

综述

酿酒酵母细胞中钙离子信号传导途径的研究进展

赵运英 蒋伶活*

(江南大学生物工程学院, 生物技术教育部重点实验室和粮食发酵工艺与技术国家工程实验室, 无锡 214122)

摘要 酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)细胞可以通过Ca²⁺/钙调磷酸酶信号途径来应对许多外界环境胁迫。在交配信息素、盐或者其他环境压力存在的条件下, 钙离子会通过细胞质膜上的未鉴定的钙转运蛋白X和M或者由Cch1和Mid1组成的钙通道进入细胞质。胞质内钙离子浓度的增加会激活细胞质里的钙调磷酸酶(calcineurin), 钙调磷酸酶的一个非常重要的作用是去磷酸化细胞质内的转录因子Crz1, 造成它快速地从细胞质转移到细胞核, 从而诱导包括液泡膜上钙泵蛋白基因*PMCI*以及内质网膜和高尔基体膜上钙泵蛋白基因*PMRI*在内的目标基因的表达。这两个钙泵蛋白和液泡膜上的Ca²⁺/H⁺交换蛋白Vcx1一起作用, 将细胞质内的钙离子浓度控制在50~200 nmol/L的正常生理浓度内, 使细胞能够正常生长。该综述主要论述了酿酒酵母细胞内Ca²⁺/钙调磷酸酶信号途径的最新研究进展。

关键词 钙调磷酸酶; 钙离子信号传导; Crz1; 酿酒酵母

Calcium/Calcineurin Signal Transduction Pathway in *Saccharomyces cerevisiae*

Zhao Yunying, Jiang Linghuo*

(The Key Laboratory of Industrial Biotechnology of the Ministry of Education and the National Engineering Laboratory for Cereal Fermentation Technology, School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract In the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, Ca²⁺ signaling mediated by the Ca²⁺/calmodulin dependent phosphatase, calcineurin, is required for survival during environmental stress. In the response to mating pheromone, salt and other environmental stresses, Ca²⁺ normally enters the cytosol of yeast cells through two unknown transporters X and M or the Ca²⁺ channel, which is composed of Cch1 and Mid1. One role of the phosphatase under these conditions is to dephosphorylate the transcription factor Crz1 in the cytosol. Dephosphorylated Crz1 rapidly translocates from the cytosol to the nucleus, where Crz1 activates the transcription of target genes including the vacuolar pump gene *PMCI* and the ER/Golgi calcium pump gene *PMRI*. Together with the vacuolar Ca²⁺/H⁺ Vcx1, Pmc1 and Pmr1 act to maintain the normal physiological calcium concentration between 50~200 nmol/L. This review addresses the recent research progress in the study of the yeast Ca²⁺/calcineurin signaling pathway.

Key words calcineurin; Ca²⁺ signal transduction; Crz1; *Saccharomyces cerevisiae*

收稿日期: 2013-03-28 接受日期: 2013-07-15

江苏省高等教育部优先资助项目和江南大学自主科学研究重点项目(批准号: JUSRP51313B)资助的课题

*通讯作者。Tel: 0510-85914371, E-mail: linghuojiang@jiangnan.edu.cn

Received: March 28, 2013 Received: July 15, 2013

This work was supported by the Priority Academic Program Development of Jiangsu Higher Education Institutions and the Key Project of Jiangnan University Independent Scientific Research Plan (Grant No. JUSRP51313B)

*Corresponding author. Tel: +86-510-85914371, E-mail: linghuojiang@jiangnan.edu.cn

网络出版时间: 2013-09-11 10:37

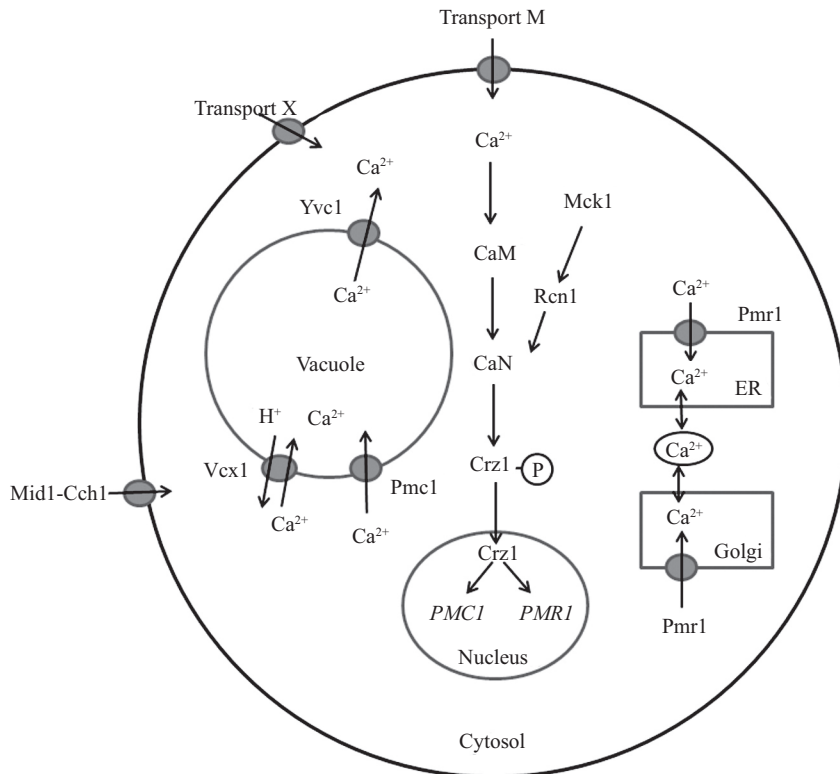
URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20130911.1037.001.html>

1 酿酒酵母细胞中钙离子信号传导途径网络

在真核细胞中, 钙离子(Ca^{2+})作为广泛存在的细胞内信使调控许多细胞过程, 如细胞增殖、肌肉收缩、细胞程序性死亡等^[1-4]。酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)细胞中 Ca^{2+} 信号传导途径已经被充分地研究, Ca^{2+} 信号应答涉及交配信息素^[5-6]、盐和环境压力^[7-8]、营养物感应^[9-10]以及细胞完整性^[11]等方面。大量研究显示, 酵母细胞中 Ca^{2+} 稳态(homeostasis)和信号传导与更高级的真核细胞基本相似(图1)。细胞中 Ca^{2+} 信号机制的基本组件是保守的, 包括 Ca^{2+} 通道(calcium channel)和转运体(transporter), Ca^{2+} 感应器或信号转导体。与哺乳动物细胞相比, 一个最大的不同是酵母缺乏哺乳动物细胞中存在多个亚型(isoforms)和剪接变体(splice variants)的复杂性。高度调控的钙稳态系统被细胞用来维持细胞质 Ca^{2+} 处在一个最佳的浓度范围。例如, 在外界环境 Ca^{2+} 浓度处在 $<1\mu\text{mol/L}$ 或者 $>100\text{mmol/L}$ 范围时, 酿酒酵母通过一个复杂的钙调控系统使细胞质 Ca^{2+} 浓度保持

在 $50\sim 200\text{nmol/L}$ 的范围^[12-14]。

细胞外 Ca^{2+} 通常通过一个未知的转运蛋白X(transporter X)进入酵母细胞的细胞质^[15]。细胞质 Ca^{2+} 通过液泡钙泵Pmc1和液泡 $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^{+}$ 交换器Vcx1被转运到液泡中, 而Pmr1钙泵负责将细胞质内的 Ca^{2+} 泵入内质网和高尔基体, 然后分泌途径中过量的 Ca^{2+} 就通过胞吐作用被排出细胞。质膜上的另一个转运蛋白M(transporter M)最近被检测到, 它在酵母细胞应答胞外高 Ca^{2+} 浓度时起作用^[14]。一个由Cch1和Mid1组成的质膜电压门控(Voltage-gated) Ca^{2+} 通道只在膜去极化、 Ca^{2+} 分泌后的排空^[16]、外激素刺激^[17-18]和低渗刺激^[19]等条件下被激活。为了应答细胞外高渗刺激, 与哺乳动物TRPC型 Ca^{2+} 通道同源的Yvc1将 Ca^{2+} 从液泡释放到细胞质中^[20]。胞内突然增加的 Ca^{2+} 与钙感应蛋白——钙调蛋白(calmodulin)结合后会激活钙调磷酸酶(calcineurin, CaN)^[21]。最近的研究发现, 胞外 Mg^{2+} 的缺乏也会导致钙调磷酸酶的激活。CaN通过去磷酸化激活细胞质内的转录因子Crz1, 使其易位到细胞核内继而诱导包括PMCI



CaM: 钙调蛋白; CaN: 钙调磷酸酶; ER: 内质网。

CaM: calmodulin; CaN: calcineurin; ER: endoplasmic reticulum.

图1 酿酒酵母细胞中的钙稳态系统(根据参考文献[24]修改)

Fig.1 Calcium homeostasis system in *Saccharomyces cerevisiae* (modified from reference [24])

和PMRI在内的Ca²⁺敏感基因的表达。此外, CaN还可以抑制Vcx1的功能^[22]。除了这些较慢的CaN依赖性反馈网络, 快速的细胞质Ca²⁺依赖性反馈也抑制了transporter M和X的活性。然而, 这些快速反馈抑制通路详细的组分和机制仍待鉴定^[14]。CaN的活性还受Rcn1调控, 而Rcn1的活性则受一个蛋白激酶GSK-3家族成员Mck1的调控^[23]。下面我们将分别介绍酿酒酵母细胞中钙离子信号传导途径的相关成员。

2 钙离子通道

2.1 Mid1和Cch1

在质膜上, 高亲和力Ca²⁺内流是由与哺乳动物Ca²⁺通道门控电压 α_1 亚单位同源的Cch1和一个可能的门控激活Ca²⁺通道蛋白Mid1组成的复合体介导的^[25-27]。这个通道与信息交配素存在、内质网压力和内质网/分泌途径储存Ca²⁺的排空等条件下Ca²⁺的流入相关。钙调磷酸酶可能通过直接让通道蛋白去磷酸化而抑制通道活性。有至少一个其他的Ca²⁺内流途径没有得到鉴定, 它可能在交配过程后期介导低亲和力Ca²⁺内流和细胞融合^[28]。

Cch1是酵母中唯一的动物VGCCs(压力门控钙通道)同源物, 它的催化亚基含有四个重复的核心跨膜域^[29]。缺少定位于高尔基体上的Ca²⁺泵-Pmr1的突变株, 显示出很高的依赖于Cch1功能的Ca²⁺内流比率, 以及高浓度的细胞质自由Ca²⁺。细胞过表达Pmc1或者Vcx1时, 也显示依赖Cch1的Ca²⁺高内流比率, 因为它们与Pmr1竞争底物。此外, Mid1在这些条件下也是Ca²⁺内流所必需的。在体内, 很多条件下Mid1与Cch1结合^[15], 也是Cch1产生活性所必需的^[17,25-27]。这说明Mid1作为Cch1的调节亚单位起作用, 这与动物VGCCs的 α_2 - Δ 亚单位类似^[29]。

2.2 Yvc1

酵母细胞中, 作为Ca²⁺主要储存器的液泡, 是类似于动物溶酶体的大容量细胞器^[20,30]。与哺乳动物瞬时感受器电位(TRP)通道蛋白同源的酵母Yvc1, 位于液泡膜上。在应答高渗休克和抗心律失常药物胺碘酮时, 从液泡释放Ca²⁺到细胞质中。然而, 酵母细胞的肌醇1,4,5-三磷酸肌醇(IP₃)受体通道还没有被鉴定, Ca²⁺如何从ER/高尔基体储存中释放出来的问题仍没有研究清楚。

液泡膜的电生理学研究显示, Yvc1对Na⁺、K⁺和Ca²⁺的选择性透过是完全必需的^[30-31]。在电源性H⁺泵Vma和次级转运蛋白, 比如H⁺-Na⁺交换器(ex-

changer)Nhx1^[32]、H⁺-Ca²⁺交换器Vcx1^[19,33]和门控Cl⁻通道Gef1的作用下, 液泡包含大量这些阳离子, 细胞质里面微克分子浓度的Ca²⁺的刺激可以使Yvc1通道打开^[31]。另外, Yvc1通道打开的可能性在-80 mV时最大, 当电位更高或者更低时它打开的可能性降低, 这说明它的活性可能受电压变化控制。从这些发现, 可以推断酵母中Yvc1作为一个阳离子释放通道, 起到一个连接到离子库-液泡的作用, 这比胞外环境的离子库更可靠。

Yvc1在体内是怎样受到调控的呢? 对Yvc1氨基酸序列的检测没有显示有电压传感蛋白片段, 也没有发现它的核心跨膜域外有与其它蛋白相似的氨基酸序列。然而, 精密的实验揭示, 在活的酵母细胞中, Yvc1在数秒的高渗刺激下被激活^[20]。利用细胞质水母荧光素作为细胞溶质自由Ca²⁺的探针显示, 培养基中高浓度盐或其它渗透物的加入对于细胞质自由Ca²⁺浓度的提升, 在Yvc1过表达时得到加强, 在Yvc1基因敲除时消失。Yvc1-依赖性Ca²⁺瞬变(transient)显然不需要胞外Ca²⁺, 但是确实需要Pmc1或者Vcx1的功能。这些发现说明, Yvc1直接(或者可能间接)引发Ca²⁺从液泡中释放出来。Yvc1可能也释放其他阳离子, 比如: Na⁺、K⁺和H⁺。这些阳离子被认为在高渗冲击时能够给细胞质提供渗透物以及短暂缓解细胞的脱水状态。Ca²⁺的释放也能帮助激活本身具有提高高盐抗性的钙调蛋白(calmodulin)和钙调磷酸酶(calcineurin)^[34-35]。这样, 在应对高渗刺激的反应中, Yvc1离子通道处在起中枢作用的位置。这些进展也提供了一个强有力的、新的、用来阐明Yvc1功能域和可能的上游信号通路调控的实验系统。

对酵母细胞中Ca²⁺释放调控的观察迫切需要提出这样一个问题: 酵母细胞Ca²⁺的释放是否伴随着Ca²⁺的内流呢? 在大多数哺乳动物细胞中, Ca²⁺从内质网中的释放导致质膜上Ca²⁺内流通道被激活, 是通过被称作储存调控或者容量钙离子进入(CCE)的机制完成的。目前, 对CCE分子水平的了解还很少, 对这个课题的研究可以从像酵母这样的遗传系统获益。酵母液泡不能发起CCE样的过程, 因为缺少Pmc1和Vcx1的突变株快速地排出液泡内的Ca²⁺^[33], 并且这些突变株也显示了与野生型相同的通过质膜的Ca²⁺内流比率^[36]。在酵母细胞中, 内质网、高尔基体排出Ca²⁺或者两者都排出Ca²⁺, 确实显现出Ca²⁺内流的激活^[15]。非常有意思的是, 这种由Ca²⁺排出

导致的Ca²⁺内流需要Cch1。

2.3 受钙调磷酸酶调控的钙泵和转运体

在酵母和其他真核生物细胞中, Ca²⁺从细胞质向细胞器和细胞外间隙的转运是由ATP驱动的钙泵和阳离子偶联交换器来完成的。在多细胞动物(后生动物)细胞中, 肌浆网(内质网)Ca²⁺-ATPases(SERCA)向ER聚集Ca²⁺, 在细胞质Ca²⁺平衡中起着显著的作用。在*S. cerevisiae*中没有SERCA的同源物, 但是ER中的Ca²⁺水平由定位于内质网和高尔基体膜上的钙泵Pmr1控制^[37]。酵母细胞Pmr1(与质膜ATPase相关)是分泌路径Ca²⁺-ATPases (SPCA)家族的第一个成员, 它介导着正常生理条件下高亲和力Ca²⁺(和Mn²⁺)的转运, 并且起着保持细胞质钙离子平衡以及为高尔基体内腔中蛋白质分选、加工和糖基化提供Ca²⁺和Mn²⁺的双重作用^[38-39]。Pmr1同源物在所有真核生物中广泛存在, 但植物是一个特别的例外。我们知道的大多关于这些转运体的结构和生理作用来自对酵母细胞的研究。最近, 这些研究已经扩展到人体^[40-42]、秀丽线虫(*Caenorhabditis elegans*)^[43-44]和小鼠^[45-47]中SPCA同源物。

质膜Ca²⁺-ATPase(PMCA)构成了这个钙离子泵超家族的另一个分支, 酵母细胞Pmc1也是其中一员。虽然与PMCA家族在序列上相关, 但是酵母细胞Pmc1缺少哺乳动物成员中与钙调蛋白和酸性磷脂类调控相关的结构域, 并且定位于液泡膜而不是质膜上。然而, 通过液泡富集而完成的Ca²⁺脱毒与转运到细胞外间隙相当, 并且Pmc1同源物在其他真菌和原生动物的酸性液泡中都有发现。PMCI的转录激活发生在高胞外Ca²⁺^[48]或者Pmr1^[49]缺失的条件下, 并且依赖于钙调磷酸酶。因为钙调磷酸酶依赖性转录激活在从真菌到哺乳动物的真核细胞中是保守的, 所以确定哺乳动物Ca²⁺泵和交换蛋白的表达水平是否受到相似的调控是非常有意义的。

另一个液泡Ca²⁺富集的主要执行者是Vcx1, 它是一种由液泡H⁺-ATPase^[33,36]建立的质子电化学梯度驱动的Ca²⁺/H⁺交换蛋白。Vcx1活性可以被钙调磷酸酶抑制^[33], 因此PMCI和PMRI的双基因突变体的生存能力可以通过钙调磷酸酶的调节亚基(CNBI)的敲除来提高, 其主要的机理是钙调磷酸酶功能的丧失可以导致Vcx1活性的上调。敲除PMCI、PMRI和VCXI三个基因的菌株缺失内源性Ca²⁺-ATPase, 是多种Ca²⁺泵外源表达的理想宿主, 缺失一个或者更

多Ca²⁺转运蛋白的突变体也可以用来评估其在参加细胞Ca²⁺平衡的不同通路中的贡献^[50-51]。

总之, 酿酒酵母细胞内的钙离子调控系统由多个组分组成, 包括位于细胞膜上的钙离子内流通道Mid1/Cch1, 位于液泡膜上释放钙离子到细胞质的交换器Yvc1, 以及受钙离子信号转导途径直接调控的钙离子泵Pmc1、Pmr1和液泡Ca²⁺/H⁺交换蛋白Vcx1。在整个钙离子信号传导过程中, 受Ca²⁺/钙调蛋白直接激活的钙调磷酸酶具有重要的作用, 下面我们将详述钙调磷酸酶及其效应蛋白的功能和调控机制。

3 钙调磷酸酶

3.1 钙调磷酸酶及其调控

蛋白磷酸酶家族包括PP1、PP2A、PP2B、PP2C和PP4-7^[52]。钙调磷酸酶(PP3/PP2B)属于丝氨酸/苏氨酸特异性蛋白磷酸酶PP2B(PP3)家族成员。钙调磷酸酶以异源二聚体的形式存在, 它由催化亚基(CnA)和调节亚基(CnB)组成。在酿酒酵母中, 钙调磷酸酶的催化亚基由CNA1和CNA2两个基因编码, 而调节亚基由CNB1基因编码^[53-56]。钙调磷酸酶的基本序列和高级结构决定了它作用底物的特异性, 也限制了它在细胞中的主要调节功能^[57-59]。另外, 钙调磷酸酶有两个特殊的Fe²⁺/Zn²⁺金属结合中心, 它需要还原态的铁参与催化磷酸酯水解反应, 通过两步金属激活过程, 使钙调磷酸酶在胞内的氧化还原反应与功能联系起来^[60-61]。

Ca²⁺和钙调蛋白共同调节钙调磷酸酶的活性, 使其对不同的钙离子信号和胞内钙离子浓度的时空变化做出应答。通过对酿酒酵母的研究显示, 钙调磷酸酶和底物的相对亲和力决定了钙调磷酸酶信号的钙离子阈值, 并影响钙调磷酸酶信号转导的特异性和后续的细胞应答特性^[62]。激活的钙调磷酸酶和底物形成一个稳定而具有弹性的结构, 来迅速应答细胞的信号需求。

钙调磷酸酶的异源二聚体结构不仅使它具有自主调控的活性和对其信号途径的调节作用, 也决定了它对微生物衍生的免疫调节剂的敏感性。它对冈田毒素(okadaic acid)、花萼海绵诱癌素(calyculin)和微囊藻素(microcystin)具有抗性。这些毒素是PP1和PP2A活性的抑制剂。但是钙调磷酸酶对环孢霉素A(cyclosporin A, CsA)和FK506(tacrolimus)敏感, 这些因子分别通过cyclophilin A和FK506-结合蛋

白12(FKBP12)与钙调磷酸酶作用。CsA-cyclophilin A和FK506-FKBP12复合物在结构上并不相关,它们作用于钙调磷酸酶的不同而又重叠的位点上^[63-64]。这些抑制复合物和底物竞争性地与钙调磷酸酶结合,从而间接地抑制了钙调磷酸酶的功能^[64]。钙调磷酸酶参与人体的细胞和器官的特异性进化过程,特别是它可以作为一些人体疾病的治疗靶点,具有临床上的意义。因此,FK506和CsA作为免疫抑制剂已经被广泛应用。

3.2 RCAN(regulator of calcineurin)

Rcn1是在真菌中首先发现的钙调磷酸酶的生理调控因子,它通过与钙调磷酸酶直接结合发挥作用^[65-68]。在线虫、果蝇、小鼠和人类等高等真核生物中,Rcn1是保守的,说明它对钙调磷酸酶信号转导的调控具有广泛的重要性^[52]。这些生物体中表达Rcn1的基因都已被鉴定出来,它们组成RCAN1基因家族^[69]。

在酿酒酵母中,Rcn1直接识别钙调磷酸酶的催化亚基,而在新隐球菌(*Cryptococcus neoformans*)中它可以识别钙调磷酸酶的催化亚基和调节亚基^[66,68]。Rcn1与钙调磷酸酶的识别,可能是与其氨基和羧基末端的结构域作用位点形成多价体,这种识别对钙调磷酸酶-FK506/FKBP12的相互作用是敏感的,并且不依赖于钙离子/钙调蛋白激活的钙调磷酸酶活性^[66,69-71]。在哺乳动物中,许多RCAN1的C末端基序(motif)已经被鉴定出来,其中包括一个PxIxxT基序(与转录因子NFATc家族钙调磷酸酶的特异性PxIxIT停泊位点(docking site)相似)和一个ELHA基序^[72-73]。这两个基序各自结合钙调磷酸酶,并且它们对激活的钙调磷酸酶和NFATc的影响和钙调磷酸酶/NFATc介导的基因表达的影响是不同的^[73]。Rcn1有一个由22个Ser-Pro(SP)重复氨基酸组成的核心区域,这个区域在高等真核生物的RCAN1中是保守的,并且它的功能类似于酿酒酵母中钙调磷酸酶的靶标和效应蛋白Crz1的保守SP重复序列^[74-75]。

上述保守的结构域是Rcn1在体内调节钙调磷酸酶功能所必需的,也是钙调磷酸酶信号转导途径与其它胁迫激活的信号网络的整合所必需的。Rcn1对钙调磷酸酶活性的调节是通过改变它的SP重复序列上两个Ser残基的磷酸化水平来实现的,这两个Ser残基相继分别被p42/44丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)和糖原合成酶激酶(GSK3)家族成员Mck1磷酸化^[74-75]。SP重复序列的磷酸化水平并不

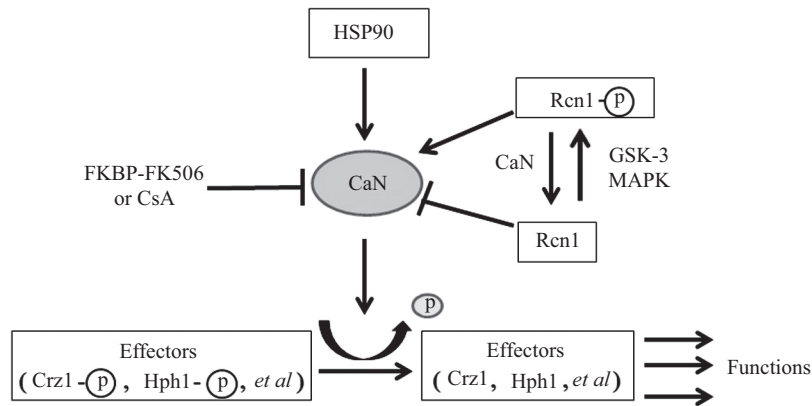
明显影响钙调磷酸酶的与Rcn1的关联^[65],但是能调节Rcn1是作为靶标亚基还是作为特异性调节器的功能,这种调节依赖于钙调磷酸酶调节组分的相对剂量^[68-69]。

Rcn1和它的功能同系物受到翻译后调控,如通过改变磷酸化状态或形成多分子复合物,来调节蛋白质的稳定性,这种调控可能是种间特异性的。在酿酒酵母*cmd1-6*缺失株(无钙调蛋白功能)、*cnb1*缺失株(不表达钙调磷酸酶的调节亚基)和野生型菌株中研究Rcn1-HA的表达发现,没有信号刺激时,钙调磷酸酶(不论是否是活性状态)的表达是细胞积累Rcn1-HA所必需的,说明Rcn1-钙调磷酸酶复合物的主要作用是调节Rcn1的半衰期^[68]。哺乳动物的Rcn1同系物RCAN1,在未受刺激的细胞中虽然与钙调磷酸酶相关,但是没有发现它们之间的相互作用对RCAN1的稳定性有影响^[76]。

真菌细胞中,热激蛋白Hsp90与钙调磷酸酶结合使其处于稳定状态,而Hsp90解离后激活钙调磷酸酶,从而对胁迫刺激和钙离子/钙调蛋白结合产生应答(图2)^[77]。Rcn1、FKBPs或者cyclophilins与钙调磷酸酶作用直接抑制它的功能。MAPK和GSK3的激酶活性以及钙调磷酸酶的磷酸酶活性共同调节Rcn1的磷酸化水平^[23,74]。下游的效应因子,Crz1和Hph1,被钙调磷酸酶去磷酸化,从而调节真菌的致病相关过程,它们包括形态变化对离子、血清和生长温度的应答,以及膜运输和细胞壁完整性^[77]。

3.3 酵母钙调磷酸酶在应答环境压力中的作用

通过*CNA1*、*CNA2*和*CNB1*基因突变以及向生长培养基中添加钙调磷酸酶抑制剂(FK506或CsA),酵母钙调磷酸酶会失去生物学功能^[53-56]。这些研究显示,钙调磷酸酶在正常的培养条件下对生长是可有可无的。然而,缺乏钙调磷酸酶的酵母细胞在离子(如在OH⁻、Mn²⁺和Na⁺/Li⁺条件下)和交配因子(α -factor)存在的环境条件下会死亡^[78-82]。另外,钙调磷酸酶在导致细胞壁缺陷(比如*fks1*、*mpk1*和*pkc1*)的突变体中也是必不可少的^[11,83]。这些遗传学现象反映了在应答环境压力时,依赖钙调磷酸酶的信号传导途径是被激活的。在正常生长条件下,细胞质内Ca²⁺浓度处于低水平状态,钙调磷酸酶呈非激活状态,因此缺少这个酶的细胞不会显现出生长缺陷。然而,应答压力时,细胞质内Ca²⁺水平上升,钙调磷酸酶被激活,使关键的底物去磷酸化从而促进细胞



黑线表示直接调控, 灰线表示可能的间接调控。

Black lines represent direct regulatory events and gray lines indicate potentially indirect regulatory events in calcineurin signaling.

图2 Hsp90、Rcn1和亲免疫因子调控钙调磷酸酶和促进真菌致病模式图(根据参考文献[84]修改)

Fig.2 Model of calcineurin regulation by Hsp90, Rcn1, and immunophilins to promote fungal pathogenesis (modified from reference [84])

的生存。

3.4 钙调磷酸酶的效应蛋白

转录因子Crz1p是酵母细胞中描述最详尽的钙调磷酸酶的直接作用底物(详见第四部分)。钙调磷酸酶除了激活Crz1外, 还具有抑制Vex1活性的功能^[53]。在哺乳动物细胞中, 除了调控转录因子, 钙调磷酸酶可通过去磷酸化其底物而具有多种功能, 这些底物包括: 离子通道、微管结合蛋白、GTP-ase等^[85]。最近, 在酿酒酵母细胞中发现了3个新的钙调磷酸酶底物, Hph1、Slm1和Slm2。Heath等^[86]发现, 钙调磷酸酶通过与Hph1蛋白的PVI AVN基序结合, 直接去磷酸化调节Hph1的活性, 从而调节细胞对高盐、碱性pH及细胞完整性等条件压力的应答。钙调磷酸酶通过PXIXIT模序与Slm1和Slm2两个蛋白结合, 并让它们去磷酸化, 从而调节酵母细胞对热激的应答^[87]。

4 转录因子Crz1

在酵母细胞中, 依赖钙调磷酸酶的信号传导途径的一个重要功能是通过激活转录因子Crz1/Tcn1/Hal8去控制基因的表达^[88-90]。Crz1上有一个锌指基序, 可以结合DNA, 并且特异性地结合到钙调磷酸酶依赖性反应元件(CDRE)上。CDRE是一个对介导Ca²⁺诱导的钙调磷酸酶依赖的基因表达所必需的24-bp DNA序列^[88]。crz1突变体对CDRE驱动转录是缺陷的, 并表现出与那些钙调磷酸酶突变体相似的表现型^[89-90]。钙调磷酸酶突变体的生长缺陷可以通过Crz1的过表达改善, 证实了Crz1是在钙调磷酸酶的下

游起作用。在体外, 钙调磷酸酶可以去磷酸化Crz1, 证明Crz1是钙调磷酸酶的一个直接底物^[22]。钙调磷酸酶主要通过调节Crz1的定位来控制Crz1的活性。

4.1 Crz1的主要功能

钙调磷酸酶的激活导致超过160个基因的表达增加, 所有这些基因在crz1Δ突变体中的表达减少, 其中大多数的基因的启动子包含Crz1结合序列(5'-GNGGC(G/T)CA-3'), 说明Crz1是酵母中钙调磷酸酶依赖性基因表达的主要介导者。

钙调磷酸酶和Crz1调控的基因功能包括如下几个类型^[91]。29%的基因编码膜结合蛋白, 12%编码质膜蛋白或者细胞壁的蛋白组分, 其他基因编码的蛋白参加膜泡运输、脂质/固醇合成和蛋白质降解、细胞壁完整性途径以及离子和小分子运输。钙调磷酸酶/Crz1的激活也导致该信号途径中关键组件以及其它信号途径相关组件的表达增加, 从而提供了各种反馈调控该途径以及和其它信号途径交叉对话的机制。这些效应物包括包括编码钙调磷酸酶自身调控子的基因RCN1, 编码Ca²⁺/钙调蛋白依赖性的蛋白激酶基因CMK2, 编码细胞壁完整性通路上游调控子的基因YPK1, 以及几个转录因子基因(CUP2、SMP1、TIS11、SOK2和NDT80)。

4.2 Crz1活性和定位的调控

钙调磷酸酶通过对Crz1去磷酸化来影响它的定位。在无外界刺激条件下, Crz1分布在细胞质内。然而, 随着细胞内Ca²⁺的增长, 它在细胞核内以一种钙调磷酸酶依赖性的方式快速积累^[22]。这种细胞核

积累是可逆转的, 比如FK506对钙调磷酸酶的抑制导致Crz1快速地重新分布到细胞质中。

钙调磷酸酶通过调控Crz1的入核转运和出核转运来调节Crz1的定位。Crz1结合到唯一负责运送Crz1入核的核转运蛋白Nmd5上。在体外, 只有去磷酸化的Crz1结合Nmd5^[92]。在体内, 只有去磷酸化形式的Crz1才能被有效地输入到细胞核中。Crz1上的核定位序列(NLS)周围残基的磷酸化可能改变Crz1的三维构象并决定NLS与Nmd5的可接近性^[92]。Crz1从细胞核输出也是通过磷酸化来调控的。Crz1的出核转运需要核输出蛋白Msn5。Msn5还可以帮助把其他几种蛋白输出到核外, 包括转录因子Pho4、转录抑制因子Mig1和细胞周期调控子Far1^[93-96]。Msn5运送的货物蛋白都是磷酸化的蛋白。包含核输出序列(NES)的Crz1在酵母双杂交实验中能与Msn5相互作用, 这种相互作用可以被NES上的磷酸化位点突变所消除^[93]。因此, Crz1的NES磷酸化是结合Msn5和随后的出核转运所必需的。

因此, 钙调磷酸酶去磷酸化转录因子Crz1并调控它的定位。当钙调磷酸酶活性低时, Crz1是磷酸化状态, 并且由于低比率的入核转运和高比率的出核转运而在细胞质中积累。激活的钙调磷酸酶使Crz1去磷酸化, Crz1则因为高比率的入核转运和低比率的出核转运快速地在细胞核中积累。

4.3 Crz1的磷酸化

Crz1是一个磷蛋白, 因此一定被蛋白激酶磷酸化。然而, 遗传学方法没有鉴定出任何一种这样的Crz1激酶。最近, 一种基于蛋白芯片的高通量方法使在体外检测酿酒酵母119种蛋白激酶对特定蛋白底物的磷酸化成为可能^[97]。通过这种方法, 磷酸化Crz1的几种激酶被鉴定。随后的研究证实了Hrr25是体内Crz1的真正调控者。Hrr25是哺乳动物中酪蛋白激酶1(CK1)的同源物, 与它的 δ 和 ϵ 亚型十分相似^[98]。在体内, Hrr25负调控Crz1的活性及其核定位。过表达Hrr25拮抗Crz1依赖性转录活性(CDRE-lacZ活性), 降低由 Ca^{2+} 诱导引发的Crz1细胞核定位。相反, 在缺乏Hrr25时, Ca^{2+} 和钙调磷酸酶对Crz1的激活作用增强。缺乏Hrr25的细胞表现出一个更高的Crz1依赖性转录的基础水平以及 Ca^{2+} 诱导的Crz1依赖性转录的更大增长。与野生型相比, Hrr25缺陷型细胞中诱导Crz1核定位需要的 Ca^{2+} 浓度更低。在缺乏Hrr25的细胞中, Crz1仍然可以被磷酸化并且其活

性仍受钙调磷酸酶的调控, 说明在体内还有其他激酶负调控Crz1。CK1的磷酸化位点是Sp/Tp-X-X-S*, 这里Sp/Tp是磷酸化的残基^[99]。因此, CK1在磷酸化底物的过程中, 经常(不是总是)与一个磷酸化其作用位点的上游残基的“启动”激酶联系在一起^[100]。

Hrr25不能够完全抑制Crz1的活性, 说明还有其他的蛋白激酶和Hrr25共同控制Crz1的磷酸化^[101-102]。Kafadar等^[101]在2004年发现, 依赖cAMP的蛋白激酶A(PKA)也能够使Crz1磷酸化而抑制Crz1的活性。PKA是酵母细胞中压力应答所必需的组分, 它在协同代谢、细胞生长以及营养适应等方面发挥功能。PKA全酶是由两个催化亚基和两个调节亚基组成的异源四聚体。cAMP与调节亚基结合使催化亚基分离从而激活PKA的活性。在酿酒酵母基因组中, 有3个同源的催化亚基基因(*TPK1*、*TPK2*和*TPK3*)和1个调节亚基基因(*BCY1*)。Kafadar等^[101]证明PKA能够在体内磷酸化Crz1, 并通过抑制它的入核对其进行负调控, 同时发现PKA在Crz1上的磷酸化位点位于其NLS内或NLS附近。2006年, Sopko等^[103]通过SDL筛选, 发现Crz1是周期蛋白依赖性激酶Pho85的一个底物, Pho85通过对Crz1磷酸化影响它的定位对其进行负调控。Pho85是酿酒酵母细胞中一个多功能周期依赖性激酶, 它在细胞周期调控和磷酸盐代谢途径中有重要的作用。

综上所述, Crz1的调控由蛋白激酶和蛋白磷酸酶共同完成。钙调磷酸酶通过对Crz1去磷酸化和促进其核定位而对其进行正调控, 而Hrr25、KA和Pho85三个蛋白激酶通过对其磷酸化而抑制其核定位而对其进行负调控。

5 小结

酿酒酵母是一种简单的、用于异源表达的真核模式生物。它有全部测序的基因组, 可容易获得的敲除突变体以及实验上适合的遗传学特性。在真核细胞中, 钙离子作为胞内信使来调节许多生物过程, 细胞通过维持细胞质和细胞器内钙离子的最适浓度, 来调节钙离子的平衡系统, 使其成为高度调节的代谢途径。在酿酒酵母中, Ca^{2+} 和钙调蛋白共同调节钙调磷酸酶的活性, 使其对不同的钙离子信号和胞内钙离子浓度的时空变化做出应答。细胞质内钙离子浓度维持在50~200 nmol/L, 通过本文所论述到的钙离子信号传导的相关成员进行精细的调控。在酵

母细胞的4757个非必需基因的缺失菌株中, 有120个对外界高钙离子胁迫敏感, 其中多数菌株的钙离子敏感性主要是由于钙调磷酸酶的激活导致的^[104]。因此, 对这些基因的深入研究会让我们更为全面地了解酵母细胞中的钙离子稳态和钙信号途径。酵母细胞钙离子信号传导途径的研究, 可以为深入研究高等真核生物细胞中更为复杂的钙离子平衡调控系统提供重要的理论和实验依据。

参考文献 (References)

- 1 Berridge MJ, Bootman MD, Lipp P. Calcium-a life and death signal. *Nature* 1998; 395(6703): 645-8.
- 2 Berridge MJ, Lipp P, Bootman MD. The versatility and universality of calcium signaling. *Nat Rev Mol Cell Bio* 2000; 1(1): 11-21.
- 3 Berridge MJ, Bootman MD, Roderick HL. Calcium signaling: Dynamics, homeostasis and remodeling. *Nat Rev Mol Cell Bio* 2003; 4(7): 517-29.
- 4 Putney JW. *Calcium Signaling*, 2nd ed. Boca Raton: CRC Press, 2005, 111-3.
- 5 Kim H, Kim A, Cunningham KW. Vacuolar H⁺-ATPase (V-ATPase) promotes vacuolar membrane permeabilization and nonapoptotic death in stressed yeast. *J Biol Chem* 2012; 287(23): 19029-39.
- 6 Nakajima-Shimada J, Sakaguchi S, Tsuji FI, Anraku Y, Iida H. Ca²⁺ signal is generated only once in the mating pheromone response pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *Cell Struct Funct* 2000; 25(2): 125-31.
- 7 Bonilla M, Nastase KK, Cunningham KW. Essential role of calcineurin in response to endoplasmic reticulum stress. *EMBO J* 2002; 21(10): 2343-53.
- 8 Matsumoto TK, Ellsmore AJ, Cessna SG, Low PS, Pardo JM, Bressan RA, *et al.* An osmotically induced cytosolic Ca²⁺ transient activates calcineurin signaling to mediate ion homeostasis and salt tolerance of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 2002; 277(36): 33075-80.
- 9 Aiello DP, Fu L, Miseta A, Bedwell DM. Intracellular glucose 1-phosphate and glucose 6-phosphate levels modulate Ca²⁺ homeostasis in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 2002; 277(48): 45751-8.
- 10 Tokes-Fuzesi M, Bedwell DM, Repa I, Sipos K, Sumegi B, Rab A, *et al.* Hexose phosphorylation and the putative calcium channel component Mid1p are required for the hexose-induced transient elevation of cytosolic calcium response in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Microbiol* 2002; 44(5): 1299-308.
- 11 Levin DE. Regulation of cell wall biogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*: the cell wall integrity signaling pathway. *Genetics* 2011; 189(4): 1145-75.
- 12 Bonilla M, Cunningham KW. Calcium release and influx in yeast: TRPC and VGCC rule another kingdom. *Sci STKE* 2002; 2002(127): pe17.
- 13 Cui J, Kaandorp JA. Mathematical modeling of calcium homeostasis in yeast cells. *Cell Calcium* 2006; 39(4): 337-48.
- 14 Cui J, Kaandorp J, Ositelu OO, Beaudry V, Knight A, Nanfack YF, *et al.* Simulating calcium influx and free calcium concentrations in yeast. *Cell Calcium* 2009; 45(2): 123-32.
- 15 Locke EG, Liang L, Bonilla M, Takita Y, Cunningham KW. A homolog of voltage-gated channels stimulated by depletion of Ca²⁺ secretory pools in yeast. *Mol Cell Biol* 2000; 20(18): 6686-94.
- 16 Bonilla M, Cunningham KW. MAP kinase stimulation of Ca²⁺ signaling is required for survival of endoplasmic reticulum stress in yeast. *Mol Biol Cell* 2003; 14(10): 4296-305.
- 17 Muller E, Locke EG, Cunningham KW. Differential regulation of two Ca²⁺ influx systems by pheromone signaling in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 2001; 159(4): 1527-38.
- 18 Zhang NN, Dudgeon DD, Paliwal S, Levchenko A, Grote E, Cunningham KW. Multiple signaling pathways regulate yeast cell death during the response to mating pheromones. *Mol Biol Cell* 2006; 17(8): 3409-22.
- 19 Salcedo-Sora JE, Ward SA, Biagini GA. A yeast expression system for functional and pharmacological studies of the malaria parasite Ca²⁺/H⁺ antiporter. *Malar J* 2012; 11: 254.
- 20 Denis V, Cyert MS. Internal Ca²⁺ release in yeast is triggered by hypertonic shock and mediated by a TRP channel homologue. *J Cell Biol* 2002; 156(1): 29-34.
- 21 Wiesenberger G, Steinleitner K, Malli R, Graier WF, Vormann J, Schweyen RJ, *et al.* Mg²⁺ deprivation elicits rapid Ca²⁺ uptake and activates Ca²⁺/calcineurin signaling in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryot Cell* 2007; 6(4): 592-9.
- 22 Stathopoulos-Gerontides A, Guo JJ, Cyert MS. Yeast calcineurin regulates nuclear localization of the Crz1p transcription factor through dephosphorylation. *Gene Dev* 1999; 13(7): 798-803.
- 23 Hilioti Z, Gallagher DA, Low-Nam ST, Ramaswamy P, Gajer P, Kingsbury TJ, *et al.* GSK-3 kinases enhance calcineurin signaling by phosphorylation of RCNs. *Gene Dev* 2004; 18(1): 35-47.
- 24 Cui J, Kaandorp JA, Sloot PM, Lloyd CM, Filatov MV. Calcium homeostasis and signaling in yeast cells and cardiac myocytes. *FEMS Yeast Res* 2009; 9(8): 1137-47.
- 25 Fischer M, Schnell N, Chattaway J, Davies P, Dixon G, Sanders D. The *Saccharomyces cerevisiae* CCH1 gene is involved in calcium influx and mating. *FEBS Lett* 1997; 419(2/3): 259-62.
- 26 Courchesne WE, Vlasek C, Klukovich R, Coffee S. Ethanol induces calcium influx via the Cch1-Mid1 transporter in *Saccharomyces cerevisiae*. *Arch Microbiol* 2011; 193(5): 323-34.
- 27 Paidhungat M, Garrett S. A homolog of mammalian, voltage-gated calcium channels mediates yeast pheromone-stimulated Ca²⁺ uptake and exacerbates the *cdc1*(Ts) growth defect. *Mol Cell Biol* 1997; 17(11): 6339-47.
- 28 Muller EM, Mackin NA, Erdman SE, Cunningham KW. Fig1p facilitates Ca²⁺ influx and cell fusion during mating of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 2003; 278(40): 38461-9.
- 29 Catterall WA. Structure and regulation of voltage-gated Ca²⁺ channels. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2000; 16: 521-55.
- 30 Palmer CP, Zhou XL, Lin J, Loukin SH, Kung C, Saimi Y. A TRP homolog in *Saccharomyces cerevisiae* forms an intracellular Ca²⁺-permeable channel in the yeast vacuolar membrane. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98(14): 7801-5.
- 31 Martinac B, Saimi Y, Kung C. Ion channels in microbes. *Physiol Rev* 2008; 88(4): 1449-90.
- 32 Nass R, Cunningham KW, Rao R. Intracellular sequestration of sodium by a novel Na⁺/H⁺ exchanger in yeast is enhanced by mutations in the plasma membrane H⁺-ATPase. *J Biol Chem* 1997; 272(42): 26145-52.
- 33 Kmetzsch L, Staats CC, Simon E, Fonseca FL, de Oliveira DL,

- Sobrinho L, *et al.* The vacuolar Ca²⁺ exchanger Vcx1 is involved in calcineurin-dependent Ca²⁺ tolerance and virulence in *Cryptococcus neoformans*. *Eukaryot Cell* 2010; 9(11): 1798-805.
- 34 Ma Y, Jiang W, Liu Q, Ryuko S, Kuno T. Genome-wide screening for genes associated with FK506 sensitivity in fission yeast. *PLoS One* 2011; 6(8): e23422.
- 35 Marquina M, González A, Barreto L, Gelis S, Muñoz I, Ruiz A, *et al.* Modulation of yeast alkaline cation tolerance by Ypi1 requires calcineurin. *Genetics* 2012; 190(4): 1355-64.
- 36 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(2): 132-6.
- 37 Strayle J, Pozzan T, and Rudolph HK. Steady-state free Ca²⁺ in the yeast endoplasmic reticulum reaches only 10 microM and is mainly controlled by the secretory pathway pump Pmr1. *EMBO J* 1999; 18(17): 4733-43.
- 38 Bowman BJ, Abreu S, Johl JK, Bowman EJ. The PMR1 gene, encoding a Ca²⁺-ATPase, is required for calcium and manganese homeostasis and normal development of hyphae and conidia in *Neurospora crassa*. *Eukaryot Cell* 2012; 11(11): 1362-70.
- 39 Durr G, Strayle J, Plemper R, Elbs S, Klee SK, Catty P, *et al.* 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(5): 1149-62.
- 40 Behne MJ, Tu CL, Aronchik I, Epstein E, Bench G, Bikle DD, *et al.* Human keratinocyte ATP2C1 localizes to the Golgi and controls Golgi Ca²⁺ stores. *J Invest Dermatol* 2003; 121(4): 688-94.
- 41 Fairclough RJ, Dode L, Vanoevelen J, Andersen JP, Missiaen L, Raeymaekers L, *et al.* Effect of Hailey-Hailey disease mutations on the function of a new variant of human secretory pathway Ca²⁺/Mn²⁺-ATPase (hSPCA1). *J Biol Chem* 2003; 278(27): 24721-30.
- 42 Ton VK, Mandal D, Vahadjji C, and Rao R. Functional expression in yeast of the human secretory pathway Ca²⁺, Mn²⁺-ATPase defective in Hailey-Hailey disease. *J Biol Chem* 2002; 277(8): 6422-7.
- 43 Callewaert G, Parys JB, de Smedt H, Raeymaekers L, Wuytack F, Vanoevelen J, *et al.* Similar Ca²⁺-signaling properties in keratinocytes and in COS-1 cells overexpressing the secretory-pathway Ca²⁺-ATPase SPCA1. *Cell Calcium* 2003; 34(2): 157-62.
- 44 van Baelen K, Vanoevelen J, Missiaen L, Raeymaekers L, Wuytack F. The Golgi PMR1 P-type ATPase of *Caenorhabditis elegans*. Identification of the gene and demonstration of calcium and manganese transport. *J Biol Chem* 2001; 276(14): 10683-91.
- 45 Reinhardt TA, Horst RL, Waters WR. Characterization of Cos-7 cells overexpressing the rat secretory pathway Ca²⁺-ATPase. *Am J Physiol Cell Physiol* 2004; 286(1): C164-9.
- 46 Wuytack F, Raeymaekers L, Missiaen L. Molecular physiology of the SERCA and SPCA pumps. *Cell Calcium* 2002; 32(5/6): 279-305.
- 47 Wuytack F, Raeymaekers L, Missiaen L. PMR1/SPCA Ca²⁺ pumps and the role of the Golgi apparatus as a Ca²⁺ store. *Pflügers Arch* 2003; 446(2): 148-53.
- 48 Curwin AJ, von Blume J, Malhotra V. Cofilin-mediated sorting and export of specific cargo from the Golgi apparatus in yeast. *Mol Biol Cell* 2012; 23(12): 2327-38.
- 49 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(3): 181-6.
- 50 Gupta SS, Ton VK, Beaudry V, Rulli S, Cunningham K, Rao R. Antifungal activity of amiodarone is mediated by disruption of calcium homeostasis. *J Biol Chem* 2003; 278(31): 28831-9.
- 51 Kellermayer R, Aiello DP, Miseta A, Bedwell DM. Extracellular Ca²⁺ sensing contributes to excess Ca²⁺ accumulation and vacuolar fragmentation in a *pmr1Δ* mutant of *S. cerevisiae*. *J Cell Sci* 2003; 116(Pt 8): 1637-46.
- 52 Jiang L, Whiteway M, Ramos Cw, Rodriguez-Medina JR, Shen SH. The *YHR076w* gene encodes a type 2C protein phosphatase and represents the seventh PP2C gene in budding yeast. *FEBS Lett* 2002; 527(1/2/3): 323-5.
- 53 Cunningham KW. Acidic calcium stores of *Saccharomyces cerevisiae*. *Cell Calcium* 2011; 50(2): 129-38.
- 54 Ruiz A, Yenush L, Ariño J. Regulation of ENA1 Na⁺-ATPase gene expression by the Ppz1 protein phosphatase is mediated by the calcineurin pathway. *Eukaryot Cell* 2003; 2(5): 937-48.
- 55 Panadero J, Hernández-López MJ, Prieto JA, Rande-Gil F. Overexpression of the calcineurin target CRZ1 provides freeze tolerance and enhances the fermentative capacity of baker's yeast. *Appl Environ Microbiol* 2007; 73(15): 4824-31.
- 56 Bodvard K, Jörhov A, Blomberg A, Molin M, Käll M. The yeast transcription factor Crz1 is activated by light in a Ca²⁺/calcineurin-dependent and PKA-independent manner. *PLoS One* 2013; 8(1): e53404.
- 57 Grigoriu S, Bond R, Cossio P, Chen JA, Ly N, Hummer G, *et al.* The molecular mechanism of substrate engagement and immunosuppressant inhibition of calcineurin. *PLoS Biol* 2013; 11(2): e1001492.
- 58 Kubokawa M, Nakamura K, Komagiri Y. Interaction between calcineurin and Ca²⁺/calmodulin kinase-II in modulating cellular functions. *Enzyme Res* 2011; 2011: 587359.
- 59 Rusnak F, Mertz P. Calcineurin: form and function. *Physiol Rev* 2000; 80(4): 1483-521.
- 60 Aras MA, Saadi RA, Aizenman E. Zn²⁺ regulates Kv2.1 voltage-dependent gating and localization following ischemia. *Eur J Neurosci* 2009; 30(12): 2250-7.
- 61 Martin BL, Graves DJ. Isotope effects on the mechanism of calcineurin catalysis: Kinetic solvent isotope and isotope exchange studies. *Biochim Biophys Acta* 1994; 1206(1): 136-42.
- 62 Roy J, Li H, Hogan PG, Cyert MS. A conserved docking site modulates substrate affinity for calcineurin, signaling output, and in vivo function. *Mol Cell* 2007; 25(6): 889-901.
- 63 Liu X, Zhao Z, Li Z, Xu C, Sun L, Chen J, *et al.* Cyclosporin A inhibits the influenza virus replication through cyclophilin A-dependent and -independent pathways. *PLoS One* 2012; 7(5): e37277.
- 64 Jin L, Harrison SC. Crystal structure of human calcineurin complexed with cyclosporin A and human cyclophilin. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99(21): 13522-6.
- 65 Fox DS, Heitman J. Calcineurin-binding protein Cbp1 directs the specificity of calcineurin-dependent hyphal elongation during mating in *Cryptococcus neoformans*. *Eukaryot Cell* 2005; 4(9): 1526-38.
- 66 Görlach J, Fox DS, Cutler NS, Cox GM, Perfect JR, Heitman J. Identification and characterization of a highly conserved calcineurin binding protein, CBP1/calciressin, in *Cryptococcus neoformans*. *EMBO J* 2000; 19(14): 3618-29.
- 67 Kaidanovich-Beilin O, Woodgett JR. GSK-3: Functional insights from cell biology and animal models. *Front Mol Neurosci* 2011; 4: 40.
- 68 Kingsbury TJ, Cunningham KW. A conserved family of calcineu-

- rin regulators. *Genes Dev* 2000; 14(13): 1595-604.
- 69 Ermak G, Morgan TE, Davies KJ. Chronic overexpression of the calcineurin inhibitory gene DSCR1 (Adapt78) is associated with Alzheimer's disease. *J Biol Chem* 2001; 276(42): 38787-94.
- 70 Rothermel B, Vega RB, Yang J, Wu H, Bassel-Duby R, Williams RS. A protein encoded within the Down syndrome critical region is enriched in striated muscles and inhibits calcineurin signaling. *J Biol Chem* 2000; 275(12): 8719-25.
- 71 Vega RB, Yang J, Rothermel BA, Bassel-Duby R, Williams RS. Multiple domains of MCIP1 contribute to inhibition of calcineurin activity. *J Biol Chem* 2002; 277(33): 30401-7.
- 72 Aramburu J, Garcia-Cozar F, Raghavan A, Okamura H, Rao A, Hogan PG. Selective inhibition of NFAT activation by a peptide spanning the calcineurin targeting site of NFAT. *Mol Cell* 1998; 1(5): 627-37.
- 73 Aubareda A, Mulero MC, Pe'rez-Riba M. Functional characterization of the calcipressin 1 motif that suppresses calcineurin-mediated NFAT-dependent cytokine gene expression in human T cells. *Cell Signal* 2006; 18(9): 1430-8.
- 74 Hilioti Z, Cunningham KW. The RCN family of calcineurin regulators. *Biochem Biophys Res Commun* 2003; 311(4): 1089-93.
- 75 Mizunuma M, Hirata D, Miyaoka R, Miyakawa T. GSK-3 kinase Mck1 and calcineurin coordinately mediate Hs1 down-regulation by Ca^{2+} in budding yeast. *EMBO J* 2001; 20(5): 1074-85.
- 76 Genescà L, Aubareda A, Fuentes JJ, Estivill X, de La Luna S, Pérez-Riba M. Phosphorylation of calcipressin 1 increases its ability to inhibit calcineurin and decreases calcipressin half-life. *Biochem J* 2003; 374(Pt 2): 567-75.
- 77 Jamal S, Deborah F. Calcineurin Regulation in Fungi and Beyond. *Eukaryot Cell* 2008; 7(2): 177-86.
- 78 Tsubakiyama R, Mizunuma M, Gengyo A, Yamamoto J, Kume K, Miyakawa T, *et al.* Implication of Ca^{2+} in the regulation of replicative life span of budding yeast. *J Biol Chem* 2011; 286(33): 28681-7.
- 79 Ma Y, Jiang W, Liu Q, Ryuko S, Kuno T. Genome-wide screening for genes associated with FK506 sensitivity in fission yeast. *PLoS One* 2011; 6(8): e23422.
- 80 Marquina M, González A, Barreto L, Gelis S, Muñoz I, Ruiz A, *et al.* Modulation of yeast alkaline cation tolerance by Ypi1 requires calcineurin. *Genetics* 2012; 190(4): 1355-64.
- 81 Moser MJ, Geiser JR, Davis TN. Ca^{2+} -calmodulin promotes survival of pheromone-induced growth arrest by activation of calcineurin and Ca^{2+} -calmodulin-dependent protein kinase. *Mol Cell Biol* 1996; 16(9): 4824-31.
- 82 Withee JL, Mulholland J, Jeng R, Cyert MS. An essential role of the pheromone-dependent Ca^{2+} signal is to activate yeast calcineurin. *Mol Biol Cell* 1997; 8(2): 263-77.
- 83 Hernandez-Lopez MJ, Panadero J, Prieto JA, Randez-Gil F. Regulation of salt tolerance by *Torulaspora delbrueckii* calcineurin target Crz1p. *Eukaryot Cell* 2006; 5(3): 469-79.
- 84 Jamal S, Deborah F. Calcineurin regulation in fungi and beyond. *Eukaryot Cell* 2008; 7(2): 177-86.
- 85 Aramburu J, Rao A, Klee CB. Calcineurin: from structure to function. *Curr Top Cell Regul* 2000; 36: 237-95.
- 86 Heath VL, Shaw SL, Roy S, Cyert MS. Hph1p and Hph2p, novel components of calcineurin-mediated stress responses in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryot Cell* 2004; 3(3): 695-704.
- 87 Bultynck G, Heath VL, Majeed AP, Galan JM, Haguenaer-Tsapis R, Cyert MS. Slm1 and slm2 are novel substrates of the calcineurin phosphatase required for heat stress-induced endocytosis of the yeast uracil permease. *Mol Cell Biol* 2006; 26(12): 4729-45.
- 88 Stathopoulos AM, Cyert MS. Calcineurin acts through the CRZ1/TCN1-encoded transcription factor to regulate gene expression in yeast. *Genes Dev* 1997; 11(24): 3432-44.
- 89 Matheos D, Kingsbury T, Ahsan U, Cunningham K. Tcn1p/Crz1p, a calcineurin-dependent transcription factor that differentially regulates gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes Dev* 1997; 11(24): 3445-58.
- 90 Bastajian N, Friesen H, Andrews BJ. Bck2 acts through the MADS box protein Mcm1 to activate cell-cycle-regulated genes in budding yeast. *PLoS Genet* 2013; 9(5): e1003507.
- 91 Cyert MS. Calcineurin signaling in *Saccharomyces cerevisiae*: How yeast go crazy in response to stress. *Biochem Biophys Res Commun* 2003; 311(4): 1143-50.
- 92 Polizzotto R, Cyert MS. Calcineurin-dependent nuclear import of the transcription factor Crz1p requires Nmd5p. *J Cell Biol* 2001; 154(5): 951-60.
- 93 Boustany L, Cyert MS. Calcineurin-dependent regulation of Crz1p nuclear export requires Msn5p and a conserved calcineurin docking site. *Genes Dev* 2002; 16(5): 608-19.
- 94 Kaffman A, Rank NM, O'Neill EM, Huang LS, O'Shea EK. The receptor Msn5 exports the phosphorylated transcription factor Pho4 out of the nucleus. *Nature* 1998; 396(6710): 482-6.
- 95 DeVit MJ, Johnston M. The nuclear exportin Msn5 is required for nuclear export of the Mig1 glucose repressor of *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr Biol* 1999; 9(21): 1231-41.
- 96 Blondel M, Alepuz PM, Huang LS, Shaham S, Ammerer G, Peter M. Nuclear export of Far1p in response to pheromones requires the export receptor Msn5p/Ste21p. *Genes Dev* 1999; 13(17): 2284-300.
- 97 Zhu H, Klemic JF, Chang S, Bertone P, Casamayor A, Klemic KG, *et al.* Analysis of yeast protein kinases using protein chips. *Nat Genet* 2000; 26(3): 283-9.
- 98 Ikeda K, Zhapparova O, Brodsky I, Semenova I, Tirnauer JS, Zaliapin I, *et al.* CK1 activates minus-end-directed transport of membrane organelles along microtubules. *Mol Biol Cell* 2011; 22(8): 1321-9.
- 99 Lee YJ, Jeschke GR, Roelants FM, Thorner J, Turk BE. Reciprocal phosphorylation of yeast glycerol-3-phosphate dehydrogenases in adaptation to distinct types of stress. *Mol Cell Biol* 2012; 32(22): 4705-17.
- 100 Pulgar V, Marin O, Meggio F, Allende CC, Allende JE, Pinna LA. **Optimal sequences for non-phosphate-directed phosphorylation by protein kinase CK1 (casein kinase-1)-a re-evaluation.** *Eur J Biochem* 1999; 260(2): 520-6.
- 101 Kafadar KA, Cyert MS. Integration of stress responses: Modulation of calcineurin signaling in *Saccharomyces cerevisiae* by protein kinase A. *Eukaryot Cell* 2004; 3(5): 1147-53.
- 102 Kafadar KA, Zhu H, Snyder M, Cyert MS. Negative regulation of calcineurin signaling by Hrr25p, a yeast homolog of casein kinase I. *Genes Dev* 2003; 17(21): 2698-708.
- 103 Sopko R, Huang D, Preston N, Chua G, Papp B, Kafadar K, *et al.* Mapping pathways and phenotypes by systematic gene overexpression. *Mol Cell* 2006; 21(3): 319-30.
- 104 Zhao Y, Du J, Zhao G, Jiang L. Activation of calcineurin is mainly responsible for the calcium sensitivity of gene deletion mutations in the genome of budding yeast. *Genomics* 2013; 101(1): 49-56.