

Univerzita Karlova

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Speciální chemicko-biologické obory

Studijní obor: Molekulární biologie a biochemie organismů



Ester Grohmanová

Regulace příjmu fosfátu u kvasinek

Control of phosphate uptake in yeast

Bakalářská práce

Školitel: RNDr. Michaela Schierová, Ph.D.

Praha, 2021

Poděkování:

Ráda bych poděkovala své školitelce, RNDr. Michaelé Schierové, Ph.D. za cenné rady, trpělivost a čas, který mi věnovala, a Františku Krampotovi, který mi byl oporou při zpracovávání této práce.

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 5. 5. 2021

Podpis:

Abstrakt

Homeostáze fosfátu je esenciální pro metabolismus buňky a regulaci buněčného cyklu. Regulace metabolismu fosfátu je závislá především na transkripčním faktoru Pho4, který stimuluje expresi některých genů pro vysokoafinitní a nízkoafinitní transportéry při nízké dostupnosti fosfátu v cytosolu. Teprve v poslední době bylo objeveno, že intracelulární dostupnost fosfátu buňka snímá pomocí inositolpyrofosfátů, jejichž vzájemný poměr ovlivňuje aktivitu nebo stabilitu regulačních i strukturních proteinů, které jsou součástí PHO regulonu, nepřímo i proteinu Pho4. Pro tyto proteiny je charakteristická přítomnost SPX domény, která interakci specifického izomeru inositolpyrofosfátu a proteinu zprostředkuje.

Tato práce popisuje základní principy regulace hladiny a aktivity vybraných proteinů PHO regulonu v závislosti na intracelulární dostupnosti fosfátu na úrovni transkripční, posttranskripční a posttranslační, především u modelového organismu *Saccharomyces cerevisiae*.

Teprve nedávno bylo zjištěno, že narušením homeostáze fosfátu lze u patogenních kvasinek *C. albicans* a *C. neoformans* inhibovat jejich virulenci. Podrobnější studie odhalily některé rozdíly ve způsobu regulace metabolismu fosfátu u různých druhů kvasinek. Detailní znalost interakcí proteinů PHO regulonu s virulencními faktory je možné využít při vývoji fungicidů.

Klíčová slova: Vysokoafinitní a nízkoafinitní transportéry, transkripční faktor Pho4, SPX doména, inositolpyrofosfáty, *Saccharomyces cerevisiae*

Abstract

Phosphate homeostasis is essential for cell metabolism and cell cycle regulation. The regulation of phosphate metabolism depends mainly on the transcription factor Pho4, which stimulates the expression of some genes for high-affinity and low-affinity transporters under low phosphate conditions. It has only recently been discovered that intracellular phosphate availability is detected by means of inositol pyrophosphates, the ratio of which affects the activity or stability of regulatory and structural proteins that are part of the PHO regulon, and indirectly also the activity of the Pho4 protein. These proteins are characterized by the presence of SPX domain that mediates the interaction of a specific inositol pyrophosphate isomer and the protein.

This thesis describes the main principles applied in the control of the level and activity of selected proteins of the PHO regulon in the model organism *Saccharomyces cerevisiae*. This complex control exploits transcriptional, posttranscriptional and posttranslational levels of gene expression regulation, few examples are presented in this thesis.

It has only recently been found that disruption of phosphate homeostasis can inhibit the virulence phenotype in the pathogenic yeasts *C. albicans* and *C. neoformans*. More detailed studies have revealed some differences in the phosphate regulatory circuits of various yeast species. Detailed knowledge of the interactions of PHO regulon proteins with virulence factors can be used in the development of fungicides.

Key words: High-affinity and low-affinity transporters, transcription factor Pho4, SPX domain, inositolpyrophosphates, *Saccharomyces cerevisiae*

Seznam zkratek

1-IP ₇	1-diphosphoinositolpentakisphosphate	1-difosfoinositolpentakisfosfát
1,5-IP ₈	1,5-bis-diphosphoinosiltetrakisphosphate	1,5-bis-difosfoinosiltetrakisfosfát
3'UTR	3'untranslated region	3'nepřekládaná oblast
5-IP ₇	5-diphosphoinositolpentakisphosphate	5-difosfoinositolpentakisfosfát
AD1	acidic domain 1(2)	kyselá doména 1(2)
AK	amino acid	aminokyselina
ATP	adenosine triphosphate	adenosintrifosfát
bHLH	basic helix-loop-helix	základní helix-loop-helix
CDK	cyclin-dependent kinase	cyklin-dependentní kináza
ConA	concanamycin A	konkanamycin A
ER	endoplasmic reticulum	endoplazmatické retikulum
Gly3P	glycerol-3P	glycerol-3P
HAP doména	histidine acid-phosphatase domain	kyselá histidin fosfatázová doména
HD doména	homologous domain	homologní doména
HOMEO	homeodomain	homeodoména
IP	inositolpyrophosphates	inositolpyrofosfáty
IP ₆	inositolhexakisphosphates	inositolhexakisfosfát
IP ₆ K	inositolhexakisphosphate 5-kinase	inositolhexakisfosfát 5-kináza
KD doména	kinase domain	kinázová doména
MN	micrococcal endonuclease	mikrokokální endonukleáza
mRNA	messenger RNA	mediátorová RNA
NES	nuclear export signal	jaderný exportní signál
NLS	nuclear localization signal	jaderný lokalizační signál
ORF	open reading frame	otevřený čtecí rámec
PDS	post-diauxic shift	post-diauxická fáze
PHO dráha	the phosphate sensing and responsive signaling pathway	fosfátová signalizační dráha
Pi	inorganic phosphate	anorganický fosfát
PKA	protein kinase A	protein kináza A
polyP	inorganic polyphosphate	anorganický polyfosfát
PPI IP ₅ K	diphosphoinositolpentakisphosphate 1-kinase	difosfoinositolpentakisfosfát 1-kináza
SPX doména	<u>S</u> yg1/ <u>P</u> ho81/ <u>X</u> PR1 domain	<u>S</u> yg1/ <u>P</u> ho81/ <u>X</u> PR1 domain
STRE	stress-response element	enhancer transkripce
TAD	transactivation domain	transaktivační doména
TBP	TATA binding protein	TATA vazebný protein
TM doména	transmembrane domain	transmembránová doména
UASp1	upstream activating sequence phosphate 1	vazebný motiv 1
UASp2	upstream activating sequence phosphate 2	vazebný motiv 2
VTC komplex	vacuolar transporter chaperone complex	vakuolární transportní chaperonový komplex

Obsah

1. Úvod.....	1
2. Homeostáze fosfátu.....	2
2.1 Nízkoafinitní a vysokoafinitní transportéry.....	4
3. Regulace homeostáze fosfátu v buňce.....	5
3.1 Změny PHO regulonu při nízké intracelulární hladině fosfátu.....	5
3.2 Změny PHO regulonu při vysoké intracelulární hladině fosfátu.....	7
3.3 Transkripční faktor Pho4.....	8
3.3.1 Interakce Pho4 s promotory cílových genů.....	11
3.4 Transkripční faktor Pho2.....	12
3.5 Funkce inositolpyrofosfátů při detekci intracelulární hladiny fosfátu.....	14
3.6 Proteiny s SPX doménami.....	17
3.6.1 Pho81.....	20
3.6.2 VTC komplex.....	22
4. Vysokoafinitní transportér a senzor fosfátu, Pho84.....	24
5. Závěr.....	27
6. Literatura.....	29

1. Úvod

Fosfor je jeden z nejdůležitějších makroprvků a je nepostradatelný pro všechny organismy. Zdrojem fosforu je anorganický nebo organický fosfát. V buňkách je fosfát přítomen v nukleotidech, fosfolipidech, fosforylovaných proteinech a cukrech a podílí se na mnoha metabolických a signalizačních drahách, včetně regulace buněčného cyklu (Ghillebert *et al.*, 2011).

Buňky kvasinek jsou hlavním modelem pro studium homeostáze fosfátu v eukaryotických buňkách. V kvasince *S. cerevisiae* je nejméně 25 z 6000 genů přímo zapojených do homeostáze anorganického fosfátu (Oshima, 1997).

V okolním prostředí je fosfátu často omezené množství, spotřeba fosfátu v buňkách se rovněž průběžně mění, např. před vstupem do S fáze musí buňka zajistit velké množství fosfátu. Buňky musí zabránit zvýšené intracelulární koncentraci fosfátu, protože akumulace fosfátu v cytosolu snižuje volnou energii, která je potřebná pro endergonické metabolické reakce. Nedostatek fosfátu může inhibovat růst a dělení, avšak zvýšená koncentrace cytosolického fosfátu by mohla zastavit metabolismus. Důsledky narušení homeostáze fosfátu jsou tedy závažné. U eukaryot, konkrétně u *S. cerevisiae* (Sethuraman *et al.*, 2001; Hürlimann *et al.*, 2009), mohou být letální, u rostlin mohou způsobovat nanismus (Puga *et al.*, 2014) a u člověka renální Fanconiho syndrom (Legati *et al.*, 2015).

Studie zaměřené na metabolismus fosfátu u různých organismů probíhají již velmi dlouho, přesto teprve nedávno byla zpřesněna představa o mechanismu detekce intracelulární hladiny fosfátu pomocí inositolpyrofosfátů (Wild *et al.*, 2016).

Závislost virulence na homeostázi fosfátu je Achillovou patou patogenních kvasinek. Invazivní kvasinkové nemoci představují vážnou hrozbu pro lidské zdraví na celém světě. Ročně zemře v důsledku infekce patogenními houbami více než 1,5 milionů lidí, z nichž 180 000 způsobí patogen *Cryptococcus neoformans* (Desmarini *et al.*, 2020). Nedávné studie u hlavních lidských patogenních hub, *Candida albicans* a *Cryptococcus neoformans*, odhalily, že narušením homeostáze fosfátu lze inhibovat virulenci kvasinky (Ikeh *et al.*, 2017; Desmarini *et al.*, 2020). Výzvou do budoucna je propojit nové poznatky získané studiem modelových a patogenních kvasinek a důkladně popsat mechanismy spojující získávání fosfátů s virulencí hub. Rozdíly v regulaci metabolismu fosfátu u kvasinek a savčích buněk lze perspektivně využít při vývoji fungicidů (Ikeh *et al.*, 2017).

Cíl práce:

Cílem bakalářské práce je charakterizovat transportní systémy pro příjem fosfátu (vysokoafinitní a nízkoafinitní transportéry) u kvasinek a především různé úrovně jejich regulace při nedostatku nebo naopak nadbytku fosfátu v cytosolu.

2. Homeostáze fosfátu

Homeostáze anorganického fosfátu (Pi) lze dosáhnout součinností více způsobů a činitelů, například importu a exportu Pi, jeho intracelulárního skladování a remobilizace, aktivního vychytávání Pi z vnějšího prostředí a recyklace Pi v buňce.

Geny zapojené do Pi homeostáze kódují mimo jiné vysokoafinitní (Pho84 a Pho89) a nízkoafinitní symportéry (Pho87 a Pho90) (Persson *et al.*, 1999) a kyselé fosfatázy, které mají za úkol hydrolyzovat Pi (Oshima, 1997), . Na vakuolární membráně je Pi transportér (Pho91) (Hürlimann *et al.*, 2009), který se podílí na hydrolyze anorganického polyfosfátu (polyP) a exportu uvolněného Pi do cytoplazmy, který vznikl hydrolyzou polyfosfátu. Z nukleotidů nebo fosfolipidů lze Pi recyklovat hydrolyzou pomocí fosfatázy Phm8 nebo fosfodiesterázy Gde1 (Patton-Vogt, 2007; Xu *et al.*, 2013). Proteinový komplex VTC (vakuolární transportní chaperonový komplex) syntetizuje polyP z ATP a translokuje vznikající řetězec polyP do vakuoly, odkud může být znovu mobilizován pomocí polyfosfatáz (Ppn1 a Ppn2) (Sethuraman *et al.*, 2001).

Mnoho genů zapojených do Pi homeostáze je exprimováno prostřednictvím signální dráhy PHO (The phosphate sensing and response signal pathway). Při nízké intracelulární koncentraci Pi se transkripční faktor Pho4 (spolu s transkripčním faktorem Pho2) ve formě heterodimeru váže na promotory genů *PHO* a aktivuje jejich transkripci. (Yoshida *et al.*, 1989a; Carroll a O'Shea, 2002). Geny dráhy PHO a jejich funkce jsou popsány v tabulce 1.

Dlouho nebyl znám mechanismus, jakým buňka detekuje intracelulární hladinu Pi, která je klíčová pro změny genové exprese a metabolismu i regulaci buněčného cyklu. Významnou úlohu senzorů plní inositolpyrofosfáty (IP), jejichž hladina se mění v závislosti na intracelulární hladině Pi. Inositol pyrofosfáty mění aktivitu mnoha proteinů PHO dráhy, např. Pho81 a Vtc, nebo přispívají k regulaci hladiny těchto proteinů v buňce. Interakce inositolpyrofosfátů s proteiny je zpravidla zprostředkována SPX doménou (podrobněji popsáno v kapitole 3.5 a 3.6) (Gerasimaite *et al.*, 2017).

Co se děje v buňce při nedostatku/dostatku fosfátu na molekulární úrovni, bude důkladně probráno v dalších kapitolách.

Tabulka 1: Seznam genů dráhy PHO a jejich funkce u *S. cerevisiae*. V tabulce jsou zároveň uvedeny názvy funkčních homologů u *C. glabrata*, *C. neoformans* a *C. albicans*. Proteiny obsahující SPX doménu jsou zvýrazněny tučně, upraveno podle Secco et al. (2012a). Geny transkripčně závislé na Pho4 jsou zvýrazněny zeleně, data o cílových genech proteinu Pho4 pocházejí z databáze SGD (<https://www.yeastgenome.org/>). Dále upraveno podle Inglis et al. (2012); Wood et al. (2012); Ikeh et al. (2017) a Köhler et al. (2020).

Název genu	Funkce genu	Názvy homologů		
		<i>C. glabrata</i>	<i>C. neoformans</i>	<i>C. albicans</i>
GDE1	kóduje glycerofosfocholin fosfodiesterázu	<i>GDE1</i>	<i>GDE2</i>	
GIT1	kóduje permeázu plazmatické membrány, která zprostředkuje příjem glycerofosfoinositolu a glycerofosfocholinu jako zdrojů inositolu a fosfátu; exprese a transport jsou regulovány dostupností fosfátu a inositolu	<i>GIT1</i>	<i>GIT1</i>	<i>GIT1</i>
<i>KCSI</i>	kóduje inositolhexakisfosfát 5-kinázu (IP ₆ K)		<i>KCSI</i>	
<i>MSN5</i>	kóduje karyoferin, který se podílí na exportu proteinů z jádra a importu do jádra, včetně exportu Pho4	<i>MSN5</i>		
<i>PHO2</i>	kóduje transkripční faktor Pho2, který se podílí na regulaci genů zapojených do metabolismu fosforu; transkripční faktory Pho2 a Pho4 se kooperativní vazbou vážou na promotory <i>PHO</i> genů; fosforylace Pho2 usnadňuje interakci s Pho4	<i>PHO2</i>		<i>GRF10</i>
<i>PHO4</i>	kóduje transkripční faktor Pho4, protein se strukturním motivem helix-loop-helix; Pho4 při nedostatku fosforu aktivuje transkripci některých genů zapojených do metabolismu fosforu	<i>PHO4</i>	<i>PHO4/HLH3</i>	<i>PHO4</i>
PHO5	kóduje kyselou fosfatázu Pho5 (1 ze 3), která mobilizuje fosfát z extracelulárních zdrojů; exprese <i>PHO5</i> při nedostatku fosforu stimuluje dimer Pho2 – Pho4		<i>APH1</i> ; <i>APH2</i> ; <i>APH3</i> ; <i>APH4</i>	<i>PHO100</i>
PHO8	kóduje vakuolární alkalickou fosfatázu	<i>PHO8</i>		
<i>PHO80</i>	kóduje cyklin, který interaguje s cyklin-dependentní kinázou Pho85; podílí se na regulaci aktivity Pho4 (mimo jiné)	<i>PHO80</i>	<i>PHO80</i>	<i>PHO80</i>
PHO81	kóduje inhibitor cyklin-dependentní kinázy (CDK), který reguluje dimer Pho80–Pho85 v reakci na hladinu fosfátu	<i>PHO81</i>	<i>PHO81</i>	<i>PHO81</i>
PHO84	kóduje vysokoafinitní fosfátový transportér Pho84, který zároveň reguluje aktivitu proteinkinázy A (PKA)	<i>PHO84</i>	<i>PHO84</i> ; <i>PHO840</i>	<i>PHO84</i>
<i>PHO85</i>	kóduje cyklin-dependentní kinázu Pho85; kináza Pho85 se podílí na kontrole hladiny živin v buňce, fosforylací inhibuje Pho4 při zvýšené hladině Pi v cytosolu	<i>PHO85</i>	<i>CMGC</i> / <i>CDK/CDK5</i>	<i>PHO85</i>
PHO87	kóduje nízkoafinitní fosfátový transportér Pho87	<i>PHO87</i>		<i>PHO87</i>
PHO89	kóduje vysokoafinitní fosfátový transportér	<i>PHO89</i>	<i>PHO89</i>	

PHO90	kóduje nízkoafinitní fosfátový transportér Pho90			
PHO91	kóduje nízkoafinitní fosfátový transportér, který exportuje fosfát z vakuolárního lumen do cytosolu; reguluje fosfátový a polyfosfátový metabolismus	<i>PHO91</i>		
<i>PHO92</i>	kóduje RNA vazebný protein snižující stabilitu <i>PHO4</i> -mRNA			
<i>PPN1</i>	kóduje vakuolární endo-polyfosfatázu	<i>CAGL0K</i> <i>06237g</i>		
<i>PPX1</i>	kóduje exo-polyfosfatázu, která hydrolyzuje anorganický polyfosfát (polyP) na fosfátové zbytky; exo-polyfosfatáza se nachází v cytosolu, na plasmatické membráně a v mitochondriální matrix	<i>CAGL0L</i> <i>08602g</i>		
<i>PSE1</i>	kóduje jaderný importní receptor			
SPL2	kóduje protein Spl2, který je svou funkcí podobný inhibitorům cyklin-dependetních kináz; při nedostatku fosfátu zprostředkuje internalizaci nízkoafinitních transportérů do vakuoly			
SYG1	kóduje predikovaný fosfátový exportér na plasmatické membráně			
VIP1	kóduje difosfoinositolpentakisfosfát 1-kinázu (PP IP ₅ K), která obsahuje kinázovou a fosfatázovou doménu	<i>VIP1</i>		
VTC1	kódují podjednotky vakuolárního transportního chaperonového komplexu (VTC komplexu)	<i>PHM4</i>	<i>VTC1</i>	<i>VTC1</i>
VTC2		<i>PHM1</i>		
VTC3		<i>PHM1</i>		<i>VTC3</i>
VTC4		<i>PHM3</i>	<i>VTC4</i>	<i>VTC4</i>
VTC5				

2.1 Nízkoafinitní a vysokoafinitní transportéry

Transport fosfátu přes buněčnou membránu je zajištěn několika transportéry lišícími se svou afinitou k Pi. Kvasinky *S. cerevisiae* mají dva vysokoafinitní transportéry a tři nízkoafinitní transportéry. H⁺/Pi symportér Pho84 a Na⁺/Pi symportér Pho89 patří mezi vysokoafinitní transportéry (Hu *et al.*, 2007). Symportér Pho84 má optimum v pH 4,4 a symportér Pho89 v pH 9,5. To zajišťuje, že fosfát lze vychytávat v širokém rozmezí pH (Persson *et al.*, 2003). H⁺/Pi symportéry Pho87 a Pho90 patří mezi nízkoafinitní transportéry. Výše zmíněné transportéry jsou lokalizovány na plasmatické membráně, zatímco nízkoafinitní transportér Pho91 je lokalizován na vakuolární membráně (Hu *et al.*, 2007).

Aktivita vysokoafinitních a nízkoafinitních transportérů je závislá na intracelulární hladině Pi. Je-li fosfátu nedostatek, zvýší se transkripce vysokoafinitních transportérů a nízkoafinitní transportéry jsou internalizovány a degradovány ve vakuole. Je-li fosfátu dostatek, nízkoafinitní transportéry Pho87

a Pho89 jsou aktivní a vysokoafinitní transportér Pho84 je internalizován a degradován ve vakuole (Qi *et al.*, 2016). Při nedostatku fosfátu je aktivována dráha PHO (Mouillon a Persson, 2006). Koncentrace dostatečně nízká pro aktivaci dráhy PHO je 0,2 mM. Optimální koncentrace pro buňku je v intervalu (0,2-0,5 mM) (Austin a Mayer, 2020).

V kapitole 4 bude podrobně popsán protein Pho84 a v kapitole 3.5 a 3.5.2 vliv inositolpyrofosfátů na stabilitu nízkoafinitních transportérů a aktivita VTC komplexu.

3. Regulace homeostáze fosfátu v buňce

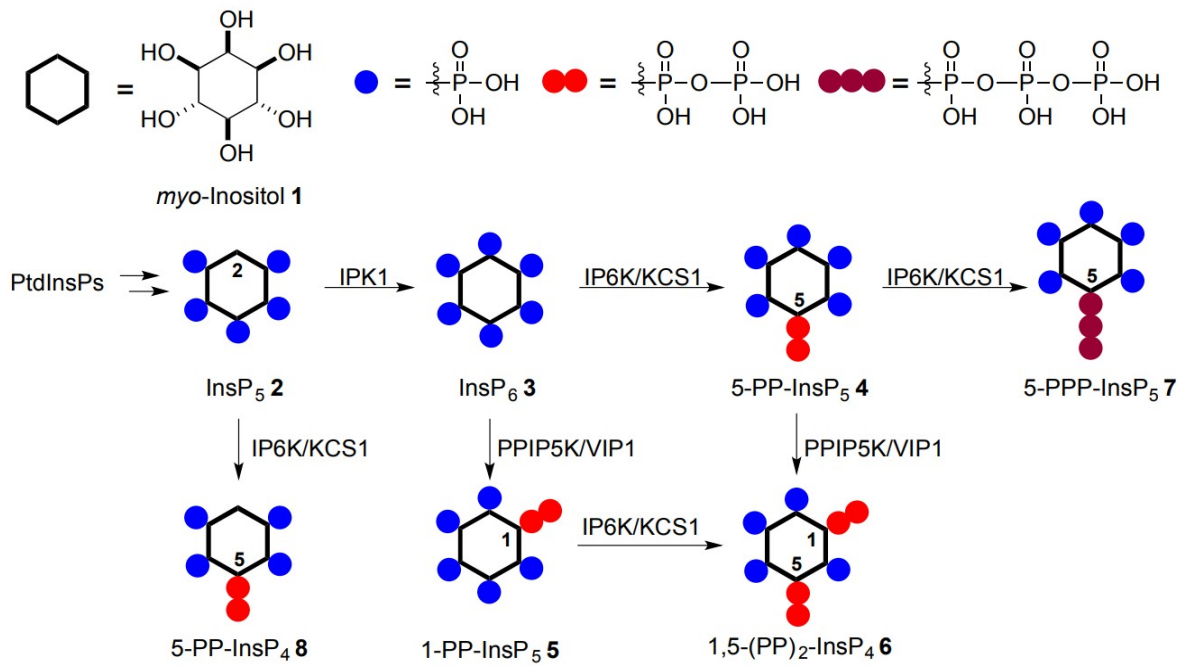
3.1 Změny PHO regulonu při nízké intracelulární hladině fosfátu

Pokud je koncentrace fosfátu v buňce nízká, je aktivována signální dráha PHO. Pokud kvasinky *S. cerevisiae* hladovějí na fosfát, pozitivní regulační protein Pho81 inaktivuje dimer Pho80–Pho85 sestavený z cyklinu a cyklin-dependentní proteinkinázy (Mouillon a Persson, 2006). Inositolpyrofosfát 1-IP₇ nekovalentně interaguje s proteinem Pho81, mění jeho konformaci a indukuje další interakce mezi Pho81 a dimerem Pho80–Pho85, čímž zabráňuje substrátům v přístupu k aktivnímu místu kinázy. Je zabráněno fosforylaci transkripčního faktoru Pho4 kinázou Pho85 (biosyntéza inositolpyrofosfátů je znázorněna na obrázku 1) (Qi *et al.*, 2016).

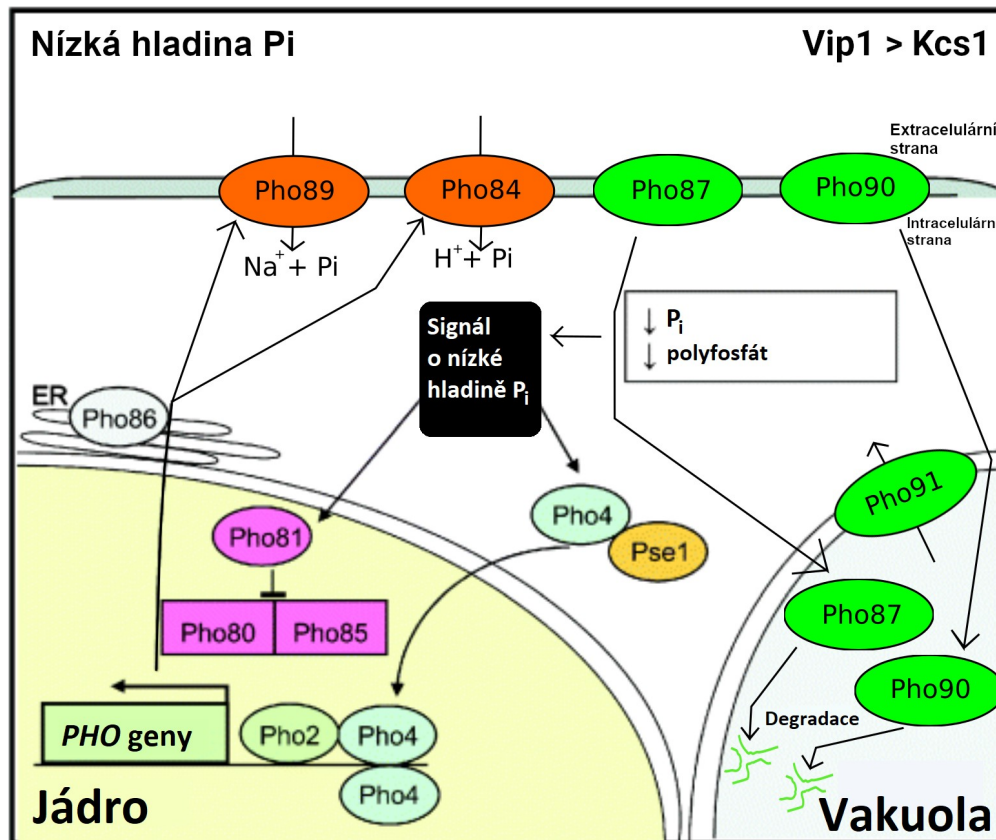
Nefosforylovaný Pho4 se v cytoplasmě naváže na jaderný importní receptor Pse1, vstoupí do jádra a ve spojení s Pho2 indukuje expresi několika genů (znázorněno na obrázku 2) (Mouillon a Persson, 2006) včetně genů kódujících vysokoafinitní transportní systém (*PHO84*, *PHO89*) (Qi *et al.*, 2016).

Při nízké koncentraci fosfátu je aktivována i exprese proteinů vakuolárního transportního chaperonového komplexu (VTC komplexu) (Hothorn *et al.*, 2009). Komplex VTC zajišťuje syntézu anorganického polyfosfátu (polyP) a jeho akumulaci ve vakuole. K syntéze polyP však dochází až při dosažení optimální intracelulární hladiny Pi. Při nízké dostupnosti Pi probíhá hydrolýza polyP pomocí vakuolární polyfosfatázy Phm5 a transport fosfátu z vakuoly do cytosolu pomocí nízkoafinitního fosfátového transportéru Pho91 (Ogawa *et al.*, 2000; Zhou a O'Shea, 2011).

Při nízké dostupnosti Pi je fosfát získáván také z makromolekul přítomných vně buňky. Dochází k importu glycerofosfoinositolu a glycerofosfocholinu do buňky pomocí fosfodiesterázy Gde1 (Qi *et al.*, 2016).



Obrázek 1: Biosyntéza inositolpyrofosfátů. *IP₆K* : inositolhexakisfosfát 5-kináza; *PP-IP₅K*: difosfoinositolpentakisfosfát 1-kináza. Molekula číslo 4, izomer *IP₇* (*5PP-IP₅*; 5-difosfoinositolpentakisfosfát), vzniká působením kinázy *Kcs1*. Molekula číslo 6, izomer *IP₈* (*1,5 (PP)₂-IP₄*; 1,5-bis-difosfoinositol-tetrakisfosfát), vzniká působením enzymů *Vip1* a *Kcs1*. Molekula číslo 5, izomer *IP₇* (*1-PP-IP₅*; 1-difosfoinositolpentakisfosfát), vzniká působením kinázy *Vip1* (Saiardi, 2012; Gerasimaite et al., 2017).

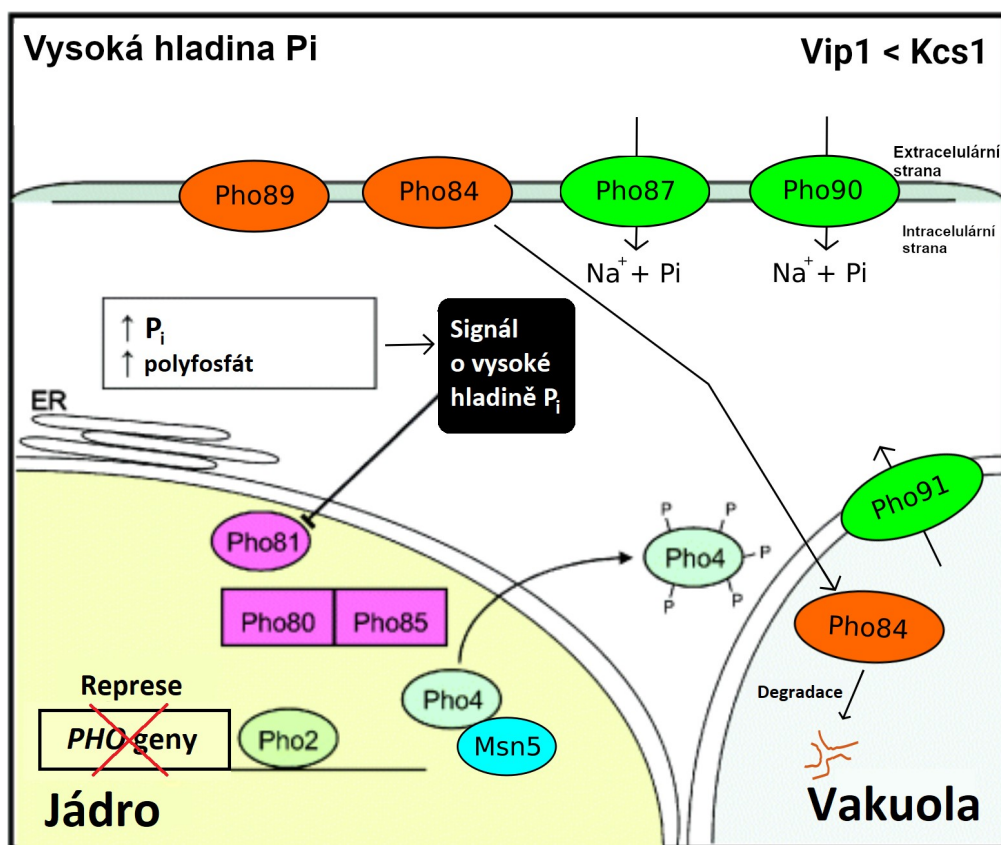


Obrázek 2: Pokud kvasinky hladovějí na fosfát, pozitivní regulační protein Pho81 (fialový) inaktivuje dimer Pho80–Pho85 (fialový) sestavený z cyklinu a cyklin-dependentní proteinkinázy. Transkripční faktor Pho4 (světle zelený) je nefosforylovaný a aktivní, což vede k aktivaci dráhy PHO a k vychytávání fosfátu z prostředí. Nízkoafinitní transportéry jsou znázorněny sytě zelenou barvou, vysokoafinitní sytě oranžovou (Mouillon a Persson, 2006). Upraveno podle Qi *et al.* (2016).

3.2 Změny PHO regulonu při vysoké intracelulární hladině fosfátu

Pokud je v buňce vysoká hladina fosfátu, je transkripční faktor Pho4 fosforylovaný na specifických serin-prolinových zbytcích pomocí dimeru Pho80–Pho85 (Qi *et al.*, 2016). Fosforylovaný Pho4 se spojí s jaderným exportním receptorem Msn5, což vede k rychlému exportu Pho4 z jádra do cytoplazmy a tím k represí genů *PHO* (znázorněno na obrázku 3) (Mouillon a Persson, 2006). Nízkoafinitní fosfátové transportéry Pho87 a Pho89 zajistí příjem fosfátu a vysokoafinitní fosfátový transportér Pho84 je internalizován a degradován ve vakuole (Qi *et al.*, 2016).

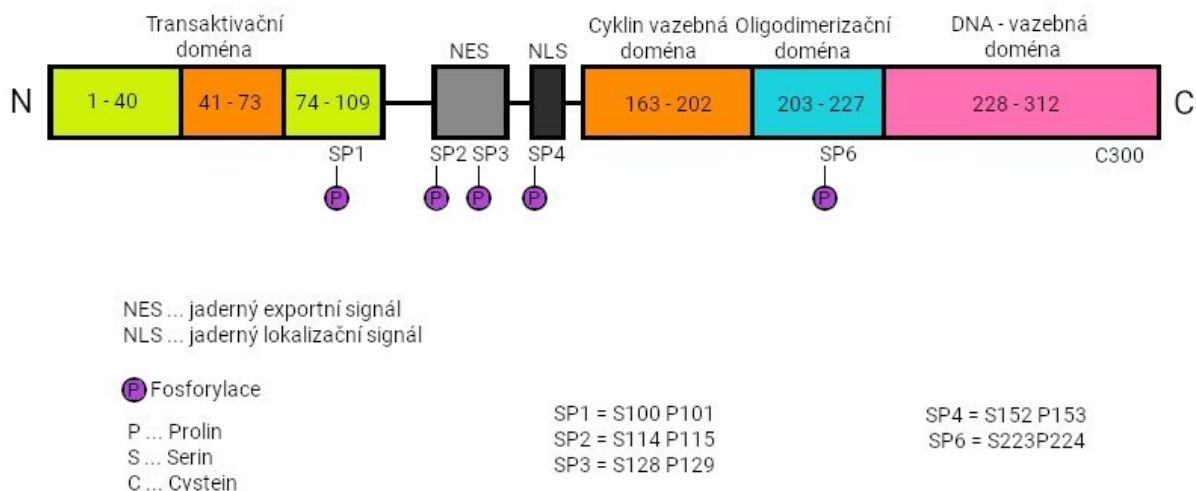
Pokud buňka s nízkým obsahem fosfátu přijme z extracelulárního prostředí fosfát a dosáhne opět optimální intracelulární hladiny P_i , dojde pomocí Pho84 k aktivaci PKA dráhy (dráha proteinkinázy A). Aktivace dráhy PKA vede ke zvýšené degradaci vysokoafinitního fosfátového transportéru Pho84 ve vakuole (Mouillon a Persson, 2006).



Obrázek 3: Vysoká hladina intracelulárního fosfátu vede k represi dráhy PHO. Dimer Pho80–Pho85 (fialový) fosforyluje transkripční faktor Pho4 (světle zelený). Pho4 je exportován z jádra s pomocí Msn5 (modrý), což vede k represi genů PHO. Příjem fosfátu zajišťují nízkoafinitní transportéry (sytě zelenou barvou), vysokoafinitní transportéry (sytě oranžovou) jsou endocytovány. Pozitivní regulační protein Pho81 (fialový) se váže na dimer Pho80–Pho85, ale neinhibuje ho (Mouillon a Persson, 2006). Upraveno podle Qi et al. (2016).

3.3 Transkripční faktor Pho4

Gen *PHO4* kóduje transkripční faktor Pho4, který je zapojený do regulace transkripce různých genů v PHO regulonu u *S. cerevisiae*. Transkript genu *PHO4* o velikosti 1,8 kb má ORF (otevřený čtecí rámec) dlouhý 936 bp a kóduje tedy 312 aminokyselinových zbytků. Gen je exprimován konstitutivně (Yoshida et al., 1989b). V proteinu Pho4 byly nalezeny 4 funkční domény: transaktivační, cyklin vazebná doména, dimerizační a DNA–vazebná doména (Ogawa a Oshima, 1990). Funkční domény proteinu Pho4 jsou znázorněny na obrázku 4.



Obrázek 4: Funkční domény transkripčního faktoru Pho4. Protein Pho4 obsahuje 4 funkční domény: transaktivační (znázorněna zelenou barvou), cyklin vazebná doména (znázorněna oranžovou), dimerizační (znázorněna modrou) a DNA-vazebná doména (znázorněna růžovou). Pho4 je posttranslačně modifikován fosforylací na SP1 až SP4 a SP6 místech. Kovalentně navázaná fosfátová skupina je zvýrazněna fialově. Export z buněčného jádra do cytoplazmy zajišťuje jaderný exportní signál (zvýrazněný šedou barvou), import do buněčného jádra z cytoplazmy zajišťuje jaderný lokalizační signál (zvýrazněný černou barvou). Sestaveno podle Ogawa a Oshima (1990) a Springer et al. (2003).

Na N-konci se nachází transaktivační doména (oblast 1.–109. AK, dále uvádím rozsah domény v závorkách bez „AK“) (Giniger a Ptashne, 1987). Tato oblast je bohatá na kyselé aminokyseliny (7.–90.) (Watson *et al.*, 1983). Nacházejí se zde také helixové struktury, konkrétně v oblastech 14.–28., 40.–54. a 75.–90. Alfa-helixy a negativní náboj jsou tedy charakteristické pro transaktivační doménu (Giniger a Ptashne, 1987).

V proteinu jsou přítomné dvě cyklin vazebné domény (41.–73. a 163.–202.), které zprostředkují interakci proteinu Pho4 s cyklinem Pho80. Oblast 181.–192. je bohatá na aminokyselinové zbytky prolinu a lysinu. Díky tomu je zde pozitivní náboj. V oblasti 167.–173. aminokyselinového zbytku je struktura alfa helixu (Johnston *et al.*, 1987; Ma a Ptashne, 1987). Předpokládá se, že vazba Pho80 na Pho4 zabraňuje nebo narušuje tvorbu oligomeru Pho2–Pho4, který stimuluje transaktivační funkci Pho4 (Cherry *et al.*, 1989).

Dimerizační doména proteinu zahrnuje 203.–227. aminokyselinový zbytek (Ogawa a Oshima, 1990). Delece v oblasti zahrnující 172.–227. AK téměř úplně zrušila transaktivační aktivitu proteinu Pho4 (Toh *et al.*, 1981). Tato oblast se překrývá s vazebnou doménou pro transkripční faktor Pho2 (200.–218. AK) (Shao *et al.*, 1996). Interakce Pho2 a Pho4 je nezbytná pro aktivaci některých cílových genů, např. *PHO5* a *PHO81* (Zhou a O’Shea, 2011).

V C-koncové oblasti proteinu Pho4 (228.–312. AK) se nachází DNA vazebná doména se strukturálním motivem basic helix-loop-helix (bHLH). Konkrétně 252.–265. AK zahrnují strukturální motiv

bHLH (Shao *et al.*, 1996). Pho4 je první transkripční faktor u kvasinek s tímto motivem (Berben *et al.*, 1990). Motiv je zodpovědný za vazbu na promotory cílových genů a zprostředkovává homodimerizaci, která je důležitá pro aktivaci. Homodimerizační doména se nachází ve druhém helixu strukturního motivu helix-loop-helix a její cysteinový zbytek je pro homodimerizaci nezbytný (Shao *et al.*, 1998).

Genová exprese genu *PHO4* je regulována na posttranskripční úrovni RNA vazebným proteinem Pho92. Pho92 se váže na 3'UTR (nepřekládaná oblast) *PHO4*-mRNA a při optimální hladině Pi v cytosolu zprostředkuje degradaci mRNA genu *PHO4* pomocí deadenylačního komplexu Pop2-Ccr4-Not. Protein Pho92 obsahuje vysoce konzervovanou doménu YTH, která má RNA-vazebnou aktivitu (Kang *et al.*, 2014).

Aktivita transkripčního faktoru Pho4 je regulována fosforylací. Pho4 je fosforylován konkrétně na 5 serin-prolinových (SP1 až SP4 a SP6) místech, přičemž každé místo hraje odlišnou roli v regulaci. Fosforylace na SP2 a SP3 zajišťuje export Pho4 z jádra, zatímco fosforylace na SP4 podporuje jaderný import. Fosforylace na SP6 brání interakci s koaktivátorem Pho2 (Komeili a O'Shea, 1999). Springer *et al.* (2003) studovali vliv fosforylace Pho4 na expresi *PHO5* a *PHO84*. Zatímco v podmínkách s nízkou intracelulární hladinou Pi je Pho4 nefosforylován a oba cílové geny jsou silně expimovány, při střední dostupnosti Pi (50-100 $\mu\text{mol Pi}$) je Pho4 fosforylován v pozici SP6 a indukuje expresi pouze *PHO84*.

Kmen, který nese Pho4 s mutovaným serinem v pozici SP6, indukuje expresi *PHO5* i v podmínkách se střední dostupností Pi (Springer *et al.*, 2003).

PHO5 a *PHO84* jsou modelovými zástupci dvou tříd cílových genů transkripčního faktoru Pho4. První skupina, představovaná *PHO5*, zahrnuje především fosfatázy, zatímco větší skupina cílových genů aktivovaných na úroveň 40 % maximální exprese při střední dostupnosti Pi, zahrnuje geny kódující proteiny pro ukládání a mobilizaci Pi a transportéry. Geny 1. třídy při střední dostupnosti Pi expimovány nejsou (Springer *et al.*, 2003). Lam *et al.* (2008) navíc prokázali, že k indukci exprese 2. třídy genů dochází po vyčerpání Pi dříve než u genů 1. třídy.

Protein Pho4 o svá vazebná místa v promotorech kompetuje s transkripčním faktorem Cbf1 (Zhou a O'Shea, 2011).

3.3.1 Interakce Pho4 s promotory cílových genů

Promotor genu *PHO5*, jeden z nejdéle studovaných cílových genů transkripčního faktoru Pho4, se stal modelovým systémem pro studium interakce transkripčních faktorů s histony přítomnými v oblasti promotoru (McAndrew *et al.*, 1998; Mao *et al.*, 2011; Korber a Barbaric, 2014).

Pho5 patří mezi nejdůležitější kyselé fosfatázy (Mouillon a Persson, 2006). Kyselé fosfatázy se nacházejí převážně v periplazmatickém prostoru a v kyselém prostředí odštěpují fosfátovou skupinu

z extracelulárních organických fosforylovaných zdrojů, například z glycerolfosfátu (Fernández-Murray a McMaster, 2005; Fleischer *et al.*, 2006). Výhodou Pho5 je snadná detekce aktivity proteinu bez nutnosti připravit proteinový extrakt (Hirst *et al.*, 1994)..

Vazebné sekvence pro Pho2 a Pho4 v promotoru *PHO5* popsali Vogel *et al.* (1989) a Barbaric *et al.* (1998). Vogel *et al.* (1989) identifikovali dva významné vazebné motivy, označené jako UASp1 a UASp2, lokalizované -369 až -352 (UASp1) a -260 až -240 bp (UASp2). Barbaric *et al.* (1998) identifikovali vazebná místa pro Pho2 a změřili vliv mutací ve vazebných místech pro Pho4 a Pho2 na expresi *PHO5*. Mutace v jednom vazebném místě pro Pho4 (UASp1 nebo UASp2) snižuje transkripci genu o 90 %. Na redukci transkripce má velmi podobný vliv i mutace ve vazebném místě pro Pho2, které se překrývá s UASp1 (-385 až -358). Z mutační analýzy promotoru genu *PHO5* vyplývá, že přímá interakce Pho2 s DNA a zároveň fyzická interakce Pho2 a Pho4 mají výrazný pozitivní vliv na úroveň transkripce. Nejbližší k transkripčnímu startu se nachází TATA box (Mao *et al.* 2011).

Mao *et al.* (2011) pomocí Pho4 fúzovaného s mikrokokální endonukleázou (Pho4–MN) potvrdili, že se Pho4 váže na promotor *PHO5* jen při nízké hladině Pi (za těchto podmínek totiž dochází k degradaci promotoru ve vazebných místech pro Pho4), zatímco při represí PHO regulonu k degradaci promotoru nedochází. K vazbě Pho4 na promotor *PHO5* dochází relativně pomalu, asi 2 hodiny po vyčerpání Pi v cytosolu. Pomocí *in vivo* studie bylo zároveň zjištěno, že vazba Pho4 do UAS1 je podmíněna interakcí s Pho2, u kmene s delecí *PHO2* nedocházelo k degradaci promotoru *PHO5* u kmene s fúzí Pho4–MN. Obdobně, delece *PHO4* výrazně oslabil interakci Pho2–MN s promotorem *PHO5*.

V promotoru *PHO5* jsou při represí PHO regulonu tři nukleozomy v konzervativních pozicích (Almer *et al.* 1986). Korber a Barbaric (2014) popisují ještě dva další, distálně od dříve popsaných. Expozice vazebných míst pro Pho4 se mění v závislosti na dostupnosti Pi, vazba dimeru Pho2–Pho4 vede k odstranění nukleozomů, které obklopují obě vazebné sekvence. Odstranění nukleozomů je závislé na vzájemné pozitivní interakci Pho2–Pho4, která zvyšuje stabilitu jejich vazby na DNA a indukuje konformační změnu aktivační domény Pho4 (Shao *et al.* 1996). Pho2 usnadňuje odstranění nukleozomů z oblasti promotoru interakcí s Esa1, katalytickou podjednotkou histonacetyl-transferázového komplexu NuA4, který se podílí na acetylaci H2A.Z, resp. Htz1, varianty charakteristické pro promotory (Nourani *et al.*, 2004). Boeger *et al.* (2008) zjistili, že při aktivaci PHO regulonu se snižuje počet nukleozomů vázaných na promotor *PHO5* na 0,6–1. Podle Korber a Barbaric (2014) vzniká při plné aktivaci promotoru hypersenzitivní oblast DNA („nucleosome free“) o délce 600 bp.

Wang *et al.* (2011) po dlouhodobém pátrání odhalili, že přítomnost histonů v promotoru *PHO5* je závislá na histon deacetyláze Rpd3 a histometyltransferáze Set1, která je zodpovědná za metylaci H3K4. Exprese Pho5 je výrazně zvýšená při delecí *RPD3* a *SET1*.

Vazba Pho2–Pho4 do UASp1 aktivuje transaktivační doménu Pho4, která umožní interakci s komplexem SAGA a TBP (TATA binding protein). SAGA zajistí acetylaci histonů v oblasti pro-

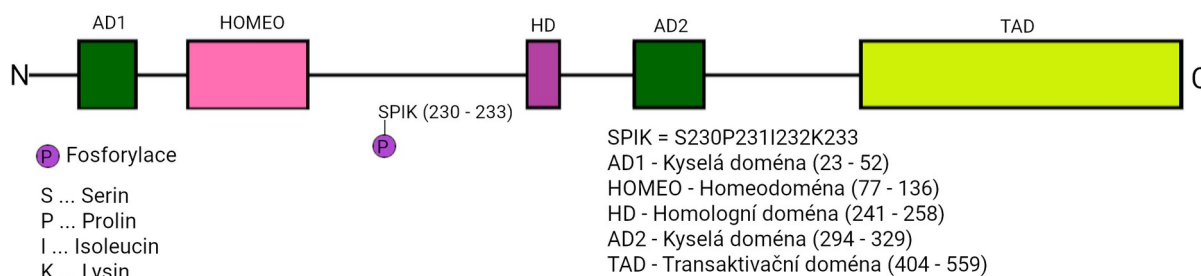
motoru. Aktivovaná transaktivační doména Pho4 společně s acetylovanými histony umožní vazbu chromatin remodelujícího komplexu SWI/Snf. Aktivace promotoru *PHO5* je tedy překvapivě komplexní (Korber a Barbaric, 2014).

PHO84 kóduje vysokoafinitní transportér Pi. Charakteristice proteinu je věnována kapitola 4. Exprese genu je silně indukována za nízké i střední dostupnosti Pi. Exprese genu se může zvýšit až 76x (Ogawa *et al.*, 1995). Gen *PHO84* patří do 2. třídy cílových genů Pho4 (Springer *et al.*, 2003). Ogawa *et al.* (1995) našli v promotoru 5 vazebných sekvencí pro Pho4, nejvzdálenější (A) až v pozici -880 bp (proti směru transkripce), vazebná místa C a D spolu sousedí. Vazebná místa C a E nebo D a E mohou zajistit plnou aktivaci exprese (Ogawa *et al.*, 1995). Podobně jako u *PHO5*, interakce Pho4 s promotorem *PHO84* je ovlivněna přítomností nukleozomů v oblasti promotoru, při aktivaci exprese dochází k výrazným změnám chromatinu. Expresi pozitivně ovlivňují proteiny Gcn5, Snf2 a Ino80. Absence Gcn5 snižuje acetylaci H3, vazbu TBP a RNA polymerázy 2 (Wippo *et al.*, 2009).

Dalším cílovým genem transkripčního faktoru Pho4 je *PHO8*, který kóduje vakuolární alkalickou fosfatázu (Kaneko *et al.*, 1982). Nedávno byla prokázána funkce Pho8 při degradaci polyfosfátu při nízké intracelulární koncentraci Pi (Kizawa *et al.*, 2016). Na rozdíl od *PHO5* se v promotoru genu *PHO8* nachází jen jedno funkční vazebné místo pro Pho4. Pro aktivaci transkripce *PHO8* navíc není nezbytná kooperace Pho2 s Pho4. Promotor *PHO8* je podle expresní reportérové analýzy s *lacZ* genem asi 10x slabší než promotor *PHO5*. S tím pravděpodobně souvisí i neúplná remodelace chromatinu v oblasti promotoru *PHO8* při nízké hladině Pi (Münsterkötter *et al.*, 2000).

3.4 Transkripční faktor Pho2

Regulační gen *PHO2* kóduje protein Pho2, který ve spojení s proteinem Pho4 aktivuje transkripci 20 genů PHO regulonu, včetně *PHO84* a *PHO5*. Transkript genu *PHO2* má velikost 1,9–2,0 kb a úroveň jeho exprese se výrazně neliší při vysoké nebo nízké hladině Pi. Funkce genu *PHO2* může být částečně nahrazena zvýšením exprese genu *PHO4*. Celková délka proteinu je 559 aminokyselinových zbytků (Berben *et al.*, 1988). N–konec proteinu Pho2 (oblast 77.–136.) obsahuje homeodoménu (Berben *et al.*, 1988). Domény transkripčního faktoru jsou znázorněny na obrázku 5.



Obrázek 5: Domény transkripčního faktoru Pho2. Protein Pho2 obsahuje 4 domény: kyselá doména AD1 a AD2 (znázorněna tmavě zelenou barvou), homeodoména HOMEO (znázorněna růžovou), homologní doména (znázorněna fialovou) a transaktivační doména (znázorněna světle zelenou). Pho2 je posttranslačně modifikován fosforylací na SPIK místě (aminokyseliny 230–233). Kovalentně navázaná fosfátová skupina je zvýrazněna fialově. Sestaveno podle Liu *et al.* (2000) a Bhoite *et al.* (2002).

Homeodoména (HOMEO) je konzervativní sekvenčně specifický motiv, který se nachází v mnoha transkripčních regulačních proteinech. Homeodoména Pho2 je nezbytná pro kooperativní vazbu DNA (vazba s více vazebnými místy, která navzájem kooperují), ale není pro tuto vazbu dostačující (Berben *et al.*, 1988). Samotný Pho2 váže DNA *in vitro* s nízkou afinitou, ale *in vivo* aktivuje transkripci s alespoň třemi rozličnými DNA–vazebnými proteiny: proteinem Pho4 s motivem helix-loop-helix, proteinem Swi5 s motivem zinkového prstu a proteinem Bas1. Pho2 a Pho4 aktivují *PHO5* a *PHO84* a další geny PHO regulonu, Pho2 a Swi5 aktivují gen *HO* (zodpovědný za změnu párovacího typu), Pho2 a Bas1 aktivují geny biosyntetické dráhy purinu a histidinu (např. gen *ADE1*) (Bhoite *et al.*, 2002).

Justice *et al.* (1997) provedli mutační analýzu kódující sekvence *PHO2* v oblasti kódující homeobox. Potvrdili, že záměna klíčových aminokyselin R5 a R7 zprostředkujících kontakt domény s DNA snižuje expresi genu *PHO5*, ale neovlivňuje expresi genu *ADE1*, který je cílovým genem Pho2 a Bas1.

Protože Berben *et al.* (1988) zjistili, že C–konec proteinu, přesněji oblast proteinu Pho2 za nepolárními aminokyselinami v pozici 405.–407., nemá vliv na aktivaci *PHO5*, zaměřili se Bhoite *et al.* (2002) na centrální část proteinu Pho2 (oblast mezi 171. a 504. AK) s cílem objevit domény Pho2 nezbytné pro interakce s kooperujícími proteiny a pro aktivaci cílových genů. V oblasti 244.–270. identifikovali několik pozic, jejichž substituce výrazně snižuje stabilitu proteinu. Naopak oblast 347.–378. obsahovala 10 pozic, jejichž substituce měla výrazný negativní vliv na expresi *PHO5* i na cílové geny Swi5 a Bas1.

Funkce C–terminální domény, v oblasti 410.–599. AK, byla dlouho sporná. Přítomnost aktivační domény právě v C–terminální oblasti Pho2 prokázali Zhang *et al.* (1997) a podrobně popsali Hannum *et al.* (2002). C–terminální doména Pho2 se uplatňuje při interakci s Bas1 při aktivaci genů metabolismu purinů.

Trankripční faktor Pho2 je fosforylován kinázou Cdc28 v místě SPIK (aminokyseliny 230.–233.). Tato fosforylace usnadňuje interakci mezi Pho2 a Pho4 (Liu *et al.*, 2000). Mutace serinu 230 a prolinu

231 na alanin v místě SPIK protein Pho2 inaktivuje, vede k neschopnosti aktivovat transkripci genu *PHO5*. Substituce serinu 230 na fosfomimetickou kyselinu asparagovou aktivitu proteinu Pho2 neovlivní, a proto lze předpokládat, že transkripci genu *PHO5* může aktivovat pouze fosforylovaný protein Pho2 (Yang *et al.*, 1996).

Analýze struktury Pho2 se věnovala skupina badatelů z Číny kolem r. 1995, jejich četné publikace jsou však dostupné jen ve formě abstraktů, např. Yang, J., Wu, J.S., Ao, S.Z. (1995). Analysis of activation activity of yeast *PHO2*, *PHO4* protein and their interaction. Acta. Biochim. Biophys. Sin. 27, 165–172. Jediná dostupná práce této skupiny se věnuje fosforylaci Pho2 (Liu *et al.*, 2000).

3.5 Funkce inositolpyrofosfátů při detekci intracelulární hladiny fosfátu

Inositolpyrofosfáty jsou odvozené od myoinositolpolyfosfátů, které v buňkách plní různé signální funkce. Inositolpyrofosfáty (IP) obsahují navíc jeden anhydrid fosfátu a energeticky bohaté difosfátové vazby. Inositolpyrofosfáty fungují jako sekundární metabolity, mohou pyrofosforylovat proteiny neenzymatickou cestou a tím měnit jejich aktivitu (Bhandari *et al.*, 2007).

V kvasinkových buňkách byly nalezeny 4 inositolpyrofosfáty: 1-PP-IP₅ (izomer IP₇), 5-PP-IP₅ (izomer IP₇), 5-PP-IP₄ (izomer IP₆) a 1,5-(PP)₂-IP₄ (izomer IP₈) (znázorněné na obrázku 1) (Saiardi, 2000; Mulugu *et al.*, 2008; Gerasimaite *et al.*, 2017). Gerasimaite *et al.* (2017) při *in vitro* a *in vivo* studii vlivu různých typů IP na produkci polyP zjistili, že 5-PP-IP₅ je fyziologicky relevantním stimulantem komplexu VTC. 1-PP-IP₅ vazbou na Pho81 umožňuje inhibici kinázy Pho85 (Azevedo *et al.*, 2010).

Inositolpyrofosfáty (IP) jsou produkovány pomocí inositol-P₆ kináz Vip1 nebo Kcs1 (Nishizawa *et al.*, 2008). Oba proteiny katalyzují přidání beta-fosfátu k hexakisfosfátu IP₆, ale produktem reakce je jiný typ izomeru IP₇ (Lee *et al.*, 2007). Při nízké koncentraci intracelulárního fosfátu je aktivita Vip1 vyšší než aktivita Kcs1, jejich hladina je regulována transkripčním faktorem Pho4. Při vysoké hladině intracelulárního fosfátu je v buňkách více proteinu Kcs1 (Nishizawa *et al.*, 2008).

Protein Vip1 patří do vzácné třídy bifunkčních enzymů schopných syntetizovat a degradovat signalizační molekuly inositolpyrofosfáty za spotřeby ATP. Vip1 obsahuje dvě autonomní katalyticky aktivní domény, kinázovou doménu, na N-konci, a pyrofosfatázovou doménu, která na ni navazuje. Obě aktivity modulují hladiny inositolpyrofosfátů 1-IP₇ a 1,5-IP₈ (Dollins *et al.*, 2020).

Vip1 fosforyluje IP₆ svým aminokyselinovým zbytkem kyseliny asparagové (u *S. cerevisiae* D487). Kináza Vip1 má celkovou délku 1146 aminokyselinových zbytků. Vip1 fosforyluje IP₆ na 1-PP-IP₅ (1-IP₇) a 5-PP-IP₅ (5-IP₇) na 1,5-(PP)₂-IP₄ (1,5-IP₈) (znázorněno na obrázku 6) (Dollins *et al.*,

2020). Ve starších člancích, např. Lee *et al.* (2008), se uvádí, že Vip1 fosforyluje IP₆ na 4-PP-IP₅ (4-IP₇) nebo 6-PP-IP₅ (6-IP₇).

Za N–koncovou doménou Vip1 následuje HAP doména (oblast 377.–920.). HAP doména má 1-pyrofosfatázovou aktivitu, zajišťuje hydrolyzu 1-IP₇ na IP₆ a 1,5-IP₈ na 5-IP₇ (znázorněno na obrázku 6). Aktivita pyrofosfatázy závisí na konzervovaném histidinovém zbytku (H548 u *S. cerevisiae*). Expresi genu *VIP1* při nízké hladině Pi aktivuje transkripční faktor Pho4 (He *et al.*, 2017; Dollins *et al.*, 2020).

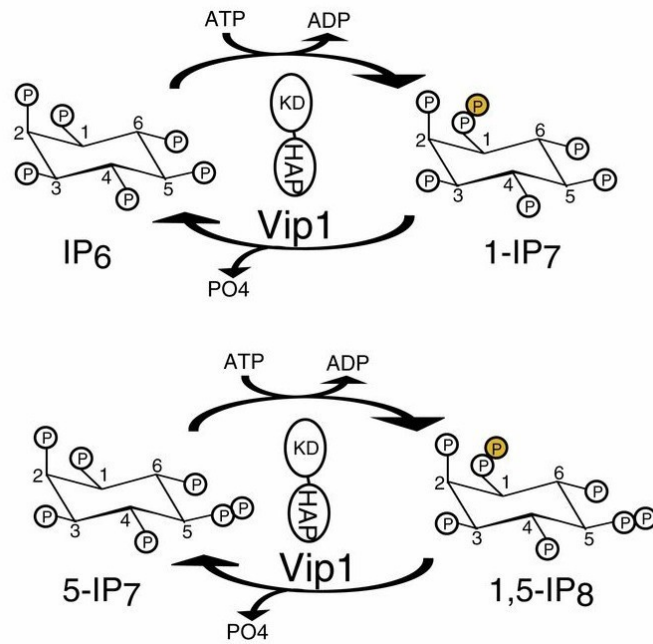
Při pH 5 má 3x vyšší účinnost 1-pyrofosfatáza než 1-kináza. Při pH 7 má 1-pyrofosfatáza dokonce 15x vyšší účinnost (Dollins *et al.*, 2020). Činnost kinázy a pyrofosfatázy reguluje homeostázi hladin 1-IP₇ a 1,5-IP₈ v buňce (Otto *et al.*, 2007) a také moduluje vakuolární morfologii (velikost vakuoly, polaritu a aktinový cytoskelet) (Feoktistova *et al.*, 1999; Mulugu *et al.*, 2008; Pöhlmann *et al.*, 2014).

Protein Kcs1 má 5-kinázovou aktivitu, Kcs1 fosforyluje IP₆ na 5-IP₇ a 1-IP₇ na 1,5-IP₈ (znázorněno na obrázku 7) (Dollins *et al.*, 2020). Hladina Kcs1 je závislá na transkripčním faktoru Pho4. Při vysoké hladině Pi se tvoří *KCSI* mRNA o velikosti 3200 bp, která kóduje funkční protein Kcs1. Při nízké dostupnosti Pi se Pho4 váže na kódující sekvenci genu *KCSI* a indukuje expresi zkrácené (sense) mRNA (2500 bp), jejíž translací vzniká nefunkční protein a také se snižuje hladina delší mRNA. Kromě toho vzniká 500 bp dlouhá antisense RNA. Obě RNA brání vzniku funkčního proteinu Kcs1 (Nishizawa *et al.*, 2008).

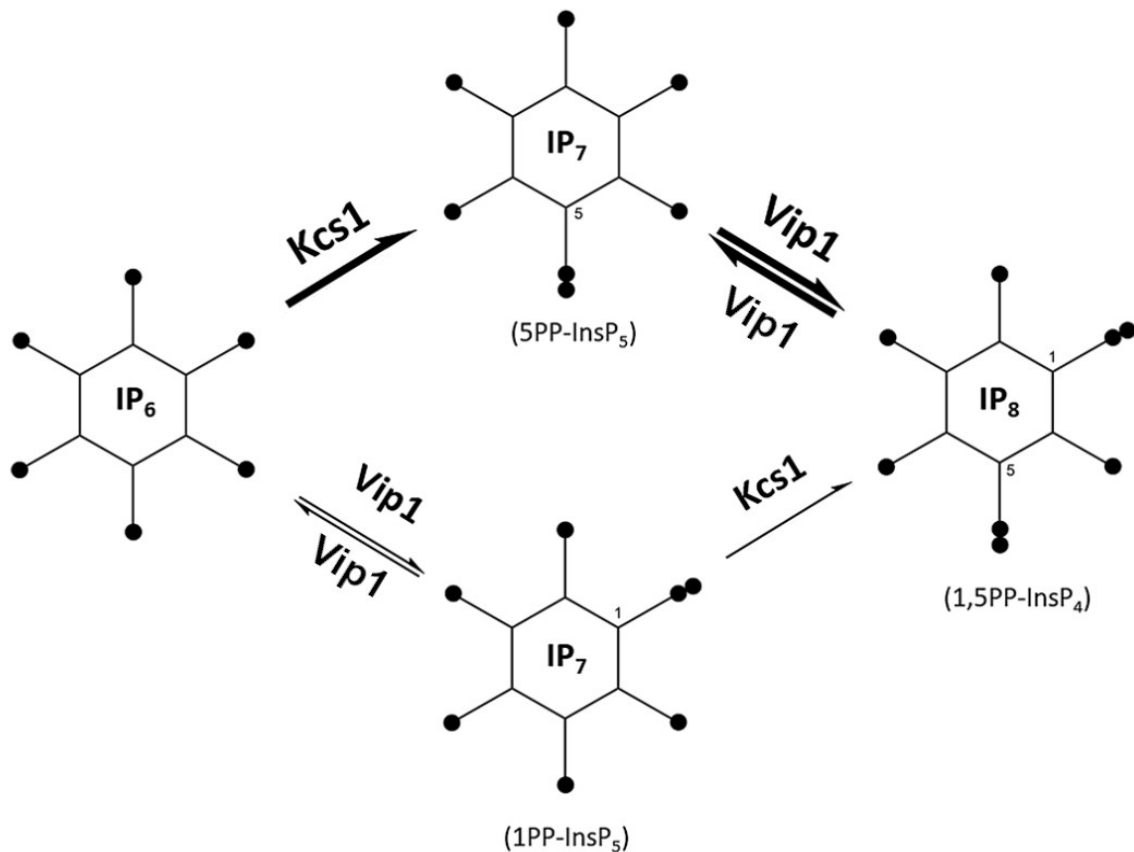
Expresе všech 4 podjednotek proteinkinázy A je zvýšená při dostatečném zásobení buňky fosfátem. Při delecі *KCSI* dochází k výraznému poklesu exprese *TPK1* (autoři předpokládají shodný výsledek i u ostatních podjednotek proteinkinázy). Kcs1 je tedy vedle Pho84 dalším proteinem, který má významný vliv na funkci PKA (Pautasso *et al.*, 2016).

Při nízké hladině fosfátu je zvýšená koncentrace inositolpyrofosfátu 1-IP₇ a snížená koncentrace inositolpyrofosfátu 5-IP₇ (Austin a Mayer, 2020).

Norman *et al.* (2018) prokázali, že regulace pseudohyfálního a filamentárního růstu je závislá na přítomnosti inositolpyrofosfátů a jejich vzájemném poměru. Zatímco delecі *VIP1* stimuluje pseudohyfální růst u haploidního kmene *S. cerevisiae* Δ1278b, delecі *KCSI* má opačný efekt. Při snížené dostupnosti zdroje dusíku, která přirozeně stimuluje pseudohyfální růst, se zvyšuje hladina produktu Kcs1, inositolpyrofosfátu 5-PP-IP₅. Jeho hladina je výrazně zvýšená u kmene s delecі *VIP1*. Pozitivní efekt na hladinu 5-PP-IP₅ i pseudohyfální růst má mutace v kinázové doméně Vip1. Filamentární růst je klíčový pro virulenci patogenní kvasinky *C. albicans*. Inhibicí Kcs1 nebo stimulací Vip1 by bylo možné snížit rozsah kvasinkové infekce.



Obrázek 6: Cyklus *Vip1* kinázy a pyrofosfatázy. *Vip1* fosforyluje IP_6 na 1-PP- IP_5 (1- IP_7) a 5-PP- IP_5 (5- IP_7) na 1,5-(PP) $_2$ - IP_4 (1,5- IP_8). *Vip1* hydrolyzuje 1- IP_7 na IP_6 a 1,5- IP_8 na 5- IP_7 (Dollins et al., 2020).



Obrázek 7: Cyklus kináz *Kcs1* a *Vip1*. *Kcs1* fosforyluje IP_6 na 5- IP_7 a 1- IP_7 na 1,5- IP_8 . Jak již bylo zmíněno, kináza *Vip1* fosforyluje IP_6 na 1-PP- IP_5 (1- IP_7) a 5-PP- IP_5 (5- IP_7) na 1,5-(PP) $_2$ - IP_4 (1,5- IP_8) a zajišťuje hydrolyzu 1- IP_7 na IP_6 a 1,5- IP_8 na 5- IP_7 . Upraveno podle Morrissette a Rolfes, (2020).

3.6 Proteiny s SPX doménami

Některé proteiny, které se podílejí na regulaci Pi homeostáze, obsahují v N-terminální oblasti (prvních 150–300 AA) SPX (Syg1/Pho81/*XPR1*) doménu (Secco *et al.*, 2012a). *XPR1* je exportér na plazmatické membráně podílející se na regulaci Pi v lidských buňkách (Giovannini *et al.*, 2013). Ačkoliv struktura SPX domény je variabilní, může být rozdělena do tří konzervovaných oblastí o délce 30–40 aminokyselinových zbytků (znázorněno na obrázku 8) (Secco *et al.*, 2012a). SPX doména interaguje s inositolpyrofosfáty (Austin a Mayer, 2020).

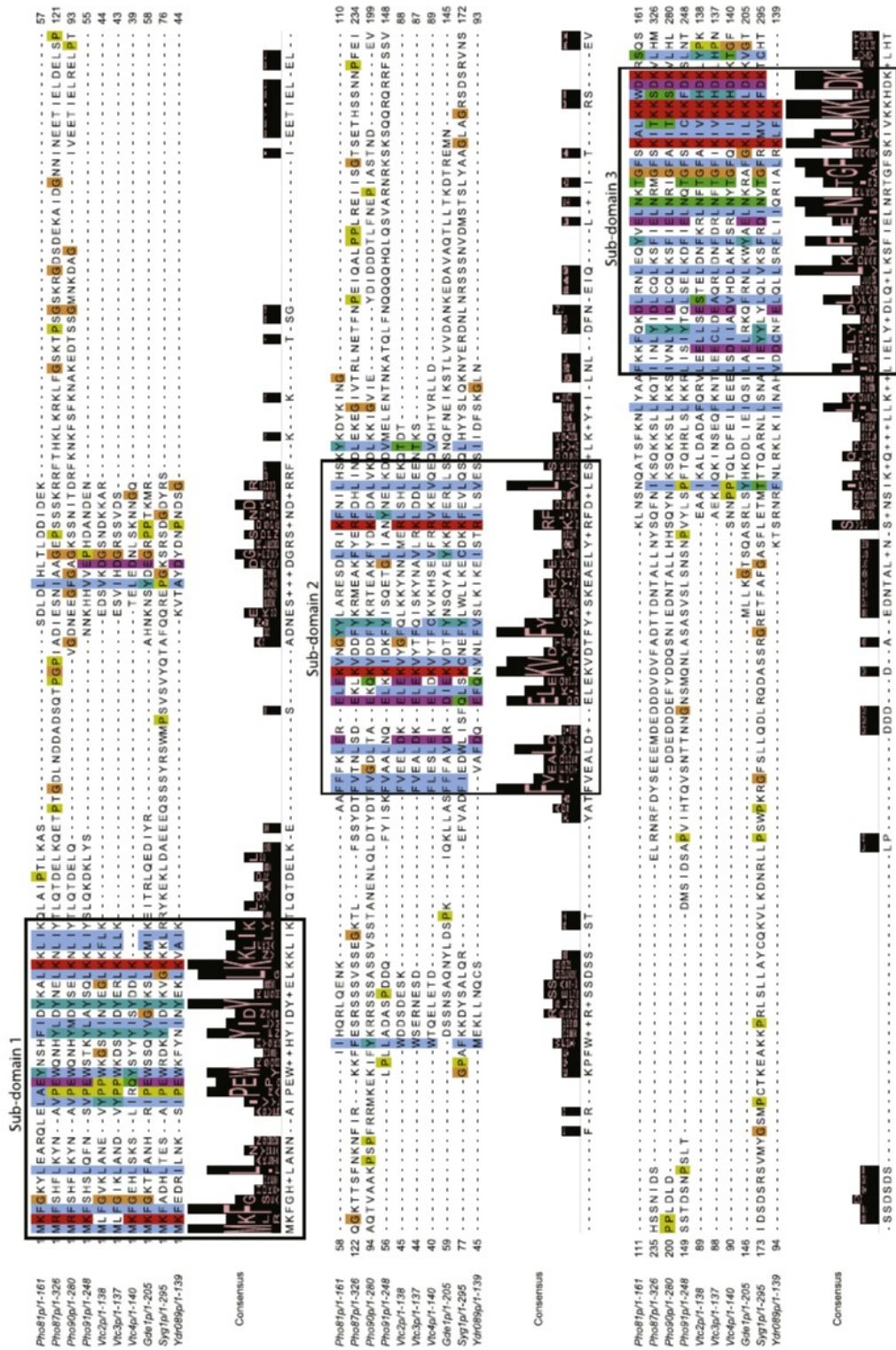
Proteiny s SPX doménou se vyskytují u kvasinek, rostlin a živočichů. Mezi proteiny s SPX doménou u kvasinek patří pozitivní regulační protein Pho81, nízkoafinitní transportéry Pho87, Pho90 a Pho91, proteiny VTC komplexu a Syg1, predikovaný fosfátový exportér na plazmatické membráně (tabulka 1). Všechny kvasinkové proteiny nesoucí SPX doménu se podílejí na udržení homeostáze Pi (Secco *et al.*, 2012a; Desfougères *et al.*, 2016).

Nízkoafinitní transportéry Pho87 a Pho90 jsou při nedostatku Pi ubiquitinovány pomocí Rpd3 a cíleny do vakuoly (Estrella *et al.*, 2008). Internalizace do vakuoly je u Pho87 zprostředkována proteinem Spl2, který se váže na SPX doménu lokalizovanou na N–konci proteinu. Hladina proteinu Spl2 je závislá na Pho4. Na rozdíl od Pho87, k endocytóze Pho90 dochází i u kmene s delecí *PHO4* nebo *SPL2*. Endocytózu obou proteinů zajišťuje protein End3, neboť u kmene s delecí *END3* translokace do vakuoly neprobíhá (Wykoff *et al.*, 2007; Ghillebert *et al.*, 2011). U kmene s delecí SPX domény v proteinu Pho90 byl zjištěn zvýšený příjem Pi a zvýšená syntéza zásobního polyfosfátu (Hürlimann *et al.*, 2009). SPX doména může být požadována také pro ubikvitinaci (Secco *et al.*, 2012a).

Protein Pho81 a VTC komplex budou podrobněji popsány v následujících kapitolách.

U rostlin nebyl žádný z proteinů s SPX doménou charakterizován jako Pi transportér, ale bylo dokázáno, že proteiny obsahující doménu SPX patří mezi hlavní regulátory homeostáze Pi a podílí se na signalizaci, remobilizaci a exportu Pi (Secco *et al.*, 2012a).

Proteiny SPX rodiny u rostlin mají vliv i na odolnost vůči chorobám, jsou důležité při nedostatku železa, při nedostatku kyslíku a v signálních drahách fytohormonů.



Obrázek 8: Doména SPX u kvasinek. SPX doména všech kvasinkových proteinů obsahujících tuto doménu byla identifikována a srovnána pomocí softwaru Conserved Domain Database a Jalview. Tři konzervované subdomény SPX jsou zvýrazněny černým rámečkem (Secco et al., 2012a).

3.6.1 Pho81

Gen *PHO81* kóduje inhibitor cyklin-dependentní kinázy (CDK), který reguluje dimer Pho80–Pho85 v reakci na hladinu fosfátu. Protein Pho81 patří mezi pozitivní regulační proteiny PHO regulonu, jeho exprese je závislá na transkripčních faktorech Pho2 a Pho4 (Creasy *et al.*, 1996). Aby mohlo dojít k Pho81 dependentní inhibici dimeru Pho80–Pho85, je potřeba inositolpyrofosfát IP_7 , který je syntetizován kinázou Vip1 (Lee *et al.*, 2007).

Gen *PHO81* kóduje protein s 1178 aminokyselinovými zbytky. SPX doména je v N–terminální části proteinu (oblast 1.–169. AK), centrální část obsahuje ankyrinovou doménu (423.–653. AK), s ní sousedí minimální regulační doména (645.–724. AK), následuje C–terminální doména s motivem GP–PDE (glycerofosfodiesterázová doména), (oblast 871.–1178.). U Pho81 není SPX doména vyžadována pro inhibici kinázové aktivity dimeru Pho80–Pho85 (Huang *et al.*, 2001; Lee *et al.*, 2008). N–terminální část proteinu (oblast mezi 4. a 158. AK, která se překrývá s 1. oblastí SPX domény) má autoinhibiční funkci. Mutace v této doméně způsobuje inhibici Pho85 i při vysoké hladině P_i v cytosolu (Secco *et al.*, 2012a).

Huang *et al.* (2001) popsali minimální doménu proteinu Pho81 (zahrnuje aminokyseliny 645.–724.), která interaguje s inositolpyrofosfátem IP_7 a zároveň s dimerem Pho80–Pho85. Protein Pho81 tvoří s dimerem Pho80–Pho85 stabilní komplex při dostatečné i velmi nízké koncentraci fosfátu v buňce. Pouze při nízké koncentraci fosfátu inhibuje aktivitu cyklin-dependentní kinázy Pho85 a tím umožní transkripčnímu faktoru Pho4 aktivovat transkripci genů PHO regulonu (Schneider *et al.*, 1994; Lee *et al.*, 2007).

Minimální doména je rozdělena na dvě funkční subdomény. První subdoména je vyžadována pro konstitutivní vazbu Pho81 s komplexem Pho80–Pho85. Druhá je zodpovědná za inhibici Pho80–Pho85 pouze v přítomnosti 1-PP- IP_5 (Lee *et al.*, 2008).

Ankyrinová doména proteinu Pho81 se skládá ze šesti tandemových repetič, které jsou homologní k rodině inhibitorů cyklin-dependentních kináz INK4. Do této rodiny patří savčí CDK inhibitor p16. Navzdory předpokladům se tato doména neúčastní interakce s Pho80-Pho85 (Huang *et al.*, 2001). Protein Pho81 se váže pouze na cyklin Pho80 komplexu Pho80–Pho85, zatímco p16 se váže přímo na CDK (Hirst *et al.*, 1994; Huang *et al.*, 2001). Interakce mezi Pho81 a Pho80–Pho85 je stabilizována fosforylací Pho81 kinázou Pho85 (Knight *et al.*, 2004).

Protein Pho81 je konstitutivně lokalizován v jádře nezávisle na hladinách P_i (Ogawa *et al.*, 2000), a proto lze předpokládat, že aktivita Pho81 není kontrolována regulací jeho lokalizace. Huang *et al.* (2001) zjistili, že Pho80 zajišťuje lokalizaci Pho81 v jádře.

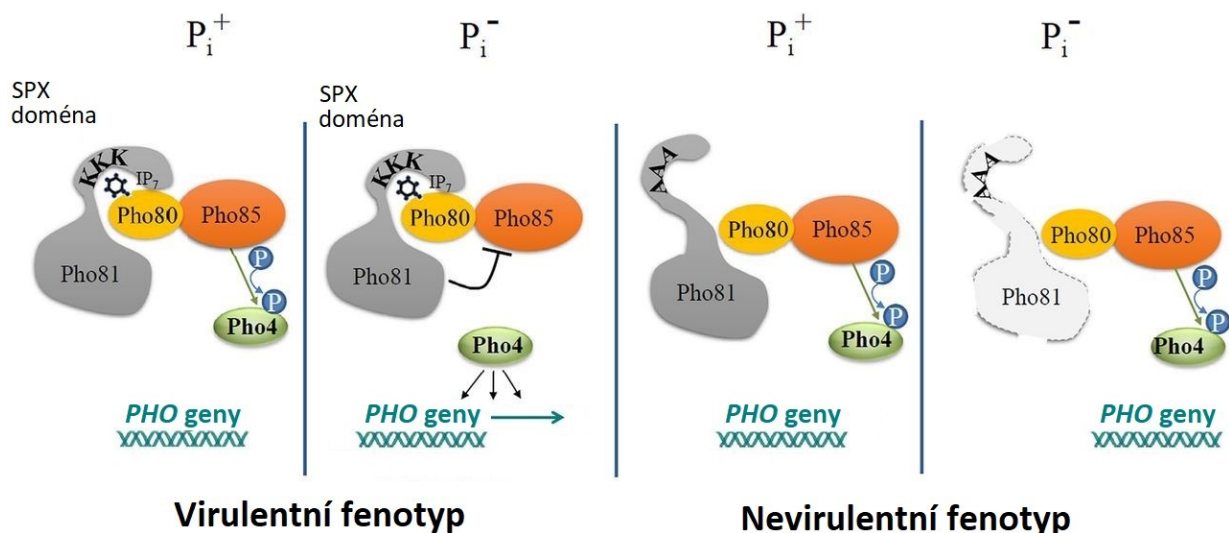
Pokud je narušena interakce mezi Pho81 a Pho80, neprojeví se při nízké koncentraci Pi inhibiční efekt Pho81 na aktivitu cyklin-dependentní kinázy Pho85 a sníží se exprese cílových genů Pho4 (Huang *et al.*, 2001; Huang *et al.*, 2007).

Lee *et al.* (2007) prokázali, že na rozdíl od Kcs1 je IP₆ kináza Vip1 zodpovědná za syntézu izomeru IP₇: 4-PP-IP₅ a 6-PP-IP₅, který je schopen indukovat inhibici Pho85. Později byl typ izomeru 4-PP-IP₅ a 6-PP-IP₅ upřesněn jako 1-PP-IP₇ (Dollins *et al.*, 2020). Koncentrace tohoto izomeru narůstá při nedostatku Pi. Lee *et al.* (2008) zjistili, že vazba daného izomeru IP₇ na Pho81 při nízké intracelulární koncentraci Pi zesílí asociaci Pho81 s Pho80 a zabrání interakci Pho4 s Pho85, čímž dochází k derepresi PHO regulonu.

V patogenní kvasince *Cryptococcus neoformans* je signální dráha inositolpolyfosfátů zásadní pro virulenci. Inositolpyrofosfát 5-PP-IP₅ (5-IP₇) syntetizovaný proteinem Kcs1 je jediným inositolpyrofosfátem požadovaným pro aktivaci dráhy PHO u *C. neoformans*, na rozdíl od *S. cerevisiae*, kde má opačnou funkci. Inositolpyrofosfát 5-IP₇ se váže na konzervovanou sekvenci lysinů v SPX doméně pozitivního regulačního proteinu Pho81 a stabilizuje asociaci proteinu Pho81 s dimerem Pho80–Pho85, čímž podporuje aktivaci dráhy PHO (znázorněno na obrázku 9). U *C. neoformans* interaguje inositolpyrofosfát přímo s SPX doménou na rozdíl od kvasinky *S. cerevisiae*. Způsob interakce mezi inositolpyrofosfátem Pho81 a Pho80 se u těchto dvou druhů liší (Desmarini *et al.*, 2020).

Při substituci konzervovaných lysinů alaninem se nezměnila sekundární ani terciární struktura domén SPX, ale 5-IP₇ se nemohl vázat (Wild *et al.*, 2016).

Blokování interakce 5-IP₇-Pho81 pomocí místně specifické cílené mutagenese vedlo k tomu, že mutovaný kmen ztratil virulentní fenotyp. Efekt substituce se shodoval s delecí genu *PHO81*, což ukazuje, že Pho81 má klíčový význam při kvasinkové virulenci. Je prokázáno, že blokování interakce 5-IP₇ s proteinem Pho81 nebo prevence produkce proteinu Pho81 vede k dramatické ztrátě houbové virulence. Vzhledem k tomu, že Pho81 nemá v buňkách savců homologa, je možné cílit navrhované fungicidy právě na protein Pho81 (Desmarini *et al.*, 2020).



Obrázek 9: Model znázorňující roli 5-IP₇ ve stabilizaci dimeru Pho80-Pho85 a v aktivaci dráhy PHO u *C. neoformans*. Vazba 5-IP₇ na SPX doménu proteinu Pho81 u *C. neoformans* podporuje asociaci proteinu Pho81 s dimerem Pho80–Pho85. 5-IP₇, který je záporně nabitý, tvoří elektrostatické interakce s klastru lysinu na povrchu SPX domény proteinu Pho81 a s neidentifikovanými zásaditými AK v molekule cyklinu Pho80. Při nedostatku fosfátu je hladina 5-IP₇ vyšší, protein Pho81 vázaný s 5-IP₇ inhibuje dimer Pho80-Pho85, což brání fosforylaci transkripčního faktoru Pho4 a spouští aktivaci dráhy PHO, která má příznivý vliv pro rozvoj patogenního fenotypu. Není-li 5-IP₇ vázán na Pho81 (pravá část obrázku), oslabuje to interakci Pho81 s Pho80 a cyklin dependentní kináza Pho85 zůstává aktivní. Upraveno podle Desmarini *et al.* (2020).

Při nízké dostupnosti Pi je protein Pho81 rovněž nezbytný pro aktivaci exprese genů stresové odpovědi, obsahující v promotorech vazebné místo PDS, a genů pro akumulaci trehalózy. Aktivace těchto genů je závislá na transkripčním faktoru Gis1 a umožňuje přechod do stacionární fáze. Swinnen *et al.* (2005) zjistili, že na rozdíl od aktivace PHO regulonu je aktivace těchto genů, zprostředkovaná inaktivací Pho80–Pho85, závislá na Pho81 v jeho plné délce.

3.6.2 VTC komplex

VTC komplex (vacuolar transporter chaperone) tvoří 5 proteinů (Vtc1–5), které jsou lokalizovány na vakuolární membráně a pravděpodobně i na periférii endoplazmatického retikula (ER) (Müller *et al.*, 2003; Uttenweiler *et al.*, 2007; Desfougères *et al.*, 2016). Proteiny Vtc2, Vtc3 a Vtc4 a Vtc5 mají N-koncovou SPX doménu (Desfougères *et al.*, 2016) Zatím je prokázáno, že SPX doména u Vtc4 není vyžadována pro katalytickou aktivitu (Hothorn *et al.*, 2009). V kvasinkových buňkách komplex VTC syntetizuje anorganický polyfosfát (polyP) z ATP a translokuje vznikající řetězec polyP do lumen. Exprese genů VTC komplexu je pozitivně regulována Pho4 proteinem (Hothorn *et al.*, 2009; Gerasimaite *et al.*, 2014).

Anorganický polyfosfát je polymer desítek až stovek ortofosfátů spojených energeticky bohatými anhydridfosforečnými vazbami (Langen *et al.*, 1958). Polyfosfáty jsou většinou umístěny ve vakuole

(Saito *et al.*, 2005). Malé množství polyP je také v mitochondriích, ER nebo v periplazmatickém prostoru (Pestov *et al.*, 2004). Polyfosfát je nezbytný pro mnoho fyziologických funkcí v živých organismech, důležitý je například pro buněčný cyklus, protože zajišťuje rychle dostupný fosfát pro replikaci (Bru *et al.*, 2016). Přítomnost polyfosfátu je také důležitá pro udržení aminokyselin ve vakuole (Austin a Mayer, 2020). Hladina polyP se dynamicky mění podle změn hladiny cytosolického Pi a má velký vliv na homeostázi cytosolického Pi (Neef a Kládde, 2003; Desfougères *et al.*, 2016). Syntéza polyP je aktivována v korelaci s dostupností Pi pomocí inositolpyrofosfátu 5-PP-IP₅, který aktivuje Vtc proteiny vazbou na jejich SPX doménu. Akumulace polyP probíhá při 0,5 mM Pi a vyšší, v přítomnosti 5-PP-IP₅ je zvýšena více než padesátkrát (Wild *et al.*, 2016; Gerasimaite *et al.*, 2017).

Produkce polyfosfátu výrazně narůstá při vzrůstající koncentraci fosfátu. Syntéza polyfosfátu běží i při relativně nízké koncentraci 10⁻³ M Pi (Shears, 2015). Syntéza a translokace polyP je řízena elektrochemickým gradientem tvořeným V-ATPázou na vakuolární membráně (Gerasimaite *et al.*, 2014). Narušení tohoto gradientu, například přidáním inhibitoru konkanamycinu A (ConA) do buněk s nízkým obsahem Pi, syntézu polyP zastaví za méně než 15 minut (Desfougères *et al.*, 2016). Inhibice syntézy polyfosfátů zvyšuje intracelulární koncentraci Pi a vede k fosforylaci Pho4 a translokaci do cytoplazmy. U buněk s delecí *VTC4* neprobíhá syntéza polyfosfátů, a proto při aplikaci konkanamycinu k fosforylaci Pho4 nedochází (Gerasimaite *et al.*, 2014).

Podjednotka VTC komplexu Vtc4 má katalytickou aktivitu, Vtc2 a Vtc3 jsou podjednotky s regulační funkcí (Werner *et al.*, 2007). VTC komplex existuje ve dvou izoformách složených buď z Vtc4/Vtc3/Vtc1/Vtc5, nebo z Vtc4/Vtc2/Vtc1/Vtc5 (Hothorn *et al.*, 2009). Isoforma Vtc5/Vtc4/Vtc3/Vtc1 se vyskytuje více na vakuolární membráně a izoforma Vtc5/Vtc4/Vtc2/Vtc1 se vyskytuje více na periférii ER. Vtc5 se vyskytuje pouze na vakuolární membráně (Uttenweiler *et al.*, 2007).

Vtc5 pravděpodobně zvyšuje účinnost směrování proteinů VTC komplexu do vakuoly, při delecí *VTC5* je hladina proteinů komplexu ve vakuolární membráně snižena (Desfougères *et al.*, 2016).

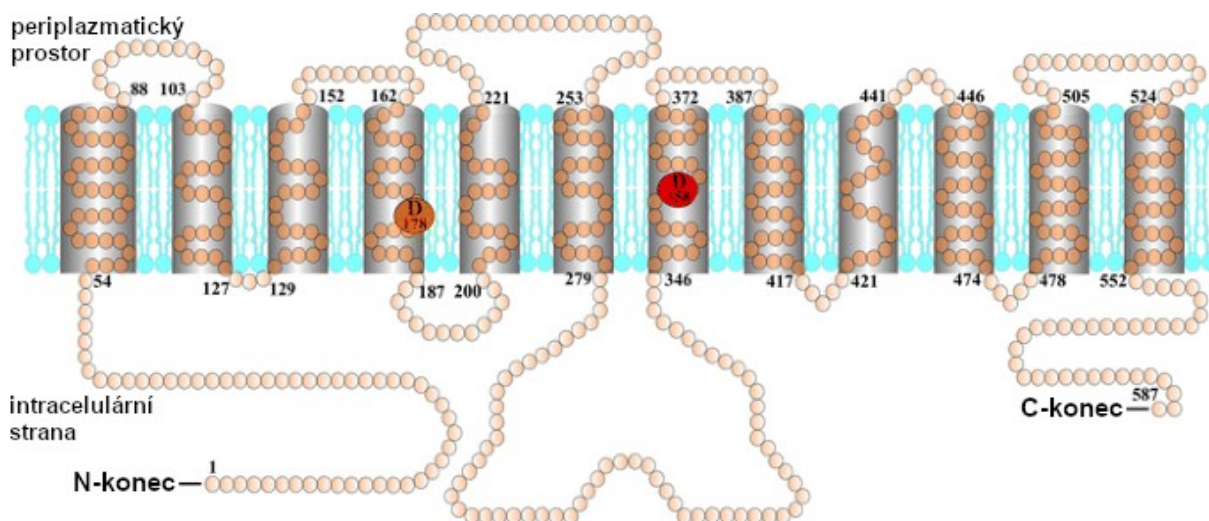
Produkce polyP pozitivně koreluje s hladinou Vtc5, při delecí *VTC5* klesá produkce polyP na 20 % oproti produkci kmene s funkčním *VTC5*. Delece *VTC5* redukuje akumulaci polyP *in vivo* i *in vitro*, ale nenaruší stimulaci syntézy polyP pomocí 5-IP₇ (Desfougères *et al.*, 2016). Nadměrná exprese *VTC5* nejen zvyšuje produkci polyP, ale má výrazný pozitivní vliv na expresi *PHO5* a *PHO84*, dokonce i v podmínkách s optimální dostupností Pi. Podle Desfougères *et al.* (2016) hraje intenzita produkce polyfosfátu klíčovou úlohu v regulaci PHO regulonu. Regulací syntézy a degradace polyP buňka vyrovnává přechodné výkyvy hladin cytosolického Pi.

Shrnutím na základě citovaných citací v kapitole 3.6.2 je, že snižování hladiny 5-IP₇ u *S. cerevisiae* pomocí transkripčního faktoru Pho4 prostřednictvím redukce exprese proteinu Kcs1 způsobuje nízkou aktivitu Vtc proteinů. Při zvýšení hladiny intracelulárního fosfátu se sníží hladina antisense RNA

a zvýší se hladina funkční kinázy Kcs1 a také aktivita Vtc proteinů. Hladina fosfátu v cytosolu opět klesne.

4. Vysokoafinitní transportér a senzor fosfátu, Pho84

Gen *PHO84* kóduje vysokoafinitní H⁺/Pi symportér Pho84 kvasinky *S. cerevisiae* (Bun-Ya *et al.*, 1991). Tento hydrofobní integrální membránový protein se skládá z 587 aminokyselinových zbytků a katalyzuje symport fosfátu a H⁺ přes plasmatickou membránu kvasinek. Převádí energii elektrochemického gradientu na energii pro translokaci fosfátu do buňky (Persson *et al.*, 1999). Sekundární strukturu tvoří 12 transmembránových (TM) domén spojených hydrofilními smyčkami a prodloužené N- a C-konce (Kruckeberg *et al.*, 1996; Boles a Hollenberg, 1997). Transportér Pho84 má významný počet konzervovaných zbytků mezi oběma polovinami transportéru (Persson *et al.*, 1999). Obě poloviny jsou oddělené velkou hydrofilní smyčkou, a proto lze předpokládat, že protein vznikl duplikací ancestrálního genu. Hydrofilní smyčka má 75 aminokyselin (Berhe *et al.*, 1995; Fristedt *et al.*, 1999). Pho84 obsahuje 12 nativních cysteinových zbytků. Pět z nich (III, VI, VIII, IX a X) se nachází v TM oblastech a zbývajících sedm v hydrofilních doménách proteinu. Substituce cysteinů serinem neovlivňuje aktivitu Pho84 (Berhe *et al.*, 2001). Model fosfátového transceptoru Pho84 je znázorněn na obrázku 10.



Obrázek 10: Model fosfátového transceptoru Pho84. Protein Pho84 má 12 transmembránových domén a funguje jako H⁺/Pi symportér. Na obrázku jsou oranžově a červeně znázorněny dva konzervované zbytky kyseliny asparagové D178 a D358, které vážou protony a umožňují oddělení transportu a signalizace (Schothorst *et al.*, 2013).

Při nedostatku fosfátu u *S. cerevisiae* je jeho vychytávání zprostředkováno převážně proteinem Pho84. Pho84 je kromě schopnosti translokovat fosfát zároveň senzorem hladiny zdroje fosfátu

ve vnějším okolí buňky. Je proto označován jako transceptor (Giots *et al.*, 2003). Transceptory jsou membránové proteiny, které se podílejí na transportu iontů a jiných molekul a zároveň se chovají jako receptorové proteiny (Huang *et al.*, 2004). Signál o hladině Pi ve vnějším okolí přenáší na proteinkinázu A (PKA), kterou aktivuje. Zvýšení intracelulární hladiny Pi u buněk trpících nedostatkem Pi, avšak dostatečně zásobených jinými zdroji, především glukózou, vede k aktivaci PKA. Změny v aktivitě PKA lze sledovat měřením aktivity trehalázy, která je zvýšena řádově v minutách po přidání nízké koncentrace Pi k dlouhodobě hladovějícím buňkám. Zároveň dochází ke snížení hladiny stresových mRNA (STRE-controlled genes *SSA3*, *CTT1* a *HSP12*). Kmeny s delecí *PHO84* nejsou schopné aktivovat PKA při zvýšení hladiny Pi v prostředí. K aktivaci trehalázy nedochází ani u kmenů bez katalytické aktivity PKA (Giots *et al.*, 2003).

Popova *et al.* (2010) prokázali, že fosfoestery (např. glycerol-3P, Gly3P), které nemohou být pomocí Pho84 transportovány, fungují jako signál pro aktivaci PKA s podobnou intenzitou jako anorganický Pi. Experiment zopakovali i v nepřítomnosti fosfatáz, které by mohly fosfát z esteru odštěpit. Kmeny s delecí *PHO84* nebyly schopné aktivovat PKA v přítomnosti Gly3P, naopak exprese *PHO84* z plazmidu indukovala nadměrnou aktivaci PKA. Schopnost Gly3P (stejně jako Pi) indukovat aktivaci PKA vyžaduje funkční katalytickou aktivitu (Tpk2), kromě aktivace trehalázy byla potvrzena i mikroarrayovou analýzou. Popova *et al.* (2010) zároveň našli v proteinu Pho84 klíčové aminokyselinové zbytky ve vazebné doméně pro fosfát, jejichž modifikace eliminovala i senzorkou funkci Pho84 (Phe160 v transmembránové doméně 4 a Val v transmembránové doméně 8) (Popova *et al.*, 2010).

Relativně brzy po aktivaci PKA dochází k internalizaci a degradaci Pho84 ve vakuole (Pratt *et al.*, 2004; Mouillon a Persson, 2005). Před endocytózou do vakuoly prochází Pho84 fosforylací a ubiquitinací ve velké hydrofilní smyčce spojující TM6 a TM7 (Lundh *et al.*, 2009; Peng *et al.*, 2003). Fosforylace a ubiquitinace Pho84 je pozorována 5 minut po přidání Pi (Mouillon a Persson, 2005). Připojení ubiquitinu závisí na ubiquitinačních konjugáčnících enzymech Ubc2 a Ubc4. Snížená aktivita PKA zpožďuje internalizaci proteinu Pho84 indukovanou zvýšenou koncentrací fosfátu (Lundh *et al.*, 2009). Lundh *et al.* (2009) navíc zjistili, že ubiquitin ligázy Ubc1 a Ubc7 usnadňují cílení Pho84 na membránu. V nepřítomnosti Ubc1 a Ubc7 zůstává Pho84 ve váčcích.

Samyn *et al.* (2012) provedli mutagenézi konzervativních pozic ve Pho84 a získali kmeny, u nichž je významně narušen transport Pi a tím i růst v podmínkách s nízkou koncentrací Pi, přesto zůstala zachována schopnost Pho84 aktivovat PKA. Největší negativní vliv na transportní aktivitu Pho84 měla mutace D358N. Při expresi této mutované varianty nedocházelo k represí *PHO5* ani při vysoké koncentraci Pi. Aktivaci PKA a následnou degradaci Pho84 vyvolává i analog fosfátu, methylfosfonát, degradaci lze zabránit aplikací inhibitoru PKA, H89 (Pratt *et al.*, 2004).

Transkripce genu *PHO84* je závislá na transkripčním faktoru Pho4 (Wykoff *et al.*, 2007). Pho84 slouží jako prvek negativní zpětné vazby PHO regulonu. Transport Pi do buňky vede ke zvýšení hladiny

ny fosfátu v buňce, inaktivaci Pho4 a ke snížení exprese *PHO84* (Lundh *et al.*, 2009). Regulátor nízkofinitních transportérů Spl2, kódovaný dalším cílovým genem proteinu Pho4, zprostředkuje degradaci nízkofinitních transportérů Pho87 a Pho90 a tím zajišťuje pozitivní zpětnou vazbu PHO regulonu. Degradace nízkofinitních transportérů snižuje hladinu intracelulárního fosfátu, a to vede k další aktivaci Pho4 (Wykoff *et al.*, 2007). Interakce Spl2 s nízkofinitními transportéry je podrobněji popsána v kapitole 3.6.

Represe *PHO84* při optimální dostupnosti Pi je zprostředkována dvěma antisense RNA odlišné délky, jejichž transkripce udržuje promotor *PHO84* v neaktivním stavu (Camblong *et al.*, 2007). Podrobněji interakci antisense RNA s promotorem *PHO84* studovali Castelnuovo *et al.* (2013). Zjistili, že hladina antisense RNA je velmi nízká, často 1 molekula na buňku. Interakce je závislá na 3'–5' exonukleáze Rrp6, která je součástí jaderného exozomu. Delece *RRP6* zvyšuje stabilitu antisense RNA a zvyšuje přítomnost histondeacetylázového komplexu v okolí promotoru *PHO84*. Pomocí „single molecule fluorescent *in situ* hybridization“ (smFISH) prokázali, že transkripce antisense RNA eliminuje možnost iniciace transkripce sense RNA. Navíc zjistili, že Rrp6 stimuluje terminaci elongace antisense RNA, která je po dokončení transkripce transportována do cytoplazmy.

5. Závěr

Homeostáze fosfátu je pro buňku velmi důležitá, protože ovlivňuje regulaci metabolismu buňky a buněčný cyklus. Aktivita proteinů, které se podílejí na homeostázi fosfátu, je řízena především transkripčním faktorem Pho4.

Transkripční faktor Pho4 reguluje přibližně 20 genů zapojených do metabolismu fosfátu. Mezi tyto geny patří např. vysokoafinitní transportéry Pho84 a Pho89, kyselé fosfatázy nebo geny pro syntézu vakuolárního polyfosfátu (*VTC1* až *VTC5*).

Při vysoké koncentraci fosfátu je transkripční faktor Pho4 inhibován komplexem Pho80–Pho85. Fosforylace proteinu Pho4 na specifických serin-prolinových zbytcích stimuluje export proteinu z jádra. Při nízké koncentraci fosfátu pozitivní regulační protein Pho81 inhibuje aktivitu kinázy Pho85. Nefosforylovaný Pho4 se v cytoplazmě naváže na jaderný importní receptor a po translokaci do jádra indukuje expresi cílových genů. Stimulace cílových genů je podporována transkripčním faktorem Pho2. Exprese genu *PHO4* je regulována na posttranskripční úrovni RNA vazebným proteinem Pho92, který se váže na 3'UTR a zprostředkuje degradaci mRNA genu *PHO4* pomocí deadenylačního komplexu Pop2–Ccr4–Not.

Příjem fosfátu zajišťují především vysokoafinitní a nízkoafinitní transportéry, jejichž aktivita je závislá na intracelulární hladině fosfátu. Teprve nedávno bylo zjištěno, že hladina fosfátu v cytosolu ovlivňuje hladinu různých izomerů inositolpyrofosfátů, především 1-PP-IP₅ a 5-PP-IP₅. Inositolpyrofosfáty jsou důležité signalizační molekuly, které reagují s SPX doménami proteinů PHO dráhy a mění jejich aktivitu.

Transkripční faktor Pho4 se podílí na regulaci hladiny difosfoinositolpentakisfosfátkinázy Vip1 a inositolhexakisfosfátkinázy Kcs1, které zajišťují biosyntézu inositolpyrofosfátů. Při nízké koncentraci intracelulárního fosfátu je aktivita Vip1 vyšší než aktivita Kcs1. Při nízké koncentraci fosfátu je pomocí Vip1 produkován především inositolpyrofosfát 1-PP-IP₅, který se váže na Pho81 a umožňuje inhibici Pho85. Při vysoké hladině intracelulárního fosfátu Kcs1 i Vip1 syntetizují 5-PP-IP₅, který zvyšuje aktivitu proteinů VTC komplexu. Produkci polyfosfátu se snižuje koncentrace Pi v cytosolu, čímž se dosáhne optimální koncentrace.

Signál o hladině fosfátu ve vnějším okolí přenáší vysokoafinitní transportér a zároveň tranceptor Pho84, který při dobré dostupnosti Pi aktivuje proteinkinázu A (PKA). Aktivace PKA vede ke zvýšené degradaci Pho84 ve vakuole.

Regulace metabolismu fosfátu zahrnuje několik pozitivních a negativních zpětných smyček. Při mírném nedostatku fosfátu je pomocí Pho4 transkribován gen *PHO84*, geny pro vakuolární transportní komplex, gen *SPL2*, který deaktivuje nízkoafinitní transportéry, a gen *PHO81* kódující pozitivní regulační protein Pho81. Exprese těchto genů zvyšuje absorpci fosfátu a jeho skladování a současně,

expresí *PHO81*, *SPL2* i genů VTC komplexu vytváří pozitivní zpětnovazebnou smyčku, která stabilizuje indukci genové exprese závislé na Pho4. Příkladem negativní zpětné vazby PHO regulonu je transkripce genu *PHO84*.

Mechanismus regulace fosfátu se u různých druhů kvasinek částečně liší. Podrobnější znalosti o mechanismu regulace fosfátu mohou vést k vývoji nových terapeutik v léčbě kvasinkových onemocnění.

6. Přehled použité literatury

- Almer, A., Rudolph, H., Hinnen, A., a Hörz, W. (1986). Removal of positioned nucleosomes from the yeast *PHO5* promoter upon *PHO5* induction releases additional upstream activating DNA elements. *EMBO J.* 5, 2689–2696.
- * Austin, S., a Mayer, A. (2020). Phosphate homeostasis – A vital metabolic equilibrium maintained through the INPHORS signaling pathway. *Front. Microbiol.* 11, 1–21.
- Barbaric, S., Münsterkötter, M., Goding, C., a Hörz, W. (1998). Cooperative Pho2-Pho4 interactions at the *PHO5* promoter are critical for binding of Pho4 to UASp1 and for efficient transactivation by Pho4 at UASp2. *Mol. Cell. Biol.* 18, 2629–2639.
- Berben, G., Legrain, M., a Hilger, F. (1988). Studies on the structure, expression and function of the yeast regulatory gene *PHO2*. *Gene* 66, 307–312.
- Berben, G., Legrain, M., Gilliquet, V., a Hilger, F. (1990). The yeast regulatory gene *PHO4* encodes a helix-loop-helix motif. *Yeast* 6, 451–454.
- Berhe, A., Fristedt, U., a Persson, B.L. (1995). Expression and purification of the high-affinity phosphate transporter of *Saccharomyces cerevisiae*. *Eur. J. Biochem.* 227, 566–572.
- Berhe, A., Zvyagilskaya, R., Lagerstedt, J.O., Pratt, J.R., a Persson, B.L. (2001). Properties of the cysteine-less Pho84 phosphate transporter of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 287, 837–842.
- Bhandari, R., Saiardi, A., Ahmadibeni, Y., Snowman, A.M., Resnick, A.C., Kristiansen, T.Z., Molina, H., Pandey, A., Werner, J.K.Jr., Juluri, K.R., Xu, Y., Prestwich, G.D., Parang, K., Snyder, S.H. (2007). Protein pyrophosphorylation by inositol pyrophosphates is a posttranslational event. *Rashna. Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 15305–15310.
- Bhoite, L.T., Allen, J.M., Garcia, E., Thomas, L.R., David Gregory, I., Voth, W.P., Whelihan, K., Rolfes, R.J., a Stillman, D.J. (2002). Mutations in the Pho2 (Bas2) transcription factor that differentially affect activation with its partner proteins Bas1, Pho4, and Swi5. *J. Biol. Chem.* 277, 37612–37618.
- Boeger, H., Griesenbeck, J., a Kornberg, R.D. (2008). Nucleosome retention and the stochastic nature of promoter chromatin remodeling for transcription. *Cell* 133, 716–726.
- * Boles, E., a Hollenberg, C.P. (1997). The molecular genetics of hexose transport in yeasts. *FEMS Microbiol. Rev.* 21, 85–111.
- Bru, S., Martínez-Lainez, J.M., Hernández-Ortega, S., Quandt, E., Torres-Torronteras, J., Martí, R., Canadell, D., Ariño, J., Sharma, S., Jiménez, J., Clotet, J. (2016). Polyphosphate is involved in cell cycle progression and genomic stability in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Microbiol.* 101, 367–380.
- Bun-Ya, M., Nishimura, M., Harashima, S., a Oshima, Y. (1991). The *PHO84* gene of *Saccharomyces cerevisiae* encodes an inorganic phosphate transporter. *Mol. Cell. Biol.* 11, 3229–3238.

- Camblong, J., Iglesias, N., Fickentscher, C., Dieppois, G., Stutz, F. (2007). Antisense RNA stabilization induces transcriptional gene silencing via histone deacetylation in *S. cerevisiae*. *Cell* *131*, 706–717.
- * Carroll, A.S., O'Shea, E.K. (2002). Pho85 and signaling environmental conditions. *27*, 87–93.
- Castelnuovo, M., Rahman, S., Guffanti, E., Infantino, V., Stutz, F., Zenklusen, D. (2013). Bimodal expression of *PHO84* is modulated by early termination of antisense transcription. *Nat. Struct. Mol. Biol.* *20*, 851–858.
- Creasy, C.L., Shao, D., a Begman, L.W. (1996). Negative transcriptional regulation of *PHO81* expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene* *168*, 23–29.
- Desfougères, Y., Gerasimaite, R., Jessen, H.J., a Mayer, A. (2016). Vtc5, a novel subunit of the vacuolar transporter chaperone complex, regulates polyphosphate synthesis and phosphate homeostasis in yeast. *J. Biol. Chem.* *291*, 22262–22275.
- Desmarini, D., Lev, S., Furkert, D., Crossett, B., Saiardi, A., Kaufman-Francis, K., Li, C., Sorrell, T.C., Wilkinson-White, L., Matthews, J., Fiedler, D., Djordjevic, J.T. (2020). IP₇-SPX domain interaction controls fungal virulence by stabilizing phosphate signaling machinery. *mBio* *11*, 1–20.
- Dollins, D., Bai, W., Fridy, P.C., Otto, J.C., Neubauer, J.L., Gattis, S.G., Mehta, K.P.M., a York, J.D. (2020). Vip1 is a kinase and pyrophosphatase switch that regulates inositol diphosphate signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *117*, 9356–9364.
- Estrella, L.A., Krishnamurthy, S., Timme, C.R., a Hampsey, M. (2008). The Rsp5 E3 ligase mediates turnover of low affinity phosphate transporters in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* *283*, 5327–5334.
- Feoktistova, A., Mccollum, D., Ohi, R., a Gould, K.L. (1999). Identification and characterization of *Schizosaccharomyces pombe* asp1(+), a gene that interacts with mutations in the Arp2/3 complex and actin. *Genet. Soc. Am.* *152*, 895–908.
- Fernández-Murray, J.P., a McMaster, C.R. (2005). Glycerophosphocholine catabolism as a new route for choline formation for phosphatidylcholine synthesis by the Kennedy pathway. *J. Biol. Chem.* *280*, 38290–38296.
- Fleischer, T.C., Weaver, C.M., McAfee, K.J., Jennings, J.L., a Link, A.J. (2006). Systematic identification and functional screens of uncharacterized proteins associated with eukaryotic ribosomal complexes. *Genes Dev.* *20*, 1294–1307.
- Fristedt, U., Weinander, R., Martinsson, H.S., a Persson, B.L. (1999). Characterization of purified and unidirectionally reconstituted Pho84 phosphate permease of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett.* *458*, 1–5.
- Gerasimaite, R., Sharma, S., Desfougères, Y., Schmidt, A., a Mayer, A. (2014). Coupled synthesis and translocation restrains polyphosphate to acidocalcisome-like vacuoles and prevents its toxicity. *J. Cell Sci.* *127*, 5093–5104.

- Gerasimaite, R., Pavlovic, I., Capolicchio, S., Hofer, A., Schmidt, A., Jessen, H.J., a Mayer, A. (2017). Inositol pyrophosphate specificity of the SPX-dependent polyphosphate polymerase VTC. *ACS Chem. Biol.* *12*, 648–653.
- Ghillebert, R., Swinnen, E., De Snijder, P., Smets, B., a Winderickx, J. (2011). Differential roles for the low-affinity phosphate transporters Pho87 and Pho90 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem. J.* *434*, 243–251.
- Giniger, E., a Ptashne, M. (1987). Transcription in yeast activated by a putative amphipathic α helix linked to a DNA binding unit. *Nature* *330*, 670–672.
- Giots, F., Donaton, M.C.V., a Thevelein, J.M. (2003). Inorganic phosphate is sensed by specific phosphate carriers and acts in concert with glucose as a nutrient signal for activation of the protein kinase A pathway in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Microbiol.* *47*, 1163–1181.
- Giovannini, D., Touhami, J., Charnet, P., Sitbon, M., a Battini, J.-L. (2013). Inorganic phosphate export by the retrovirus receptor *XPRI* in metazoans. *Cell Rep.* *3*, 1866–1873.
- Hannum, C., Kulaeva, O.I., Sun, H., Urbanowski, J.L., Wendus, A., Stillman, D.J., a Rolfes, R.J. (2002). Functional mapping of Bas2: Identification of activation and Bas1-interaction domains. *J. Biol. Chem.* *277*, 34003–34009.
- He, B.Z., Zhou, X., a O’Shea, E.K. (2017). Evolution of reduced co-activator dependence led to target expansion of a starvation response pathway. *Elife* *6*, 1–26.
- Hirst, K., Fisher, F., McAndrew, P.C., a Goding, C.R. (1994). The transcription factor, the Cdk, its cyclin and their regulator: Directing the transcriptional response to a nutritional signal. *EMBO J.* *13*, 5410–5420.
- Hothorn, M., Neumann, H., Lenherr, E.D., Wehner, M., Rybin, V., Hassa, P.O., Uttenweiler, A., Reinhardt, M., Schmidt, A., Seiler, J., Ladurner, A.G., Herrmann, C., Scheffzek, K., Mayer, A. (2009). Catalytic core of a membrane-associated eukaryotic polyphosphate polymerase. *Science*. *324*, 513–516.
- Hu, H.C., Stadler-waibel, M., Werner, T.P., a Freimoser, F.M. (2007). Pho91 is a vacuolar phosphate transporter that regulates phosphate and polyphosphate metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Biol. Cell* *18*, 4438–4445.
- Huang, K., Ferrin-O’Connell, I., Zhang, W., Leonard, G.A., O’Shea, E.K., a Quioco, F.A.A. (2007). Structure of the Pho85-Pho80 CDK-cyclin complex of the phosphate-responsive signal transduction pathway. *Mol. Cell* *28*, 614–623.
- Huang, S., Jeffery, D.A., Anthony, M.D., a O’Shea, E.K. (2001). Functional analysis of the cyclin-dependent kinase inhibitor Pho81 identifies a novel inhibitory domain. *Mol. Cell. Biol.* *21*, 6695–6705.
- Huang, Y., Anderle, P., Bussey, K.J., Barbacioru, C., Shankavaram, U., Dai, Z., Reinhold, W.C., Papp, A., Weinstein, J.N., a Sadée, W. (2004). Membrane transporters and channels: Role of the transportome in cancer chemosensitivity and chemoresistance. *Cancer Res.* *64*, 4294–4301.

- Hürlimann, H.C., Pinson, B., Stadler-Waibel, M., Zeeman, S.C., a Freimoser, F.M. (2009). The SPX domain of the yeast low-affinity phosphate transporter Pho90 regulates transport activity. *EMBO Rep.* 10, 1003–1008.
- Cherry, J.R., Johnson, T.R., Dollard, C., Shuster, J.R., a Denis, C.L. (1989). Cyclic AMP-dependent protein kinase phosphorylates and inactivates the yeast transcriptional activator ADR1. *Cell* 56, 409–419.
- * Ikeh, M., Ahmed, Y., a Quinn, J. (2017). Phosphate acquisition and virulence in human fungal pathogens. *Microorganisms* 5, 48.
- Johnston, S.A., Salmeron, J.M., a Dincher, S.S. (1987). Interaction of positive and negative regulatory proteins in the galactose regulon of yeast. *Cell* 50, 143–146.
- Justice, M.C., Hogan, B.P., a Vershon, A.K. (1997). Homeodomain-DNA interactions of the Pho2 protein are promoter-dependent. *Nucleic Acids Res.* 25, 4730–4739.
- Kaneko, Y., Toh-e, A., a Oshima, Y. (1982). Identification of the genetic locus for the structural gene and a new regulatory gene for the synthesis of repressible alkaline phosphatase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* 2, 127–137.
- Kang, H.J., Jeong, S.J., Kim, K.N., Baek, I.J., Chang, M., Kang, C.M., Park, Y.S., a Yun, C.W. (2014). A novel protein, Pho92, has a conserved YTH domain and regulates phosphate metabolism by decreasing the mRNA stability of *PHO4* in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem. J.* 457, 391–400.
- Kizawa, K., Aono, T., a Ohtomo, R. (2016). *PHO8* gene coding alkaline phosphatase of *Saccharomyces cerevisiae* is involved in polyphosphate metabolism. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 62, 297–302.
- Knight, J.P., Daly, T.M., a Bergman, L.W. (2004). Regulation by phosphorylation of Pho81p, a cyclin-dependent kinase inhibitor in *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr. Genet.* 46, 10–19.
- * Köhler, J.R., Acosta-Zaldívar, M., a Qi, W. (2020). Phosphate in virulence of *Candida albicans* and *Candida glabrata*. *J. Fungi* 6, 40.
- Komeili, A., a O’Shea, E.K. (1999). Roles of phosphorylation sites in regulating activity of the transcription factor Pho4. *Science.* 284, 977–980.
- * Korber, P., a Barbaric, S. (2014). The yeast *PHO5* promoter: From single locus to systems biology of a paradigm for gene regulation through chromatin. *Nucleic Acids Res.* 42, 10888–10902.
- * Kruckeberg, A.L. (1996). The hexose transporter family of *Saccharomyces cerevisiae*. *Arch. Microbiol.* 166, 283–292.
- Lam, F.H., Steger, D.J., a O’Shea, E.K. (2008). Chromatin decouples promoter threshold from dynamic range. *Nature* 453, 246–250.
- Langen, P., a Liss, E. (1958). Formation and conversion of yeast polyphosphates. *Biochem Z* 330, 455–466.

- Lee, Y.S., Huang, K., Quioco, F.A., a O'Shea, E.K. (2008). Molecular basis of cyclin-CDK-CKI regulation by reversible binding of an inositol pyrophosphate. *Nat. Chem. Biol.* 4, 25–32.
- Lee, Y.S., Mulugu, S., York, J.D., O'Shea, E.K. (2007). Regulation of a cyclin-CDK-CDK inhibitor complex by inositol pyrophosphates. *Science*. 316, 109–112.
- Legati, A., Giovannini, D., Nicolas, G., López-Sánchez, U., Quintáns, B., Oliveira, J.R., Sears, R.L., Ramos, E.M., Spiteri, E., Sobrido, M.J., Carracedo, Á., Castro-Fernández, C., Cubizolle, S., Fogel, B.L., Goizet, C., Jen, J.C., Kirdlar, S., Lang, A.E., Miedzybrodzka, Z., Mitarnun, W., Paucar, M., Paulson, H., Pariente, J., Richard, A.C., Salins, N.S., Simpson, S.A., Striano, P., Svenningsson, P., Tison, F., Unni, V.K., Vanakker, O., Wessels, M.W., Wetchaphanphesat, S., Yang, M., Boller, F., Champion, D., Hannequin, D., Sitbon, M., Geschwind, D.H., Battini, J.L., Coppola, G. (2015). Mutations in *XPR1* cause primary familial brain calcification associated with altered phosphate export. *Nat. Genet.* 47, 579–581.
- Liu, C., Yang, Z., Yang, J., Xia, Z., a Ao, S. (2000). Regulation of the yeast transcriptional factor Pho2 activity by phosphorylation. *J. Biol. Chem.* 275, 31972–31978.
- Lundh, F., Samyn, D., Popova, Y., Lagerstedt, J.O., Thevelein, J.M., Persson, B.L. (2009). Molecular mechanisms controlling phosphate-induced downregulation of the yeast Pho84 phosphate transporter molecular mechanisms controlling phosphate-induced downregulation of the yeast. *Biochemistry* 48, 4497–4505.
- Ma, J., a Ptashne, M. (1987). The carboxy-terminal 30 amino acids of GAL4 are recognized by GAL80. *Cell* 50, 137–142.
- Mao, C., Brown, C.R., Griesenbeck, J., a Boeger, H. (2011). Occlusion of regulatory sequences by promoter nucleosomes *in vivo*. *PLoS One* 6, 2–11.
- McAndrew, P.C., Svaren, J., Martin, S.R., Hörz, W., a Goding, C.R. (1998). Requirements for chromatin modulation and transcription activation by the Pho4 acidic activation domain. *Mol. Cell. Biol.* 18, 5818–5827.
- Morrisette, V.A., a Rolfes, R.J. (2020). The intersection between stress responses and inositol pyrophosphates in *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr. Genet.* 66, 901–910.
- Mouillon, J.M., a Persson, B.L. (2005). Inhibition of the protein kinase A alters the degradation of the high-affinity phosphate transporter Pho84 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr. Genet.* 48, 226–234.
- * Mouillon, J.M., a Persson, B.L. (2006). New aspects on phosphate sensing and signalling in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Res.* 6, 171–176.
- Mulugu, S., Bai, W., Fridy, P.C., Bastidas, R.J., Otto, J.C., Dollins, D.E., Haystead, T. a, Ribeiro, A. a, a York, J.D. (2008). A conserved family of enzymes that phosphorylate inositol hexakisphosphate. *Science*. 106, 106–109.
- Münsterkötter, M., Barbaric, S., a Hörz, W. (2000). Transcriptional regulation of the yeast *PHO8* promoter in comparison to the coregulated *PHO5* promoter. *J. Biol. Chem.* 275, 22678–22685.
- Neef, D.W., a Kladden, M.P. (2003). Polyphosphate loss promotes SNF/SWI- and Gcn5-dependent mitotic induction of *PHO5*. *Mol. Cell. Biol.* 23, 3788–3797.

- Nishizawa, M., Komai, T., Katou, Y., Shirahige, K., Ito, T., a Toh-e, A. (2008). Nutrient-regulated antisense and intragenic RNAs modulate a signal transduction pathway in yeast. *PLoS Biol.* *6*, 2817–2830.
- Norman, K.L., Shively, C.A., De La Rocha, A.J., Mutlu, N., Basu, S., Cullen, P.J., a Kumar, A. (2018). Inositol polyphosphates regulate and predict yeast pseudohyphal growth phenotypes. *PLoS Genet.* *14*, 1–22.
- Nourani, A., Utley, R.T., Allard, S., a Côté, J. (2004). Recruitment of the NuA4 complex poises the *PHO5* promoter for chromatin remodeling and activation. *EMBO J.* *23*, 2597–2607.
- Ogawa, N., a Oshima, Y. (1990). Functional domains of a positive regulatory protein, Pho4, for transcriptional control of the phosphatase regulon in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* *10*, 2224–2236.
- Ogawa, N., Saitoh, H., Miura, K., Magbanua, J.P.V., Bun-ya, M., Harashima, S., a Oshima, Y. (1995). Structure and distribution of specific cis-elements for transcriptional regulation of *PHO84* in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Gen. Genet.* *249*, 406–416.
- Ogawa, N., DeRisi, J., a Brown, P.O. (2000). New components of a system for phosphate accumulation and polyphosphate metabolism in *Saccharomyces cerevisiae* revealed by genomic expression analysis. *Mol. Biol. Cell* *11*, 4309–4321.
- * Oshima, Y. (1997). The phosphatase system in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes Genet. Syst.* *72*, 323–334.
- Otto, J.C., Kelly, P., Chiou, S.T., a York, J.D. (2007). Alterations in an inositol phosphate code through synergistic activation of a G protein and inositol phosphate kinases. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *104*, 15653–15658.
- * Patton-Vogt, J. (2007). Transport and metabolism of glycerophosphodiester produced through phospholipid deacylation. *Biochim. Biophys. Acta* *1771*, 337–342.
- Pautasso, C., Reca, S., Chatfield-Reed, K., Chua, G., Galello, F., Portela, P., Zarembek, V., a Rossi, S. (2016). Identification of novel transcriptional regulators of PKA subunits in *Saccharomyces cerevisiae* by quantitative promoter-reporter screening. *FEMS Yeast Res.* *16*, 1–12.
- Peng, J., Schwartz, D., Elias, J.E., Thoreen, C.C., Cheng, D., Marsischky, G., Roelofs, J., Finley, D., a Gygi, S.P. (2003). A proteomics approach to understanding protein ubiquitination. *Nat. Biotechnol.* *21*, 921–926.
- * Persson, B.L., Petersson, J., Fristedt, U., Weinander, R., Berhe, A., a Pattison, J. (1999). Phosphate permeases of *Saccharomyces cerevisiae*: Structure, function and regulation. *Biochim. Biophys. Acta* *1422*, 255–272.
- * Persson, B.L., Lagerstedt, J.O., Pratt, J.R., Pattison-Granberg, J., Lundh, K., Shokrollahzadeh, S., Lundh, F. (2003). Regulation of phosphate acquisition in *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr Genet* *43*, 225–244.

- Pestov, N.A., Kulakovskaya, T. V., a Kulaev, I.S. (2004). Inorganic polyphosphate in mitochondria of *Saccharomyces cerevisiae* at phosphate limitation and phosphate excess. *FEMS Yeast Res.* *4*, 643–648.
- Pöhlmann, J., Risse, C., Seidel, C., Pöhlmann, T., Jakopec, V., Walla, E., Ramrath, P., Takeshita, N., Baumann, S., Feldbrügge, M., Fischer, R., Fleig, U. (2014). The Vip1 inositol polyphosphate kinase family regulates polarized growth and modulates the microtubule cytoskeleton in fungi. *PLoS Genet.* *10*, e1004586.
- Popova, Y., Thayumanavan, P., Lonati, E., Agrochão, M., a Thevelein, J.M. (2010). Transport and signaling through the phosphate-binding site of the yeast Pho84 phosphate transceptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *107*, 2890–2895.
- Pratt, J.R., Mouillon, J.M., Lagerstedt, J.O., Pattison-Granberg, J., Lundh, K.I., a Persson, B.L. (2004). Effects of methylphosphonate, a phosphate analogue, on the expression and degradation of the high-affinity phosphate transporter Pho84, in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochemistry* *43*, 14444–14453.
- Puga, M.I., Mateos, I., Charukesi, R., Wang, Z., Franco-Zorrilla, J.M., De Lorenzo, L., Irigoyen, M.L., Masiero, S., Bustos, R., Rodríguez, J., Leyva, A., Rubio, V., Sommer, H., Paz-Ares, J. (2014). SPX1 is a phosphate-dependent inhibitor of phosphate starvation response 1 in *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *111*, 14947–14952.
- * Qi, W., Baldwin, S.A., Muench, S.P., a Baker, A. (2016). Pi sensing and signalling: From prokaryotic to eukaryotic cells. *Biochem. Soc. Trans.* *44*, 766–773.
- * Saiardi, A. (2012). How inositol pyrophosphates control cellular phosphate homeostasis? *Adv. Biol. Regul.* *52*, 351–359.
- Saiardi, A., Caffrey, J.J., Snyder, S.H., a Shears, S.B. (2000). The inositol hexakisphosphate kinase family. Catalytic flexibility and function in yeast vacuole biogenesis. *J. Biol. Chem.* *275*, 24686–24692.
- Saito, K., Ohtomo, R., Kuga-Uetake, Y., Aono, T., a Saito, M. (2005). Direct labeling of polyphosphate at the ultrastructural level in *Saccharomyces cerevisiae* by using the affinity of the polyphosphate binding domain of *Escherichia coli* exopolyphosphatase. *Appl. Environ. Microbiol.* *71*, 5692–5701.
- Samyn, D.R., Ruiz-Pávon, L., Andersson, M.R., Popova, Y., Thevelein, J.M., a Persson, B.L. (2012). Mutational analysis of putative phosphate- and proton-binding sites in the *Saccharomyces cerevisiae* Pho84 phosphate:H(+) transceptor and its effect on signalling to the PKA and PHO pathways. *Biochem. J.* *445*, 413–422.
- * Secco, D., Wang, C., Shou, H., a Whelan, J. (2012a). Phosphate homeostasis in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, the key role of the SPX domain-containing proteins. *FEBS Lett.* *586*, 289–295.

- * Secco, D., Wang, C., Arpat, B.A., Wang, Z., Poirier, Y., Tyerman, S.D., Wu, P., Shou, H., a Whelan, J. (2012b). The emerging importance of the SPX domain-containing proteins in phosphate homeostasis. *New Phytol.* *193*, 842–851.
- Sethuraman, A., Rao, N.N., a Kornberg, A. (2001). The endopolyphosphatase gene: Essential in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *98*, 8542–8547.
- Shao, D., Creasy, C.L., a Bergman, L.W. (1996). Interaction of *Saccharomyces cerevisiae* Pho2 with Pho4 increases the accessibility of the activation domain of Pho4. *Mol. Gen. Genet.* *251*, 358–364.
- Shao, D., Creasy, C.L., a Bergman, L.W. (1998). A cysteine residue in helix (II) of the bHLH domain is essential for homodimerization of the yeast transcription factor Pho4p. *Nucleic Acids Res.* *26*, 710–714.
- * Shears, S.B. (2015). Inositol pyrophosphates: Why so many phosphates? *Adv. Biol. Regul.* *57*, 203–216.
- Schneider, K.R., Smith, R.L., a O’Shea, E.K. (1994). Phosphate-regulated inactivation of the kinase? Pho80-Pho85 by the CDK inhibitor Pho81. *Science.* *266*, 122–126.
- Schothorst, J., Kankipati, H.N., Conrad, M., Samyn, D.R., Van Zeebroeck, G., Popova, Y., Rubio-Texeira, M., Persson, B.L., a Thevelein, J.M. (2013). Yeast nutrient transceptors provide novel insight in the functionality of membrane transporters. *Curr. Genet.* *59*, 197–206.
- Springer, M., Wykoff, D.D., Miller, N., a O’Shea, E.K. (2003). Partially phosphorylated Pho4 activates transcription of a subset of phosphate-responsive genes. *PLoS Biol.* *1*, 261–270.
- Stefanovic, A., Arpat, A.B., Bligny, R., Gout, E., Vidoudez, C., Bensimon, M., a Poirier, Y. (2011). Over-expression of *PHO1* in *Arabidopsis* leaves reveals its role in mediating phosphate efflux. *Plant J.* *66*, 689–699.
- Swinnen, E., Rosseels, J., a Winderickx, J. (2005). The minimum domain of Pho81 is not sufficient to control the Pho85-Rim15 effector branch involved in phosphate starvation-induced stress responses. *Curr. Genet.* *48*, 18–33.
- Toh, E.A., Inouye, S., a Oshima, Y. (1981). Structure and function of the *PHO82*-Pho4 locus controlling the synthesis of repressible acid phosphatase of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* *145*, 221–232.
- Uttenweiler, A., Schwarz, H., Neumann, H., Mayer, A. (2007). The vacuolar transporter chaperone (VTC) complex is required for microautophagy. *Mol. Biol. Cell* *18*, 986–994.
- Vogel, K., Hörz, W., a Hinnen, A. (1989). The two positively acting regulatory proteins Pho2 and Pho4 physically interact with *PHO5* upstream activation regions. *Mol. Cell. Biol.* *9*, 2050–2057.
- Wang, S.-S., Zhou, B.O., a Zhou, J.-Q. (2011). Histone H3 lysine 4 hypermethylation prevents aberrant nucleosome remodeling at the *PHO5* promoter. *Mol. Cell. Biol.* *31*, 3171–3181.
- Watson, D.K., Psallidopoulos, M.C., Samuel, K.P., Dalla-Favera, R., a Papas, T.S. (1983). Nucleotide sequence analysis of human c-myc locus, chicken homologue, and myelocytomatosis virus *MC29*

- transforming gene reveals a highly conserved gene product. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *80*, 3642–3645.
- Wild, R., Gerasimaite, R., Jung, J.Y., Truffault, V., Pavlovic, I., Schmidt, A., Saiardi, A., Jessen, H.J., Poirier, Y., Hothorn, M., Mayer, A. (2016). Control of eukaryotic phosphate homeostasis by inositol polyphosphate sensor domains. *Science*. *352*, 986–990.
- Wippo, C.J., Krstulovic, B.S., Ertel, F., Musladin, S., Blaschke, D., Stürzl, S., Yuan, G.-C., Hörz, W., Korber, P., a Barbaric, S. (2009). Differential cofactor requirements for histone eviction from two nucleosomes at the yeast *PHO84* promoter are determined by intrinsic nucleosome stability. *Mol. Cell. Biol.* *29*, 2960–2981.
- Wykoff, D.D., Rizvi, A.H., Raser, J.M., Margolin, B., a O’Shea, E.K. (2007). Positive feedback regulates switching of phosphate transporters in *S. cerevisiae*. *Mol. Cell* *27*, 1005–1013.
- Xu, Y.F., Létisse, F., Absalan, F., Lu, W., Kuznetsova, E., Brown, G., Caudy, A.A., Yakunin, A.F., Broach, J.R., a Rabinowitz, J.D. (2013). Nucleotide degradation and ribose salvage in yeast. *Mol. Syst. Biol.* *9*, 665.
- Yang, Z.Y., Yang, J., Ao, S.Z. (1996). Studies on the potential phosphorylation sites of the yeast Pho2 factor. *Shanghai* *28*, 547–554.
- Yoshida, K., Ogawa, N., a Oshima, Y. (1989a). Function of the *PHO* regulatory genes for repressible acid phosphatase synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Gen. Genet.* *217*, 40–46.
- Yoshida, K., Kuromitsu, Z., Ogawa, N., a Oshima, Y. (1989b). Mode of expression of the positive regulatory genes *PHO2* and *PHO4* of the phosphatase regulon in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Gen. Genet.* *217*, 31–39.
- Zhang, S., Burkett, T.J., Yamashita, I., a Garfinkel, D.J. (1997). Genetic redundancy between *SPT23* and *MGA2*: regulators of Ty-induced mutations and Ty1 transcription in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* *17*, 4718–4729.
- Zhou, X., a O’Shea, E.K. (2011). Integrated approaches reveal determinants of genome-wide binding and function of the transcription factor Pho4. *Mol. Cell* *42*, 826–836.

*Sekundární citace