

DOKTORI (Ph.D.) - TÉZISEK

Intracelluláris kalcium transzporterek vizsgálata élesztő (*Saccharomyces cerevisiae*) modellben

Dr. Kellermayer Richárd

Pécsi Tudományegyetem
Általános Orvostudományi Kar
PÉCS
2005.

DOKTORI (Ph.D.) - TÉZISEK

Intracelluláris kalcium transzporterek vizsgálata élesztő (*Saccharomyces cerevisiae*) modellben

Készítette:

Dr. Kellermayer Richárd

Témavezetők:

Dr. Melegh Béla

Dr. Miseta Attila

Dr. David M. Bedwell

Programvezető:

Dr. Melegh Béla

Doktori Iskola vezetője:

Dr. Sümegei Balázs

Pécsi Tudományegyetem

Általános Orvostudományi Kar

PÉCS

2005.

Összefoglalás.....	3.
Bevezető.....	4.
Célkitűzések.....	6.
Eredmények	
- Környezeti kalcium érzékenység.....	6.
- Kalcium felvétel és össz-sejt-kalcium.....	8.
- <i>PMCI</i> transzkripció.....	10.
- Kalcium függő vakuoláris morfológia.....	11.
- Intracelluláris kalcium megoszlás.....	14.
- Intracelluláris kalcium szekvesztráció.....	16.
Megbeszélés.....	19.
Az új eredmények tételes összefoglalása.....	23.
Az értekezés alapjául szolgáló saját közlemények.....	23.
Egyéb saját közlemények.....	24.
Irodalomjegyzék.....	25.

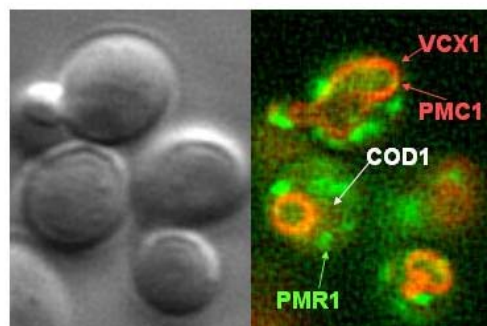
Összefoglalás

Az intracelluláris kalcium homeosztázis és jelátvitel vizsgálata napjaink molekuláris biológiai kutatásának középpontjában áll. Az eukarióta élesztők, mint ahogy a sütő-élesztő (*Saccharomyces cerevisiae*) is, kiváló molekuláris-genetikai modellként szolgálnak a magasabb rendű emlős kutatások számára. Az élesztők, bár jóval tágabb környezeti kalcium viszonyok mellett, de az emlős sejtekhez hasonlóan igen alacsony szintű szabad citoszolikus kalcium tartományt (50-200nM) tartanak fent. Így a *Saccharomyces cerevisiae* kalcium homeosztázis és jelátvitel szempontjából is hasznos organizmus a sejtelettani kutatásokban. E munkában három sejten belüli kalcium transzporter jellemezése történik molekuláris-genetikai módszerekkel. Nevezetesen a PMC1 vacuoláris Ca^{2+} -ATPáz, a PMR1 Golgi Ca^{2+} -ATPáz és a VCX1 vacuoláris $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^{+}$ antiporter vizsgálata kerül részletezésre az egyes fehérjék deléciós mutánsainak kalcium fenotípusa, össz-kalcium tartalma, kalcium felvevő képessége, intracelluláris kalcium megoszlása és gyors kalcium szekvesztrációja alapján. A vizsgálatokon keresztül igyekszünk közelebb kerülni az intracelluláris kalcium transzporterek együttes, szinkronizált szerepének megértéséhez a sejten belüli kalcium szabályozásban. E munka fontosságát szemlélteti, hogy nemrégiben azonosították a PMR1 fehérje humán homológjának, a hSPCA1 kalcium transzporternek, mutációit benignus familiáris pemphigusban.

Bevezetés

A kalcium szerepet játszik az élesztők számos élettani folyamatában, úgymint: a sejtciklus szabályozásban ^{1;2}; a szénhidrát megvonás hatására beálló G0 fázisból való kijutásban glükóz hozzáadására ³⁻⁵; a párhuzamos válasz néhány aspektusában ^{6;7}; a fehérjék feldolgozásában a szekréciós út során ⁸, és különböző környezeti hatásokhoz való alkalmazkodásban ⁹⁻¹¹. Az emlős sejtekhez hasonlóan, a kalcium jelátvivő ionként is viselkedik a kalcium-calmodulin-calcineurin rendszeren keresztül, melynek hatására számos jól leírt transzkripciós változás történik a sejtekben ¹²⁻¹⁴. Mindezen megfigyelés azt igazolja, hogy a sütő-élesztő (továbbiakban élesztő), avagy *Saccharomyces cerevisiae* hasznos modellként szolgálhat az emlős sejtek kalcium függő folyamatainak feltárása során.

Érdekes módon ez idáig csak néhány sejtben belüli fehérjéről igazolódott, hogy kitüntetett szereppel bír az élesztők kalcium anyagcseréjében. Ezek között található a vacuoláris Ca^{2+} -ATPáz PMC1 ¹⁵, a vacuoláris $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^{+}$ antiporter VCX1 (HUM1) ^{16;17} és a főleg Golgi apparátusban található $\text{Ca}^{2+}/\text{Mn}^{2+}$ -ATPáz PMR1 ¹⁸⁻²⁰. Nemrégiben azonosították az endoplazmatikus reticulum (ER) kalcium homeosztázisában résztvevő COD1 Ca^{2+} -ATPáz²¹ (1-es ábra).



1-es ábra: A kalcium anyagcsere szempontjából kitüntetett szereppel bíró fehérjék *S. cerevisiae*-ben. Az ábrán a vakuolumot FM 4-64-vel (vitális fluoreszcens festék) jelöltük és a sejtek PMR1-GFP kiméra fehérjét expresszáltak.

A fenti és valószínűleg számos más fehérje összehangolt működése biztosítja, hogy az élesztő sejtek nyugalmi citoplazmatikus szabad kalcium mennyisége szűk határok (50-200nM) között maradjon igen széles környezeti kalcium koncentrációk mellett is^{13;14}. Amikor a környezeti kalcium mennyisége növekszik, a kalcium-calmodulin-rendszeren keresztül aktiválódik a TCN1/CRZ1 transzkripció faktor és számos fehérje (ezek között a PMR1 és a PMC1 fehérje) expressziója fokozódik. Ezzel szemben, ilyen körülmények között a VCX1 fehérje mennyisége enyhén-, aktivitása nagyobb mértékben (poszt-transzlációs folyamaton keresztül) csökken^{13;14;16;22}.

A PMC1 és a PMR1 fehérjék hiánya (deléciós mutációk hatására) valamelyest ellentétes Ca^{2+} fenotípushoz vezet. A *pmc1Δ* törzs magas környezeti kalcium szintre (>200mM) érzékeny és össz-kalcium tartalma kisebb, mint a vad típusé¹⁵. Ezzel szemben a *pmr1Δ* törzs inkább környezeti kalcium-szint csökkenésre érzékeny, míg kalcium felvevő képessége és össz-kalcium tartalma nagyobb, mint a vad típusé^{23;24}. A VCX1 fehérje hiánya önmagában nem vezet kalcium érzékenységre változáshoz²⁵ (1-es táblázat).

Fehérje	Lokalizáció	Működés	Mutáns Ca^{2+} fenotípusa
VCX1	Vacuolum (Ca^{2+} => VCX1 gátlás)	Ca^{2+}/H^+ antiporter	Nincs
PMR1	Golgi apparátus (Ca^{2+} =>PMR1↑)	Ca^{2+} ATP-áz	Alacsony calcium környezetre érzékeny
PMC1	Vacuolum (Ca^{2+} =>PMC1↑)	Ca^{2+} ATP-áz	Magas calcium környezetre érzékeny

1-es táblázat: Az általunk vizsgált fehérjék lokalizációja, működése és kalcium fenotípusa. Citoplazmáris kalcium-szint növekedés következtében a VCX1 főleg posztranszlációsán gátlódik, a PMR1 transzkripciója enyhén a PMC1-é jelentősen megnő.

Első megközelítésben igen eltérő kalcium fenotípust mutatnak a fenti fehérjék deléciós mutánsai. Mégis, néhány tanulmány felvetette funkcionális kölcsönhatások lehetőségét a két intracelluláris Ca^{2+} -ATPáz között^{8;26}. Azt is közölték, hogy a *pmr1Δ* mutánsban indukálódik a PMC1 fehérje és a vacuoláris Ca^{2+}/H^+ csere²⁷. Ezek a vizsgálatok azt jelzik, hogy

funkcionális átfedések lehetnek az egyes sejten belüli kalcium transzporter fehérjék között az életképesség fenntartása érdekében akkor, ha a fehérjék közül egy vagy kettő működése kiesik.

Célkitűzések

Munkánkban szeretnénk mélyrehatóbban megvizsgálni az egyes sejten belüli kalcium transzporterek szerepét az élesztők intracelluláris kalcium homeosztázisában. Ezt a bevezetőben ismertetett fehérjék deléciós mutánsainak megfigyelésével igyekszünk majd véghez vinni, különös tekintettel a munkánkat megelőzően más élesztő törzsekben életképtelennek leírt *pmr1/pmc1Δ* kettős mutáns vizsgálatán keresztül. Ez utóbbi törzs vizsgálatával a PMC1 és a VCX1 fehérjék pontosabb szerepéről is tájékozódhatunk a *pmr1Δ* élesztőben. Leginkább azt a kérdést szeretnénk megvizsgálni, hogy miként lehetnek funkcionális átfedések az egyes intracelluláris kalcium transzporterek között, amikor egyik vagy másik működése kiesik. Kísérleteinkben a molekuláris biológiai módszerek széles skálájával próbálunk meg minél részletesebb információt szerezni a sejten belüli kalcium szabályozást illetően. E módszereket a következő fejezetben fogjuk ismertetni.

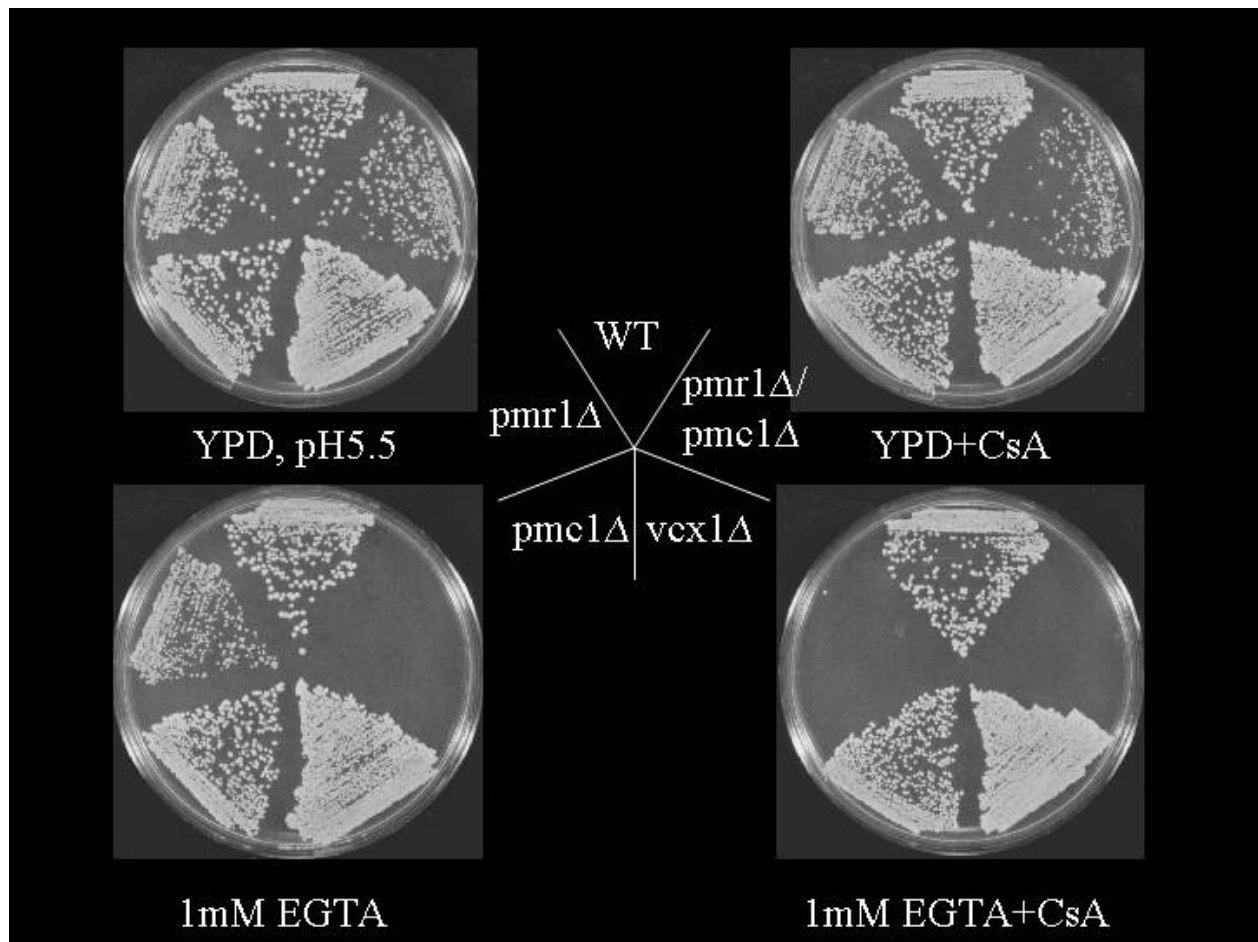
Eredmények

Környezeti kalcium érzékenység

A környezeti kalcium érzékenységet kalciummal vagy EGTA-val kiegészített YPD-agarose táptalajokon vizsgáltuk. A korábbi közleményeknek megfelelően azt tapasztaltuk, hogy a *pmr1Δ* törzs kevés kalciumot tartalmazó (EGTA-val kiegészített YPD medium) közegben nem nő, míg a *pmc1Δ* törzs emelkedett kalcium szintre érzékeny. A *vcx1Δ* törzs nem mutatott kalcium érzékeny fenotípust mások megfigyeléséhez hasonlóan. A *pmc1/pmr1Δ* kettős mutáns vizsgálata során meglepő eredményt kaptunk. Azt tapasztaltuk, hogy ez a törzs

érzékenyebb a *pmr1Δ* törzsnél EGTA-ra, azaz alacsony környezeti kalcium szintre (3-as ábra).

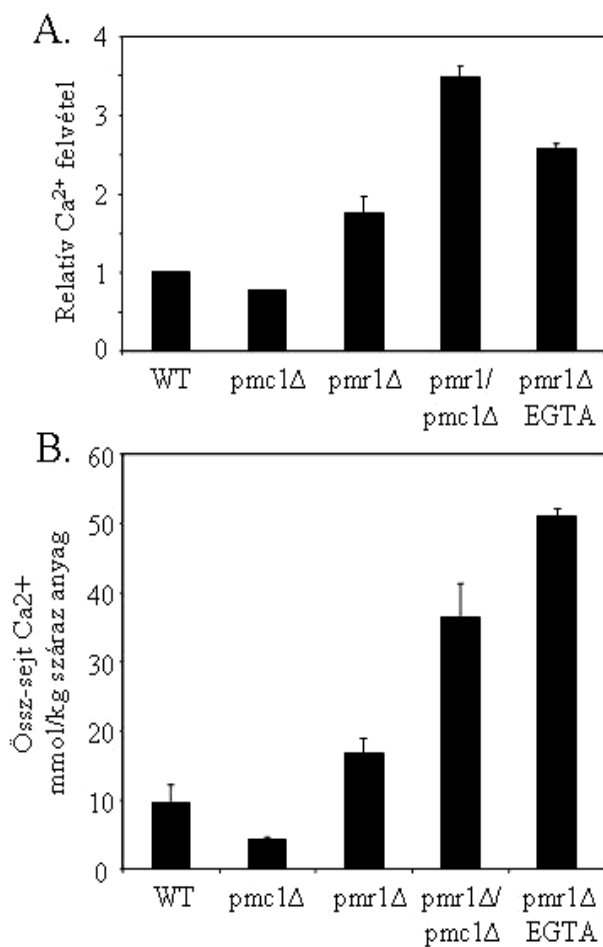
Ezen túlmenően azt figyeltük meg, hogy a *pmr1Δ* törzsben csökkentett kalcium tartalmú táptalajon aktiválódik a calcineurin, mivel ennek blokkolása (cyclosporine A /CsA/-val)²⁸ gátolta a törzs növekedését (3-as ábra). Ezzel szemben a *pmc1/pmr1Δ* mutáns magas kalciumra ugyanolyan érzékeny volt, mint a *pmr1Δ* törzs (nem mutatjuk). Tehát a PMC1 fehérje hiánya nem befolyásolja a *pmr1Δ* mutáns kalcium érzékenységet magas környezeti kalcium viszonyok között. Ezekből a megfigyelésekből egyrészt arra következtettünk, hogy alacsony környezeti kalcium szint mellett, nem várt módon, a *pmr1Δ* törzsben fokozódik az intracelluláris kalcium stressz, hiszen a kalcium-calmodulin-calcineurin rendszer aktiválódik. Továbbá, hogy ilyen körülmények között a PMC1 fehérje nélkülözhetetlen a *pmr1Δ* törzs számára. Korábbi közlemények a *pmr1Δ* mutáns alacsony környezeti kalcium érzékenységét azzal magyarázták, hogy ilyen körülmények között a törzs nem képes elegendő kalcium felvételére, és a Golgi-apparátusban a növekedéshez szükséges kalcium szint fenntartására.²⁹ Ezzel szemben a mi vizsgálataink azt sejtették, hogy alacsony környezeti kalcium szint mellett a *pmr1Δ* törzsben fokozódik a kalcium felvétel és mennyiség, és így a kalcium-calmodulin-calcineurin rendszeren keresztül aktiválódhat a PMC1 transzkripció, mely fehérje szükséges a növekedéshez ilyen körülmények között.



3-as ábra: Vizsgálatok táptalajon. A *pmr1/pmclΔ* törzs érzékenyebb a környezeti kalcium szint csökkenésre, mint a *pmr1Δ* törzs (bal oldali tárgylemezek). Továbbá, a *pmr1Δ* törzs érzékeny calcineurin gátlásra alacsony környezeti kalcium körülmények között (jobb oldali tárgylemezek).

Kalcium felvétel és össz-sejt-kalcium

Miután megvizsgáltuk a *pmr1Δ* törzs környezeti kalcium érzékenységének néhány jellemzőjét, kalcium-felvétel és össz-sejt kalcium méréseket végeztünk a táptalajok megfigyelésével kialakított elképzeléseink igazolására. Azt tapasztaltuk, hogy a *pmr1Δ* mutánsához képest a *pmr1/pmclΔ* törzs kalcium felvétele és össz-kalcium tartalma körülbelül 2-szer fokozottabb. Ezen túlmenően azt figyeltük meg, hogy 1mM EGTA-val kiegészített táptalajban megnő a *pmr1Δ* törzs kalcium felvétele és kalcium tartalma a normál médiumbelihez képest (4-es ábra).



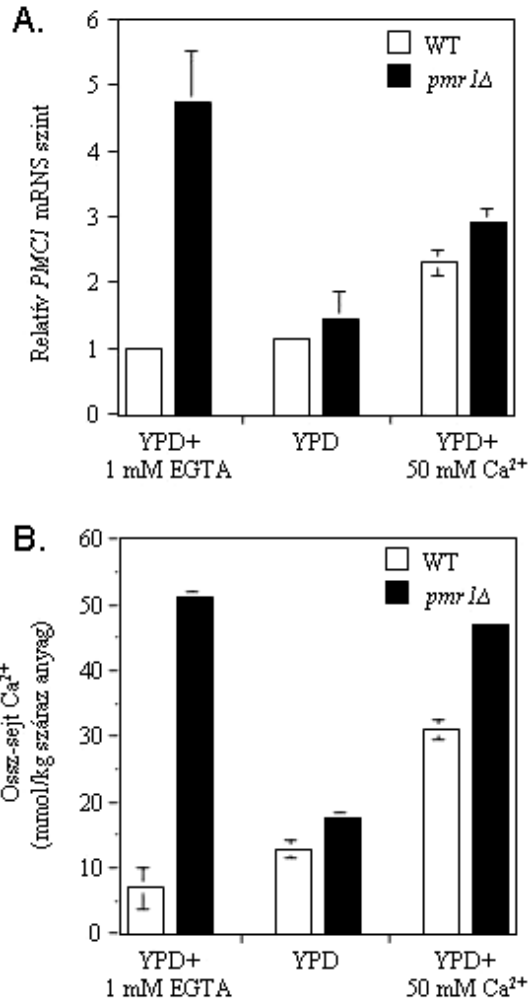
4-es ábra: Relatív kalcium felvétel és össz-sejt-kalcium tartalom. A kísérletek leírását az anyagok és metodikák részben ismertettük. Minden kísérletet minimum 3-szor végeztünk el, az eredményeket átlagoltuk és standard deviációt (hiba határok) számítottunk. EGTA: 1mM EGTA-val kiegészített táptalaj (YPD, pH 5.5)

Ezek az eredmények egyrészt megerősítették a táptalajok megfigyelésével hozott feltételezéseinket. A *pmr1Δ* törzsben csökkent környezeti kalcium szint mellett megnövekszik a sejtek kalcium felvétele és össz-kalcium tartalma. Továbbá, a *pmr1Δ* mutánsban fontos szereppel bír a PMC1 fehérje. Másrészt viszont az, hogy a *pmc1* deléció fokozza a *pmr1Δ* fenotípust (fokozott kalcium felvétel és össz-sejt-kalcium) meglepő, nem várt eredmény, hiszen a *pmc1Δ* mutáció önmagában pontosan ellentétes jellemzőkhöz vezet *S. cerevisiae*-ben (4-es ábra). Ez utóbbi eredmények azt jelezték, hogy szemben a vad típusú sejtekkel, a PMC1

fehérje más jellegű, a PMR1 fehérjéhez hasonló szerepet is betölt a *pmr1Δ* mutánsban, hiszen deléciója additív, *pmr1Δ* fenotípus fokozódást eredményez.

***PMCI* transzkripció**

Táptalajon tett megfigyeléseink azt jelezték, hogy a *pmr1Δ* törzsben aktiválódik a calmodulin-calcineurin rendszer, amikor alacsony kalcium tartalmú közegbe kerül. Továbbá, azt találtuk, hogy ilyen körülmények között szükséges a *PMCI* fehérje jelenléte a sejtekben. Korábbi tanulmányokból ismert, hogy a calcineurin aktiválódásán keresztül a *PMCI* transzkripció fokozódik, amikor a *S. cerevisiae* sejtek magas kalcium tartalmú közegbe kerülnek¹⁵. Annak további igazolására, hogy a *pmr1Δ* mutánsban alacsony kalcium tartalmú közegben hasonló változások mennek végbe, mint a vad típusú sejtekben magas kalcium tartalmú környezetben, *PMCI* Northern-blot vizsgálatokat végeztünk. Azt tapasztaltuk, hogy míg a vad típusú sejtekben a környezeti kalcium szint fokozódásával megegyezően nő a *PMCI* mRNS mennyisége, addig a *pmr1Δ* mutánsban mind csökkent, mind növekedett kalcium tartalmú környezetben fokozódik a *PMCI* transzkripció a normál (YPD) körülményekhez képest (5-ös ábra A.). A *PMCI* mRNS szintek összhangban állnak az össz-sejt-kalcium tartalommal (fokozott intracelluláris kalcium stresszel) (5-ös ábra B.)



5-ös ábra: Alacsony kalcium tartalmú környezetben fokozódik az intracelluláris kalcium mennyiség függő *PMCI* transzkripció a *pmr1Δ* mutánsban. A sejteket logaritmusos fázisig növeltük YPD-ben, vagy 1mM EGTA-val-, illetve 50mM Ca²⁺-val kiegészített YPD-ben, majd az anyagok és metodikák részben ismertetett módon végeztük a kísérleteket. Az eredmények minimum 3 kísérlet átlagát mutatják.

Kalcium függő vakuoláris morfológia

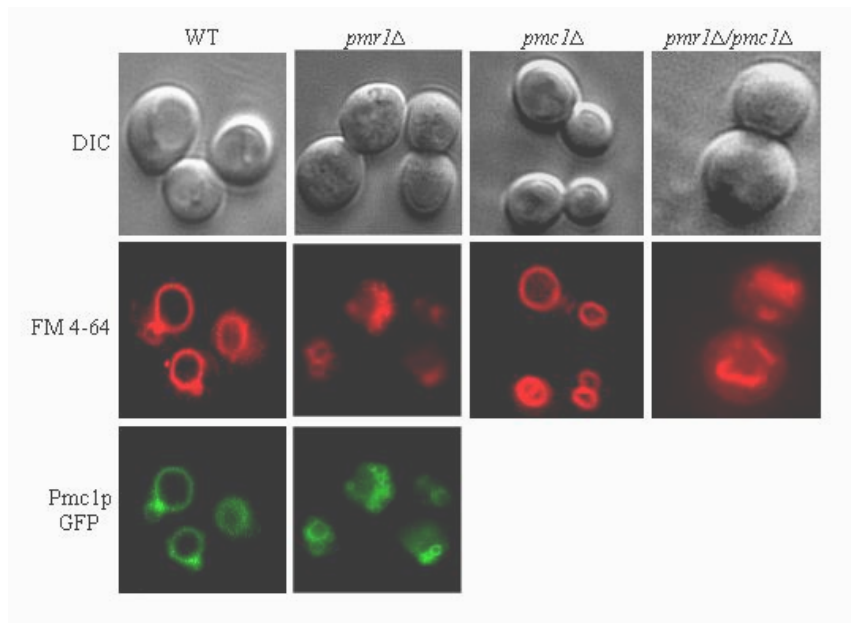
Előző funkcionális megfigyeléseinkből arra következtettünk, hogy a *pmr1Δ* törzsben, ha csak kis mértékben is, de a *PMC1* fehérje segíti a Golgi apparátus kalcium felvételét miközben a szekretoros úton eljut a vakuolumig. Más tanulmányok is hasonló következtetéshez vezettek^{8;30;31}. Egy *pmr1Δ* törzsben szubcelluláris frakcionálással

kimutatták, hogy a PMC1 átfedésben van nemcsak vacuoláris fehérje markerekkel hanem Golgi-apparátusbeliekkel is³².

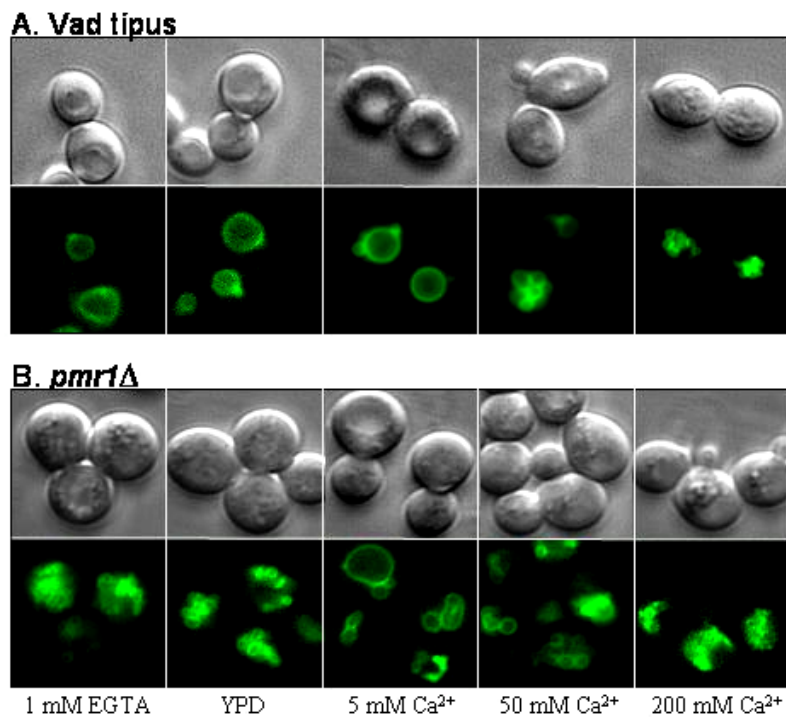
Ez utóbbi tanulmány alapján kísérletet tettünk, hogy a PMC1 fehérjét *in vivo* is kimutassuk a *pmr1Δ* törzs Golgi apparátusában. Ezért létrehoztunk egy PMC1-gyel megegyező funkcióval bíró, PMC1-GFP kiméra fehérjét és expresszáltuk a *pmc1Δ* törzsben és a *pmr1/pmc1Δ* mutánsban. Így végső soron a vad törzs és a *pmr1Δ* mutáns PMC1 lokalizációját tudtuk nyomon követni különböző extracelluláris kalcium viszonyok között.

Módszerünk felbontása nem bizonyult elégségesnek ahhoz, hogy a PMC1 fehérjét kimutassuk a Golgi-apparátusban, de vizsgálataink mégis érdekes megfigyelésekhez segítettek hozzá bennünket. Azt találtuk, hogy mind a *pmr1Δ* mutánsban, mind a *pmr1/pmc1Δ* törzsben a vakuolum igen kifejezetten fragmentált, vezikuláris, sőt tubuláris formát ölt (6-os ábra). További vizsgálokkal azt igazoltuk, hogy a vakuolum fragmentálódik a vad típusban is, ha növekvő extracelluláris kalcium koncentrációnak vannak kitéve a sejtek. Ezzel szemben, a *pmr1Δ* törzsben mind csökkenő, mind növekvő extracelluláris kalcium koncentrációk mellett fokozódik a vakuoláris vezikuláció (7-es ábra). E változásokat a vad típusban nem ozmotikus stressz okozta, mivel még 300mM NaCl-nak kitett vad típusú sejtekben is 1-3 vakuolum látható (nem mutatott).

Ezen és korábbi kísérleteink alapján úgy tűnt, hogy az intracelluláris kalcium stressz vakuoláris fragmentációt okoz, mely vezikuláris, tubuláris, apróbb vakuolumokhoz vezet. Így a vacuoláris morfológia megfigyelése hasznos, könnyen vizsgálható támpontot adhat élesztő kalcium anyagcsere kutatások közben a celluláris kalcium stressz fokára nézve. Valóban, az általunk vizsgált törzsek vakuoláris morfológiájának utólagos vizsgálata, minden esetben összhangban állt a más módszerekkel megállapított sejten belüli fokozott kalcium stresszel.

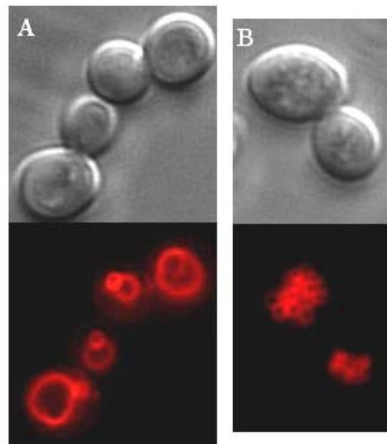


6-os ábra: Vakuoláris fragmentáció a *pmr1*Δ és a *pmr1*/*pmc1*Δ törzsben. A vakuolumokat FM 4-64-vel (vitális vacuoláris fluoreszcens festék) illetve PMC1-GFP fúziós fehérjével jelöltük.



7-es ábra: Extracelluláris kalcium hatására bekövetkező vakuoláris fragmentáció.

Továbbiakban a *pmc1/vcx1Δ* mutánst vizsgáltuk, annak a kérdésnek a megválaszolása érdekében, hogy vajon a citoplazmatikus vagy a vakuoláris kalcium stressz okozza a vakuolumok felaprózódását. Ez utóbbi törzs már 100mM extracelluláris kalcium koncentráció mellett sem nő és vakuoluma jóval kisebb mennyiségű kalciumot tartalmaz, mint a vad törzs³³, hiszen a kitüntetett szereppel bíró vakuoláris kalcium transzporterek közül egyik sem fejeződik ki benne. Azt tapasztaltuk, hogy a *pmc1/vcx1Δ* mutáns már 50mM kalciumban növesztve is kifejezetten fragmentált, vezikuláris vakuolumokat tartalmaz (8-as ábra).



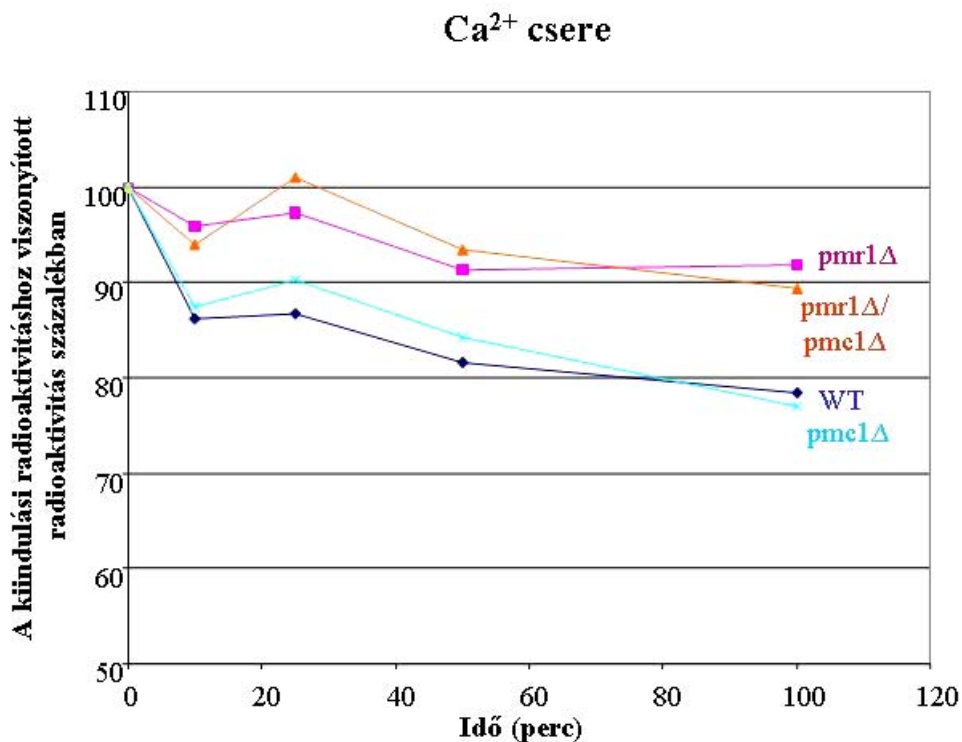
8-as ábra: Jelentősen felaprózódott vakuolumokat tartalmaz a *pmc1/vcx1Δ* törzs már 50 mM környezeti Ca^{2+} szint mellett is. A. Normál YPD, pH 5.5. B. YPD, pH 5.5 + 50 mM CaCl_2 .

Ebből arra következtettünk, hogy a vakuoláris morfológiát leginkább az extravakuoláris kalcium mennyisége befolyásolja *Saccharomyces cerevisiae*-ben.

Intracelluláris kalcium megoszlás

Az intracelluláris kalcium megoszlást az anyagok és metodikák részben ismertetett Ca^{2+} kicserélődéssel vizsgáltuk az egyes törzsekben. A sejtek kalcium tartalma jórészt intracelluláris organellekben található *S. cerevisiae*-ben³⁴. Úgy tűnik, hogy a vakuolum tartalmazza az össz-sejt-kalciumnak mintegy 80-90%-át, egy lassú kicserélődésű, polifoszfát-komplex formájában^{35;36}. Ezzel szemben a Golgi apparátus kalcium tartalma egy

dinamikusabb, kalcium raktárt képez. Így kinetikai szempontból, kalcium kicserélődési kísérletekben, elkülöníthetünk egy viszonylag gyorsabban kicserélődő kalcium készletet (melyet a Golgi és az endoplazmatikus reticulum /ER/ alkot) és egy ki nem cserélődő, stabilabb, vakuoláris kalcium raktárt^{15;37}. Mivel korábbi kísérleteinkből arra következtettünk, hogy a PMC1 fehérje a *pmr1Δ* mutánsban részben PMR1 szerű feladatokat lát el, kíváncsiak voltunk a *pmr1/pmc1Δ* törzs intracelluláris kalcium megoszlására. Azt találtuk, hogy a *pmr1Δ* mutánshoz hasonlóan a *pmr1/pmc1Δ* törzsben is eltolódik az intracelluláris kalcium eloszlás a vakuoláris (lassan-, avagy nem-kicserélődő) raktár irányába (9-es ábra).



9-es ábra: A *pmr1/pmc1Δ* törzsben a vakuoláris kalcium aránya nő. Míg a vad típus (WT) és a *pmc1Δ* törzsben a kalcium kb. 20%-a a gyorsan kicserélődő (Golgi-ER) pool-ban van, addig a *pmr1Δ*, és a *pmr1/pmc1Δ* mutáns kalcium tartalmának csak 10% található e formában és ez utóbbi törzsekben kb. 90%-ra nő a vakuoláris, nem kicserélődő raktár aránya.

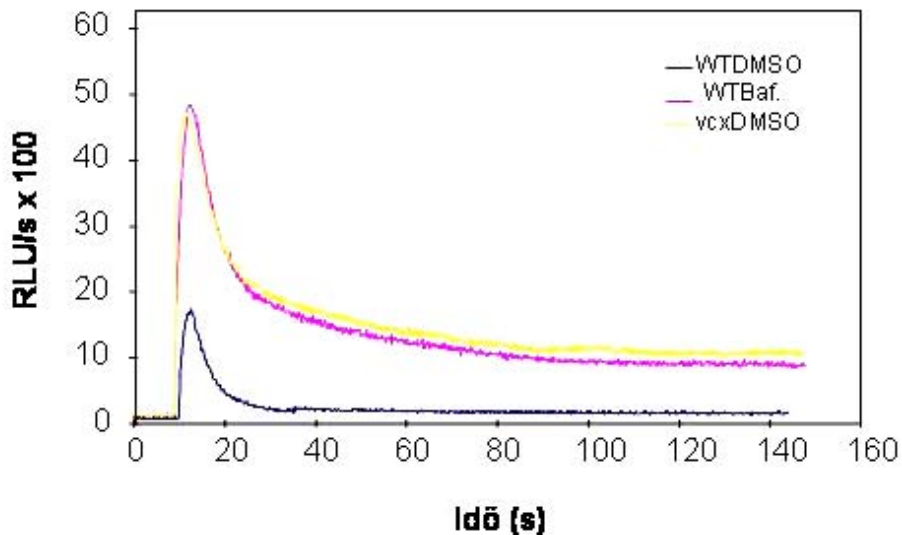
Ezek az eredmények azt jelezték, hogy valószínűleg a vakuoláris rendszerrel asszociálódó fehérje, vagy fehérjék lehetnek felelősek a kalcium homeosztázis fenntartásáért a kettős mutánsban is. Továbbá azt mutatták, hogy ha a PMC1 fehérje esetlegesen el is lát PMR1 jellegű (kalcium szekvesztráció a Golgi apparátusba) funkciókat a *pmr1Δ* mutánsban, akkor a fehérje ez irányú működése oly kis mértékű, hogy az össz-kalcium eloszlást a *pmr1Δ* törzsben nem befolyásolja.

Intracelluláris kalcium szekvesztráció

A sejten belüli kalcium megoszlás vizsgálata során arra a következtetésre jutottunk, hogy a *pmr1/pmc1Δ* törzsben a kalcium háztartás fenntartásáért egy vakuolummal asszociált, fehérje lehet felelős. Korábbi vizsgálatok a PMC1 fehérjén kívül csak egy ilyen, a kalcium háztartásban fontos szereppel bíró fehérjét azonosítottak. Ez a VCX1/HUM1 vacuoláris $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^{+}$ antiporter. Izolált vakuolumokkal végzett vizsgálatok azt igazolták, hogy ez az egyetlen fehérje, ami felelős a vacuoláris pH-grádiens-függő-kalcium-felvételért¹⁷.

Annak érdekében, hogy megvizsgáljuk, hogy valóban a VCX1 fehérje lehet-e felelős a *pmr1/pmc1Δ* törzs kalcium háztartásának fenntartásáért, kalcium szekvesztrációs vizsgálatokat végeztünk citoplazmatikusan expresszált aequorin segítségével. Ilyen körülmények között, a colenterazinnal aktivált aequorin érzékenyen lumineszkál a szabad, reakcióképes citoplazmatikus kalcium hatására (lásd anyagok és metodikák). Így indirekt módon, kalibrációs görbe segítségével lehet szabad citoplazmatikus kalcium-szint változásokat követni élesztőben, de más sejtekben is (lásd anyagok és metodikák). E rendszer segítségével azt vizsgáltuk, hogy az egyes törzsek hogyan reagálnak 100mM Ca^{2+} sokkra. Korábbi vizsgálatainkból tudtuk, hogy míg a *pmr1Δ* törzs hasonló lumineszcens választ ad, mint a vad típusú sejtek, addig a *pmc1Δ* mutáns kisebb aktivitást mutat a vad típusnál ilyen kísérletekben (nem mutatott). Ezen túlmenően azt tapasztaltuk, hogy a *vcx1Δ* törzs jóval

magasabb szabad kalcium szinttel reagál külső kalcium sokkra, mint a vad típusú sejtek. Ezen megfigyelést a vacuoláris H^+ -ATPáz farmakológiai gátlószerével, bafilomycin A1-gyel³⁸ is igazoltuk, mellyel a VCX1 fehérje, mint vacuoláris Ca^{2+}/H^+ antiporter indirekt gátolható³⁹ (10-es ábra).

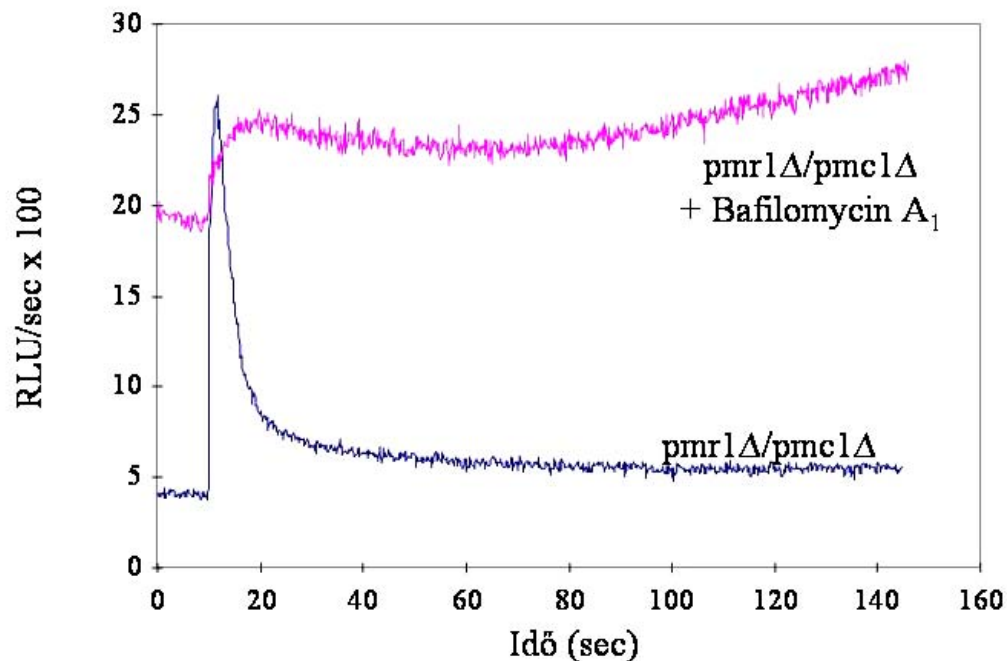


10-es ábra: A VCX1 fehérje gyors kalcium szekvesztrációt végez *Saccharomyces cerevisiae*-ben. A coelenterazinnal feltöltött, aequorint expresszáló sejteket az ábra 10. másodpercében 100mM Ca^{2+} -val sokkoltuk és a lumineszcenciát luminométer segítségével rögzítettük. A *vcx1* deléción és a bafilomycin A1 hasonló módon fokozza a vad típusú sejtek szabad kalcium szint változását kalcium sokkot követően. RLU: relatív fényegység; DMSO: dimetil-szulfoxid; Baf: 10 perces pre-inkubáció 5 μ M, DMSO-ban oldott bafilomycin A1-vel.

Ezekből a vizsgálatokból arra következtettünk, hogy a PMR1, PMC1 és VCX1 fehérjék közül a VCX1 fehérje játszik kitüntetett szerepet a gyors intracelluláris kalcium változások tompításában, azaz a szabad cytoplazmatikus Ca^{2+} -szint szoros szabályozásában³⁹. Továbbá, kísérleteink azt igazolták, hogy a VCX1 fehérje ezen szerepe bafilomycin A1 segítségével, teljesen gátolható (10-es ábra).

A fenti kísérleteink alapján bafilomycin A1-gyel kezeltük az aequorint kifejező, *pmr1/pmc1* Δ törzset annak érdekében, hogy megvizsgáljuk a VCX1 fehérje szerepét e

mutánsban. Ezt követően kalcium sokknak vetettük alá a tenyészetet és luminométer segítségével rögzítettük a sejtek intracitoplazmatikus kalcium szint változását (11-es ábra).



11-es ábra: A VCX1 fehérje kulcs szerepet játszik a *pmr1/pmclΔ* törzs kalcium háztartásának fenntartásában. A coelenterazinnal feltöltött, aequorint expresszáló sejteket az ábra 10. másodpercében 100mM Ca²⁺-val sokkoltuk és a lumineszcenciát luminométer segítségével rögzítettük. RLU: relatív fényegység. Bafilomycin A₁: 10 perces pre-inkubáció 5 μM, DMSO-ban oldott bafilomycin A₁-gyel.

Azt tapasztaltuk, hogy a *pmr1/pmclΔ* törzs önmagában egy gyors szabad citoplazmatikus Ca²⁺-szint emelkedéssel reagál extracelluláris kalcium sokkra, majd ezen megnövekedett kalcium mennyiség gyorsan eloszlik a sejtekben. A VCX1 fehérje indirekt gátlása bafilomycin A₁-vel viszont már az alap citoplazmáris kalcium szintet is lényegesen megnövelte (160nM-ról 260 nM-ra) és a sejtek képtelenek voltak a kalcium intracelluláris szekvesztrációjára. Ezen eredmények megerősítették azt a megfigyelésünket, hogy a *vcx1/pmrl/pmclΔ* törzs életképtelen³³, hiszen már a VCX1 fehérje rövid idejű blokkolása is teljesen megzavarja a *pmr1/pmclΔ* mutáns citoplazmatikus kalcium regulációját. Más

szemszögből viszont, megfigyeléseink azt is jelezték, hogy a három fehérje közül egy megléte elégséges a kalcium homeosztázis bizonyos szintű fenntartásához *S. cerevisiae*-ben.

Megbeszélés

E munkánk során megfigyeltük a *pmr1Δ S. cerevisiae* törzs alacsony környezeti kalcium érzékenységének néhány részletét. Azt tapasztaltuk, hogy EGTA-val kiegészített táptalajon megnő a mutáns sejtek kalcium felvétele és akkumulációja, szemben a vad típuséval. A változások hatására aktiválódik a kalcium-calmodulin rendszer, mely a PMC1 fehérje transzkripcióját körülbelül ötszörösére növeli a *pmr1Δ* sejtekben a vad típusúakhoz képest. Ez a PMC1 mennyiség növekedés szükséges a *pmr1Δ* törzs számára ilyenkor, hiszen a *pmr1/pmc1Δ* kettős mutáns érzékenyebb EGTA-ra (extracelluláris kalcium szint csökkenésre) mint a *pmr1Δ* törzs. Az EGTA divalens kation kelátor és a PMR1 nemcsak kalcium de mangán transzportot is végez és a *pmr1Δ* törzs mangánra érzékeny. A PMC1 fehérje azonban szelektív Ca^{2+} transzporter és a deléciója nem befolyásolja a *pmr1Δ* mutáns kalcium fenotípusát (saját megfigyelés). Ezekből arra következtettünk, hogy EGTA-val végzett megfigyeléseink elsősorban a kalcium homeosztázisra vonatkoztak. Ezt a tényt megerősítettük azzal a kísérlettel, melyben a kalciumra szelektívebb BAPTA kelátorral is ugyanazt az eredményt kaptuk, mint EGTA-val⁴⁰.

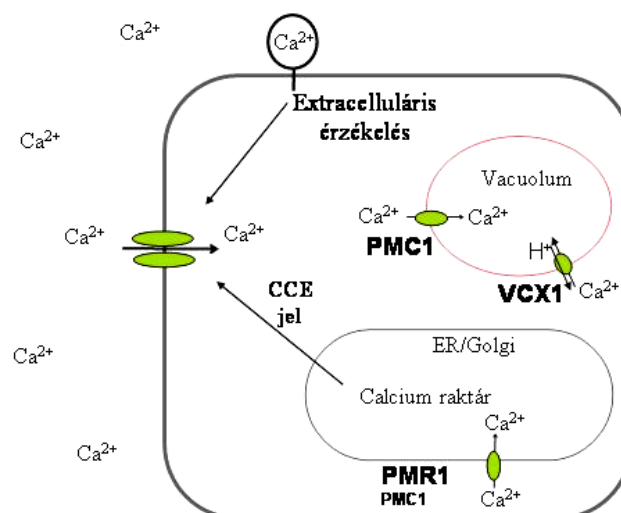
Korábbi megfigyelések már sejtették, hogy a PMC1 fehérje szerepet játszhat a Golgi apparátus kalcium homeosztázisának fenntartásában akkor, amikor a PMR1 funkciója kiesik (deléciós mutáns). Egy PMC1 sokszorozott plazmiddal történő expressziója csökkentette a *pmr1Δ* fenotípust⁸. Ezen túlmenően, egy *pmr1/pmc1Δ* törzsből az endoplazmatikus retikulum (ER) függő „unfolded protein” válasz (UPR) fokozottabb volt, mint a *pmr1Δ* mutánsban, mutatva azt, hogy a PMC1 funkció elvesztése fokozza az ER Ca^{2+} hiányát, mely ion gátolja a fehérjék felgyűrődését⁴¹. A mi megfigyeléseink - mármint, hogy a PMC1 fehérje hiánya

fokozza a *pmr1Δ* mutáns kalcium fenotípusát - megerősítették a fenti megfigyeléseket. Így arra a következtetésre jutottunk, hogy a PMC1 fehérjének egy hányada részt vesz az ER-Golgi rendszer kalcium homeosztázisának fenntartásában különösen akkor, amikor a PMR1 fehérje nem tudja ellátni e szerepét. Ennek megerősítése végett, megpróbáltuk kimutatni a PMC1 fehérjét a szekretoros organellekben egy PMC1-GFP kiméra fehérje segítségével. Módszerünk nem bizonyult kellően érzékenynek ehhez, mégis vizsgálatainkból hasznos megfigyeléseket tettünk a vakuoláris morfológia és az intracelluláris kalcium stressz összefüggéseit illetően. Nevezetesen megállapítottuk, hogy az extravakuoláris, intracelluláris kalcium tartalom függvényében fokozódik a vakuolumok szétesése, mely apróbb vezikulumok, tubulusok létrejöttéhez vezet. Felvetettük, hogy ennek funkcionális jelentősége lehet, mivel e folyamat által megnövekszik a vakuoláris fajlagos felület, amely optimalizálhatja a vakuoláris kalcium szekvesztráció hatékonyságát, és ez által végső soron csökkenhet a citoplazmatikus kalcium stressz⁴⁰.

Annak ellenére, hogy mi nem tudtuk *in vivo* kimutatni a PMC1 fehérjét a szekretoros organellekben, subcelluláris fragmentációs vizsgálatok igazolták a PMC1 jelenlétét a Golgi apparátusban egy *pmr1Δ* mutánsban⁴².

Saccharomyces cerevisiae-ben a Golgi apparátus kalcium tartalmának csökkenése Ca^{2+} felvételhez vezet egy nagy affinitású kalcium transzporterén keresztül melyet a *CCHI* és *MIDI* gén kódol. Ez a megfigyelés ahhoz a hipotézishez vezetett, hogy élesztőkben létezik egy mechanizmus mely a Golgi apparátus kalcium tartalmát és a nagy affinitású kalcium felvételt összeköti, hasonlóan az emlős sejtek kapacitatív kalcium beáramlás (capacitative calcium entry /CCE/) jelenségéhez³⁰. Ez a modell azt sugallja, hogy a *pmr1Δ* törzs alacsony kalcium tartalmú környezetre azért érzékeny, mert ilyen körülmények között nincsen elegendő extracelluláris kalcium, melynek segítségével biztosítani tudná a sejt a megfelelő kalcium szintet a Golgi apparátusban. A mi megfigyeléseinket - melyek szerint alacsony

kalcium tartalmú környezetben fokozódik a *pmr1Δ* törzs kalcium felvétele és össz-kalcium tartalma – nem lehetett magyarázni a fenti hipotézissel, hiszen igen valószínűtlen, hogy a Golgi apparátus kalcium tartalma kisebb, amikor mintegy háromszoros kalcium tartalom van jelen a sejtekben. Ezen túlmenően azt tapasztaltuk, hogy 5 ill. 50 mM extracelluláris kalcium tartalom mellett a legkisebb a *pmr1Δ* törzsben a vacuoláris fragmentáció, mely azt jelzi, hogy a környezeti kalcium szint enyhe emelkedése csökkenti a celluláris kalcium felvételt és stresszt (7-es ábra). Ezen megfigyeléseink alapján felvetettük egy olyan mechanizmus lehetőségét, mely a környezeti kalcium szint függvényében befolyásolja a kalcium felvétel fokát. Erre egy sejtfelszíni érzékelő molekula látszik legalkalmasabbnak, melyen keresztül intracelluláris jelátvitel segítségével tájékoznak a sejtek a környezeti kalcium viszonyokról. Hasonló extracelluláris érzékelőt emlős vizsgálatok leírtak már^{43;44}. Vizsgálataink igen határozottan felvetik tehát egy extracelluláris kalcium érzékelő mechanizmus létét, mely segítségével az élesztő sejtek folyamatosan tájékoznak környezetük kalcium viszonyairól és így az intracelluláris, kitüntetett szereppel bíró fehérjék segítségével dinamikusan tudnak alkalmazkodni a változásokhoz (12-es ábra).



12-es ábra: Az extracelluláris kalcium érzékelés modellje. A sejtek kalcium felvételét mind a CCE jellegű mechanizmus mind a környezeti kalcium érzékelés befolyásolja, alakítja.

Az intracelluláris kalcium megoszlásra és a kalcium szekvesztrációra tett megfigyeléseink azt igazolták, hogy a *pmr1/pmc1Δ* törzs kalcium homeosztázisának fenntartásáért a VCX1 fehérje felelős. Ezek az eredmények megerősítették korábbi megfigyeléseinket, mely szerint a három, általunk vizsgált fehérje közül, bármely kettő összetett deléciós mutánsa életképes de a három fehérje egyesített hiánya életképtelenséghez vezet *Saccharomyces cerevisiae*-ben³³. Ez egyben azt jelenti, hogy ha szűkebb környezeti kalcium határok között is, de a PMR1, PMC1 vagy a VCX1 fehérje megléte önmagában is elegendő az életképességhez szükséges mértékű kalcium homeosztázis fenntartására a másik kettő hiányában. Ez azt jelenti, hogy az önmagukban igen eltérő sajátosságú fehérjék között meglepően nagy funkcionális átfedések lehetnek akkor, ha egyik vagy másik működése kiesik.

Munkánk felhívja a figyelmet arra, hogy milyen kifinomult, összetett szabályozási rendszer teszi lehetővé a *Saccharomyces cerevisiae* alkalmazkodását széles spektrumú környezeti kalcium viszonyokhoz. Ezen túlmenően a *pmr1/Δ* törzs vizsgálatával nyert megfigyeléseink fontos támpontokat adhatnak a benignus familiáris pemphigus (Hailey-Hailey betegség) patogenezisének megértéséhez. Ez utóbbi betegség hátterében azonosították a *PMR1* gén humán homológjának az *ATP2C1*-nek mutációit⁴⁵. Az *ATP2C1* fehérje terméke (hSPCA1) funkcionálisan azonos a *PMR1*-vel *Saccharomyces cerevisiae*-ben⁴⁶, így a *pmr1/Δ* mutáns a Hailey-Hailey betegség hasznos modelljeként szolgálhat.

Az új eredmények tételes összefoglalása

1. Alacsony divalens kation tartalmú környezetben (EGTA, BAPTA) a *pmr1Δ* mutáns nagy affinitású kalcium felvétele és össz-kalcium tartalma fokozódik.
2. A fokozott kalcium felvétel hatására aktiválódik a calmodulin-calcineurin rendszer és fokozódik a PMC1 transzkripció.
3. E megfigyeléseinket, összhangban az irodalommal, csak egy extracelluláris kalcium érzékelési mechanizmussal tudtuk magyarázni.
4. Alacsony divalens kation tartalmú körülmények között szükséges a PMC1 működése a *pmr1Δ* mutáns számára, mely kiemeli, hogy EGTA-val végzett megfigyeléseink leginkább a *pmr1Δ* mutáns kalcium homeosztázisában bekövetkezett változásokra vonatkoznak.
5. A *pmr1Δ* törzsben a *PMC1* deléciója fokozza a nagy affinitású kalcium felvételt és az össz-kalcium felhalmozódást. Funkcionálisan ez azt igazolja, hogy a PMC1 ilyenkor fontos szerepet tölt be az ER-Golgi kalcium homeosztázisának fenntartásban.
6. A *Saccharomyces cerevisiae* vakuolumai extravacuoláris kalcium stressztől függően fragmentálódnak.
7. A *pmr1/pmc1Δ* mutánsban a VCX1 fehérje felelős a kalcium homeosztázis fenntartásáért.

Az értekezés alapjául szolgáló saját irodalom

Kellermayer R, Aiello DP, Miseta A, Bedwell DM.

Extracellular Ca(2+) sensing contributes to excess Ca(2+) accumulation and vacuolar fragmentation in a *pmr1Δ* mutant of *S. cerevisiae*.

J Cell Sci. 2003 Apr 15;116(Pt 8):1637-46.

Miseta A. **Kellermayer R**, Aiello DP, Fu L, Bedwell DM.

The vacuolar Ca²⁺/H⁺ exchanger Vcx1p/Hum1p tightly controls cytosolic Ca²⁺ levels in *S. cerevisiae*.

FEBS Lett. 1999 May 21;451(2):132-6.

Miseta A, Fu L, **Kellermayer R**, Buckley J, Bedwell DM.

The Golgi apparatus plays a significant role in the maintenance of Ca²⁺ homeostasis in the vps33Delta vacuolar biogenesis mutant of *Saccharomyces cerevisiae*.

J Biol Chem. 1999 Feb 26;274(9):5939-47

Egyéb saját irodalom

Kellermayer R, Czakó M, László Z, Gyuris P, Kozári A, Melegh B, Kosztolányi Gy.
 α Thalassemia/Mental Retardation Syndrome in a 45,X Male

Am J Med Genet (Accepted 2004. Okt.)

Szigeti R, **Kellermayer R**.

Hailey-Hailey disease and calcium: lessons from yeast.

J Invest Dermatol 2004 Dec;123(6):1195-6.

Kellermayer R, Szigeti R, Kellermayer M, Miseta A.

The intracellular dissipation of cytosolic calcium following glucose re-addition to carbohydrate depleted *Saccharomyces cerevisiae*.

FEBS Lett. 2004 Jul 30;571(1-3):55-60

Kellermayer R, Faden H, Grossi M.

Clinical presentation of parvovirus B19 infection in children with aplastic crisis.

Pediatr Infect Dis J. 2003 Dec;22(12):1100-1.

Meacham G, Browne B, Zang W, **Kellermayer R**, Bedwell D, and Cyr D.

Mutations in the yeast Hsp40 chaperone protein Ydj1 cause defects in Ax11 biogenesis and pro-a-factor processing.

J Biol Chem. 1999 Nov 26;274(48):34396-402.

Felhasznált eredeti közlemények impakt faktora: 18.25

Összesített eredeti közlemények impakt faktora: 38.6

Irodalomjegyzék

1. Hartley AD, Bogaerts S, Garrett S: cAMP inhibits bud growth in a yeast strain compromised for Ca²⁺ influx into the Golgi. *Mol.Gen.Genet.* 1996;251:556-564.
2. Iida H, Sakaguchi S, Yagawa Y, Anraku Y: Cell cycle control by Ca²⁺ in *Saccharomyces cerevisiae*. *J.Biol.Chem.* 1990;265:21216-21222.
3. Eilam Y, Othman M: Activation of Ca²⁺ influx by metabolic substrates in *Saccharomyces cerevisiae*: role of membrane potential and cellular ATP levels. *J.Gen.Microbiol.* 1990;136 (Pt 5):861-866.
4. Eilam Y, Othman M, Halachmi D: Transient increase in Ca²⁺ influx in *Saccharomyces cerevisiae* in response to glucose: effects of intracellular acidification and cAMP levels. *J.Gen.Microbiol.* 1990;136 (Pt 12):2537-2543.
5. Kaibuchi K, Miyajima A, Arai K, Matsumoto K: Possible involvement of RAS-encoded proteins in glucose-induced inositolphospholipid turnover in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 1986;83:8172-8176.
6. Nakajima-Shimada J, Iida H, Tsuji FI, Anraku Y: Monitoring of intracellular calcium in *Saccharomyces cerevisiae* with an apoaequorin cDNA expression system. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 1991;88:6878-6882.
7. Withee JL, Mulholland J, Jeng R, Cyert MS: An essential role of the yeast pheromone-induced Ca²⁺ signal is to activate calcineurin. *Mol.Biol.Cell* 1997;8:263-277.
8. Durr G, Strayle J, Plemper R, Elbs S, Klee SK, Catty P, Wolf DH, Rudolph HK: The medial-Golgi ion pump Pmr1 supplies the yeast secretory pathway with Ca²⁺ and Mn²⁺ required for glycosylation, sorting, and endoplasmic reticulum-associated protein degradation. *Mol.Biol.Cell* 1998;9:1149-1162.
9. Batiza AF, Schulz T, Masson PH: Yeast respond to hypotonic shock with a calcium pulse. *J.Biol.Chem.* 1996;271:23357-23362.
10. Mori IC, Iida H, Tsuji FI, Isobe M, Uozumi N, Muto S: Salicylic acid induces a cytosolic Ca²⁺ elevation in yeast. *Biosci.Biotechnol.Biochem.* 1998;62:986-989.
11. Denis V, Cyert MS: Internal Ca(2+) release in yeast is triggered by hypertonic shock and mediated by a TRP channel homologue. *J.Cell Biol.* 2002;156:29-34.
12. Stathopoulos AM, Cyert MS: Calcineurin acts through the CRZ1/TCN1-encoded transcription factor to regulate gene expression in yeast. *Genes Dev.* 1997;11:3432-3444.
13. Yoshimoto H, Saltsman K, Gasch AP, Li HX, Ogawa N, Botstein D, Brown PO, Cyert MS: Genome-wide analysis of gene expression regulated by the calcineurin/Crz1p signaling pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *J.Biol.Chem.* 2002;277:31079-31088.
14. Matheos DP, Kingsbury TJ, Ahsan US, Cunningham KW: Tcn1p/Crz1p, a calcineurin-dependent transcription factor that differentially regulates gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes Dev.* 1997;11:3445-3458.

15. Cunningham KW, Fink GR: Calcineurin-dependent growth control in *Saccharomyces cerevisiae* mutants lacking PMC1, a homolog of plasma membrane Ca²⁺ ATPases. *J.Cell Biol.* 1994;124:351-363.
16. Cunningham KW, Fink GR: Calcineurin inhibits VCX1-dependent H⁺/Ca²⁺ exchange and induces Ca²⁺ ATPases in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol.Cell Biol.* 1996;16:2226-2237.
17. Pozos TC, Sekler I, Cyert MS: The product of HUM1, a novel yeast gene, is required for vacuolar Ca²⁺/H⁺ exchange and is related to mammalian Na⁺/Ca²⁺ exchangers. *Mol.Cell Biol.* 1996;16:3730-3741.
18. Antebi A, Fink GR: The yeast Ca(2+)-ATPase homologue, PMR1, is required for normal Golgi function and localizes in a novel Golgi-like distribution. *Mol.Biol.Cell* 1992;3:633-654.
19. Rudolph HK, Antebi A, Fink GR, Buckley CM, Dorman TE, LeVitre J, Davidow LS, Mao JI, Moir DT: The yeast secretory pathway is perturbed by mutations in PMR1, a member of a Ca²⁺ ATPase family. *Cell* 1989;58:133-145.
20. Sorin A, Rosas G, Rao R: PMR1, a Ca²⁺-ATPase in yeast Golgi, has properties distinct from sarco/endoplasmic reticulum and plasma membrane calcium pumps. *J.Biol.Chem.* 1997;272:9895-9901.
21. Cronin SR, Rao R, Hampton RY: Cod1p/Spf1p is a P-type ATPase involved in ER function and Ca²⁺ homeostasis. *J.Cell Biol.* 2002;157:1017-1028.
22. Stathopoulos-Gerontides A, Guo JJ, Cyert MS: Yeast calcineurin regulates nuclear localization of the Crz1p transcription factor through dephosphorylation. *Genes Dev.* 1999;13:798-803.
23. Antebi A, Fink GR: The yeast Ca(2+)-ATPase homologue, PMR1, is required for normal Golgi function and localizes in a novel Golgi-like distribution. *Mol.Biol.Cell* 1992;3:633-654.
24. Halachmi D, Eilam Y: Elevated cytosolic free Ca²⁺ concentrations and massive Ca²⁺ accumulation within vacuoles, in yeast mutant lacking PMR1, a homolog of Ca²⁺ -ATPase. *FEBS Lett.* 1996;392:194-200.
25. Pozos TC, Sekler I, Cyert MS: The product of HUM1, a novel yeast gene, is required for vacuolar Ca²⁺/H⁺ exchange and is related to mammalian Na⁺/Ca²⁺ exchangers. *Mol.Cell Biol.* 1996;16:3730-3741.
26. Marchi V, Sorin A, Wei Y, Rao R: Induction of vacuolar Ca²⁺-ATPase and H⁺/Ca²⁺ exchange activity in yeast mutants lacking Pmr1, the Golgi Ca²⁺-ATPase. *FEBS Lett.* 1999;454:181-186.
27. Marchi V, Sorin A, Wei Y, Rao R: Induction of vacuolar Ca²⁺-ATPase and H⁺/Ca²⁺ exchange activity in yeast mutants lacking Pmr1, the Golgi Ca²⁺-ATPase. *FEBS Lett.* 1999;454:181-186.

28. Foor F, Parent SA, Morin N, Dahl AM, Ramadan N, Chrebet G, Bostian KA, Nielsen JB: Calcineurin mediates inhibition by FK506 and cyclosporin of recovery from alpha-factor arrest in yeast. *Nature* 1992;360:682-684.
29. Cunningham KW, Fink GR: Ca²⁺ transport in *Saccharomyces cerevisiae*. *J.Exp.Biol.* 1994;196:157-166.
30. Locke EG, Bonilla M, Liang L, Takita Y, Cunningham KW: A homolog of voltage-gated Ca(2+) channels stimulated by depletion of secretory Ca(2+) in yeast. *Mol.Cell Biol.* 2000;20:6686-6694.
31. Bonilla M, Nastase KK, Cunningham KW: Essential role of calcineurin in response to endoplasmic reticulum stress. *EMBO J.* 2002;21:2343-2353.
32. Marchi V, Sorin A, Wei Y, Rao R: Induction of vacuolar Ca²⁺-ATPase and H⁺/Ca²⁺ exchange activity in yeast mutants lacking Pmr1, the Golgi Ca²⁺-ATPase. *FEBS Lett.* 1999;454:181-186.
33. Miseta A, Fu L, Kellermayer R, Buckley J, Bedwell DM: The Golgi apparatus plays a significant role in the maintenance of Ca²⁺ homeostasis in the vps33Delta vacuolar biogenesis mutant of *Saccharomyces cerevisiae*. *J.Biol.Chem.* 1999;274:5939-5947.
34. Halachmi D, Eilam Y: Cytosolic and vacuolar Ca²⁺ concentrations in yeast cells measured with the Ca²⁺-sensitive fluorescence dye indo-1. *FEBS Lett.* 1989;256:55-61.
35. Ohsumi Y, Kitamoto K, Anraku Y: Changes induced in the permeability barrier of the yeast plasma membrane by cupric ion. *J.Bacteriol.* 1988;170:2676-2682.
36. Eilam Y, Lavi H, Grossowicz N: Mechanism of stimulation of Ca²⁺ uptake by miconazole and ethidium bromide in yeasts: role of vacuoles in Ca²⁺ detoxification. *Microbios* 1985;44:51-66.
37. Dunn T, Gable K, Beeler T: Regulation of cellular Ca²⁺ by yeast vacuoles. *J.Biol.Chem.* 1994;269:7273-7278.
38. Banta LM, Robinson JS, Klionsky DJ, Emr SD: Organelle assembly in yeast: characterization of yeast mutants defective in vacuolar biogenesis and protein sorting. *J.Cell Biol.* 1988;107:1369-1383.
39. Miseta A, Kellermayer R, Aiello DP, Fu L, Bedwell DM: The vacuolar Ca²⁺/H⁺ exchanger Vcx1p/Hum1p tightly controls cytosolic Ca²⁺ levels in *S. cerevisiae*. *FEBS Lett.* 1999;451:132-136.
40. Kellermayer R, Aiello DP, Miseta A, Bedwell DM: Extracellular Ca(2+) sensing contributes to excess Ca(2+) accumulation and vacuolar fragmentation in a pmr1Delta mutant of *S. cerevisiae*. *J.Cell Sci.* 2003;116:1637-1646.
41. Bonilla M, Nastase KK, Cunningham KW: Essential role of calcineurin in response to endoplasmic reticulum stress. *EMBO J.* 2002;21:2343-2353.

42. Marchi V, Sorin A, Wei Y, Rao R: Induction of vacuolar Ca²⁺-ATPase and H⁺/Ca²⁺ exchange activity in yeast mutants lacking Pmr1, the Golgi Ca²⁺-ATPase. *FEBS Lett.* 1999;454:181-186.
43. Brown EM, Vassilev PM, Hebert SC: Calcium ions as extracellular messengers. *Cell* 1995;83:679-682.
44. Hebert SC, Brown EM, Harris HW: Role of the Ca(2+)-sensing receptor in divalent mineral ion homeostasis. *J.Exp.Biol.* 1997;200 (Pt 2):295-302.
45. Hu Z, Bonifas JM, Beech J, Bench G, Shigihara T, Ogawa H, Ikeda S, Mauro T, Epstein EH, Jr.: Mutations in ATP2C1, encoding a calcium pump, cause Hailey-Hailey disease. *Nat.Genet.* 2000;24:61-65.
46. Ton VK, Mandal D, Vahadji C, Rao R: Functional expression in yeast of the human secretory pathway Ca(2+), Mn(2+)-ATPase defective in Hailey-Hailey disease. *J.Biol.Chem.* 2002;277:6422-6427.