

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie
Studijní obor: Biologie



Adam Nejedlý

Autofagie u kvasinek
Autophagy in yeast

Bakalářská práce

Školitel: prof. RNDr. Zdena Palková, CSc.

Konzultant: RNDr. Libuše Váchová, CSc.

Praha, 2021

Prohlášení:

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

V Praze, 6. 5. 2021

Podpis

Děkuji prof. RNDr. Zdeně Palkové, CSc. za vedení práce, poznámky, rady a trpělivost. Velké díky patří i Mgr. Martině Humpálové za její podporu a obětavou pomoc s veškerými problémy.

Abstrakt

Autofagie je proces degradace buněčné cytoplazmy, proteinů a organel zejména v odpověď na nedostatek živin nebo poškození buněčných struktur. Modelovým organismem pro výzkum autofagie u eukaryot jsou kvasinkové organismy, zejména *Saccharomyces cerevisiae*, v menší míře pak *Komagataella phapphi*. Autofagii dělíme podle dvou kritérií jednak na makroautofagii a mikroautofagii, druhá na selektivní a neselektivní autofagii. Při makroautofagii se kolem degradovaného materiálu tvoří autofagozom, který následně fúzuje s vakuolou. Mikroautofagie probíhá přímým vychlípáním a obalením degradovaného materiálu vakuolární membránou. Během neselektivní autofagie je sekvestrována náhodná část cytosolu, selektivní autofagie slouží ke specifické degradaci konkrétních proteinů a organel. Výzkum autofagie má značný medicínský význam kvůli úloze defektů autofagie v mnoha závažných lidských onemocněních.

Klíčová slova: autofagie, mikroautofagie, makroautofagie, degradace proteinů a organel, Atg proteiny, Cvt dráha, kvasinkový organismus

Abstract

Autophagy is a process of degradation of the cell cytoplasm, proteins, and organelles. It appears mainly as a response to a lack of nutrients or damage of cell structures and components. Yeast *Saccharomyces cerevisiae* and also *Komagataella phapphi* are the main model organisms for the research of autophagy. Autophagy is classified by two main criteria. Firstly, we divide autophagy into macroautophagy and microautophagy. During macroautophagy, the phagophore vesicle, called the autophagosome, is created around sequestered cargo and then fuses with the vacuole. Microautophagy is a process in which a vacuolar membrane directly surrounds and sequester degraded cargo. During non-selective (bulk) autophagy, a random non-specific portion of cytoplasm is degraded. On the other hand, selective autophagy serves as a pathway for the degradation of specific proteins and organelles. Autophagy research has nowadays a great medical significance thanks to the role of autophagy defects in a wide area of human diseases.

Key words: autophagy, microautophagy, macroautophagy, protein and organelle degradation, Atg protein family, Cvt pathway, yeast organism

Obsah

Abstrakt.....	iv
Obsah.....	v
Seznam použitých zkratek.....	vii
1 Úvod.....	1
1.1 Cíle práce.....	2
2 Poznámka k nomenklatuře.....	3
3 Neselektivní makroautofagie.....	4
3.1 Atg proteiny, PAS a tvorba autofagozomu.....	4
3.1.1 Atg1p Ser/Thr protein-kinázový komplex.....	5
3.1.2 Membránový protein Atg9p a komplex Atg2p-Atg18p.....	7
3.1.3 Atg14p a fosfatidylinositol-3-kinázový komplex.....	9
3.1.4 Atg12p ubiquitin-like konjugační komplex.....	11
3.1.5 Atg8p ubiquitin-like konjugační komplex.....	12
3.2 Fúze autofagozomu s vakuolou a degradace materiálu.....	13
4 Cvt dráha.....	14
4.1 Charakterizace proteinů Ape1p a Ams1p.....	14
4.2 Tvorba Cvt komplexu.....	15
4.3 Klíčová úloha proteinu Atg11p a tvorba Cvt váčku.....	16
4.4 Přepínání mezi Cvt drahou a neselektivní makroautofagií.....	17
5 Selektivní makroautofagie.....	19
5.1 Makropexofagie.....	19
5.2 Makromitofagie.....	20
5.3 Makronukleofagie.....	21
6 Mikroautofagie.....	23
6.1 Neselektivní mikroautofagie.....	23
6.2 Selektivní mikroautofagie.....	24
6.2.1 Mikropexofagie.....	25
6.2.2 Mikromitofagie.....	26
6.2.3 Piecemental Microautophagy of the Nucleus.....	26

7 Závěr.....	28
8 Literatura.....	30

Použité zkratky

aa	amino acids
AIM	Atg8-family-interacting motifs
Ams1p	α -mannosidáza
Ape1p	aminopeptidáza I
Atg	autophagy-related
ATP	adenosintrifosfát
CCD	coiled-coil domain
Cvt	cytoplasm-to-vacuole
ERES	endoplasmatic reticulum exit sites
ERMES	endoplasmic reticulum-mitochondria encounter structure
kap.	kapitola
MIPA	micropexophagic apparatus
obr.	obrázek
PE	fosfatidylethanolamin
PKA	proteinkináza A
PAS	phagophore assembly site
PMN	piecemental autophagy of the nucleus
PrA	proteináza A
PrB	proteináza B
PtdIns	fosfatydilinositol
PtdIns3P	fosfatidylinositol-3-fosfát
TOR	target of rapamycin
Ubl	ubiquitin-like
Vps	vacuolar protein sorting pathway
VSM	vacuolar sequestring membrane
VTC	vacuolar transporter chaperone

1 Úvod

Autofagie je evolučně konzervovaný proces degradace organického materiálu v eukaryotických buňkách. V užším smyslu slova k autofagii řadíme buněčné procesy, při kterých jsou buď nesespecifická část cytoplazmy, nebo konkrétní proteiny či organely translokovány do vakuol (u vyšších eukaryot lysozomů) buňky, kde jsou následně degradovány. Takové procesy známe v současnosti tři, makroautofagii, mikroautofagii a chaperony zprostředkovanou autofagii, která ale byla popsána pouze u vyšších eukaryot a u kvasinek nebyla identifikována.

Při makroautofagii vznikají v cytoplazmě *de novo* dvojmembránové váčky zvané autofagozomy (tvořené izolační membránou), které se, v závislosti na typu autofagie, tvoří nesespecificky či specificky kolem degradovaného materiálu (Takeshige *et al.*, 1992). Bezprostředně po svém vzniku fúzíjí váčky s vakuolární membránou a jsou degradovány v lumen vakuoly. Druhý typ autofagie, který v kvasinkách i vyšších eukaryotech nalezneme, je mikroautofagie. Při mikroautofagii nevznikají autofagozomy, ale vychlipující se membrána vakuoly zde přímo obaluje nesespecificky či specificky degradovaný materiál a vzniklý váček je následně odškrncen do lumen vakuoly, kde je dále štěpen.

Druhé dělení autofagie je na neselektivní, při které je nesespecificky obalována a degradována náhodná část cytoplazmy buňky, a selektivní, při níž je preferenčně degradována konkrétní organela či protein. Jak makroautofagie, tak i mikroautofagie mohou být selektivní i neselektivní. Specifické proteiny nezbytné pro zajištění funkční autofagie nazýváme Atg proteiny (Klionsky *et al.*, 2003). Několik z těchto proteinů tvoří autofagické *core* (jádro), které je nezbytné pro všechny typy autofagie a je jejich jednotícím prvkem. Další Atg proteiny se uplatňují jen u specifických autofagických drah a biosyntetické Cvt dráhy, dopravující do lumen vakuoly prekurzor proteázy *Apel1p* a mannosidásu *Ams1p* (Klionsky *et al.*, 1992). Cvt dráha sdílí s autofagii řadu mechanismů, často bývá řazena mezi selektivní typy makroautofagie a je používána jako jejich modelová dráha.

U kvasinek je autofagie indukována zejména při nedostatku živin (Takeshige *et al.*, 1992). Buňka díky ní získává materiál pro syntézu proteinů a látek nezbytných k přežití organismu. Zastává však důležité funkce zřejmě i v dalších buněčných procesech. Jedná se například o selektivní degradaci poškozených peroxizomů či mitochondrií, která může hrát důležitou úlohu jak v zachování homeostázy buňky, tak v řízených apoptotických procesech.

Pro výzkum autofagie u kvasinek se používá především kvasinka *Saccharomyces cerevisiae*. Zejména výzkum pexofagie (selektivní degradace peroxizomů) probíhá i na metylotrofních kvasinkách *Komagataella phapphi*, dříve známé jako *Pichia pastoris*, a *Hansenula polymorpha*. Pokud v práci nebude výslovně uvedeno jinak, veškeré poznatky zde prezentované pochází z výzkumu a popisují fungování kvasinky *Saccharomyces cerevisiae*.

1.1 Cíle práce

Cílem práce je popsat zejména klíčové molekulární mechanismy tvorby autofagozomu a jeho degradace v neselektivní makroautofagii a Cvt dráze, která je modelovým typem selektivní autofagie. Rád bych se také zmínil o obecné charakteristice selektivní makroautofagie a jejích nejdůležitějších typech. Ve stručnosti bych chtěl popsat i druhý typ autofagie, mikroautofagii. V závěru své bakalářské práce bych rád ve stručnosti zmínil příčiny systematického výzkumu a nastínil současné problémy, se kterými se výzkum autofagie u kvasinek potýká.

2 Poznámka k nomenklatuře

Názvosloví genů a proteinů účastnících se autofagie v kvasinkách bylo zpočátku výzkumu této problematiky značně nejednotné. Pro proteiny účastnící se autofagie vzniklo několik paralelních označení (Apg, Aut), ke kterým se přidalo označení proteinů účastnících se Cvt dráhy (Cvt). Některé proteiny jsou nezbytné jak pro funkci degradační neselektivní makroautofagie, tak i biosyntetické Cvt dráhy, a nesly tak paralelní označení Aut/Cvt nebo Apg/Cvt, případně i Aut/Apg/Cvt. V textu mé bakalářské práce budu pro tyto proteiny používat jednotné označení zavedené v roce 2003 (Klionsky *et al.*, 2003), které je v současné době všeobecně přijímané a rozšířené.

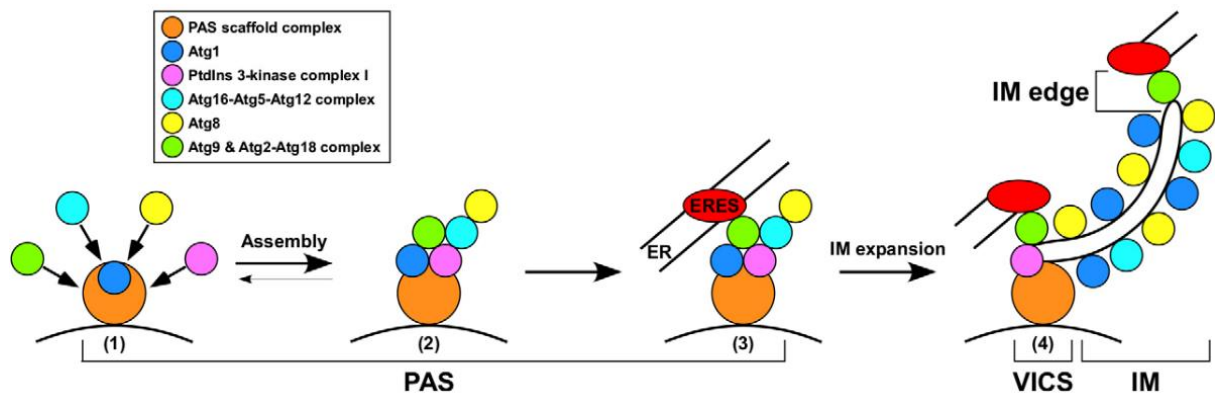
Nejasnosti v odborné literatuře panují i nad samotným označením typů autofagie. Pro přehlednost se v textu budu držet striktního označení neselektivní makroautofagie (v literatuře často referovaná pouze jako ‚autofagie‘ či ‚neselektivní autofagie‘), selektivní makroautofagie (v literatuře často referovaná jako ‚selektivní autofagie‘), Cvt dráha (v literatuře často řazená mezi selektivní makroautofagii), neselektivní mikroautofagie a selektivní mikroautofagie.

3 Neselektivní makroautofagie

Zřejmě nejkompexněji probádaným typem autofagie u kvasinek je neselektivní makroautofagie. Během ní se z tzv. PAS (*phagophore-assembly-site*) místa vzniku fagoforu v blízkosti buněčné vakuoly tvoří kolem nespecifické části cytoplazmy s náhodným obsahem proteinů či organel dvojmembránový váček, tvořící autofagozom o průměru 300-900 nm (Takeshige *et al.*, 1992). Původ membrány tvořící autofagozom je předmětem diskusí, prvotním zdrojem by zřejmě mohla být jaderná membrána, od které se odštěpují váčky nazvané alfazomy (Baba *et al.*, 2019). Při následné expanzi fagoforu kolem degradovaného materiálu a vytvoření uzavřeného autofagozomu je pak zřejmě využita membrána endoplazmatického retikula (Kotani *et al.*, 2018). Po uzavření materiálu určeného k degradaci a vzniku dvojmembránového autofagozomu fúzuje vnější membrána váčku s membránou vakuoly. Vnitřní membrána i s obsahem určeným k degradaci, nazývaná autofagické tělíčko, se ocitá v lumen vakuoly, kde je degradována místními proteázami (Takeshige *et al.*, 1992).

3.1 Atg proteiny, PAS a tvorba autofagozomu

V reakci na aktivaci autofagie pomocí specifických indukčních drah se nejprve do PAS rekrutují proteiny specifické pro neselektivní makroautofagii (obr. 1). Jedná se zejména o skupinu proteinů, pro něž se v literatuře ujal označení Atg (*autophagy-related*) (Klionsky *et al.*, 2003). Proteinů, účastnících se vzniku PAS, tvorby autofagozomu a jeho následné fúze s vakuolou, je dosud popsáno několik desítek. U Atg proteinů klíčových pro správnou funkci neselektivní a částečně i selektivní makroautofagie a Cvt dráhy se v literatuře setkáme na dělení do pěti základních skupin, které úzce souvisí s jejich konkrétními rolemi při tvorbě autofagozomu. Za indukci neselektivní makroautofagie zodpovídá Atg1p kináza a její regulátory (kap. 3.1.1). Atg1p kinázový komplex je zodpovědný za lokalizaci membránového proteinu Atg9p do PAS, který spolu s komplexem Atg2p-Atg18p stojí za expanzí membrány fagoforu a uzavření autofagozomu (kap. 3.1.2). Klíčová pro rekrutování proteinů Atg2p a Atg18p do PAS je fosforylace fosfatidylinositolu (PtdIns) pomocí proteinu Atg14p a fosfatidylinositol-3-kinázového (PtdIns3 kinázového) komplexu (kap. 3.1.3). Atg12p *ubiquitin-like* konjugiční komplex (kap. 3.1.4) a Atg8p *ubiquitin-like* konjugiční komplex propojují Atg8p s fosfatidylethanolaminem (PE). Vzniklý Atg8p-PE, má důležitou roli v indukci tvorby fagoforu (kap.3.1.5).



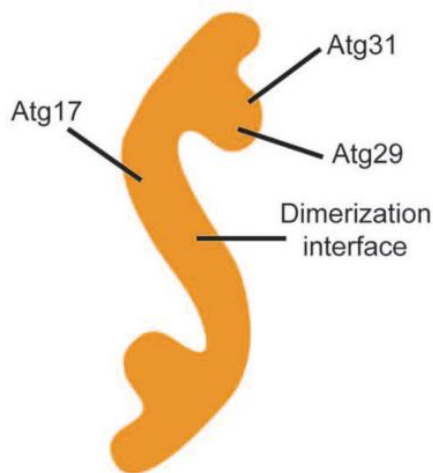
Obrázek X: Tvorba autofagozomu v PAS. Po navázání *core* Atg proteinů a expanzi fagoforu je klíčovým zdrojem membrány ERES endoplazmatického retikula (kap. 3.1.2). Podle (K. Suzuki *et al.*, 2013).

3.1.1 Atg1p Ser/Thr protein-kinázový komplex

Na počátku vzniku PAS v neselektivní makroautofagii je skupina proteinů interagujících s proteinem Atg1p. Atg1p je serin/threoninová protein-kináza s kinázovou doménou nacházející se na N konci aminokyselinového řetězce proteinu. Fosforylační stav a kinázová aktivita proteinu Atg1p hraje spolu s jeho ostatními regulátory klíčovou roli v indukcii autofagie a formaci autofagozomu v situaci, kdy kvasinka trpí nedostatkem živin (Matsuura *et al.* 1997; Papinsky *et al.*, 2014). Protein Atg1p i s ním asociované proteiny jsou nepostradatelné nejen pro nespecifickou, ale i pro specifickou makroautofagii a Cvt dráhu (S. V. Scott *et al.*, 2000).

Klíčovou roli v aktivaci Atg1p kinázy a indukcii autofagie v reakci na nedostatek živin hraje TORC1 dráha, v posledním kroku reprezentovaná TORC1 komplexem. Protein Tor1p (*target of rapamycin*) je kináza příbuzná fosfatidylinositol-3-kináze (PtdIns3 kináze), zodpovědná za regulaci buněčného cyklu v reakci na dostupnost živin, mimo jiné i dusíku (Thomas & Hall, 1997). Jeho nedostatek způsobuje inaktivaci TORC1 dráhy, vedoucí k zastavení buňky v G₁ fázi buněčného cyklu (Heitman *et al.*, 1991). Kromě TORC1 komplexu je za indukcii autofagie v kvasinkách zodpovědná i Ras/PKA signální dráha, která je důležitým komponentem kontroly buněčného růstu kvasinky. Ras/PKA signální dráha reguluje neselektivní makroautofagii negativně a zvýšená hladina její signalizace tak neselektivní makroautofagii inhibuje (Noda & Ohsumi, 1998; Budovskaya *et al.*, 2004). Obě dráhy působí nezávisle na sobě defosforylací proteinu Atg13p, který se po aktivaci váže na proteiny Atg1p a Atg17p, čímž zprostředkovává jejich vzájemnou vazbu a indukuje vznik autofagozomu (Kamada *et al.*, 2000; Kabeya *et al.*, 2005; Stephan *et al.*, 2009).

Atg17p je scaffoldový protein účastnící se iniciačních kroků formace PAS a následného vzniku autofagozomu. Analogické funkce v selektivní makroautofagii plní scaffoldový protein Atg11p, který je klíčový pro přepínání mezi Cvt dráhou a neselektivní makroautofagií (kap. 4.4). Atg11p pravděpodobně interaguje i s proteinem Atg17p během neselektivní makroautofagie (Suzuki *et al.*, 2007, Mao *et al.*, 2013; Matscheko *et al.*, 2019). Starší studie předpokládaly, že po defosforylaci proteinu Atg13p se dimerizovaný protein Atg17p váže na protein Atg1p. Tato vazba by umožnila tvorbu pentamerického Atg1p kinázového komplexu Atg1p-Atg13p-Atg17p-Atg29p-Atg31p (Kawamata *et al.*, 2008; Kabeya *et al.*, 2009; Stjepanovic *et al.*, 2014). Strukturní studie ukázaly, že komplex Atg17p-Atg31p-Atg29p tvoří dimerickou strukturu ve tvaru S, v jejíž jádře nalezneme dva proteiny Atg17p, na které se na obou koncích struktury váží globulární proteiny Atg29p a Atg31p (obr. 2). Fosforylace obou těchto proteinů ovlivňuje konformaci komplexu (Mao *et al.*, 2013; Chew *et al.*, 2018). Výzkumy předpokládaly, že takto poskládaný komplex je klíčový pro vazbu subkomplexu Atg1p-Atg13p do PAS (Kabeya *et al.*, 2009; Mao *et al.*, 2013). Novější studie ale ukazují, že defosforylovaný protein Atg13p svojí vazbou do komplexu Atg17p-Atg29p-Atg31p zřejmě vyvazuje proteiny Atg29p a Atg31p a uvolňuje vazebná místa proteinu Atg17p pro vazbu proteinu Atg9p váčků, jejich lokalizaci do PAS a expanzi fagoforu (Rao *et al.*, 2016).

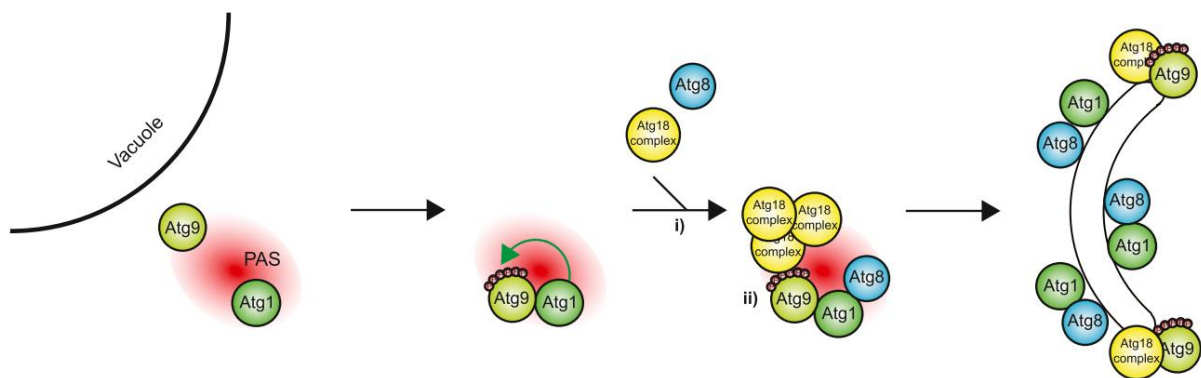


Obrázek 2: Struktura Atg17p-Atg29p-Atg31p komplexu. Jádro tvoří dimerizovaný protein Atg17p, na jehož konce se váží Atg9p váčky, stejně jako inhibitory této interakce, globulární proteiny Atg29p a Atg31p. Podle (Chew *et al.*, 2018).

Komplex Atg17p-Atg31p-Atg29p pravděpodobně plní funkci i při fúzi již uzavřeného autofagozomu s membránou vakuoly rekrutací SNARE proteinu Vam7p do PAS (viz kap 3.2) (Liu *et al.*, 2017).

3.1.2 Membránový protein Atg9p a komplex Atg2p-Atg18p

Dalším v hierarchii proteinů, který se po Atg1p proteinkináze a s ní asociovaných proteinech váže do PAS, je protein Atg9p (Suzuki *et al.*, 2007). Aminokyselinová sekvence transmembránového proteinu Atg9p obsahuje osm hydrofobních transmembránových domén a dvě delší hydrofilní domény na N a C konci proteinu (Noda *et al.*, 2000). Protein Atg9p je substrátem pro Atg1p proteinkinázu, která jej fosforyluje a aktivuje tak řadu jeho funkcí. Jednou z nich je vazba proteinu Atg8p i proteinového komplexu Atg2p-Atg18p do PAS, která je nezbytná pro indukci expanze membrány autofagozomu (obr. 3) (Papinski *et al.*, 2014).



Obrázek 3: Fosforylace proteinu Atg9p a jeho lokalizace do PAS. Podle (Papinski *et al.*, 2014).

Při vazbě proteinu Atg9p do PAS nebyla vyloučena účast proteinu Atg1p, který plní tuto funkci v Cvt dráze (He *et al.*, 2006), zdálo se však, že ovlivňuje vazbu proteinu Atg9p do PAS i v makroautofagii. Další výzkum přinesl informaci, že hlavní úlohu ve vazbě proteinu Atg9p do PAS má především N koncová, tzv. HORMA doména proteinu Atg13p a samotná interakce proteinů Atg9p a Atg1p není k indukci neselektivní makroautofagie dostačující. (Suzuki *et al.*, 2015). V rozporu s tímto zjištěním stojí některé předchozích výzkumy i novější studie, přisuzující roli vazby Atg9p váček do PAS proteinu Atg17p (Rao *et al.*, 2016). Dalším faktorem pomáhajícím vazbě proteinu Atg9p do PAS může být protein Trs85p (Kakuta *et al.*, 2012; Backues *et al.*, 2015). Vazba Atg9p do PAS je zřejmě ovlivněna i kinázovou aktivitou enzymu Atg1p, který ovlivňuje dynamiku jeho interakce pomocí fosforylace proteinu Atg9p (Sekito *et al.*, 2009).

Membránový protein Atg9p se vyskytuje v buňce na membráně Atg9p váček. Atg9p váčky jsou jednomembránové struktury měřící v průměru 30-60 nm, které obsahují okolo 30 molekul proteinu Atg9p. Tyto váčky jsou odškrabovány z Golgiho aparátu za dosud ne zcela objasněné účasti proteinů Atg23p a Atg27p, které se na formaci Atg9p váček podílejí. Atg27p je transmembránový protein, který shlukuje protein Atg9p na specifických subdoménách Golgiho

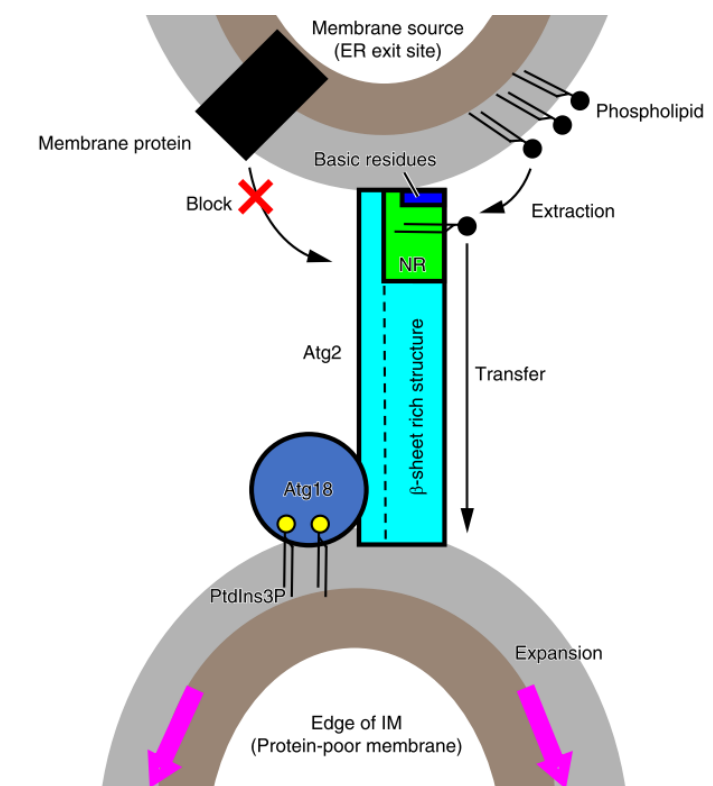
aparátu. Na nich se následně na protein Atg9p váže protein Atg23p, který pomáhá stabilizovat shluk proteinů Atg9p při odškrcování Atg9p váčků z membrány organely (Yen & Klionsky, 2007; Backues *et al.*, 2015). Atg9p váčky se v růstovém stadiu buňky patrně volně pohybují po celé cytoplazmě, některé starší studie však tvrdí, že se shlukují v rezervoárech poblíž mitochondrií (Mari *et al.*, 2010; Yamamoto *et al.*, 2012). Při hladovění buňky a indukci autofagie lokalizují Atg9p váčky jednotlivě do PAS, kde jich stačí pouze několik pro indukci tvorby autofagozomů. Atg9p váčky nejsou zdrojem lipidů pro celý autofagozom, účastní se ale první fáze jeho tvorby. Za kandidáta na další důležitý zdroj materiálu pro tvorbu membrány autofagozomu jsou považovány tzv. ERES (*endoplasmatic reticulum exit sites*) (viz dále) (Graef *et al.*, 2010; Kotani *et al.*, 2018). Po vzniku autofagozomu se protein Atg9p vyskytuje na vnější membráně fagoforu, během fúze autofagozomu s vakuolou a bezprostředně po ní je ale recyklován zpět do Atg9p váčků a nezůstává na vakuolární membráně (Graef *et al.*, 2010; Yamamoto *et al.*, 2012).

Kromě výše popsaného plní membránový protein Atg9p během vzniku autofagozomu i funkci při vazbě proteinového komplexu Atg2p-Atg18p do PAS. Proteinový komplex Atg2p-Atg18p zprostředkovává vazbu mezi fagoforem v PAS a membránou endoplazmatického retikula, umožňující transport lipidů a expanzi vznikajícího autofagozomu. Protein Atg2p se váže na vznikající membránu v PAS díky svému C koncovému amfipatickému α -helixu. Při vazbě na membránu v PAS místě rozeznává protein Atg2p přítomnost v lipidové vrstvě zakotveného fosfatidylinositol-3-fosfátu (PtdIns3P), který je fosforylován PtdIns3 kinázovým komplexem (kap. 3.1.3). PtdIns3P není pro vazbu proteinu Atg2p na membránu vznikajícího fagoforu esenciální, zvyšuje ale jeho afinitu k lipidové vrstvě. Pro vazbu proteinu Atg2p do PAS není nezbytná ani vazba s membránovým proteinem Atg9p, interakce obou proteinů je ale vyžadována pro správnou distribuci proteinu Atg2p na fagoforu a navázání proteinu Atg18p do PAS. Protein Atg18p vyžaduje pro svoji lokalizaci do místa vzniku jak asociaci proteinu Atg2p s proteinem Atg9p, tak asociaci s PtdIns3P. Celý proces vede ke vzniku proteinového komplexu Atg9p-Atg2p-Atg18p (Kotani *et al.*, 2018; Sánchez *et al.*, 2018; Osawa *et al.*, 2019).

Funkce proteinu Atg2p zůstávala dlouho neznámá a jeho klíčová úloha v expanzi autofagozomu byla objasněna až před několika lety. Rozhodující úlohu ve funkci proteinu Atg2p hrají jeho N a C koncové domény. Jak již bylo popsáno výše, C terminální doména nese amfipatický α -helix, který se váže na membrány a spolu s proteinem Atg18p zprostředkovává vazbu proteinu Atg2p do PAS. Preferenční vazba do PAS je zajištěna jednak interakcí proteinu Atg18p s PtdIns3P, za druhé pak vazbou proteinu Atg2p primárně na membrány nesoucí

zakřivení odpovídající průměru vznikajícího fagoforu v PAS. N konec proteinu Atg2p se naopak váže na membránu endoplazmatického retikula a zprostředkovává tak vazbu mezi PAS a ERES subdoménami endoplazmatického retikula (Kotani *et al.*, 2018).

Po vazbě obou membrán zajišťuje protein Atg2p taktéž transfer lipidů z membrány endoplazmatického retikula na membránu vznikajícího autofagozomu (obr. 4). Atg2p tvoří přemostění mezi oběma membránami a skrze jeho hydrofobní kanál putují fosfolipidy, bez nežádoucí příměsi membránových proteinů, z endoplazmatického retikula na membránu autofagozomu. Tato interakce nevyžaduje ke svému fungování energii ve formě ATP, detaily celého procesu ale zatím nejsou podrobně známy (Osawa *et al.*, 2019).

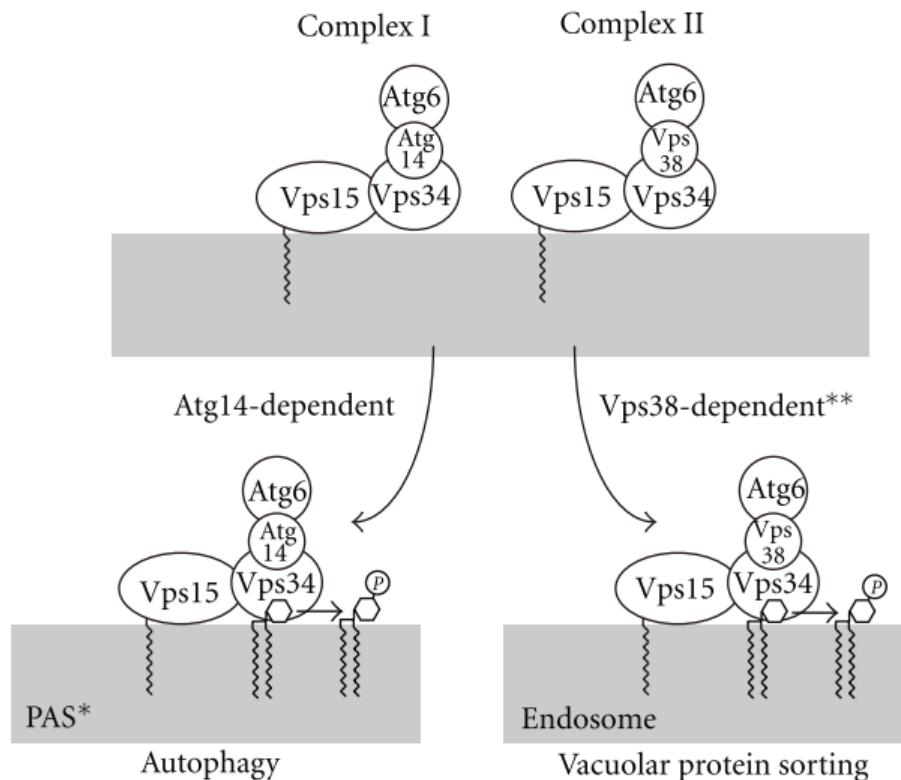


Obrázek 4: Transport lipidů z ERES na fagofor vznikajícího autofagozomu zprostředkovaný Atg2p-Atg18p komplexem. Podle (Osawa *et al.*, 2019).

3.1.3 Atg14p a fosfatidylinositol-3-kinázový komplex

Protein Vps34p je kvasinková PtdIns3 kináza. V buňce tvoří minimálně dva PtdIns3 kinázové komplexy I a II. Oba komplexy jsou tvořeny proteiny Vps15p, Atg6p (také nazývaným Vps30p), Vps34p a typově specifickými proteiny Atg14p, Atg38p (komplex I) a Vps38p (komplex II), které určují konkrétní funkci komplexu v rámci buňky (obr. 5). Komplex II s proteinem Vps38p plní svoji funkci v tzv. Vps dráze (*vacuolar protein sorting pathway*), tedy v dráze transportující proteiny z Golgiho aparátu do vakuoly. Minoritně zastoupený

komplex I obsahující protein Atg14p má svoji nezastupitelnou úlohu v degrační autofagické i biosyntetické Cvt dráze. Úlohou komplexu v PAS je fosforylace PtdIns na PtdIns3P, jež následně rekrutuje další důležité Atg proteiny do místa vzniku autofagozomu. Protein Atg14p plní v PtdIns3 kinázovém komplexu I funkci při vazbě všech komponent a pomocí *coiled-coil* struktur na N terminální doměně propojuje protein Atg6p a subkomplex Vps15p-Vps34p do funkčního komplexu. Analogickou funkci plní v komplexu II protein Vps38p (Araki *et al.*, 2013; Kametaka *et al.*, 1998; Kihara *et al.*, 2001; Obara *et al.*, 2006).



Obrázek 5: Dva typy PtdIns3 kinázového komplexu. Komplex I s proteinem Atg14p funguje v autofagii a Cvt dráze, komplex II s proteinem Vps38p ve Vps dráze. Na schématu chybí součást komplexu I, protein Atg38p. Podle (Obara & Ohsumi, 2011).

Na autofagozom se PtdIns3 kinázový komplex I váže pomocí BARA domény (α - β *repeated, autophagy-specific*), tedy C terminální domény proteinu Atg6p, tvořené třemi repetitivními β -listů a α -helixů. Opačná, N koncová doména proteinu Atg6p má specifickou funkci ve Vps dráze. Centrální CCD (*coiled-coil domain*) doména váže protein Atg14p, se kterým tak protein Atg6p utváří subkomplex Atg6p-Atg14p lokalizující do PAS. Komplementace PtdIns3 kinázového komplexu by v navrhovaném modelu probíhala až na membráně fagoforu, na které by se do něj samostatně vázal i protein Vps15p (Obara *et al.*, 2006; Noda *et al.*, 2012). Původní výzkumy navrhovaly, že PtdIns3 kinázový komplex váže na povrch vznikajícího fagoforu v PAS HORMA doména proteinu Atg13p, podle dalších studií se ale jeví

pravděpodobné, že za vazbou komplexu do PAS stojí membránový protein Atg9p obsažený v Atg9p váčcích (Jao et al., 2013; Suzuki et al., 2015).

3.1.4 Atg12p ubiquitin-like konjugační komplex

Degradace proteinů pomocí ubiquitin-proteazomální dráhy probíhá pomocí připojení ubiquitinu na protein určený k degradaci v proteazomu. K připojení ubiquitinu na protein slouží E1-3 proteiny. Protein E1p aktivuje za spotřeby ATP ubiquitin, který se následně váže na protein E2p. Do hry poté vstupuje protein E3p, jenž připojuje C-konec ubiquitinu na lyzinové zbytky proteinu určeného k degradaci. Ubiquitin-like proteiny plnicí v buňce rozmanité funkce sdílejí s E proteiny či ubiquitinem částečnou sekvenční, strukturní či funkční homologii (review např. Hershko & Ciechanover, 1998).

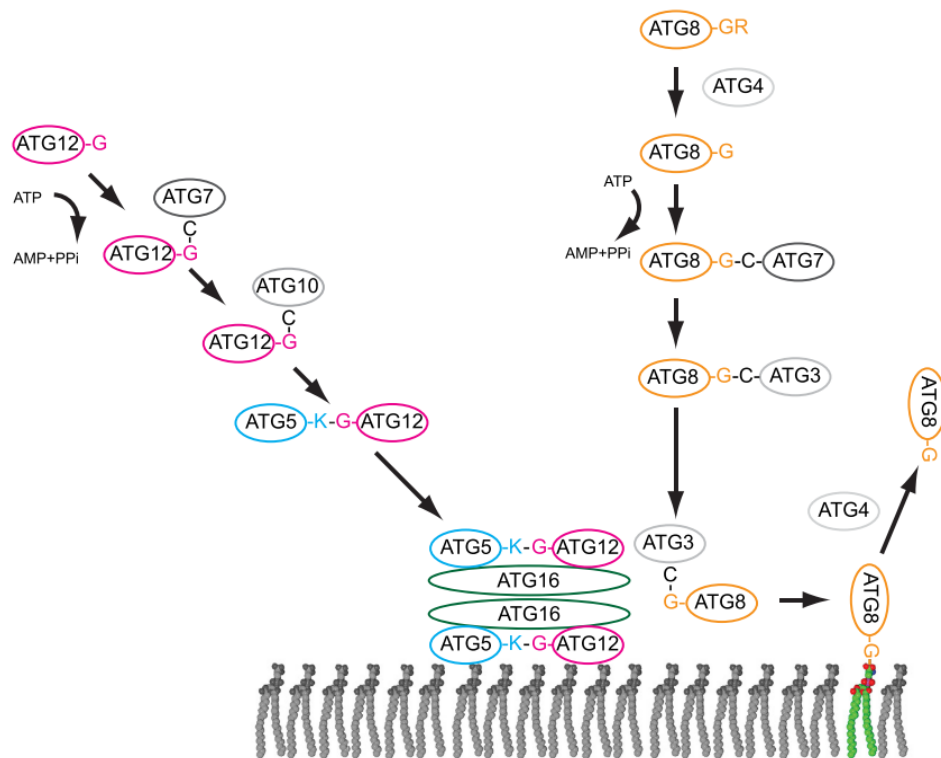
Atg12p ubiquitin-like konjugační komplex je v makroautofagii klíčový pro vazbu proteinu Atg8p na PE lipidové membrány vznikajícího autofagozomu. Protein Atg12p tvoří pomocí svého C terminálního konce komplex s proteinem Atg5p. Interakci obou proteinů zprostředkovává za spotřeby ATP ubiquitin E1 like protein Atg7p, který díky energii vzniklé štěpením ATP aktivuje protein Atg12p. Aktivovaný protein Atg12p se následně váže na protein Atg10p, jenž funguje jako ubiquitin E2 like protein a umožňuje vazbu proteinu Atg12p na protein Atg5p (Mizushima et al., 1998; Shintani et al., 1999).

Vazba proteinu Atg12p na protein Atg5p indukuje vazbu proteinu Atg16p na protein Atg5p a vzniká tak konjugační komplex Atg12p-Atg5p-Atg16p (Kuma, et al., 2002; Mizushima et al., 1999). Tento komplex slouží jako E3 like ubiquitinligáza, která pomocí interakce s proteinem Atg3p a membránovým PE zprostředkovává přenos proteinu Atg8p z proteinu Atg3p na PE (obr. 6) (kap. 3.1.5). Klíčovou funkci při této reakci hraje zejména ireverzibilně spojený komplex proteinů Atg12p-Atg5p, protein Atg16 patrně plní úlohu lokalizace konjugačního komplexu Atg12p-Atg5p-Atg16p do PAS, čímž reguluje interakci komplexu se substrátem a kontroluje tak míru lipidace proteinu Atg8p v buňce (Hanada et al., 2007).

3.1.5 Atg8p ubiquitin-like konjugační komplex

Atg8p je hydrofilní ubiquitin-like protein o velikosti 117 aa. Ihned po syntéze proteinu je štěpen jeho C konec proteázou Atg4p. Odhalí se tak glycinový zbytek, jímž se protein Atg8p váže na membránový PE (Lang et al., 1998; Ichimura et al., 2000; Kirisako et al., 2000). Stejně jako u ubiquitinu, vazbu proteinu Atg8p na PE zprostředkovávají E1, E2 a E3 like proteiny. E1 like enzymem je protein Atg7p, který katalyzuje vazbu proteinu Atg8p a na E2 like protein

Atg3p (Ichimura et al., 2000). Přenos proteinu Atg8p z E2 like proteinu Atg3p na membránový PE zprostředkovává konjugační E3 like komplex Atg12p-Atg5p-Atg16p (obr. 6) (kap. 3.1.4).



Obrázek 6: Schéma *ubiquitin-like* konjugace proteinu Atg8p s PE. Podle (Zens et al., 2015).

Protein Atg8p funguje v PAS jako scaffolfový protein, na který se s ním interagující proteiny váží pomocí AIM (*Atg8-family-interacting motifs*) (Noda et al., 2008; Noda et al., 2010). Jedná se jak o proteiny klíčové v neselektivní makroautofagii, například Atg1p kinázu, tak především receptorové proteiny selektivních autofagických drah (kap 4.3) (Kraft et al., 2012; Nakatogawa et al., 2012). Jednou z důležitých funkcí proteinu Atg8p je vazba s proteinem Atg38p, který je součástí PtdIns3 kinázového komplexu I. Tato interakce zprostředkovává pozitivní zpětnou vazbu a je důležitá pro zesílení lokalizace od Atg8p upstream působícího PtdIns3P kinázového komplexu, a tím pádem i Atg proteinů downstream od něj působících, včetně proteinu Atg8p, do PAS (Yu et al., 2020). Před fúzí autofagozomu s vakuolou defosforyluje fosfatáza Ymr1p PE, díky čemuž je z autofagozomu uvolněn nejen protein Atg8p, ale i další Atg proteiny, jejichž vazba v PAS na proteinu Atg8p závisí. Atg proteiny se tím pádem vrací do cytoplazmy, ve které mohou formovat nové autofagozomy (Cebollero, 2012). Defosforylace PE fosfatázou Ymr1p je zřejmě klíčová i pro další průběh makroautofagie. Díky defosforylaci PE totiž z autofagozomu disociuje protein Atg17p a uvolňuje se PX doména proteinu Vam7p, který následně zprostředkovává fúzi vnější membrány autofagozomu

s membránou vakuoly (Liu et al., 2017). Z vnější membrány autofagozomu může být protein Atg8p odstraněn i štěpením cysteinovou proteázou Atg4p. (Kirisako et al., 2000).

Jednou z klíčových funkcí proteinu Atg8p je zřejmě vazba autofagických proteinů k membráně vznikajícího fagoforu. Podle nových poznatků se Atg8p nachází na membráně nedávno popsaných alfazomů, váček vznikajících odštěpením z jaderné membrány, které obsahují Atg8p-PE. Alfazomy by mohly být hledaným zdrojem prvotní membrány PAS, na kterou by byly core Atg proteiny rekrutovány vazbou s Atg8p-PE. S membránou by následně fúzovaly Atg9p váčky a po vytvoření kanálu mezi PAS a ERES pomocí komplexu Atg2p-Atg8p by byla dokončena tvorba autofagozomu (Baba et al., 2019).

3.2 Fúze autofagozomu s vakuolou a degradace materiálu

Z PAS vzniklé autofagozomy bezprostředně fúzí s vakuolou, ve které jsou následně degradovány (Takeshige *et al.*, 1992). S vakuolou fúzuje pouze vnější membrána autofagozomu, vnitřní membrána se do lumen vakuoly dostává jako jednomembránové autofagické tělísko (*autophagic body*) (Baba *et al.*, 1994). Fúzi s vakuolou umožňuje protein Vam7p rodiny SNARE, který je do PAS lokalizován komplexem proteinů Atg17p-Atg31p-Atg29p spolu s proteinem Atg11p, který je ale schopen do PAS lokalizovat protein Vam7p i samostatně. Protein Vam7p se váže na protein Atg17p pomocí SNARE domény a s proteiny Atg17p i Atg11p interaguje pomocí *helix-helix* interakce (Liu *et al.*, 2017). Aktivace proteinu Vam7p a následné fúze autofagozomu s vakuolou závisí na defosforylaci PE Ymr1p fosfatázou (kap. 3.1.5). Vnitřní membrána autofagozomu je v lumen vakuoly degradována pomocí glykosylovaného proteinu Atg15p, který nese lipasové aktivní místo a do vakuoly se dostává nezávisle na autofagické dráze transportem přes endoplazmatické retikulum a Golgiho komplex. Lipázová aktivita proteinu je aktivována interakcí s komponentem vnitřní membrány autofagozomu, nesoucím funkci ko-lipázy, čímž se předchází paralelní degradaci vakuolární membrány (Epple *et al.*, 2001; Teter *et al.*, 2001).

Po rozštěpení membrány autofagozomu je jeho obsah degradován. K tomuto procesu je nezbytná přítomnost funkční protonové pumpy H^+ -ATPázy lokalizované na vakuolární membráně, která vytváří protonový gradient a acidifikuje lumen vakuoly (Nakamura *et al.*, 1997). Samotnou degradaci autofagického materiálu zajišťuje zejména proteáza B, která je ve vakuole aktivována štěpením svého prekurzoru proteázou A (Takeshige *et al.*, 1992). Další funkcí proteázy B je štěpení a aktivace prekurzoru aminopeptidázy I, která je do lumen vakuoly dopravována v autofagických a Cvt váčkách (kap. 4) (Klionsky *et al.*, 1992).

4 Cvt dráha

Vakuolární proteázy aminopeptidáza I (Ape1p) a α -mannosidáza (Ams1p) jsou do vakuoly, na rozdíl od většiny ostatních proteáz, které jsou do lumen transportovány pomocí Vps dráhy, dopravovány v autofagických váčcích (Baba *et al.*, 1997). Neselektivní makroautofagie je indukována při nedostatku živin a z něj vyplývajícího hladovění buňky, Ape1p i Ams1p jsou oproti tomu do vakuolárního lumen dopravovány i za optimálních růstových podmínek. K tomu u kvasinek slouží konstitutivní biosyntetická Cvt (*cytoplasm-to-vacuole*) dráha, která s neselektivní makroautofagií sdílí část proteinového aparátu a často bývá zařazována jako speciální typ selektivní makroautofagie (Klionsky *et al.*, 1992; Harding *et al.*, 1996; Oda *et al.*, 1996; Scott *et al.*, 1996). Cvt dráha byla dosud popsána pouze u kvasinek, u vyšších eukaryot identifikována nebyla. Díky své podobnosti s některými typy selektivní makroautofagie bývá využívána jako modelová dráha pro její studium.

4.1 Charakterizace proteinů Ape1p a Ams1p

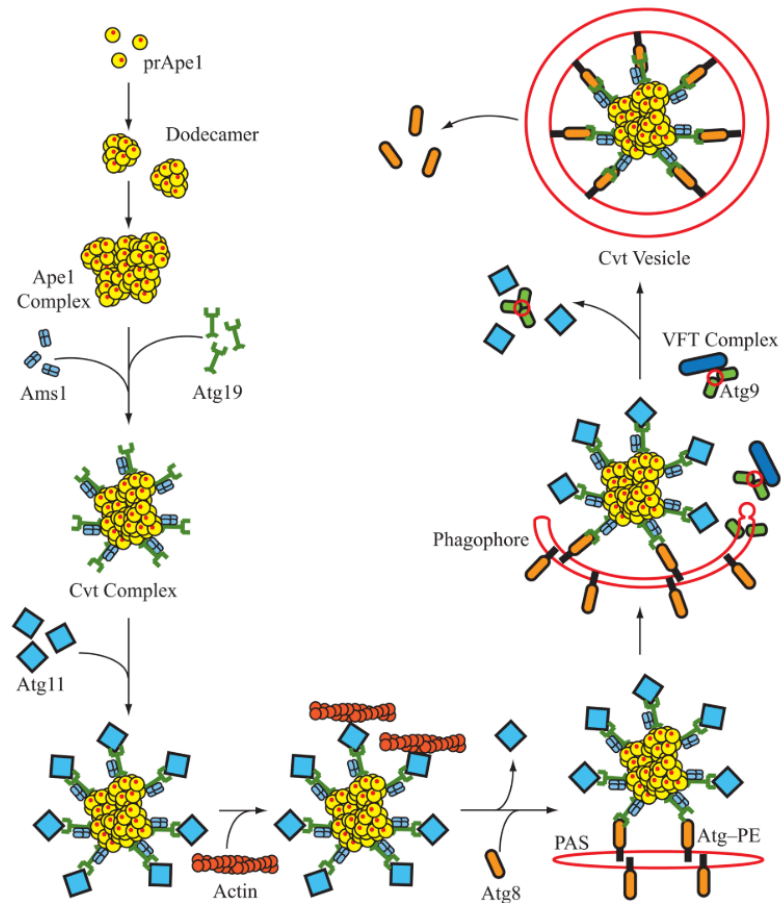
Proteáza Ape1p je do lumen vakuoly dopravována jako prekurzor prApe1p, což je protein o velikosti 61 kDa (Klionsky *et al.*, 1992). Již krátce po svém vzniku prApe1p oligomerizuje v cytoplasmě a tvoří dodekamer o celkové hmotnosti 732 kDa. Oligomerizace prApe1p probíhá skrze C-koncovou doménu proteinu (Kim *et al.*, 1997; Oda *et al.*, 1996). Před vstupem do Cvt dráhy tvoří dodekamery prApe1p ještě o úroveň složitější strukturu. Jednotlivé prekurzory prApe1p spolu totiž interagují pomocí svých propeptidů a tvoří komplex dodekamerů, jehož velikost je regulována vazbou Cvt receptoru Atg19p (Bertipaglia *et al.*, 2016; Shintani *et al.*, 2002). Klíčový pro transport prekurzoru prApe1p do vakuoly je první amfipatický helix proteinu (Oda *et al.*, 1996). Ve vakuole je následně terminální N-koncová doména prekurzoru odštěpena proteázou B a vzniká maturovaný enzym Ape1p o velikosti 50 kDa (Klionsky *et al.*, 1992; Kim *et al.*, 1997).

Mannosidáza Ams1p, druhý protein transportovaný Cvt drahou, se do vakuoly dostává také jako prekurzor. Jedná se o protein o velikosti 122 kDa, který je v lumen vakuoly štěpen na maturovanou mannosidázu o velikosti 73 kDa. Štěpení prekurzoru není, na rozdíl od prApe1p, esenciální pro proteázovou funkci proteinu. (Klionsky *et al.*, 1992; Hutchins & Klionsky, 2001; Yoshihisa & Anraku, 1990). Do Cvt komplexu se Ams1p váže jako tetramer, na rozdíl od prApe1p ale není esenciální pro funkční Cvt dráhu (Bertipaglia *et al.*, 2016; Shintani *et al.*, 2002).

4.2 Tvorba Cvt komplexu

Interagující oligomery proteinů Ams1p-Atg19p-prApe1p, vážící se v přibližném stechiometrickém poměru 1:1:3, tvoří dohromady Cvt komplex (Bertipaglia *et al.*, 2016; Scott *et al.*, 2001). Klíčovým pro vznik Cvt komplexu je protein Atg19p, receptor Cvt dráhy (Scott *et al.*, 2001), který je aktivován fosforylací pomocí Hrr25p kinázy (Pfaffenwimmer *et al.*, 2014). V cytosolu se vyskytuje jako trimer, který se váže spolu s tetramerem mannosidázy Ams1p. Následuje vazba na komplexy dodekamerů proteázy prApe1p. Dodekamery tvoří struktury vyšší úrovně pomocí interakce prekurzorové N-koncové domény proteinů prApe1p, se kterými ale kompetuje protein Atg19p, vážící se do stejného místa pomocí své *coiled-coil* domény. Koncentrace receptorového proteinu Atg19p tak kompeticí o vazebné místo ovlivňuje počet volných domén pro vzájemnou vazbu dodekamerů a tím i konečnou velikost Cvt váčků vznikajících uzavřením dvojmembrány fagoforu těsně okolo Cvt komplexu (Bertipaglia *et al.*, 2016; Kim *et al.*, 2001). Kromě domén pro vazbu proteázových prekurzorů Ams1p a prApe1p interaguje protein Atg19p pomocí vazebných míst na svém C-konci i s dalšími dvěma klíčovými prvky Cvt dráhy, proteiny Atg8p a Atg11p (Shintani *et al.*, 2002; Kim *et al.*, 2002). Vazba receptoru Atg19p na protein Atg11p je klíčová pro transport Cvt komplexu do PAS vznikajících autofagozomů a Cvt váčků i následnou tvorbu fagoforu Cvt váčku (Scott *et al.*, 2001; Shintani *et al.*, 2002).

Novější výzkumy identifikovaly také samostatný receptor pro Ams1p, protein Atg34p (Suzuki *et al.*, 2010). Stejně jako Atg19p a další receptorové proteiny selektivní makroautofagie je aktivován fosforylací, pravděpodobně pomocí Hrr25p kinázy (Farré *et al.*, 2013; Pfaffenwimmer *et al.*, 2014; K. Suzuki *et al.*, 2010). Atg34p obsahuje jak AIM doménu pro vazbu na protein Atg8p, tak i doménu pro vazbu na scaffoldový protein Atg11p. Vykazuje tak analogické funkce jako hlavní receptorový protein Cvt dráhy Atg19p, na rozdíl od něj ale není nezbytný pro transport Ams1p do vakuoly pomocí Cvt dráhy. Funkci však plní v lokalizaci Ams1p do vakuoly během neselektivní makroautofagie, při které tvoří Ams1p komplexy, které rekrutuje do vznikajícího autofagozomu (Suzuki *et al.*, 2010).



Obrázek 7: Schéma vzniku Cvt váčku. Po složení Cvt komplexu váže receptor Atg19p protein Atg11p a Cvt komplex je po aktinových vláčkách transportován do PAS, kde se tvoří Cvt váček. Prvotním zdrojem membrány by mohly být alfazomy (kap 3.1.5). Podle (Lynch-Day & Klionsky, 2011).

4.3 Klíčová úloha proteinu Atg11p a tvorba Cvt váčku

Protein Atg11p je považován za jeden z klíčových proteinů pro selektivní makroautofagii, v jejíchž jednotlivých typech nahrazuje zejména funkci v neselektivní makroautofagii působícího proteinu Atg17p. Podle recentních poznatků hraje důležitou roli také v přepínání mezi Cvt drahou a neselektivní makroautofagií (kap. 4.5). V Cvt dráze se dimerní protein Atg11p váže svojí C-terminální oblastí na receptorový protein Atg19p vázaný v Cvt komplexu (Matscheko *et al.*, 2019; Shintani *et al.*, 2002; Yorimitsu & Klionsky, 2005). Protein Atg11p následně lokalizuje Cvt komplex do PAS po aktinovém cytoskeletu buňky díky interakci s proteinem Arp2p komplexu Arp2p/3p (Monastyrskaya *et al.*, 2008; Monastyrskaya *et al.*, 2008; Monastyrskaya *et al.*, 2006; Reggiori *et al.*, 2005). Důležitou roli při tvorbě PAS hraje Atg11p kináza, která je na membránu vakuoly lokalizována proteinem Atg13p. Atg11p následně lokalizuje Cvt komplex do blízkosti Atg11p kinázy, která se na něj váže a aktivuje svojí kinázovou aktivitu, důležitou pro lokalizaci dalších proteinů, například Atg8p-PE, do PAS (Kraft *et al.*, 2012; Torggler *et al.*, 2016).

Původ iniciační membrány vznikajícího fagoforu je stále nejasný. Roli mohou hrát nově objevené alfazomy (kap 3.1.5), které vznikají na jaderné membráně a je na nich přítomen protein Atg8p-PE. Ten je klíčový pro selektivní makroautofagii díky svým dvěma specifickým hydrofobním vazebným místům, na které se váží receptory selektivně makroautofagických drah pomocí AIM (*Atg8-family-interacting motifs*) domény, nesoucí WXXL vazebný motiv (Baba *et al.*, 2019; Noda *et al.*, 2008). WEEL, WXXL sekvence proteinu Atg19p, receptoru Cvt dráhy, váže protein Atg8p do PAS, čímž zprostředkovává vazbu mezi Cvt komplexem a membránou vznikajícího fagoforu (Noda *et al.*, 2008). Důležitá je i další funkce proteinu Atg11p, který pomocí N-koncové domény homologické s Atg9p vazebnou doménou proteinu Atg17p váže do PAS Atg9p váčky s VFT komplexem, které jsou zodpovědné za expanzi fagoforu okolo Cvt komplexu (kap. 3.1.2) (He *et al.*, 2006a; Matscheko *et al.*, 2019; Reggiori & Klionsky, 2006). Recentní poznatky přinesly zjištění, že v makromitofagii je pro vazbu proteinu Atg11p s proteinem Atg9p klíčová dimerizace proteinu Atg11p indukovaná receptorovým proteinem Atg32p. Lokalizace Atg9p váček do PAS tak závisí na interakci mezi proteinem Atg11p a receptorovým proteinem makromitofagie. Je pravděpodobné, že obdobný princip dimerizace proteinu Atg11p pomocí receptorového proteinu by mohl fungovat i v Cvt dráze a dalších typech selektivní autofagie (Matscheko *et al.*, 2019). Stejně jako v neselektivní makroautofagii, i pro formaci Cvt váčky je nezbytný protein Atg14p a PtdIns3 kinázový komplex, fosforylující PtdIns na PtdIns3P, a regulující tak vazbou proteinů Atg2p, Atg12p, Atg18p do PAS, expanzi membrány a uzavření fagoforu (kap 3.1.2 a 3.1.3). Výsledkem celého procesu je vznik Cvt váček o průměru 140-160 nm, tedy menších než autofagozomy vznikající při neselektivní makroautofagii, které jsou obvykle 300-900 nm velké (Baba *et al.*, 1997; Takeshige *et al.*, 1992).

Stejně jako protein Atg17p v neselektivní makroautofagii, i protein Atg11p váže do PAS protein Vam7p, který je díky své SNARE doméně zodpovědný za fúzi vnější membrány Cvt váčky s membránou vakuoly (Liu *et al.*, 2017). Do vakuoly se dostává jednomembránové Cvt tělísko, které je degradováno proteázou PrB, prApe1 i Ams1 jsou štěpeny a vznikají tak plně funkční maturované proteiny (Kim *et al.*, 1997; Klionsky *et al.*, 1992; Scott *et al.*, 1997).

4.5 Přepínání mezi Cvt drahou a neselektivní makroautofagií

Klíčovou roli v přepnutí mezi konstitutivní Cvt drahou a neselektivní makroautofagií hrají proteiny Atg11p a Atg17p, které v obou drahách zastávají analogické funkce. Protein Atg11p je zodpovědný za lokalizaci Atg9p váček a SNARE proteinu Vam7p do PAS, Atg17p zastává

tuto funkci v neselektivní makroautofagii (He *et al.*, 2006a; Sekito *et al.*, 2009). Atg11p má vyšší afinitu pro vazbu proteinu Atg9p než protein Atg17p a při dostatku živin váže Atg9p váčky efektivněji než Atg17p, což zajišťuje funkční Cvt dráhu. Při hladovění buňky je ale protein Atg11p ubiquitinizován a následně degradován v proteazomech. To vede ke změně poměru koncentrace proteinu Atg11p a proteinu Atg17p, který je následně aktivován složeným Atg1p kinázovým komplexem, jeho afinita k vazbě Atg9p váček se zvýší a indukuje se tak přepnutí z Cvt dráhy na neselektivní makroautofagii. Při obou procesech se do PAS váže jen několik Atg9p váček, což je u Atg17p regulováno vytvořením komplexu Atg1p-Atg13p-Atg17p se subkomplexem Atg29p-Atg31p, inhibujícím vazbu Atg17p a Atg9p (Matscheko *et al.*, 2019; Rao *et al.*, 2016).

5 Selektivní makroautofagie

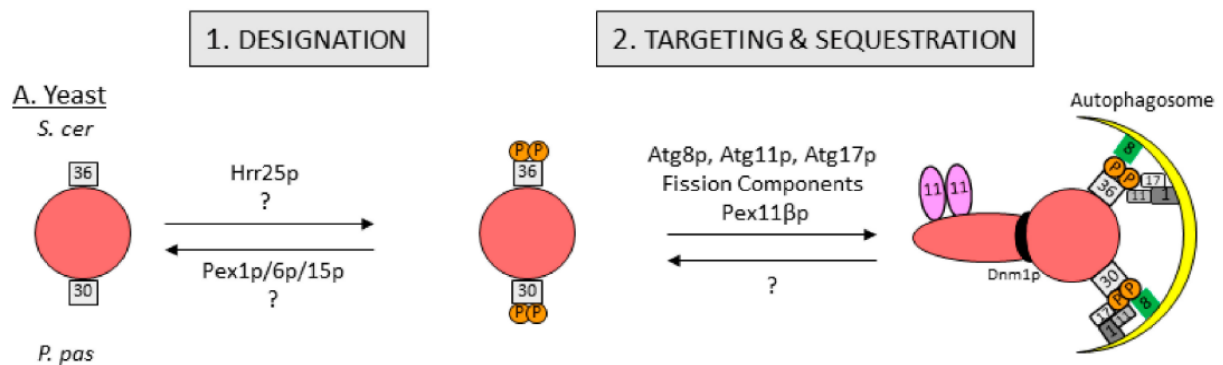
Za hlavní modelovou dráhu pro selektivní makroautofagii bývá považována Cvt dráha, která je kvůli své biosyntetické funkci zařazena do předcházející samostatné kapitoly. Klíčové molekulární mechanismy většiny selektivně autofagických drah se podobají mechanismům Cvt dráhy. Mívají specifický receptorový protein, který váže jak scaffoldový protein Atg11p, tak, skrze AIM motiv, i protein Atg8p, klíčový pro vazbu membrány a expanzi fagoforu okolo degradovaného materiálu (Noda *et al.*, 2008). U tří níže vybraných drah selektivní autofagie jsou proto popsána pouze jejich specifika a odlišnosti od Cvt dráhy a nikoli detailní popis vzniku fagoforu a jeho fúze s vakuolou. Typů selektivní makroautofagie je popsána celá řada, především kvůli požadovanému rozsahu práce se zde nevěnuji všem a vybral jsem pouze stěžejní dráhy, konkrétně makropexofagii (kap. 5.1), makromitofagii (kap. 5.2) a makronukleofagii (kap 5.3).

5.1 Makropexofagie

Selektivní degradace peroxizomů může probíhat jak v důsledku nedostatku živin, zejména dusíku, a z něho plynoucího hladovění, tak i v případě, kdy je peroxisom poškozen a není plně funkční. Stejně jako většina ostatních autofagických drah, i funkční makropexofagie závisí na Atg proteinech (Hutchins *et al.*, 1999; Tuttle & Dunn, 1995). Výzkum makropexofagie se provádí jak na kvasince *Saccharomyces cerevisiae*, tak zejména na metylotrofních kvasinkách *Hansenula polymorpha* a *Komagataella phapphi*.

Receptorem pro selektivní makropexofagii je protein Atg36p, který je lokalizován na peroxisom membránovým proteinem Pex3p. Klíčovou pro indukci autofagie je fosforylace receptoru, která je aktivována právě proteinem Pex3p. Ten umožňuje interakci receptoru Atg36p s Hrr25p kinázou, která protein Atg36p fosforyluje a aktivuje tak jeho interakci se scaffoldovým proteinem Atg11p i z ní vyplývající indukci makropexofagie. (Meguro *et al.*, 2020; Motley *et al.*, 2012; Tanaka *et al.*, 2014). Protein Atg36p interaguje pomocí fosforegulovatelné AIM domény i s proteinem Atg8p. Domény pro vazbu Atg11p a Atg8p se překrývají, se kterým z obou proteinů se protein Atg36p váže je pravděpodobně dáno právě jeho fosforylací (Farré *et al.*, 2013). Dalším proteinem, který váže makropexofagický receptor, je scaffoldový protein Atg17p (Nazarko *et al.*, 2009). Fosforylace receptoru Atg36p lokalizovaného na peroxisomální membráně tedy vede k navázání proteinů Atg11p a Atg17p, které degradovaný peroxisom lokalizují do pexofagického PAS. V něm se Atg36p váže na

protein Atg8p, rekrutují se *core* Atg proteiny, peroxisom je sekvestrován fagoforem a následně degradován (obr. 8).



Obrázek 8: Schéma degradace peroxisomu makropexofagií u *Saccharomyces cerevisiae* a *Komagataella phapphi*. Dráha je indukována fosforylací receptoru Atg30p/Atg36p. Podle (Germain & Kim, 2020).

U metylotrofní kvasinky *Komagataella phapphi* je receptorem makropexofagie protein Atg30p, který je aktivován taktéž fosforylací pomocí Hrr25p kinázy (Farré *et al.*, 2013; Farré *et al.*, 2008). Na rozdíl od interakce obou proteinů v kvasince *Saccharomyces cerevisiae* se tohoto procesu v *Komagataelle phapphi* účastní i protein Atg37p, který fosforylací proteinu Atg30p Hrr25p kinázou aktivuje a je tak zodpovědný za lokalizaci degradovaného peroxizomu do PAS i jeho následnou degradaci. Membránový protein Pex3p má v *Komagataelle phapphi* zcela opačnou funkci než v *Saccharomyces cerevisiae*. Kompetuje totiž s proteinem Atg37p o vazbu na receptor Atg30p a inhibuje tím jeho fosforylací Hrr25p kinázou (Zientara-Rytter *et al.*, 2018). Na rozdíl od *Saccharomyces cerevisiae* využívá *Komagataella phapphi* k funkční pexofagii i protein Atg28p, analog proteinů Atg29p a Atg31p v *Saccharomyces cerevisiae* (Stasyk *et al.*, 2006), a sterylglukosyltransferázu Atg26p (Cao & Klionsky, 2007; Stasyk *et al.*, 2003).

5.2 Makromitofagie

Makromitofagie, tedy selektivní degradace mitochondrií, je v kvasinkách aktivována buď nedostatkem živin a z něj plynoucího hladovění buňky, nebo při poškození a funkčním defektu mitochondrie. Makromitofagie díky tomu udržuje zdravou populaci mitochondrií, zajišťuje dlouhověkost a zpomaluje chronologické stárnutí buněk s limitovanou dostupností živin, při které kvasinka *Saccharomyces cerevisiae* využívá respirační metabolismus. Makromitofagie také pomáhá udržet populaci mitochondrií generující pouze nízké hladiny ROS (*reactive-oxygen-species*) a brání tak oxidativnímu poškození buňky (Nowikovsky *et al.*, 2007; Richard *et al.*, 2013). Při nedostatku živin je aktivována makromitofagie pomocí homologu proteinfosfatázy, proteinu Aup1p, lokalizovaného do mitochondriálního mezimembránového

prostoru a interagujícího s dalším nepostradatelným proteinem funkční makromitofagie, Atg1p kinázou (Tal *et al.*, 2007). Důležitým proteinem pomáhajícím rozeznávat stárnoucí mitochondrie určené k degradaci je protein Atg33p. Jeho přesná funkce zatím nebyla popsána, k makromitofagii je ale potřebný pouze v post logaritmické fázi růstu, a nikoliv za podmínek nedostatku živin (Kanki *et al.*, 2009).

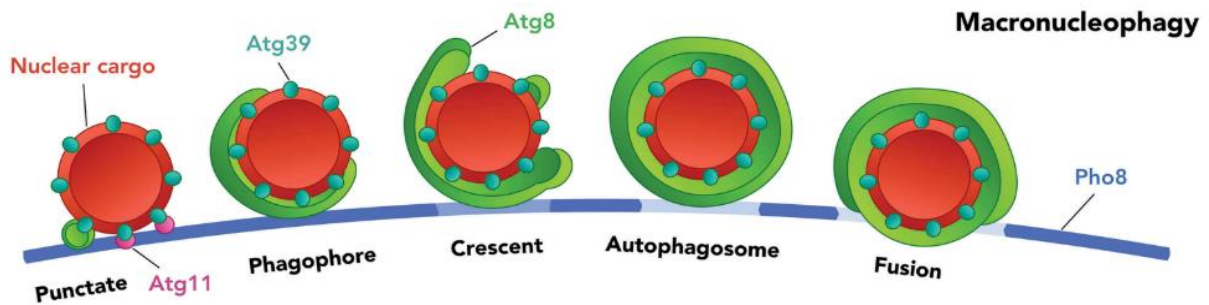
Receptorem makromitofagie je transmembránový protein vnější mitochondriální membrány Atg32p, který je svým N koncem orientovaný do cytoplazmy a C koncem do mezimembránového prostoru mitochondrie. Atg32p interaguje se scaffoldovým proteinem Atg11p zodpovědným za lokalizaci mitochondrií do mitofagického PAS v blízkosti vakuoly a jejich následnou degradaci v lumen vakuoly (Kanki *et al.*, 2009; Kanki & Klionsky, 2008; Okamoto *et al.*, 2009). Během respiračních podmínek vedoucích k degradaci poškozených mitochondrií je hladina receptoru Atg32p v buňce zvýšená (Kanki *et al.*, 2009; Okamoto *et al.*, 2009). Pro aktivaci receptoru je nezbytná jeho fosforylace (Aoki *et al.*, 2011). Protein Atg32p obsahuje WXXL příbuzný WXXI motiv, tedy fosforylační regulovatelnou AIM doménu zajišťující vazbu na další pro makroautofagii nezbytný protein Atg8p. (Farré *et al.*, 2013; Okamoto *et al.*, 2009).

Důležité pro vznik mitofagozomu a degradaci mitochondrií pomocí makromitofagie je ERMES (*endoplasmic reticulum-mitochondria encounter structure*). ERMES je místo kontaktu endoplazmatického retikula s mitochondrií sloužící k výměně fosfolipidů mezi membránami obou organel (Kornmann *et al.*, 2009). ERMES je klíčová pro funkci makromitofagie, spojení endoplazmatického retikula s mitochondrií její pomocí je zřejmě zdrojem membrány pro vznik mitofagozomu (Böckler & Westermann, 2014).

5.3 Makronukleofagie

Nukleofagie je selektivní degradace jaderné membrány a cytoplazmy. Makronukleofagie je, stejně jako většina autofagických procesů, indukována nedostatkem živin, zejména dusíku. Při její indukci se z perinukleárního endoplazmatického retikula odštěpují dvojmembránové váčky obsahující kromě jiného i komponenty jaderné cytoplazmy, které jsou následně degradovány ve vakuole. Receptorem nukleofagie je protein Atg39p, který nese jak AIM doménu pro vazbu na protein Atg8p, tak i místo pro interakci se scaffoldovým proteinem Atg11p. Při makronukleofagii se z perinukleární membrány endoplazmatického retikula odštěpují dvojmembránové váčky, které obsahují i komponenty jaderné cytoplazmy (Mochida *et al.*, 2015).

Makronukleofagii degradované váčky mají průměr je cca 350-390 nm, což je činí většími než Cvt váčky, ale o něco menšími než autofagozomy. Do místa vzniku váčku lokalizuje jak protein Atg8p, tak protein Atg11p, a dá se tak předpokládat, že je makronukleofagie řízena procesy závislémi na *core* Atg proteinech, stejně jako další typy selektivně makroautofagických drah (Otto & Thumm, 2021). Příbuzným typem selektivní makronukleofagie je ER-fagie (*endoplasmic reticulum-phagy*), která závisí na činnosti receptorového proteinu Atg40p (Mochida *et al.*, 2015)



Obrázek 9: Schéma degradace části jaderné cytoplazmy a membrány během makronukleofagie. Podle (Otto & Thumm, 2021).

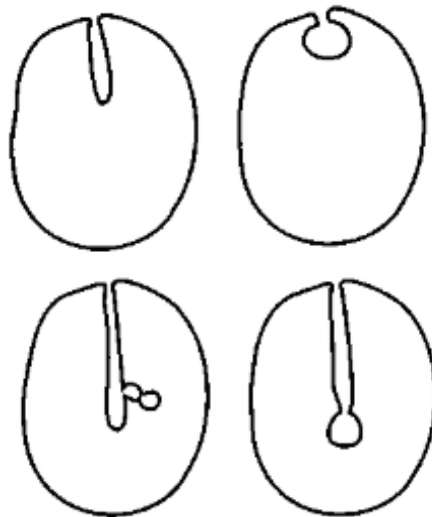
6 Mikroautofagie

Mikroautofagie je proces, při kterém se kolem autofagií degradovaného materiálu nevytváří autofagický váček, ale cytoplazma či organely jsou přímo obaleny membránou vychlipující se nebo vchlipující se vakuoly. Vzniklá membránová struktura následně fúzuje a odškrcuje do vakuolárního lumen mikroautofagické tělíska určené k degradaci. Pod pojem mikroautofagie řadíme několik procesů, které jsou, na rozdíl od procesů makroautofagických, řízených téměř bez výjimky pomocí stejných *core* proteinů, ovládaný značně odlišnými molekulárními aparáty. Detailní průběh jednotlivých mikroautofagických procesů je z většiny probádaný o něco méně než průběh procesů makroautofagických.

6.1 Neselektivní mikroautofagie

Neselektivní mikroautofagie je indukována za podmínek nedostatku živin. Pro její průběh je vyžadována funkční makroautofagie a *core* Atg proteiny. Neselektivní mikroautofagie zřejmě slouží především k degradaci přebytečné membrány a udržení membránového složení i velikosti vakuoly, která je ovlivněna fúzí s autofagozomy (Müller *et al.*, 2000; Sattler & Mayer, 2000; Uttenweiler & Mayer, 2000). Klíčovými pro indukci neselektivní makroautofagie je proteinový komplex EGO, tvořený proteiny Ego1p, Gtr2p a Ego3p, lokalizovaný na vakuolární membráně. Společně s TORC1 signální drahou zřejmě reguluje neselektivní mikroautofagii v odpověď na influx autofagozomů na vakuolární membránu (Dubouloz *et al.*, 2005).

Při neselektivní mikroautofagii se tvoří podlouhlé, válcovité vchlípeniny dovnitř vakuoly, nazvané autofagické trubičky (*autophagic tubes*), které mají po celé délce stejný průměr a zužují se ve svém krčku (obr. 10). Po uzavření tvoří mikroautofagická tělíska, která jsou následně, i s náhodnou částí cytoplazmy, degradována v lumen vakuoly (Müller *et al.*, 2000). Za uzavření trubiček a vytvoření autofagického tělíska je zodpovědný VTC (*vacuolar transporter chaperone*) společně s kalmodulinem Cmd1p, který by mohl být zodpovědný i za invaginaci membrány při tvorbě autofagických trubiček (Uttenweiler, *et al.*, 2005; Uttenweiler *et al.*, 2007). Invaginující vakuolární membrána tvořící autofagické trubičky obsahuje vysoké procento lipidů a málo či žádné transmembránové proteiny. Tento fakt je v souladu s předpokladem, že hlavní úlohou neselektivní mikroautofagie je kompenzovat membránový influx způsobený fúzí s autofagozomy a snížit tak plochu vakuolární membrány a tím i její velikost (Müller *et al.*, 2000; Satter & Mayer, 2000).



Obrázek 10: Schéma vniku autofagické trubičky a odškrcení mikroautofagozomu. Podle (Müller *et al.*, 2000).

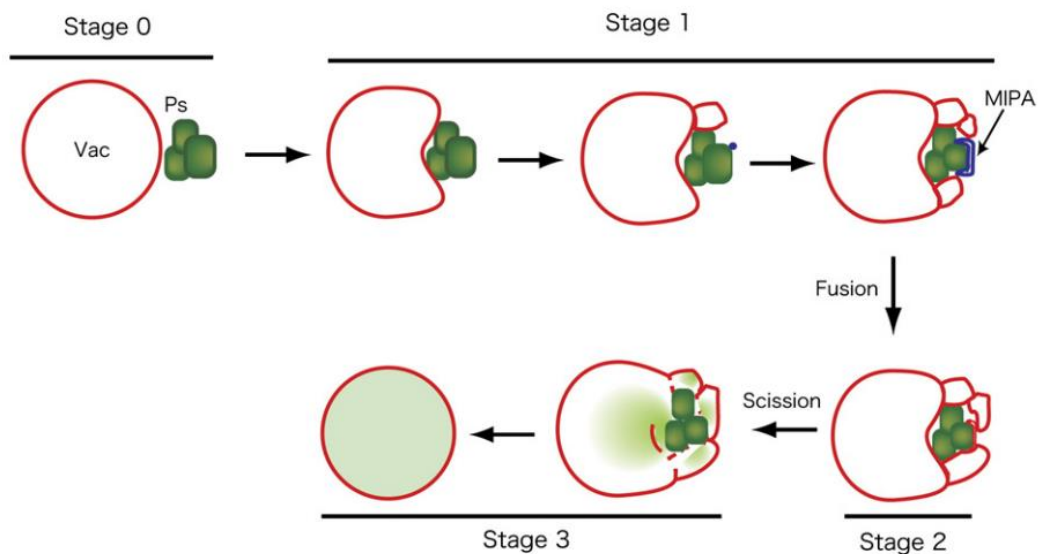
6.2 Selektivní mikroautofagie

Kromě neselektivní mikroautofagie pomocí autofagických trubiček existuje i celá řada selektivních mikroautofagických drah se značně variabilním molekulárním aparátem. Podrobně jsou zde rozebrány tři typy selektivní mikroautofagie, které jsou jednak významné v buněčném metabolismu, a zároveň korespondují se třemi typy selektivní makroautofagie popsané v předchozí kapitole. Jedná se konkrétně o mikropexofagii (kap. 6.2.1), makromitofagii (kap 6.2.2) a PMN (*piecemental microautophagy of the nucleus*).

6.2.1 Mikropexofagie

Stejně jako v průběhu makropexofagie, i v mikropexofagii jsou selektivně degradovány buněčné peroxizomy. Klíčovým organismem pro výzkum mikropexofagie je metylotrofní kvasinka *Komagataella phapphi*. Selektivní degradace peroxizomů pomocí mikropexofagie vyžaduje u *Komagataelly phapphi* tvorbu dvou specifických struktur, VSMs (*vacuolar sequestrating membranes*) a MIPA (*micropexophagic apparatus*). Membrána vakuoly se při mikropexofagii vychlipuje a obaluje degradovaný peroxizom či peroxizomy, často při tom tvoří septa a dělí se na samostatné VMS kompartmenty. Poté, co je jimi peroxizom téměř celý obalen, tvoří se okolo jeho poslední volné části, v místě označitelném jako peroxizomální PAS, MIPA (obr. 11). Jedná se o strukturu tvořenou lipidovou dvojmembránou a specifickými proteiny, mezi nimiž hraje klíčovou roli *ubiquitin-like* protein Paz2p, podobný proteinu Atg8p kvasinky *Saccharomyces cerevisiae*. Po vytvoření membránového obalu kolem celého peroxizomu fúzí

VSMs a MIPA a peroxizom se dostává do lumen vakuoly jako dvojmembránové pexofagické tělísko, které je následně degradováno (Mukaiyama *et al.*, 2004).



Obrázek 11: Degradace peroxizomů během mikropexofagie. Po jejich obalení pomocí VSMs je klíčový vznik MIPA struktury. Podle (Sakai *et al.*, 2006).

Pro tvorbu MIPA v *Komagataella phapphi* je důležitý protein Atg35p. S ním interaguje protein Atg28p (funkčním analogem proteinů Atg29p a Atg31p v *Saccharomyces cerevisiae*), který zprostředkovává vazbu proteinu Atg35p na protein Atg17p, jenž je spolu s proteinem Atg11p zodpovědný za tvorbu pexofagického PAS (Nazarko *et al.*, 2011; Farré *et al.*, 2008).

6.2.2 Mikromitofagie

Mikromitofagie, tedy selektivní obalení mitochondrií vakuolární membránou a její následná degradace, je jedním z nejméně probádaných typů selektivní mikroautofagie a autofagie vůbec. Mechanismy indukce mikromitofagie jsou pravděpodobně obdobné jako u makromitofagie, spuštění dráhy tak nastává jak z důvodu nedostatku živin, tak stárnutí a poškození jednotlivých mitochondrií působením ROS. Výzkum mikromitofagie ukázal, že je buňkou preferenčně indukována namísto makromitofagie v respiračních podmínkách, pokud kvasinky rostou na médiu s laktátem a nemohou tak fermentovat. Specifickým faktorem pro funkční mikromitofagii je mitochondriální protein Uth1p, nezbytné jsou také *core* Atg geny (Kiššová *et al.*, 2004; Kiššová *et al.*, 2007).

6.2.3 Piecemental Microautophagy of the Nucleus

PMN je proces negativně regulovaný TORC1 drahou a podmíněný nedostatkem živin, při kterém se k sobě váže jaderná membrána a membrána vakuoly. Jaderná membrána následně

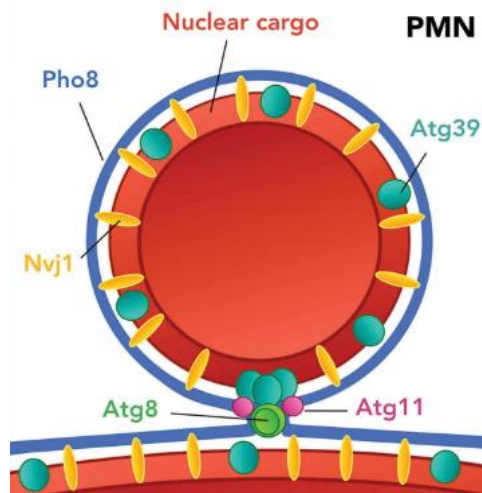
tvoří kapkovité vychlípeniny, membrána vakuoly se naopak vchlípí dovnitř a obaluje rostoucí vychlípeniny jaderné membrány. Po vytvoření kapky se vychlípená jaderná membrána zúží ve svém krčku a postupně se oddělí od zbytku jádra. Okolo vzniklého mikroautofagického váčku se následně uzavře vakuolární membrána, která jej obklopuje, a vznikne tak trojmembránové mikroautofagické tělísko v lumen vakuoly, které je následně štěpeno rezidentními proteázami a degradováno (obr. 12). Hlavním obsahem váčků tvořených jadernou membránou jsou pre-ribozomy (*preribosomes*), které by po transportu do cytoplazmy vytvořily maturované ribozomy pro syntézu proteinů. V případě, kdy buňka trpí nedostatkem živin, sníží se v odpověď na hladovění i její proteosyntéza. V cytoplazmě je tak potřeba menší počet ribozomů a efektivním snížením jejich počtu je degradace prekurzorů, které se ještě nacházející v jaderné cytoplazmě (Roberts *et al.*, 2003).

Klíčový pro kontakt mezi jádrem a vakuolou jsou NV spoje (*nucleus-vacuole junctions*), za které jsou zodpovědné především dva transmembránové proteiny. Prvním je vakuolární membránový protein Vac8p, druhým jeho vazebný partner, jaderný membránový protein Nvj1p. Oba proteiny se shlukují na svých membránách, interagují spolu a spojují vakuolu a jádrem. Protein Nvj1p interaguje s proteinem Vac8p pomocí svého C konce, jenž přesahuje z vnější jaderné membrány do cytoplazmy (Pan *et al.*, 2000).



Obrázek 12: Schéma vzniku PMN váčku a jeho degradace. Podle (Roberts *et al.*, 2003).

Původní výzkumy předpokládaly, že Atg proteiny nejsou pro funkční PMN potřebné. Pozdější studie ovšem ukázaly, že PMN je závislé na *core* Atg proteinech a nejnovější výzkumy přinesly zjištění, že, stejně jako makronukleofagie, i funkční PMN vyžaduje receptorový protein Atg39p. Do místa vzniku NV spojů navíc lokalizují i *core* Atg proteiny Atg8p a Atg11p (obr. 13). U NV spojů byla také nově pozorována membránová struktura připomínající mikropexofagický MIPA, s lokalizovaným proteinem Atg8p. Sekvestrace autofagického tělíska tvořeného nejen vakuolární, ale i nevakuolární membránou v průběhu pexofagie i nukleofagie by mohla vysvětlit problém degradace autofagických tělísek v lumen vakuoly během těchto procesů, protože vakuolární membrána je logicky nedostupná pro degradaci vakuolárními lipázami a proteázami (Krick *et al.*, 2008; Otto & Thumm, 2021).



Obrázek 13: Předpokládané zapojení *core* Atg proteinů Atg8p a Atg11p a receptoru Atg39p při částečné degradaci jádra pomocí PMN. Podle (Otto & Thumm, 2021).

7 Závěr

Cílem mé bakalářské práce bylo představit mechanismy degradace buněčného materiálu ve vakuole kvasinek, pro které se v odborné literatuře ujal název autofagie. O tématu jsem chtěl referovat v celé šíři jeho záběru, požadovaný rozsah práce mi však nedovolil, abych podrobně popsal molekulární mechanismy všech typů autofagie. Rozhodl jsem se tedy zevrubněji referovat o nejlépe probádaném a možná také neklíčovějším typu autofagie u kvasinek, neselektivní makroautofagii. V několika podkapitolách jsem popsal indukci autofagie a podrobně rozvedl mechanismus vzniku autofagozomu, tedy makroautofagií indukovaného dvojmembránového váčku s materiálem určeným k degradaci. Rozsáhleji jsem pojal i popis biosyntetické Cvt dráhy, která slouží jako modelová dráha pro většinu typů selektivní makroautofagie. U konkrétní typů selektivní makroautofagie jsem proto následně uvedl pouze základní mechanismy, specifické faktory a odlišnosti od Cvt dráhy. V poslední kapitole práce jsem na několika stranách stručně přiblížil problematiku, typy a fungování mikroautofagie, druhé velké skupiny autofagických procesů. Mikroautofagie je, i z důvodů uvedených výše, popsána v práci méně podrobně, stěžejní část díla leží v pojednání o neselektivní makroautofagii.

Výzkum autofagie na kvasinkových modelových organismech, zástupcích nižších eukaryot, neslouží pouze pro důsledné rozšiřování lidských vědomostí o živé přírodě, ale má také významný přesah do současných medicínských fenoménů. Konkrétně se jedná zejména o stárnutí buněk i mnohobuněčných organismů, zapříčiněné hromaděním proteinových agregátů v cytoplazmě či defektů v degradaci starých a poškozených organel. Ty, například v případě mitochondrií produkujících ROS, nevratně poškozují buňku i celý organismus a mohou vést k nebezpečné indukci mutagenese DNA. S tím souvisí mnohá, v dnešní době hojně studovaná a v západním světě rozšířená lidská onemocnění. Jedná se jak o nádorové bujení, tak i některé významné degenerativní choroby typu Parkinsonovy či Alzheimerovy choroby, na které má defekt ve správné funkci autofagie v buňkách významný vliv. Vrozené poruchy v autofagii jsou příčinou i některých geneticky podmíněných chorob (Mizushima & Levine, 2020).

Zejména výzkum neselektivní makroautofagie probíhal v posledních letech se značnou intenzitou a postupně odhalil její klíčové molekulární mechanismy. Zdá se, že studie posledních let vrhly světlo například na dlouho nevyřešený problém zdroje prvotní lipidové membrány při tvorbě autofagozomu, i když její původ stále není zcela uspokojivě vysvětlen. Dobře probádaná je i biosyntetická Cvt dráha a na vcelku vysoké úrovni je znalost některých selektivních makroautofagických drah, jako například pexofagie, stále jsou ale nalézány i jejich nové typy.

Zřejmě nejméně probádaným typem autofagie je mikroautofagie, kde je známo poměrně málo informací jak ohledně molekulárních mechanismů neselektivní mikroautofagie, tak i řady jejích selektivních drah. Je navíc pravděpodobné, že na své objevení stále čekají další, zatím nepopsané typy selektivní autofagie. Zda je tomu skutečně tak uvidíme v následujících letech.

8 Literatura

- Aoki, Y., Kanki, T., Hirota, Y., Kurihara, Y., Saigusa, T., Uchiumi, T., & Kang, D. (2011). Phosphorylation of serine 114 on Atg32 mediates mitophagy. *Molecular Biology of the Cell*, 22 (17), 3206–3217. <https://doi.org/10.1091/mbc.E11-02-0145>
- Araki, Y., Ku, W. C., Akioka, M., May, A. I., Hayashi, Y., Arisaka, F., *et al.* (2013). Atg38 is required for autophagy-specific phosphatidylinositol 3-kinase complex integrity. *Journal of Cell Biology*, 203 (2), 299–313. <https://doi.org/10.1083/jcb.201304123>
- Baba, M., Osumi, M., Scott, S. V., Klionsky, D. J., & Ohsumi, Y. (1997). Two distinct pathways for targeting proteins from the cytoplasm to the vacuole/lysosome. *Journal of Cell Biology*, 139 (7), 1687–1695. <https://doi.org/10.1083/jcb.139.7.1687>
- Baba, M., Takeshige, K., Baba, N., & Ohsumi, Y. (1994). Ultrastructural analysis of the autophagic process in yeast: Detection of autophagosomes and their characterization. *Journal of Cell Biology*, 124 (6), 903–913. <https://doi.org/10.1083/jcb.124.6.903>
- Baba, M., Tomonaga, S., Suzuki, M., Gen, M., Takeda, E., Matsuura, A., *et al.* (2019). A nuclear membrane-derived structure associated with Atg8 is involved in the sequestration of selective cargo, the Cvt complex, during autophagosome formation in yeast. *Autophagy*, 15 (3), 423–437. <https://doi.org/10.1080/15548627.2018.1525475>
- Backues, S. K., Orban, D. P., Bernard, A., Singh, K., Cao, Y., & Klionsky, D. J. (2015). Atg23 and Atg27 Act at the Early Stages of Atg9 Trafficking in *S. cerevisiae*. *Traffic*, 16 (2), 172–190. <https://doi.org/10.1111/tra.12240>
- Bertipaglia, C., Schneider, S., Jakobi, A. J., Tarafder, A. K., Bykov, Y. S., Picco, A., *et al.* (2016). Higher-order assemblies of oligomeric cargo receptor complexes form the membrane scaffold of the Cvt vesicle. *EMBO Reports*, 17 (7), 1044–1060. <https://doi.org/10.15252/embr.201541960>
- Böckler, S., & Westermann, B. (2014). Mitochondrial ER Contacts Are Crucial for Mitophagy in Yeast. *Developmental Cell*, 28, 450–458. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2014.01.012>
- Budovskaya, Y. V., Stephan, J. S., Reggiori, F., Klionsky, D. J., & Herman, P. K. (2004). The Ras/cAMP-dependent Protein Kinase Signaling Pathway Regulates an Early Step of the Autophagy Process in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biological Chemistry*, 279 (20), 20663–20671. <https://doi.org/10.1016/j.cortex.2009.08.003>
- Cao, Y., & Klionsky, D. J. (2007). Atg26 is not involved in autophagy-related pathways in *Saccharomyces cerevisiae*. *Autophagy*, 3 (1), 17–20. <https://doi.org/10.4161/auto.3371>
- Cebollero, E., van der Vaart, A., Zhao, M., Rieter, E., Klionsky, D. J., Helms, J. B., *et al.* (2012). Phosphatidylinositol-3-Phosphate Clearance Plays a Key Role in Autophagosome Completion. *Current Biology*, 22 (17), 1545–1553. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2012.06.029>
- Chew, L. H., Setiawati, D., Klionsky, D. J., & Yip, C. K. (2018). Structural characterization of the *Saccharomyces cerevisiae* autophagy regulatory complex Atg17-Atg31-Atg29. *Autophagy* 9 (10), 1467–1474. <https://doi.org/10.4161/auto.25687>
- Dubouloz, F., Deloche, O., Wanke, V., Cameroni, E., & De Virgilio, C. (2005). The TOR and EGO protein complexes orchestrate microautophagy in yeast. *Molecular Cell*, 19 (1), 15–26. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2005.05.020>

- Epple, U. D., Suriapranata, I., Eskelinen, E. L., & Thumm, M. (2001). Aut5/Cvt17p, a putative lipase essential for disintegration of autophagic bodies inside the vacuole. *Journal of Bacteriology*, *183* (20), 5942–5955. <https://doi.org/10.1128/JB.183.20.5942-5955.2001>
- Farré, J. C., Burkenroad, A., Burnett, S. F., & Subramani, S. (2013). Phosphorylation of mitophagy and pexophagy receptors coordinates their interaction with Atg8 and Atg11. *EMBO Reports*, *14* (5), 441–449. <https://doi.org/10.1038/embor.2013.40>
- Farré, J. C., Manjithaya, R., Mathewson, R. D., & Subramani, S. (2008). PpAtg30 Tags Peroxisomes for Turnover by Selective Autophagy. *Developmental Cell*, *14*, 365–376. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2007.12.011>
- Germain, K., & Kim, P. K. (2020). Pexophagy : A Model for Selective Autophagy. *International Journal of Molecular Sciences*, *21* (2) 578–605. <https://doi.org/10.3390/ijms21020578>
- Graef, M., Friedman, J. R., Graham, C., Babu, M., & Nunnari, J. (2010). ER exit sites are physical and functional core autophagosome biogenesis components. *Molecular biology of the cell*, *24* (18), 2765–3009. <https://doi.org/10.1091/mbc.e13-07-0381>
- Hanada, T., Noda, N. N., Satomi, Y., Ichimura, Y., Fujioka, Y., Takao, T., *et al.* (2007). The Atg12-Atg5 Conjugate Has a Novel E3-like Activity for Protein Lipidation in Autophagy. *The Journal of Biological Chemistry*, *282* (52), 37298–37302. <https://doi.org/10.1074/jbc.C700195200>
- Harding, T. M., Hefner-gravink, A., Thumm, M., & Klionsky, D. J. (1996). Genetic and Phenotypic Overlap between Autophagy and the Cytoplasm to Vacuole Protein Targeting Pathway. *Journal of Biological Chemistry*, *4* (11), 17621–17625. <https://doi.org/10.1074/jbc.271.30.17621>
- He, C., Song, H., Yorimitsu, T., Monastyrska, I., Yen, W. L., Legakis, J. E., *et al.* (2006). Recruitment of Atg9 to the preautophagosomal structure by Atg11 is essential for selective autophagy in budding yeast. *Journal of Cell Biology*, *175* (6), 925–935. <https://doi.org/10.1083/jcb.200606084>
- Heitman, J., Mowa, N. R., & Hallt, M. N. (1991). Targets for Cell Cycle Arrest by the Immunosuppressant Rapamycin in Yeast. *Science*, *253* (5022), 905–909. <https://doi.org/10.1126/science1715094>
- Hershko, A., & Ciechanover, A. (1998). The ubiquitin system. *Annual Review Biochemistry*, *458* (67), 825–479. <https://doi.org/10.1038/458421a>
- Hutchins, M. U., & Klionsky, D. J. (2001). Vacuolar Localization of Oligomeric α -Mannosidase Requires the Cytoplasm to Vacuole Targeting and Autophagy Pathway Components in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biological Chemistry*, *276* (23), 20491–20498. <https://doi.org/10.1016/j.cortex.2009.08.003>
- Hutchins, M. U., Veenhuis, M., & Klionsky, D. J. (1999). Peroxisome degradation in *Saccharomyces cerevisiae* is dependent on machinery of macroautophagy and the Cvt pathway. *Journal of Cell Science*, *112* (22), 4079–4087. <https://doi.org/10.1242/jcs.112.22.4079>
- Ichimura, Y., Kirisako, T., Takao, T., Satomi, Y., Shimonishi, Y., Ishihara, N., *et al.* (2000). A ubiquitin-like system mediates protein lipidation. *Nature*, *408* (6811), 488–492. <https://doi.org/10.1038/35044114>

- Jao, C. C., Ragusa, M. J., Stanley, R. E., & Hurley, J. H. (2013). A HORMA domain in Atg13 mediates PI 3-kinase recruitment in autophagy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *110*(14), 5486–5491. <https://doi.org/10.1073/pnas.1220306110>
- Kabeya, Y., Kamada, Y., Baba, M., Hirosato, T., Mitsuru, S., & Ohsumi, Y. (2005). Atg17 Functions in Cooperation with Atg1 and Atg13 in Yeast Autophagy. *Molecular Biology of the Cell*, *16* (5), 2544–2553. <https://doi.org/10.1091/mbc.E04>
- Kabeya, Y., Noda, N. N., Fujioka, Y., Suzuki, K., Inagaki, F., & Ohsumi, Y. (2009). Characterization of the Atg17–Atg29–Atg31 complex specifically required for starvation-induced autophagy in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *389* (4), 612–615. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2009.09.034>
- Kamada, Y., Funakoshi, T., Shintani, T., Nagano, K., Ohsumi, M., & Ohsumi, Y. (2000). Tor-mediated Induction of Autophagy Via an Apg1 Protein Kinase Complex. *Journal of Cell Biology*, *150* (6), 1507–1513. <https://doi.org/10.1083/jcb.150.6.1507>
- Kametaka, S., Okano, T., Ohsumi, M., & Ohsumi, Y. (1998). Apg14p and Apg6/Vps30p form a protein complex essential for autophagy in the yeast, *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biological Chemistry*, *273* (35), 22284–22291. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.35.22284>
- Kanki, T., Ke, W., Cao, Y., Baba, M., & Klionsky, D. J. (2009). Atg32 is a mitochondrial protein that confers selectivity during mitophagy. *Developmental Cell*, *17* (1), 98–109. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2009.06.014>.Atg32
- Kanki, T., & Klionsky, D. J. (2008). Mitophagy in yeast occurs through a selective mechanism. *Journal of Biological Chemistry*, *283* (47), 32386–32393. <https://doi.org/10.1074/jbc.M802403200>
- Kanki, T., Wang, K., Baba, M., Bartholomew, C. R., Lynch-Day, M., Du, Z., *et al.* (2009). A Genomic Screen for Yeast Mutants Defective in Selective Mitochondria Autophagy. *Molecular Biology of the Cell*, *20* (11), 4730–4738. <https://doi.org/10.1091/mbc.E09>
- Kawamata, T., Kamada, Y., Kabeya, Y., Sekito, T., & Ohsumi, Y. (2008). Organization of the Pre-autophagosomal Structure Responsible for Autophagosome Formation. *Molecular Biology of the Cell* *19* (5), 2039–2050. <https://doi.org/10.1091/mbc.E07>
- Kihara, A., Noda, T., Ishihara, N., & Ohsumi, Y. (2001). Two distinct Vps34 phosphatidylinositol 3-kinase complexes function in autophagy and carboxypeptidase y sorting in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Cell Biology*, *152* (3), 519–530. <https://doi.org/10.1083/jcb.152.3.519>
- Kim, J., Kamada, Y., Stromhaug, P. E., Guan, J., Hefner-gravink, A., Baba, M., *et al.* (2001). Cvt9 / Gsa9 Functions in Sequestering Selective Cytosolic Cargo Destined for the Vacuole. *Journal of Cell Biology*, *153* (2), 381–396. <https://doi.org/10.1083/jcb.153.2.381>
- Kim, J., Scott, S. V., Oda, M. N., & Klionsky, D. J. (1997). Transport of a Large Oligomeric Protein by the Cytoplasm to Vacuole Protein Targeting Pathway. *Journal of Cell Biology*, *137* (3), 609–618. <https://doi.org/10.1083/jcb.137.3.609>
- Kirisako, T., Ichimura, Y., Okada, H., Kabeya, Y., Mizushima, N., Yoshimori, T., *et al.* (2000). The Reversible Modification Regulates the Membrane-Binding State of Apg8/Aut7 Essential for Autophagy and the Cytoplasm to Vacuole Targeting Pathway. *Journal of Cell Biology*, *151* (2), 263–275. <https://doi.org/10.1083/jcb.151.2.263>

- Kiššová, I., Deffieu, M., Manon, S., & Camougrand, N. (2004). Uth1p is involved in the autophagic degradation of mitochondria. *Journal of Biological Chemistry*, 279 (37), 39068–39074. <https://doi.org/10.1074/jbc.M406960200>
- Kiššová, I., Salin, B., Schaeffer, J., Bhatia, S., Manon, S., & Camougrand, N. (2007). Selective and non-selective autophagic degradation of mitochondria in yeast. *Autophagy*, 3 (4), 329–336. <https://doi.org/10.4161/auto.4034>
- Klionsky, D. J., Cregg, J. M., Dunn, W. A., Emr, S. D., Sakai, Y., Sandoval, I. V., ... Arbor, A. (2003). A Unified Nomenclature for Yeast Autophagy-Related Genes. *Developmental Cell*, 5, 539–545. <https://doi.org/10.1083/jcb.119.2.287>
- Klionsky, D. J., Cueva, R., & Yaver, D. S. (1992). Aminopeptidase I of *Saccharomyces cerevisiae* Is Localized to the Vacuole Independent of the Secretory Pathway. *The Journal of Cell Biology*, 119 (2), 287–299. <https://doi.org/10.1083/jcb.119.2.287>
- Kornmann, B., Currie, E., Collins, S. R., Schuldiner, M., Nunnari, J., Weissman, J. S., & Walter, P. (2009). An ER-mitochondria tethering complex revealed by a synthetic biology screen. *Science*, 325 (5939), 477–481. <https://doi.org/10.1126/science.1175088>
- Kotani, T., Kirisako, H., Koizumi, M., Ohsumi, Y., & Nakatogawa, H. (2018). The Atg2-Atg18 complex tethers pre-autophagosomal membranes to the endoplasmic reticulum for autophagosome formation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 115 (41), 10363–10368. <https://doi.org/10.1073/pnas.1806727115>
- Kraft, C., Kijanska, M., Kalie, E., Siergiejuk, E., Lee, S. S., Semplicio, G., *et al.* (2012). Binding of the Atg1/ULK1 kinase to the ubiquitin-like protein Atg8 regulates autophagy. *EMBO Journal*, 31 (18), 3691–3703. <https://doi.org/10.1038/emboj.2012.225>
- Krick, R., Muehe, Y., Prick, T., Bremer, S., Schlotterhose, P., Eskelinen, E., *et al.* (2008). Piecemeal Microautophagy of the Nucleus Requires the Core Macroautophagy Genes. *Molecular Biology of the Cell*, 19 (10), 4492–4505. <https://doi.org/10.1091/mbc.E08>
- Kuma, A., Mizushima, N., Ishihara, N., & Ohsumi, Y. (2002). Formation of the ~350-kDa Apg12-Apg5·Apg16 multimeric complex, mediated by Apg16 oligomerization, is essential for autophagy in yeast. *Journal of Biological Chemistry*, 277 (21), 18619–18625. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111889200>
- Lang, T., Schaeffeler, E., Bernreuther, D., Bredschneider, M., Wolf, D. H., & Thumm, M. (1998). Aut2p and Aut7p, two novel microtubule-associated proteins are essential for delivery of autophagic vesicles to the vacuole. *EMBO Journal*, 17(13), 3597–3607. <https://doi.org/10.1093/emboj/17.13.3597>
- Liu, X., Mao, K., Yu, A. Y. H., Omairi-Nasser, A., Austin II, J., Glick, B. S., *et al.* (2017). The Atg17-Atg31-Atg29 complex coordinates with Atg11 to recruit the Vam7 SNARE and mediate autophagosome-vacuole fusion. *Current Biology*, 26 (2), 150–160. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2015.11.054>
- Lynch-Day, M., & Klionsky, D. J. (2011). The Cvt pathway as a model for selective autophagy. *FEBS Letters*, 584 (7), 1359–1366. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2010.02.013>
- Mao, K., Chew, L. H., Inoue-aono, Y., Cheong, H., Nair, U., Popelka, H., & Yip, C. K. (2013). Atg29 phosphorylation regulates coordination of the Atg17-Atg31-Atg29 complex with the Atg11 scaffold during autophagy initiation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110 (31), 2875–2884.

<https://doi.org/10.1073/pnas.1300064110>

Mari, M., Griffith, J., Rieter, E., Krishnappa, L., Klionsky, D. J., & Reggiori, F. (2010). An Atg9-containing compartment that functions in the early steps of autophagosome biogenesis. *Journal of Cell Biology*, *190* (6), 1005–1022. <https://doi.org/10.1083/jcb.200912089>

Matscheko, N., Mayrhofer, P., Rao, Y., Beier, V., & Wollert, T. (2019). Atg11 tethers Atg9 vesicles to initiate selective autophagy. *PLoS Biology*, *17* (7), 1–21. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3000377>

Matsuura, A., Tsukada, M., Wada, Y., & Ohsumi, Y. (1997). Apg1p, a novel protein kinase required for the autophagic process in *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene*, *192* (2), 245–250. [https://doi.org/10.1016/S0378-1119\(97\)00084-X](https://doi.org/10.1016/S0378-1119(97)00084-X)

Meguro, S., Zhuang, X., Kirisako, H., & Nakatogawa, H. (2020). Pex3 confines pexophagy receptor activity of Atg36 to peroxisomes by regulating hrr25-mediated phosphorylation and proteasomal degradation. *Journal of Biological Chemistry*, *295* (48), 16292–16298. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA120.013565>

Mizushima, N., & Levine, B. (2020). Autophagy in Human Diseases. *New England Journal of Medicine*, *383* (16), 1564–1576. <https://doi.org/10.1056/nejmra2022774>

Mizushima, N., Noda, T., & Ohsumi, Y. (1999). Apg16p is required for the function of the Apg12p-Apg5p conjugate in the yeast autophagy pathway. *EMBO Journal*, *18* (14), 3888–3896. <https://doi.org/10.1093/emboj/18.14.3888>

Mizushima, N., Noda, T., Yoshimori, T., Tanaka, Y., Ishii, T., George, M. D., *et al.* (1998). A protein conjugation system essential for autophagy. *Nature*, *395*, 395–398. <https://doi.org/10.1038/26506>

Mochida, K., Oikawa, Y., Kimura, Y., Kirisako, H., Hirano, H., Ohsumi, Y., & Nakatogawa, H. (2015). Receptor-mediated selective autophagy degrades the endoplasmic reticulum and the nucleus. *Nature*, *522* (7556), 359–362. <https://doi.org/10.1038/nature14506>

Monastyrska, I., He, C., Geng, J., Hoppe, A. D., Li, Z., & Klionsky, D. J. (2008). Arp2 Links Autophagic Machinery with the Actin Cytoskeleton. *Molecular Biology of the Cell* *19* (5), 1962–1975. <https://doi.org/10.1091/mbc.E07>

Monastyrska, I., Reggiori, F., & Klionsky, D. J. (2008). Harpooning the Cvt complex to the phagophore assembly site. *Autophagy* *4* (7), 914–916. <https://doi.org/10.4161/auto.6657>

Monastyrska, I., Shintani, T., Klionsky, D. J., & Reggiori, F. (2006). Atg11 directs autophagosome cargoes to the PAS along actin cables. *Autophagy*, *2* (2), 119–121. <https://doi.org/10.4161/auto.2.2.2298>

Motley, A. M., Nuttall, J. M., & Hettema, E. H. (2012). Atg36, the *Saccharomyces cerevisiae* receptor for pexophagy. *Autophagy*, *8* (11), 1680–1681. <https://doi.org/10.4161/auto.21485>

Mukaiyama, H., Baba, M., Osumi, M., Aoyagi, S., Kato, N., Ohsumi, Y., & Sakai, Y. (2004). Modification of a Ubiquitin-like Protein Paz2 Conducted Micropexophagy through Formation of a Novel Membrane Structure Hiroyuki. *Molecular Biology of the Cell*, *15* (1), 58–70. <https://doi.org/10.1091/mbc.E03>

Müller, O., Sattler, T., Flötenmeyer, M., Schwarz, H., Mayer, A., Miiller, O., *et al.* (2000). Autophagic Tubes: Vacuolar Invaginations Involved in Lateral Membrane Sorting and Inverse Vesicle Budding. *The Journal of Cell Biology*, *151* (3), 519–528.

<https://doi.org/10.1083/jcb.151.3.519>

Nakamura, N., Matsuura, A., Wada, Y., & Ohsumi, Y. (1997). Acidification of vacuoles is required for autophagic degradation in the yeast, *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biochemistry*, *121* (2), 338–344. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.jbchem.a021592>

Nakatogawa, H., Ohbayashi, S., Sakoh-Nakatogawa, M., Kakuta, S., Suzuki, S. W., Kirisako, H., *et al.* (2012). The autophagy-related protein kinase Atg1 interacts with the ubiquitin-like protein Atg8 via the Atg8 family interacting motif to facilitate autophagosome formation. *Journal of Biological Chemistry*, *287* (34), 28503–28507. <https://doi.org/10.1074/jbc.C112.387514>

Nazarko, T. Y., Farré, J. C., & Subramani, S. (2009). Peroxisome Size Provides Insights into the Function of Autophagy-related Proteins Taras. *Molecular Biology of the Cell*, *20* (9), 4524–4530. <https://doi.org/10.1091/mbc.E09>

Nazarko, V. Y., Nazarko, T. Y., Farré, J. C., Stasyk, O. V., Warnecke, D., Ulaszewski, S., *et al.* (2011). Atg35, a micropexophagy-specific protein that regulates micropexophagic apparatus formation in *Pichia pastoris*. *Autophagy*, *7* (4), 375–385. <https://doi.org/10.4161/auto.7.4.14369>

Noda, N. N., Kobayashi, T., Adachi, W., Fujioka, Y., Ohsumi, Y., & Inagaki, F. (2012). Structure of the novel C-terminal domain of vacuolar protein sorting 30/autophagy-related protein 6 and its specific role in autophagy. *Journal of Biological Chemistry*, *287* (20), 16256–16266. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.348250>

Noda, N. N., Kumeta, H., Nakatogawa, H., Satoo, K., Adachi, W., Ishii, J., *et al.* (2008). Structural basis of target recognition by Atg8 / LC3 during selective autophagy. *Genes to Cells*, *13* (12), 1211–1218. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2443.2008.01238>

Noda, T., Kim, J., Huang, W., Baba, M., Tokunaga, C., Ohsumi, Y., & Klionsky, D. J. (2000). Apg9p / Cvt7p Is an Integral Membrane Protein Required for Transport Vesicle Formation in the Cvt and Autophagy Pathways. *Journal of Cell Biology*, *148* (3), 465–479. <https://doi.org/10.1083/jcb.148.3.465>

Noda, T., & Ohsumi, Y. (1998). Tor, a phosphatidylinositol kinase homologue, controls autophagy in yeast. *Journal of Biological Chemistry*, *273* (7), 3963–3966. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.7.3963>

Nowikovsky, K., Reipert, S., Devenish, R. J., & Schweyen, R. J. (2007). Mdm38 protein depletion causes loss of mitochondrial K⁺/ H⁺ exchange activity, osmotic swelling and mitophagy. *Cell Death and Differentiation*, *14* (9), 1647–1656. <https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4402167>

Obara, K., & Ohsumi, Y. (2011). Atg14: A key player in orchestrating autophagy. *International Journal of Cell Biology*, *2011*. <https://doi.org/10.1155/2011/713435>

Obara, K., Sekito, T., & Ohsumi, Y. (2006). Assortment of Phosphatidylinositol 3-Kinase Complexes—Atg14p Directs Association of Complex I to the Pre-autophagosomal Structure in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular Biology of the Cell*, *17* (4), 1527–1539. <https://doi.org/10.1091/mbc.E05>

Oda, M. N., Scott, S. V., Hefner-gravink, A., Caffarelli, A. D., & Klionsky, D. J. (1996). Identification of a Cytoplasm to Vacuole Targeting Determinant in Aminopeptidase I. *Journal of Cell Biology*, *132* (6), 999–1010. <https://doi.org/10.1083/jcb.132.6.999>

- Okamoto, K., Kondo-okamoto, N., & Ohsumi, Y. (2009). Mitochondria-Anchored Receptor Atg32 Mediates Degradation of Mitochondria via Selective Autophagy. *Developmental Cell*, *17*(1), 87–97. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2009.06.013>
- Osawa, T., Kotani, T., Kawaoka, T., Hirata, E., Suzuki, K., Nakatogawa, H., *et al.* (2019). Atg2 mediates direct lipid transfer between membranes for autophagosome formation. *Nature Structural and Molecular Biology*, *26* (4), 281–288. <https://doi.org/10.1038/s41594-019-0203-4>
- Otto, F. B., & Thumm, M. (2021). Mechanistic dissection of macro- and micronucleophagy. *Autophagy*, *17* (3), 626–639. <https://doi.org/10.1080/15548627.2020.1725402>
- Pan, X., Roberts, P., Chen, Y., Kvam, E., Shulga, N., Huang, K., *et al.* (2000). Nucleus – Vacuole Junctions in *Saccharomyces cerevisiae* Are Formed Through the Direct Interaction of Vac8p with Nvj1p. *Molecular Biology of the Cell* *11* (6), 2445–2457. <https://doi.org/10.1091/mbc.11.7.2445>
- Papinski, D., Schuschnig, M., Reiter, W., Wilhelm, L., Barnes, C. A., Maiolica, A., *et al.* Article Early Steps in Autophagy Depend on Direct Phosphorylation of Atg9 by the Atg1 Kinase. *Molecular Cell*, *53* (3), 471–483. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2013.12.011>
- Pfaffenwimmer, T., Reiter, W., Brach, T., Nogellova, V., Papinski, D., Schuschnig, M., *et al.* (2014). Hrr25 kinase promotes selective autophagy by phosphorylating the cargo receptor Atg19. *EMBO Reports*, *15* (8), 862–870. <https://doi.org/10.15252/embr.201438932>
- Rao, Y., Perna, M. G., Hofmann, B., Beier, V., & Wollert, T. (2016). The Atg1-kinase complex tethers Atg9-vesicles to initiate autophagy. *Nature Communications*, *7*, 1-13. <https://doi.org/10.1038/ncomms10338>
- Reggiori, F., & Klionsky, D. J. (2006). Atg9 Sorting from Mitochondria is Impaired in Early Secretion and VFT-complex Mutants in *Saccharomyces Cerevisiae*. *Journal of Cell Science*, *119* (Pt 14), 2903–2911. <https://doi.org/10.1242/jcs.03047>
- Reggiori, F., Monastyrska, I., Shintani, T., & Klionsky, D. J. (2005). The Actin Cytoskeleton Is Required for Selective Types of Autophagy, but Not Nonspecific Autophagy, in the Yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular Biology of the Cell*, *16* (12), 5843–5856. <https://doi.org/10.1091/mbc.E05>
- Richard, V. R., Leonov, A., Beach, A., Burstein, M. T., Koupaki, O., Gomez-Perez, A., *et al.* (2013). Macromitophagy is a longevity assurance process that in chronologically aging yeast limited in calorie supply sustains functional mitochondria and maintains cellular lipid homeostasis. *Aging*, *5* (4), 234–269. <https://doi.org/10.18632/aging.100547>
- Roberts, P., Moshitch-Moshkovitz, S., Kvam, E., O’Toole, E., Winey, M., & Goldfarb, D. S. (2003). Piecemeal Microautophagy of Nucleus in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular Biology of the Cell*, *14* (1), 129–141. <https://doi.org/10.1091/mbc.E02>
- Sakai, Y., Oku, M., van der Klei, I. J., & Kiel, J. A. K. W. (2006). Pexophagy: Autophagic degradation of peroxisomes. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, *1763* (12), 1767–1775. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2006.08.023>
- Sánchez, R. G., Rose, J., Guimarães, R., Mari, M., Papinski, D., Rieter, E., & Geerts, W. J. (2018). Atg9 establishes Atg2-dependent contact sites between the endoplasmic reticulum and phagophores. *Journal of Cell Biology*, *217* (8), 2743–2763. <https://doi.org/10.1083/jcb.201710116>

- Sattler, T., & Mayer, A. (2000). Cell-free Reconstitution of Microautophagic Vacuole Invagination and Vesicle Formation. *Journall of Cell Biology*, 151 (3), 529–538. <https://doi.org/10.1083/jcb.151.3.529>
- Scott, S. V., Nice, D. C., Nau, J. J., Weisman, L. S., Kamada, Y., Keizer-Gunnink, I., *et al.* (2000). Apg13p and Vac8p are part of a complex of phosphoproteins that are required for Cytoplasm to vacuole targeting. *Journal of Biological Chemistry*, 275 (33), 25840–25849. <https://doi.org/10.1074/jbc.M002813200>
- Scott, Sidney V., Guan, J., Hutchins, M. U., Kim, J., & Klionsky, D. J. (2001). Cvt19 Is a Receptor for the Cytoplasm-to-Vacuole Targeting Pathway. *Molecular Cell*, 7 (6), 1131–1141. [https://doi.org/10.1016/s1097-2765\(01\)00263-5](https://doi.org/10.1016/s1097-2765(01)00263-5)
- Scott, Sidney V., Hefner-Gravink, A., Morano, K. A., Noda, T., Ohsumi, Y., & Klionsky, D. J. (1996). Cytoplasm-to-vacuole targeting and autophagy employ the same machinery to deliver proteins to the yeast vacuole. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93 (22), 12304–12308. <https://doi.org/10.1073/pnas.93.22.12304>
- Scott, Sidney V., Baba, M., Ohsumi, Y., & Klionsky, D. J. (1997). Aminopeptidase I Is Targeted to the Vacuole by a Nonclassical Vesicular Mechanism. *The Journal of Cell Biology*, 138 (1), 37–44.
- Sekito, T., Kawamata, T., Ichikawa, R., Suzuki, K., & Ohsumi, Y. (2009). Atg17 recruits Atg9 to organize the pre-autophagosomal. *Genes to Cells*, 14 (5), 525–538. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2443.2009.01299>
- Shintani, T., Huang, W., Stromhaug, P. E., & Klionsky, D. J. (2002). Mechanism of Cargo Selection in the Cytoplasm to Vacuole Targeting Pathway. *Developmental Cell*, 3 (6), 825–837. <https://doi.org/10.1083/jcb.138.1.37>
- Shintani, T., Mizushima, N., Ogawa, Y., Matsuura, A., Noda, T., & Ohsumi, Y. (1999). Apg10p, a novel protein-conjugating enzyme essential for autophagy in yeast. *EMBO Journal*, 18 (19), 5234–5241. <https://doi.org/10.1093/emboj/18.19.5234>
- Stasyk, O. V., Nazarko, T. Y., Stasyk, O. G., Krasovska, O. S., Warnecke, D., Nicaud, J. M., *et al.* (2003). Sterol glucosyltransferases have different functional roles in *Pichia pastoris* and *Yarrowia lipolytica*. *Cell Biology International*, 27 (11), 947–952. <https://doi.org/10.1016/j.cellbi.2003.08.004>
- Stasyk, O. V., Stasyk, O. G., Mathewson, R. D., Farré, J. C., Nazarko, V. Y., Krasovska, O. S., *et al.* (2006). Atg28, a novel coiled-coil protein involved in autophagic degradation of peroxisomes in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Autophagy*, 2(1), 30–38. <https://doi.org/10.4161/auto.2226>
- Stephan, J. S., Yeh, Y., Ramachandran, V., Deminoff, S. J., & Herman, P. K. (2009). The Tor and PKA signaling pathways independently target the Atg1 / Atg13 protein kinase complex to control autophagy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106 (40), 17049–17054. <https://doi.org/10.1073/pnas.0903316106>
- Stjepanovic, G., Davies, C. W., Stanley, R. E., Ragusa, M. J., Kim, D. J., & Hurley, J. H. (2014). Assembly and dynamics of the autophagy-initiating Atg1 complex. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111 (35), 12793–12798. <https://doi.org/10.1073/pnas.1407214111>
- Suzuki, K., Akioka, M., Kondo-kakuta, C., Yamamoto, H., & Ohsumi, Y. (2013). Fine

- mapping of autophagy-related proteins during autophagosome formation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Cell Science*, 126, 2534–2544. <https://doi.org/10.1242/jcs.122960>
- Suzuki, K., Kondo, C., Morimoto, M., & Ohsumi, Y. (2010). Selective transport of α -mannosidase by autophagic pathways: Identification of a novel receptor, Atg34p. *Journal of Biological Chemistry*, 285 (39), 30019–30025. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.143511>
- Suzuki, K., Kubota, Y., Sekito, T., & Ohsumi, Y. (2007). Hierarchy of Atg proteins in pre-autophagosomal structure organization. *Genes to Cells*, 12 (2), 209–218. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2443.2007.01050>
- Suzuki, S. W., Yamamoto, H., Oikawa, Y., Kondo-Kakuta, C., Kimurac, Y., Hirano, & H., Ohsumi, Y. (2015). Atg13 HORMA domain recruits Atg9 vesicles during autophagosome formation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 112 (11), 3350–3355. <https://doi.org/10.1073/pnas.1421092112>
- Takeshige, K., Baba, M., Tsuboi, S., Noda, T., & Ohsumi, Y. (1992). Autophagy in yeast demonstrated with proteinase-deficient mutants and conditions for its induction. *Journal of Cell Biology*, 119 (2), 301–312. <https://doi.org/10.1083/jcb.119.2.301>
- Tal, R., Winter, G., Ecker, N., Klionsky, D. J., & Abeliovich, H. (2007). Aup1p, a yeast mitochondrial protein phosphatase homolog, is required for efficient stationary phase mitophagy and cell survival. *Journal of Biological Chemistry*, 282 (8), 5617–5624. <https://doi.org/10.1074/jbc.M605940200>
- Tanaka, C., Tan, L. J., Mochida, K., Kirisako, H., Koizumi, M., Asai, E., *et al.* (2014). Hrr25 triggers selective autophagy-related pathways by phosphorylating receptor proteins. *Journal of Cell Biology*, 207 (1), 91–105. <https://doi.org/10.1083/jcb.201402128>
- Teter, S. A., Eggerton, K. P., Scott, S. V., Kim, J., Fischer, A. M., & Klionsky, D. J. (2001). Degradation of Lipid Vesicles in the Yeast Vacuole Requires Function of Cvt17, a Putative Lipase. *Journal of Biochemical Chemistry*, 276 (3), 2083–2087. <https://doi.org/10.1074/jbc.C000739200>
- Thomas, G., & Hall, M. N. (1997). TOR signalling and control of cell growth George Thomas* and Michael N Hall. *Current Opinion in Cell Biology*, 9 (6), 782–787. [https://doi.org/10.1016/S0955-0674\(97\)80078-6](https://doi.org/10.1016/S0955-0674(97)80078-6)
- Torggler, R., Papinski, D., Brach, T., Bas, L., Schuschnig, M., Pfaffenwimmer, T., *et al.* (2016). Two Independent Pathways within Selective Autophagy Converge to Activate Atg1 Kinase at the Vacuole. *Molecular Cell*, 64 (2), 221–235. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2016.09.008>
- Tuttle, D. L., & Dunn, W. A. (1995). Divergent modes of autophagy in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Journal of Cell Science*, 108 (1), 25–35. <https://doi.org/10.1242/jcs.108.1.25>
- Uttenweiler, A., & Mayer, A. (2000). Microautophagy in the Yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Methods in Molecular Biology*, 445, 245–259. https://doi.org/10.1007/978-1-59745-157-4_16
- Uttenweiler, A., Schwarz, H., & Mayer, A. (2005). Microautophagic vacuole invagination requires calmodulin in a Ca²⁺-independent function. *Journal of Biological Chemistry*, 280 (39), 33289–33297. <https://doi.org/10.1074/jbc.M506086200>
- Uttenweiler, A., Schwarz, H., Neumann, H., & Mayer, A. (2007). The Vacuolar Transporter

Chaperone (VTC) Complex Is Required for Microautophagy. *Molecular Biology of the Cell*, 18 (1), 166–175. <https://doi.org/10.1091/mbc.E06>

Yamamoto, H., Kakuta, S., Watanabe, T. M., Kitamura, A., Sekito, T., Kondo-kakuta, C., *et al.* (2012). Atg9 vesicles are an important membrane source during early steps of autophagosome formation. *Journal of Cell Biology*, 198 (2), 219–233. <https://doi.org/10.1083/jcb.201202061>

Yen, W. L., & Klionsky, D. J. (2007). Atg27 is a second transmembrane cycling protein. *Autophagy*, 3 (3), 254–256. <https://doi.org/10.4161/auto.3823>

Yorimitsu, T., & Klionsky, D. J. (2005). Atg11 Links Cargo to the Vesicle-forming Machinery in the Cytoplasm to Vacuole Targeting Pathway. *Molecular Biology of the Cell*, 16 (4), 1593–1605. <https://doi.org/10.1091/mbc.E04>

Yoshihisa, T., & Anraku, Y. (1990). A Novel Pathway of Import of α -Mannosidase, a Marker Enzyme of Vacuolar Membrane, in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biological Chemistry*, 265 (36), 22418–22425. [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(18\)45721-3](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(18)45721-3)

Yu, Z. Q., Sun, L. L., Jiang, Z. Di, Liu, X. M., Zhao, D., Wang, H. T., *et al.* (2020). Atg38-Atg8 interaction in fission yeast establishes a positive feedback loop to promote autophagy. *Autophagy*, 16 (11), 2036–2051. <https://doi.org/10.1080/15548627.2020.1713644>

Zens, B., Sawa-Makarska, J., & Martens, S. (2015). In vitro systems for Atg8 lipidation. *Methods*, 75, 37–43. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2014.11.004>

Zientara-Rytter, K., Ozeki, K., Nazarko, T. Y., & Subramani, S. (2018). Pex3 and Atg37 compete to regulate the interaction between the pexophagy receptor, Atg30, and the Hrr25 kinase. *Autophagy*, 14 (3), 368–384. <https://doi.org/10.1080/15548627.2017.1413521>