in cytosolic free calcium. *Nature* **345**: 528–530.
- [24] GILROY S., READ N. D., TREWAVAS A. J. 1990. Elevation of cytoplasmic calcium by caged calcium or caged inositol triphosphate initiates stomatal closure. *Nature* **346**: 769–771.
- [25] GILROY S., HUGHES W. A., TREWAVAS A. J. 1986. The measurement of intracellular calcium levels in protoplasts from higher plant cells. *FEBS Lett.* **199**: 217–221.
- [26] GILROY S., FRICKER M. D., READ N. D., TREWAVAS A. J. 1991. Role of calcium in signal transduction of *Commelina* guard cells. *Plant Cell* **3**: 333–344.
- [27] GRYNKIEWICZ G., POENIE M., TSIEN R. Y. 1985. A new generation of Ca^{2+} indicators with greatly improved fluorescence properties. *J. Biol. Chem.* **260**: 3440–3450.
- [28] HEPLER P. 1990. Does calcium regulate events through amplitude modulation? *Curr. Topics Plant Biochem. Physiol.* **9**: 1–9.
- [29] HEPLER P. K., WAYNE R. O. 1985. Calcium and plant development. *Ann. Rev. Plant Physiol.* **36**: 397–439.
- [30] HOUGLAND R. P. 1992. Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals. Molecular Probes, Inc., Eugene, USA, ss. 419.
- [31] IRVING H. R., GEHRING C. A., PARISH R. 1992. Changes in cytosolic pH and calcium of guard cell precede stomatal movements. *Proc Natl Acad Sci USA* **89**: 1790–1794.
- [32] KAUSS H. 1987. Some aspects of calcium-dependent regulation in plant metabolism. *Annu. Rev. Plant Physiol.* **38**: 47–72.
- [33] KEITH C. H., RATAN R., MAXFIELD F. R., BAJER A., SHELANSKI M. L. 1985. Local cytoplasmic calcium gradients in living mitotic cells. *Nature*, **516**: 848–850.
- [34] KNIGHT M. R., CAMPBELL A. K., SMITH S. M., TREWAVAS A. J. 1991. Transgenic plants aequorin reports the effects of touch and coldshock and elicitors on cytoplasmic calcium. *Nature* **352**: 524–526.
- [35] KNIGHT M. R., SMITH S. M., TREWAVAS A. J. 1992. Windinduced plant motion immediately increases cytosolic calcium. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**: 4967–4971.
- [36] KNIGHT M. R., READ N. D., CAMPBELL A. K., TREWAVAS A. J. 1993. Imaging calcium dynamics in living plants using semisynthetic recombinant aequorins. *J. Cell Biol.* **121**: 83–90.
- [37] LYNCH J., POLITO V. S., LAUHLI A. 1989. Salinity stress increases cytoplasmic Ca activity in maize root protoplasts. *Plant Physiol.* **90**: 1271–1274.
- [38] McAINSH M. R., BROWNLEE C., HETERINGTON A. M. 1990. Abscisic acidinduced elevation of guard cell cytosolic Ca^{2+} precedes stomatal closure. *Nature* **343**: 186–188.
- [39] McAINSH M. R., BROWNLEE C., HETERINGTON A. M. 1992. Visualizing changes in cytosolic free Ca^{2+} during the response of stomatal guard cells to abscisic acid. *Plant Cell* **4**: 1113–1122.
- [40] McCORMACK J. G., COBBOLD P. H. 1991. Cellular Cal-

- cium. A Practical Approach. IRL Press, Oxford, ss. 410.
- [41] MINTA A., KAO J. P. Y., TSIEN R. Y. 1988. Fluorescent indicator for cytosolic calcium based on rhodamine and fluorescein chromophores. *J. Biol. Chem.* **264**: 8171–8178.
- [42] NOBILING R., REISS H.-D. 1987. Quantitative analysis of calcium gradients and activity in growing pollen tubes of *Lilium longiflorum*. *Protoplasma* **139**: 20–24.
- [43] ORCHARD C. H., BOYETT M. R., KEY C. H., HUNTER M. 1991. The use of electrodes to study cellular Ca^{2+} metabolism. W: McCORMACK, J. G., COBBOLD P. H. (red.), *Cellular Calcium. A Practical Approach*. Oxford Univ. Press, Oxford, ss. 83–113.
- [44] READ N. D., ALLAN W. T. G., KNIGHT H., KNIGHT M. R., MALHÓ R., RUSSELL A., SHACKLOCK P. S., TREWAVAS A. T. 1992. Imaging and measurement of cytosolic free calcium in plant and fungal cells. *J. Microscopy* **166**: 57–86.
- [45] RIDGWAY E. B., ASHLEY C. C. 1967. Calcium transients in single muscle fibers. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **29**: 229–234.
- [46] RUSS U., GROLIG F., WAGNER G. 1991. Changes of cytoplasmic free Ca^{2+} in the green alga *Mougeotia scalaris* as monitored with indo-1, and their effect on the velocity of chloroplast movements. *Planta* **184**: 105–112.
- [47] SANDERS D., MILLER A. J., BLACKFORD S., BROSNAN J. M., JOHANES E. 1990. Cytosolic free calcium homeostasis in plants. *Curr. Topics Plant Biochem. Physiol.* **9**: 20–37.
- [48] SHACKLOCK P. S., READ N. D., TREWAVAS A. J. 1992. Cytosolic free calcium mediates red light-induced photomorphogenesis. *Nature*, **358**: 753–754.
- [49] SHIMOMURA O., MUSICKI B., KISHI Y. 1988. Semisynthetic aequorin as a tool for the measurement of calcium concentration. *Biochem. J.* **251**: 405–410.
- [50] SHIMOMURA O., MUSICKI B., KISHI Y. 1989. Semisynthetic aequorins with improved sensitivity to Ca^{2+} ions. *Biochem. J.* **261**: 913–920.
- [51] SHIMOMURA O., INOUE S., MUSICKI B., KISHI Y. 1990. Recombinant aequorin and recombinant semisynthetic aequorins – cellular Ca^{2+} ion indicators. *Biochem. J.* **270**: 309–312.
- [52] THOMAS A. P., DELAVILLE F. 1991. The use of fluorescent indicators for measurements of cytosolic free calcium concentration in cell populations and single cells. W: McCORMACK J. G., COBBOLD P. H. (red.), *Cellular Calcium. A Practical Approach*. Oxford Univ. Press, Oxford, ss. 1–54.
- [53] TIMMERS A. C. J., REISS H.-D., SCHEL H. N. 1991. Digitonin-aided loading of Fluo-3 into embryogenic plant cells. *Cell Calcium* **12**: 515–521.
- [54] TRETYN A. 1992. Elektrofizjologiczne badania nad rolą jonów wapnia w mechanizmie działania auksyny w komórkach włóknikowych korzeni gorczyczy (*Sinapis alba* L.). *Mechanizmy Regulacji Morfogenezy Roślin*, Rogów, 15–16. 05. 1992. Materiały Zjazdowe, ss. 95–98.
- [55] TRETYN A., KADO R., KENDRICK R. E. 1995. Loading of Fluo-3 and Fluo-3/AM into *Sinapis alba* root and visualization of free calcium by confocal scanning laser microscopy. *J. Exp. Bot.*, w druku.
- [56] TRETYN A., KENDRICK R. E., WAGNER G. 1991a. The role(s) of calcium ions in phytochrome action. *Photochem. Photobiol.* **54**: 1135–1155.
- [57] TRETYN A., WAGNER G., FELLE H. H. 1991b. Signal transduction in *Sinapis alba* root hairs: Auxins as external messengers. *J. Plant Physiol.* **139**: 187–193.
- [58] TSIEN R. Y. 1980. New calcium indicators and buffers with high selectivity against magnesium and protons: design, synthesis, and properties of prototype structures. *Biochemistry* **19**: 2396–2404.
- [59] TSIEN R. Y. 1981. A nondisruptive technique for loading calcium buffers and indicators into cells. *Nature* **290**: 527–528.
- [60] TSIEN R. Y., POZZAN T., RINK T. J. 1982a. T-cell mitogens cause early changes in cytoplasmic free Ca^{2+} and membrane potential in lymphocytes. *Nature* **295**: 68–71.
- [61] TSIEN R. Y., POZZAN T., RINK T. J. 1982b. Calcium homeostasis in intact lymphocytes: cytoplasmic free calcium monitored with a new, intracellularly trapped fluorescent indicator. *J. Cell Biol.* **94**: 325–334.
- [62] WALZ B., BAUMANN O. 1989. Calcium-sequestering cell organelles: *In situ* localization, morphological and functional characterization. *Progr. Histochem. Cytochem.* **20**: 147–182.
- [63] WILLIAMS D. A., FAY F. S. 1990. Intracellular calibration of the fluorescent calcium indicator Fura-2. *Cell Calcium* **11**: 75–83.
- [64] WILLIAMS D. A., CODY S. H., GEHRING C. A., PARISH R. W., HARRIS P. J. 1990. Confocal imaging of ionized calcium in living plant cells. *Cell Calcium* **11**: 291–297.
- [65] WILLIAMSON R. E., ASHLEY C. C. 1982. Free Ca^{2+} and cytoplasmic streaming in the alga *Chara*. *Nature* **296**: 647–651.