

**Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta**

Studijní program: Molekulární biologie a biochemie organismů



Martina Pazourová

Membránová kontaktní místa u *Saccharomyces cerevisiae*
Membrane contact sites in *Saccharomyces cerevisiae*

Bakalářská práce

Vedoucí práce: Mgr. Irena Vopálenská, Ph.D.

Praha, 2025

Poděkování

Tímto bych chtěla poděkovat Mgr. Ireně Vopálenské, Ph.D. za vedení této bakalářské práce, za cenné rady, ochotu a v neposlední řadě za čas, který mi v průběhu zpracování této bakalářské práce věnovala.

Prohlášení

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

V Praze, 29. 4. 2025

Martina Pazourová

Abstrakt

Membránová kontaktní místa jsou mikrodomény organelových membrán držené vazebnými proteiny v těsné blízkosti. Tento blízký kontakt umožňuje komunikaci organel transportem metabolitů či signalizací, navíc se membránová kontaktní místa podílejí na biogenezi, dědičnosti či autofagii organel. Tato práce se zabývá charakterizací kontaktních míst, převážně peroxisomu, v kvasince *Saccharomyces cerevisiae*. Dále se zaměřuje na vazebné proteiny, na jimi tvořené komplexy a také na celkový význam a funkci kontaktních míst peroxisomu s endoplazmatickým retikulem, plazmatickou membránou, mitochondrií, lipidovými kapkami a vakuolou.

Klíčová slova: membránová kontaktní místa, *Saccharomyces cerevisiae*, peroxisom, endoplazmatické retikulum, plazmatická membrána, mitochondrie, lipidové kapky, vakuola, Pex3

Abstract

Membrane contact sites are organelle microdomains tethered in an immediate proximity by tether proteins. This proximity of tethered organelles enables interorganelle communication such as transport of metabolites and signalization. On top of that membrane contact sites facilitate organelle biogenesis, inheritance or autophagy. This review focuses on the characterization of membrane contact sites especially those of peroxisomes in the yeast model *Saccharomyces cerevisiae*. Tether proteins and the complexes they form, the overall importance and function of the peroxisome contact sites with endoplasmatic reticulum, plasmatic membrane, mitochondria, lipid droplets and vacuole will be discussed.

Keywords: membrane contact sites, *Saccharomyces cerevisiae*, peroxisome, endoplasmatic reticulum, plasmatic membrane, mitochondria, lipid droplets, vacuole, Pex3

Obsah

1	Seznam zkratk	5
2	Úvod	6
3	MCSs peroxisomu a ER	8
3.1	Biogeneze peroxisomu	8
3.2	Dělení a dědičnost peroxisomu	12
4	MCSs peroxisomu a plazmatické membrány	13
4.1	MECA	14
5	MCSs peroxisomu a lipidových kapek	16
5.1	Pexopodia a <i>gnarls</i>	16
5.2	Vznik LDs	18
6	MCSs peroxisomu a mitochondrie	20
6.1	ERMES	20
6.2	PerMit	22
6.2.1	Pex11	22
6.2.2	Pex34 a Fzo1	23
7	MCSs peroxisomu a vakuoly	25
7.1	VAPCONS	25
7.2	PerVale	26
8	Závěr	29
9	Seznam použité literatury	30

1 Seznam zkratek

Acetyl-CoA – acetyl-koenzym A

AMK – aminokyselina/y

BiFC – bimolekulární fluorescenční komplementace

cER – kortikální endoplazmatické retikulum

DAG – diacylglycerol

ER – endoplazmatické retikulum

ERMES – membránové kontaktní místo mitochondrie a endoplazmatického retikula

FM – fluorescenční mikroskopie

GA – Golgiho aparát

LDs – lipidové kapky

MCSs – membránová kontaktní místa

MECA – membránové kontaktní místo mitochondrie, endoplazmatického retikula a plazmatické membrány

PA – kyselina fosfatidová

PC – fosfatidylcholin

PDH komplex – pyruvátdehydrogenázový komplex

PE – fosfatidylethanolamin

pER – peroxisomální endoplazmatické retikulum

PerMit – membránové kontaktní místo peroxisomu a mitochondrie

PerVale – membránové kontaktní místo peroxisomu a vakuoly

PI – fosfatidylinositol

PI(4)P – fosfatidylinositol 4-fosfát

PI(4,5)P2 – fosfatidylinositol 4,5-bisfosfát

PM – plazmatická membrána

PMPs – peroxisomální membránové proteiny

PPVs – preperoxisomální váčky

SE – sterolové estery

TAG – triacylglycerol

TCA cyklus – citrátový cyklus

VAPCONS – membránové kontaktní místo peroxisomu a vakuoly

VMK – volné mastné kyseliny

2 Úvod

Membránová kontaktní místa (MCSs) kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* jsou mikrodomény membrán, ve kterých jsou membrány dvou nebo více organel vázané v bezprostřední blízkosti. Jsou od sebe vzdálené v rozmezí 10-80 nm, v literatuře se většinou udává vzdálenost 30 nm (Helle et al., 2013; Scorrano et al., 2019). Kontaktní místa mohou být tvořena jak organelami s dvojrstevnou membránou, tak i organelami s jednou lipidovou vrstvou, jako jsou například lipidové kapky (LDs) (Helle et al., 2013).

Vzájemnou asociaci membrán zajišťují tzv. *tether* proteiny, což jsou vazebné proteiny tvořící komplexy, které pojí dané organely k sobě. Tyto vazebné struktury drží membrány pomocí protein-protein interakcí či protein-lipid interakcí např. u LDs. Tím tvoří MCSs a udržují je v přechodném, dynamickém nebo stabilním stavu. Membrány v místech kontaktu nefúzíují (Helle et al., 2013; Scorrano et al., 2019). Výjimkou jsou však kontakty peroxisomu a LDs, kde membránové výběžky peroxisomu penetrují membrány LDs a zasahují do jejich jádra (Binns et al., 2006; Kalutski et al., 2022). Současné studie prokazují, že každá membránová organela tvoří kontaktní místo s minimálně jednou, většinou s více membránovými organelami (Kakimoto et al., 2018; Shai et al., 2018; Valm et al., 2017).

Díky kompartmentaci metabolických dějů do organel, ve kterých probíhají specifické biochemické reakce za specifických podmínek, vzešla potřeba komunikační sítě, která distribuuje metabolity a informace. Tato síť, kterou mimo jiné představují právě MCSs, zajišťuje koordinaci metabolismu a jeho efektivitu ve formě sdílení intermediátů (Helle et al. 2013; Prinz et al., 2020). Za centrální uzel této rozvětvené sítě je považováno ER, a to díky největšímu množství navázaných kontaktů (Helle et al., 2013; Valm et al., 2017).

MCSs mají mnoho funkcí, mezi ně patří např. vápníková signalizace, lipidová homeostáza, autofagie mitochondrie a peroxisomu, biogeneze peroxisomu a LDs, stresová odpověď, membránový transport a dědičnost organel (Binns et al., 2006; Bisinski et al., 2022; Böckler and Westermann, 2014; David et al., 2013; Hariri et al., 2018; Hulmes et al., 2020; Kawano et al., 2018; Kornmann et al., 2011; Liu et al., 2018; Wang et al., 2018).

Vzhledem k rozsahu práce se tato rešerše bude zabývat hlavně membránovými místy, které navazuje peroxisom, tedy kontaktními místy peroxisomu s endoplazmatickým retikulem (ER), plazmatickou membránou (PM), LDs, mitochondrií a vakuolou. Budou však zmíněna i kontaktní místa, která úzce souvisí s těmi peroxisomálními, konkrétně MCSs ER a mitochondrieERMES; MCSs mezi ER a LDs a MCSs tvořené ER, PM a mitochondrií.

Peroxisom také tvoří kontakt s Golgiho aparátem (GA). Avšak tato asociace membrány peroxisomu a membrány cisterny GA je velice dynamická, vzácná a metabolicky regulovaná.

Předpokládá se, že je to právě kvůli obratu cisteren GA. Tato nedávno popsaná MCSs dostala označení GoPo. Díky teprve nedávnému objevu existence těchto MCSs a jejich samotnému charakteru nebyla tato MCSs zatím podrobně popsána. Tento nedostatek informací otevírá možnost navazujícímu výzkumu (Castro et al., 2022).

3 MCSs peroxisomu a ER

Peroxisom je dynamická a konzervovaná jednomembránová organela eukaryotických buněk, jejíž hlavní funkce spočívá v signalizaci, homeostáze redoxních dějů, transferu metabolitů a hlavně v lipidovém metabolismu, protože β -oxidace mastných kyselin v kvasince *Saccharomyces cerevisiae* probíhá v peroxisomech (Farré et al., 2019; Joshi, 2021; Marchesini and Poirier, 2003). *S. cerevisiae* je také příhodným modelem pro studii peroxisomů, jelikož při růstu na proliferačním médiu, bohatém na kyselinu olejovou, tato kvasinka tvoří mnoho velkých peroxisomů (Hiltunen et al., 2003). Peroxisomy vznikají *de novo* z ER nebo dělením již existujících peroxisomů, tedy modelem *growth and division*, který v buňkách kvasinky převažuje (Motley and Hettema, 2007; Hoepfner et al., 2005; Mast et al., 2016).

MCSs mezi peroxisomem a ER zajišťují transport proteinů a membránových lipidů potřebných pro biogenezi, jelikož peroxisomy neobsahují potřebné enzymy na jejich syntézu. Tyto MCSs dále zajišťují dělení, sestavení a dědičnost peroxisomu (Ferreira and Carvalho, 2021; Joshi et al., 2016). Biogeneze peroxisomů a jejich asociace s ER je řízena proteiny ze skupiny peroxinů, kódovanými *PEX* geny (Distel et al., 1996).

3.1 Biogeneze peroxisomu

Nehledě na způsob vzniku peroxisomu musí být matrixové proteiny, peroxisomální membránové proteiny (PMPs) a lipidy z míst syntézy transportovány do nově vznikajícího peroxisomu (Jansen and van der Klei, 2019).

Do peroxisomu jsou lipidy transportovány jak nevezikulárním, tak vezikulárním způsobem, avšak poměr, jakým se tyto mechanismy podílejí na celkovém transportu lipidů, není dosud známý stejně jako jejich mechanismus a regulace (Jansen and van de Klei, 2019; Raychaudhuri and Prinz et al., 2008). Předpokládá se, že nevezikulární transport lipidů by mohl představovat dostatečný zdroj lipidů pro růst a dělení peroxisomů a umožňovat rychlou regulaci množství a složení lipidů v membránách. Není přesně známo, jak tento transport funguje, ale nejspíš je potřeba, aby došlo k přiblížení obou membrán či dokonce vytvoření kontaktu. Vezikulární transport, který představuje druhý způsob transportu lipidů do peroxisomů, pravděpodobně slouží spíše k přenosu některých integrálních membránových proteinů do peroxisomů (Raychaudhuri and Prinz et al., 2008).

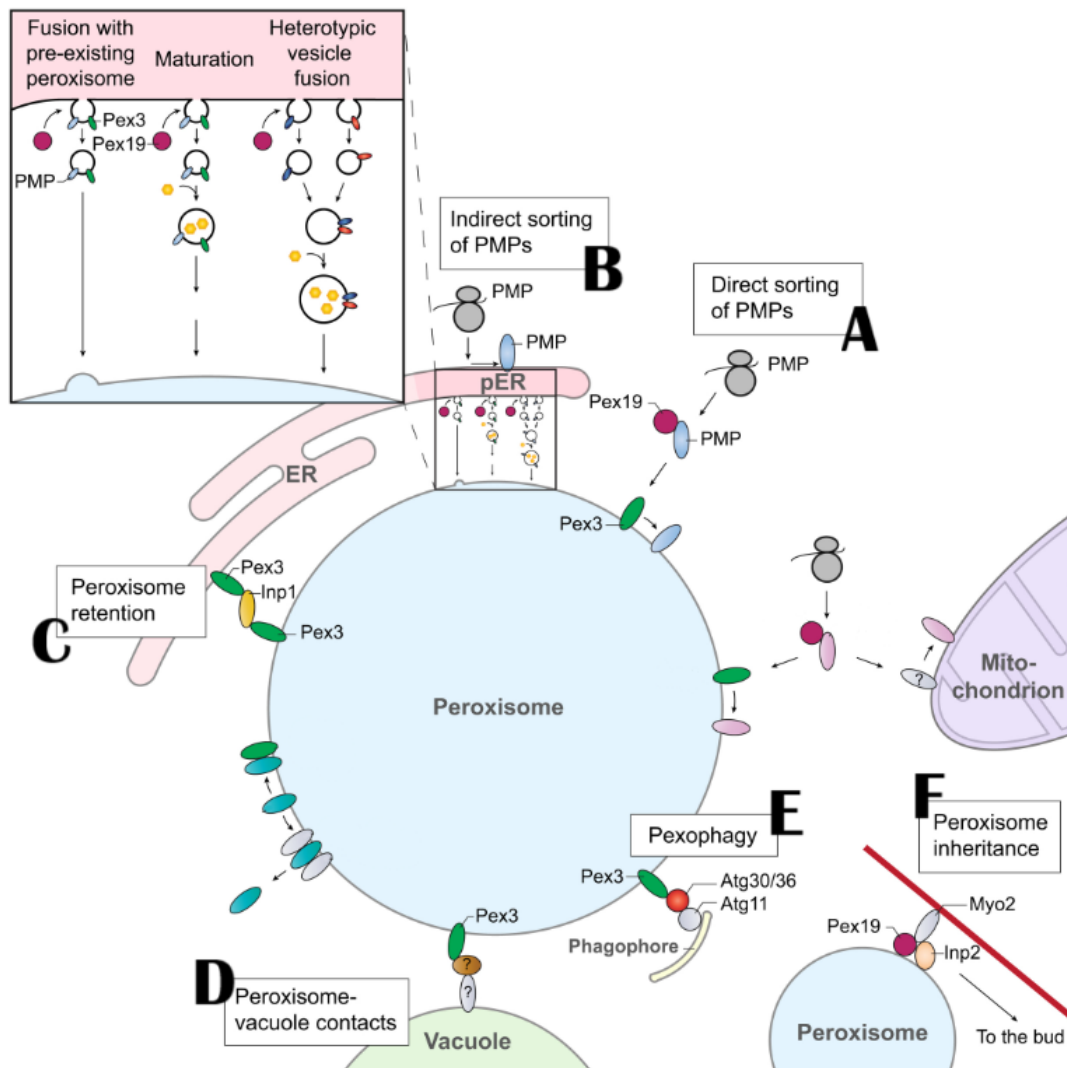
PMPs rozdělujeme do dvou tříd podle způsobu transportu. Přímé třídění PMPs třídy 1 do peroxisomu zajišťuje cytosolický receptor (chaperon) Pex19 a peroxisomální membránový protein Pex3 (Obr. 1A). Pex19 naváže nové translatované PMPs a donese je k membráně peroxisomu, kde následně váže Pex3, který funguje jako *docking* faktor a začleňuje nové PMPs

do membrány peroxisomu zatím neznámým způsobem (Jansen and van der Klei, 2019; Jones et al., 2004). Nepřímé třídění PMPs třídy 2 (např. Pex3) do peroxisomu probíhá vložení PMPs nejprve do membrány ER přes Sec61 a Get3 transporterové komplexy (Obr. 1B). PMPs se následně shromažďují do subdomén označovaných peroxisomální ER (pER), odkud poté pučí vezikuly, které fúzí s již existujícími peroxisomy, nebo samy maturují do peroxisomů (Fakieh et al., 2013; Tam et al., 2005; van der Zand et al., 2010).

Matrixové proteiny v nativní konformaci do peroxisomu importuje peroxisomální transportní komplex. Skládá se z *docking* komplexu (Pex13, Pex14 a Pex17) a RING proteinů (Pex2, Pex10 a Pex12). Cytosolický receptor Pex5 váže matrixové proteiny s peroxisomální cílovou sekvencí PTS1, která obsahuje aminokyselinovou sekvenci SKL na C-terminálním konci proteinu. Následně váže *docking* protein Pex14 změnou své topologie na membránou vázanou formu, a tím tvoří transportní pór, kterým jsou matrixové proteiny transportovány do peroxisomu (Gould et al., 1989; Meinecke et al., 2010; van der Zand et al., 2010).

Biogeneze *de novo* peroxisomů začíná lokalizací PMPs do domén pER, ze kterých pučí preperoxisomální váčky (PPVs), ty pak postupně fúzí a maturují do peroxisomu (Ferreira and Carvalho, 2021; Joshi et al., 2016; van der Zand et al., 2010; van der Zand et al., 2012). První kroky formace PPVs a třídění PMPs do pER iniciují a řídí peroxiny Pex3 a Pex19 (Agrawal et al., 2016).

Při studiu *pex* mutantů bylo dokázáno, že kmeny s delecí genů *PEX3* (kmeny *pex3Δ*) a *PEX19* (kmeny *pex19Δ*) nedokáží správně lokalizovat PMPs do domén pER, ve kterých vznikají PPVs. To znemožňuje samotný vznik PPVs. Z výsledků těchto experimentů autoři vyvodili, že peroxiny Pex3 a Pex19 jsou nezbytné pro biogenezi peroxisomů (Hettema et al., 2000). V navazujících studiích bylo však dokázáno, že buňky neprodukující Pex3 PPVs tvoří, avšak tyto PPVs obsahují jen některé PMPs, které se do nich dostávají způsobem nezávislým na Pex3 (Wróblewska et al., 2017). Wróblewska et al. (2017) také prokázali, že v kmenech *pex3Δ* se PMPs (konkrétně Pex14) nehromadí v ER, ale v malých peroxisomálních váčkách schopných importu proteinů. U kvasinky *Hansenula polymorpha* (synonymum *Ogataea Polymorpha*) vede delece *PEX3* k selektivní autofagii těchto váček, protože pexofagii v této kvasince spouští právě nepřítomnost Pex3. U kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* jsou váčky nesoucí PMPs v *pex3Δ* buňkách poměrně stabilní. Pex3 asociuje s receptorem pro pexofagii Atg36, který interaguje s Atg11. Atg11 poté umožňuje kontakt s fagoforem a výslednou degradaci peroxisomu (Obr. 1E). Díky odlišné funkci Pex3 v kvasince *S. cerevisiae* delece genu *PEX3* selektivní pexofagii neaktivuje (Knoops et al., 2014; Motley et al., 2012; Wróblewska et al., 2017). Ačkoliv jsou proteiny Pex3 a Pex19 stále podrobovány intenzivnímu výzkumu, zatím nebylo objasněno, jak přesně operují (Jansen and van der Klei, 2019).

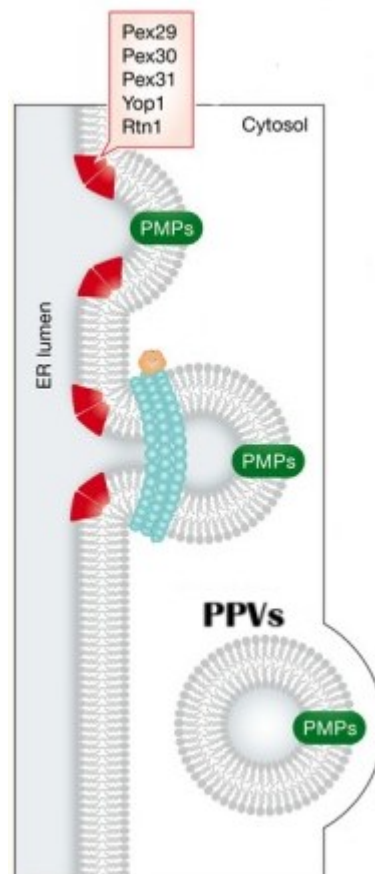


Obrázek 1 Funkce Pex3 v peroxisomu. (A) Přímé třídění PMPs: Pex19 váže nově translatované PMPs a Pex3, který začleňuje tyto PMPs do membrány peroxisomu. (B) Nepřímé třídění PMPs: PMPs jsou nejprve vloženy do membrány ER a akumulují se v pER odkud pučí PPVs pomocí Pex19 a buď fúzí s již existujícími peroxisomy, sami maturují do peroxisomů, nebo fúzí s ostatními váčky a formují tak peroxisomy. Žluté šestiúhelníky vyobrazují proteiny peroxisomální matrix transportované peroxisomálním transportním komplexem. (C) Komplex proteinu Inp1 vázaného na peroxisomální Pex3 a Pex3 endoplazmatického retikula kotví peroxisom k ER. (D) Pex3 tvoří MCSs s vakuolou. (E) Pex3 interaguje s Atg36 a Atg11, Atg11 váže fagofor. (F) Transport nekotveného peroxisomu označeného Inp2 proteinem, který váže Myo2 a Pex19. Peroxisom je takto transportován do pupenu (převzato a volně upraveno podle Jansen and van der Klei, 2019).

V MCSs peroxisomu a ER u kvasinky *S. cerevisiae* figurují integrální membránové proteiny ER Pex29, Pex30 a jeho paralog Pex31. Tyto peroxiny jsou lokalizovány do subdomén membrány (Ferreira and Carvalho, 2021; Joshi et al., 2016; Viceacoumar et al., 2003; Viceacoumar et al., 2004). Pex29 tvoří komplex s Pex30 a také s proteinem z rodiny retikulonů Rtn1 a proteinem Yop1 (Obr. 2). Rtn1 a Yop1 jsou rovnoměrně lokalizovány na vnější membráně ER a stabilizují její zakřivení (David et al., 2013; De Craene et al., 2006; Mast et al., 2016). Při studiu kmenů s delecí genu *PEX30* byla pozorována zvýšená biogeneze, tedy vyšší počet peroxisomů, zatímco delece

PEX31 vedla ke zvětšení peroxisomů. Při studiu kmenů s delecí genu *PEX29* bylo pozorováno zvýšení počtu peroxisomů, avšak samotné peroxisomy byly menší a shlukovaly se (David et al., 2013; Vizeacoumar et al., 2003; Vizeacoumar et al., 2004). I z dalších studií vyplývá, že komplex Pex29/Pex30 reguluje *de novo* biogenezi peroxisomu, a také pomáhá generovat místa biogeneze PPVs a zakřivovat membránu při pučení PPVs (David et al., 2013; Joshi et al., 2016; Mast et al., 2016; Vizeacoumar et al., 2004; Voeltz et al., 2006).

I když Pex30 a Pex31 nejsou pro tvorbu PPVs esenciální, jsou potřebné pro jejich správnou biogenezi a mobilitu (Vizeacoumar et al., 2004). Lokalizace Pex30 do subdomén ER, kde probíhá tvorba PPVs, a jeho signifikance byly potvrzeny jeho kolokalizací s nově syntetizovanými PMPs Pex14, které jsou právě zde transportovány do PPVs (Joshi et al., 2016). Způsob, jakým jsou přesně místa biogeneze stanovena a regulována, není dosud známý (Ferreira and Carvalho, 2021).



Obrázek 2 Peroxiny Pex29, Pex30 a Pex31 interagují s proteiny Yop1 a Rtn1 a zajišťují zakřivení membrány na místech vzniku PPVs (převzato a upraveno podle Farré et al., 2018).

3.2 Dělení a dědičnost peroxisomu

V buňkách *S. cerevisiae* jsou MCSs esenciální pro správnou segregaci peroxisomů mezi mateřskou a dceřinou buňkou v průběhu mitózy, kdy nové peroxisomy putují do dceřiné buňky a staré zůstávají v mateřské buňce, čímž je zajištěna dědičnost (Choudhry et al., 2018).

Předpokládá se, že při tomto ději vznikají MCSs obsahující Pex3 protein vázaný na membránu kortikálního ER (cER), druhý Pex3 protein, který je součástí membrány peroxisomu, a protein Inp1 (Obr. 1C). Inp1 je periferní membránový protein peroxisomu a je s to vázat Pex3 na svůj N-terminální i C-terminální konec. Funguje tedy jako molekulární pant a zadržuje tak peroxisom v mateřské buňce (Fagarasanu et al., 2005; Knoblach et al., 2013; Wu et al., 2018).

Studiem ortologů Inp1 bylo zjištěno, že protein obsahuje na C-terminálním konci konzervovaný leucinový motiv LNYLL, obklopený negativně nabitými aminokyselinami (AMK), v pozici 312-316 AMK. Tento motiv je nezbytný pro samotnou vazbu na Pex3. Je také nápadně podobný motivu vazby mezi Pex3 a Pex19, který označujeme jako LXXLL. Pex3 a Pex19 jsou nezbytné pro biogenezi peroxisomů (viz podkapitola 3.1; Hettler et al., 2000). Díky podobnosti vazebných motivů Inp1 a Pex19, dochází ke kompetici o vazbu proteinu Pex3. To bylo prokázáno nadměrnou expresí Inp1, která vedla ke ztrátě peroxisomů (Hulmes et al., 2020; Sato et al., 2010).

Asymetrickým dělením peroxisomů vzniká nový neukotvený peroxisom neobsahující Inp1, který je aktivně transportován do dceřiné buňky. Starý peroxisom zůstává nadále vázaný díky Pex3 a Inp1 k cER v mateřské buňce. Transport neukotveného peroxisomu zajišťuje vazba receptoru Inp2, který se váže na neukotvený peroxisom a zároveň interaguje s motorovým proteinem myosinem Myo2 (Obr. 1F). Myo2 váže aktinová filamenta a umožňuje transport peroxisomu podél aktinových filament do pupenu (Knoblach et al., 2013; Saraya et al., 2010). Pex19 stabilizuje interakci Myo2 a Inp2 (Otzen et al., 2012). Transportu neukotveného peroxisomu správným směrem napomáhá protein Inp1, který je kotvený přes Pex3 na cER v pupenu (Fagarasanu et al., 2005; Knoblach et al., 2013).

Výsledky novějších studií nepodporují model pantu a vazby Inp1 na Pex3 peroxisomu a cER. Předpokládají lokalizaci Inp1 na straně peroxisomu sousedící s plazmatickou membránou v místech zřetelně prostorově oddělených od ER. To poukazuje na existenci kontaktních míst mezi peroxisomy a PM. (viz kapitola 4; Hulmes et al., 2020; Krikken et al., 2020). Tyto objevy však nevylučují existenci jiného vazebného místa v proteinu Inp1, existenci dalších vazebných složek, možnost úplné nezávislosti MCSs peroxisomu a ER na Inp1 a možnost funkce Inp1 v kontaktních místech peroxisomu s jinými organelami (Hulmes et al., 2020; Knoblach and Rachubinski, 2019).

4 MCSs peroxisomu a plazmatické membrány

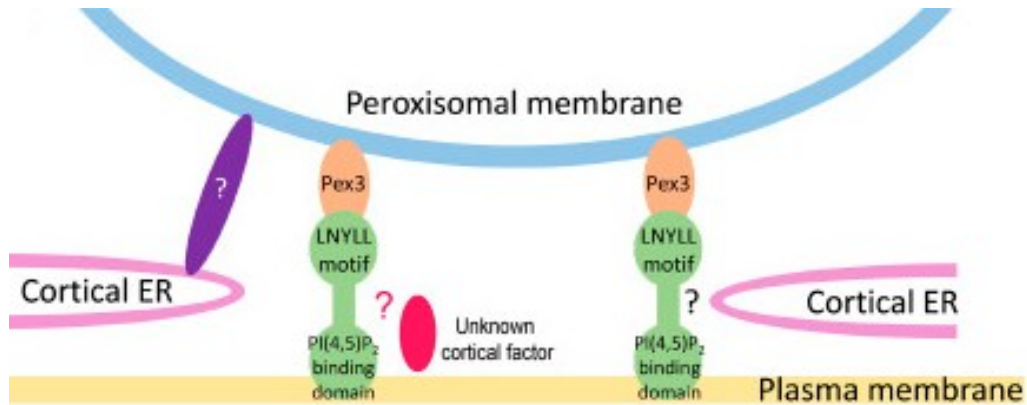
Membránový kontakt peroxisomu a plazmatické membrány vzniká při dělení peroxisomu a je klíčový pro dědičnost (Hulmes et al., 2020).

Součástí MCSs peroxisomu a PM je Inp1, který se váže na peroxisomální protein Pex3. C-terminální doména proteinu Inp1 váže Pex3 díky konzervovanému LNYLL motivu, což tvoří propojení mezi peroxisomální membránou a membránou plazmatickou (viz podkapitola 3.2; Obr. 3; Hulmes et al., 2020). Inp1 ukotvuje peroxisomy asociací s plazmatickou membránou díky 100 AMK dlouhé části své N-terminální domény, která váže fosfatidylinositol 4,5-bisfosfát (PI(4,5)P₂) (Hulmes et al., 2020).

Část proteinu Inp1 zodpovědná za vazbu a úspěšnou asociaci peroxisomu k plazmatické membráně byla prokázána vytvořením minimální verze N-terminálních 100 AMK Inp1, která dokázala v buňkách s delecí *inp1Δ* pod promotorem *INP1* vázat PM. Ostatní verze (100-420) nekotvily peroxisomy k PM. Kotvení pomocí Inp1 bylo dále potvrzeno vytvořením umělé vazebné spojky fúzí GFP-Pex15 (Pex15 je integrální membránový protein peroxisomu) a PH domény Num1. Tato doména proteinu Num1 také váže PI(4,5)P₂, avšak působí v MCSs mitochondrie a PM (viz podkapitola 4.1; Casler et al., 2024). Umělá vazebná spojka dokázala obnovit kotvení peroxisomu k PM v buňkách s delecí *inp1Δ*. Minimální Inp1 ani umělá spojka však nedokázaly obnovit správnou lokalizaci peroxisomů, které byly často pozorovány ve shlucích u krčku pupenu. To poukazuje na další funkce Inp1 (Hulmes et al., 2020). Hulmes et al. (2020) nepotvrdili interakci N-terminálního konce Inp1 s Pex3, což dále nekoresponduje s výsledky Knobloch et al. (2013).

Vazba Inp1 přímo na PI(4,5)P₂ byla prokázána *in vitro*. Byly použity umělé lipozomy obsahující fosfatidylcholin (PC), fosfatidylethanolamin (PE), 22% PI(4)P, PI(4,5)P₂, fosfatidylserin (PS) a Inp1 purifikován z bakterie *Escherichia coli* označený pomocí MBP (MBP-Inp1). Ze všech lipozomů MBP-Inp1 vázal právě lipozomy PC/PE obsahující PI(4,5)P₂ (Hulmes et al., 2020). Tento lipid je součástí plazmatické membrány, kde se také syntetizuje z fosfatidylinositol 4-fosfátu (PI(4)P) (Martinez Marshall et al., 2019).

Tato vazba peroxisomu k plazmatické membráně zajišťuje jeho zadržení v mateřské buňce při dělení (viz podkapitola 3.2). Zvláštní shlukování peroxisomů při nahrazení Inp1 (minimálním Inp1 nebo umělou spojkou) vypovídá o existenci dalších funkcí Inp1, existenci dalších možných vazebných složek či potřebě dalších MCSs s dalšími organelami pro správné ukotvení peroxisomů k PM. Nabízí se možnost existence trojného membránového kontaktního místa, kde by hrálo roli cER, jako je tomu u MCSs, mitochondrie a PM, označených MECA (Casler et al., 2024; Hulmes et al., 2020; Knobloch and Rachubinski, 2019).



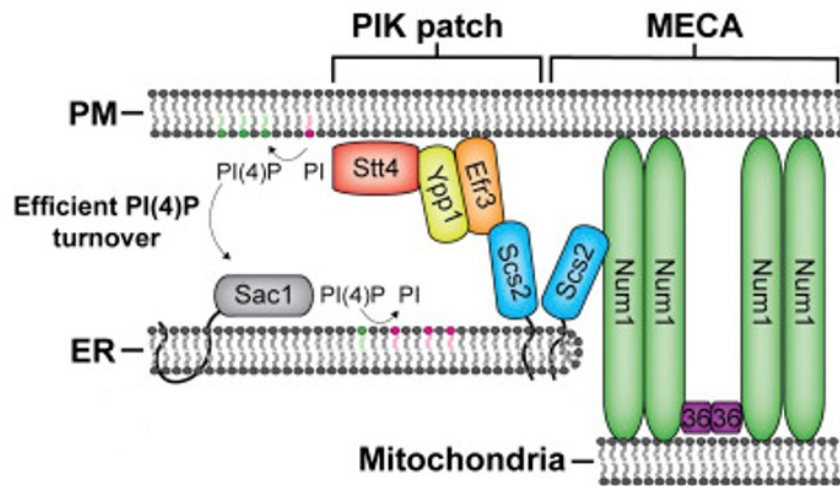
Obrázek 3 *Inp1* LNYLL motivem váže peroxisomální *Pex3* a díky své N-terminální doméně váže $PI(4,5)P_2$, čímž vytváří kontakt mezi peroxisomem a plazmatickou membránou. Další možné vazebné složky či kontakty s dalšími organelami zatím nejsou známy (převzato a upraveno podle Hulmes et al., 2020).

4.1 MECA

Lépe charakterizovanými kontaktními místy oproti MCSs peroxisomu a PM jsou MCSs MECA. MECA kotví mitochondrie k PM a ER. Dá se tedy považovat za organizační centrum důležité pro komunikaci mezi ER, PM a mitochondrií. Figuruje při mitochondriálním dělení a nově byla objevena funkce těchto kontaktů v regulaci obratu fosfatidylinositol-4-fosfátu $PI(4)P$ (Casler et al., 2024).

Skládá se ze tří podjednotek, a to Num1, Mdm36 a Scs2 (Obr. 4; Lackner et al., 2013). Num1 svou C-terminální PH doménou váže $PI(4,5)P_2$ na plazmatické membráně a N-terminální CC doménou váže kardiolipin na membráně mitochondrie a přímo interaguje s mitochondriálním membránovým proteinem Mdm36. Toto připojení generuje napětí membrány potřebné pro správné rozdělení mitochondrie (Hammermeister et al., 2010; Won et al., 2021). Num1 interaguje také s integrálním proteinem ER Scs2, a to motivem FFAT na své C-terminální doméně. Tím vzniká vazba mezi ER a PM (Casler et al., 2024).

Analýzou Num1 pro vyhledání potenciálních interakčních partnerů byly nalezeny tři nové složky, a to Ypp1, Erf3 a kináza Stt4 (Casler et al., 2024). Tyto proteiny formují komplex na PM, který fosforyluje fosfatidylinositol (PI) na $PI(4)P$ (Baird et al., 2008). Tento komplex se nachází v místech PIK, které sousedí s kontakty MECA. Nedávná studie navrhl, že funkcí Num1 v regulaci obratu $PI(4)P$ je zajištění prostorové organizace membrán a všech přítomných proteinů včetně Sac1. Právě tím se zvýší účinnost obratu $PI(4)P$ zprostředkovaného fosfatázou Sac1 (Casler et al., 2024).



Obrázek 4 MCSs MECA, která se skládají z proteinů Num1, Mdm36 a Scs2, tvoří komunikační centrum mezi mitochondrií, ER a plazmatickou membránou. MECA sousedí s PIK místy, kde se nachází komplex Stt4/Ypp1/Efr3. Tento komplex syntetizuje PI(4)P z PI. MECA zajišťuje vhodnou prostorovou orientaci pro obrat PI(4)P fosfatázou Sac1, která se nachází v membráně ER (převzato a upraveno podle Casler et al., 2024).

5 MCSs peroxisomu a lipidových kapek

Lipidové kapky (LDs) slouží eukaryotickým buňkám jako zásobárna volných mastných kyselin (VMK) ve formě neutrálních lipidů, např. triacylglycerolu (TAG) a sterolových esterů (SE), které se nachází v jádře LDs. Jádro je obaleno jednou vrstvou fosfolipidů (Faresse and Walther, 2009). Další funkcí LDs je segregace lipidů, která zabraňuje buněčné toxicitě, protože nadbytek VMK, které nejsou vloženy do LDs, vyvolává programovanou buněčnou smrt nebo nekrózu (Eisenberg and Büttner, 2014). V kvasince *Saccharomyces cerevisiae* jsou LDs spojeny s endoplazmatickým retikulu (Jacquier et al., 2011).

Důležitost kontaktních míst mezi peroxisomy a LDs vyplývá z funkce obou organel v udržování lipidové homeostázy a možnosti propojení jejich metabolismů. Na lipolýzu, tedy rozklad TAG na VMK, probíhající v LDs funkčně navazuje β -oxidace mastných kyselin, tedy štěpení VMK na acetyl-koenzym A (acetyl-CoA), v peroxisomu (Binns et al., 2006).

Ačkoli byl pozorován kontakt mezi peroxisomy a LDs a analýza interaktomu odhalila interakce proteinů LDs Erg6 a Pet10 s proteiny peroxisomu (konkrétně Pex5, Pex3, Inp1 a některými RING proteiny) (Pu et al., 2011), konkrétní vazebný protein tvořící MCSs nebyl u *Saccharomyces cerevisiae* nalezen (Binns et al., 2006; Joshi, 2021).

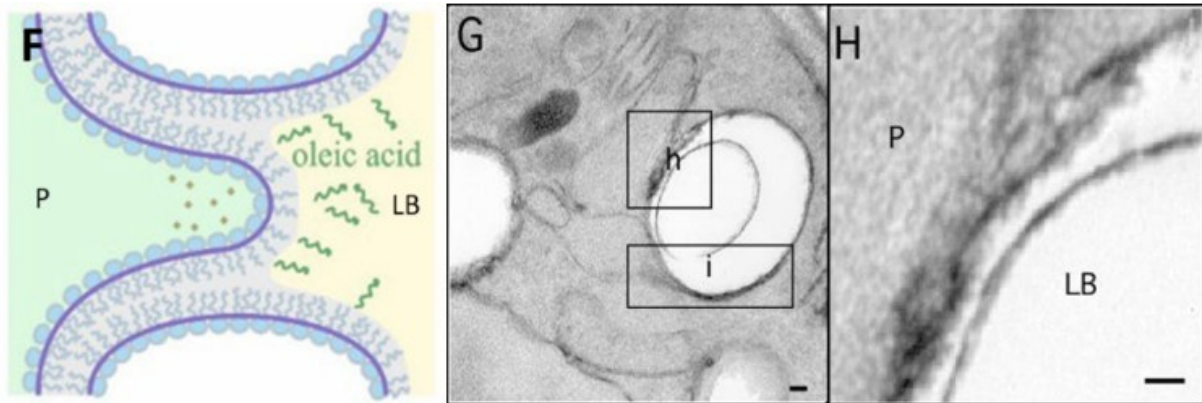
5.1 Pexopodia a *gnarls*

Při růstu v kultivačním médiu s kyselinou olejovou generuje buňka velké LDs a peroxisomy, které jsou přehlceny enzymy pro oxidaci mastných kyselin (Hiltunen et al., 2003; McCammon et al., 1990). Díky transmisní elektronové mikroskopii bylo zjištěno, že peroxisomy v kvasince *Saccharomyces cerevisiae* v těchto podmínkách tvoří tzv. pexopodia, prstům podobné membránové výběžky. Pexopodia zasahují do centra LDs, kde probíhá fúze membrány lipidové kapky s vnějším listem peroxisomální membrány (Obr. 5; Binns et al., 2006; Kong et al., 2020).

Nejspíše právě zde probíhá propojení metabolismu mastných kyselin a jejich přenos, protože frekvence tvorby pexopodií a celkový kontakt mezi peroxisomem a LDs se zvýší při hladovění, kdy jsou buňky nuceny použít zásoby mastných kyselin z LDs. Tento předpoklad utvrdil výsledek proteolýzy a hmotnostní spektrometrie purifikovaných LDs. Mimo jiných proteinů bylo identifikováno 8 peroxisomálních proteinů β -oxidační dráhy kyseliny olejové, což prokazuje, že pexopodia jsou obohacena o enzymy β -oxidace, a peroxisomy tedy dokáží rozšířit metabolické procesy, jako právě β -oxidaci mastných kyselin, do jader LDs (Binns et al., 2006; Kong et al., 2020).

Nedávná studie použitím molekulárního dynamického modelování odhalila možný způsob fúze membrán peroxisomu a LDs, tedy vznik a růst pexopodií. Proces začíná lokálním spojením vnějších vrstev membrán organel, což vytvoří krček, přechodnou strukturu tvarem

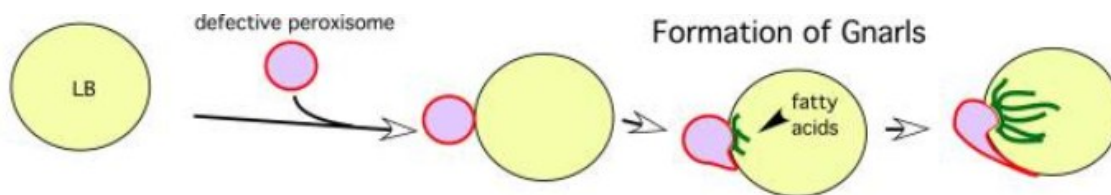
připomínající přesýpací hodiny (Markin et al., 1984). Tato struktura se nadále rozšiřuje inkorporací VMK, např. kyseliny olejové, do membrány a dává vznik pexopodiím. Kyselina olejová indukuje negativní spontánní zakřivení membrány, díky kterému pexopodia rostou do jádra LDs (Kalutsky et al., 2022).



Obrázek 5 (F) Tvorba pexopodií fúzí membrán peroxisomu (P) a lipidové kapky (LB), mastné kyseliny (vyznačeny zeleně) jsou zde připraveny na oxidaci β -oxidačními enzymy (hnědé tečky) a difúzi do peroxisomu (převzato a upraveno podle Kalutsky et al., 2022). (G) Snímek pořízen transmissním elektronovým mikroskopem zachycuje interakce (označeny h, i) lipidové kapky s hned dvěma peroxisomy. (H) je zvětšení čtverce h ze snímku (G). (H) Zachycuje peroxisom (P) penetrující lipidovou kapku (LB), tato inkluze se označuje jako pexopodium. Měřítka (G, H) je 50 nm (převzato a upraveno podle Binns et al., 2006).

Kontakt membrány poškozeného peroxisomu a LDs vede k tvorbě tzv. *gnarls*, což jsou protáhlé 10-30 nm široké tubuly vyčnívající z LDs, jejichž lumen často ústí do jádra LDs (Obr. 6; Binns et al., 2006).

Gnarls se výjimečně vyskytují i v nemutovaných buňkách, častěji byly ale pozorovány v mutovaných buňkách. Například u kmene s delecí *pex5Δ* obsahovalo tyto struktury 50 % buněk. Peroxin Pex5 je cytosolický receptor nutný pro transport peroxisomálních matrixových proteinů (viz kapitola 3.1) včetně dvou enzymů β -oxidace mastných kyselin. Ztráta Pex5 tudíž vede k nepřítomnosti této katabolické dráhy. *Gnarls* tedy nejsou manifestace peroxisomálních membrán, protože v nich nebyly nalezeny žádné peroxisomální membránové proteiny. Jsou to pravděpodobně struktury volných mastných kyselin, k jejichž nadbytečné syntéze dochází při kontaktu peroxisomu s LDs, kdy jsou stimulovány zatím neznámé lipázy. Jelikož VMK nemohou být v tomto případě metabolizované peroxisomem, hromadí se do těchto struktur (Binns et al., 2006).



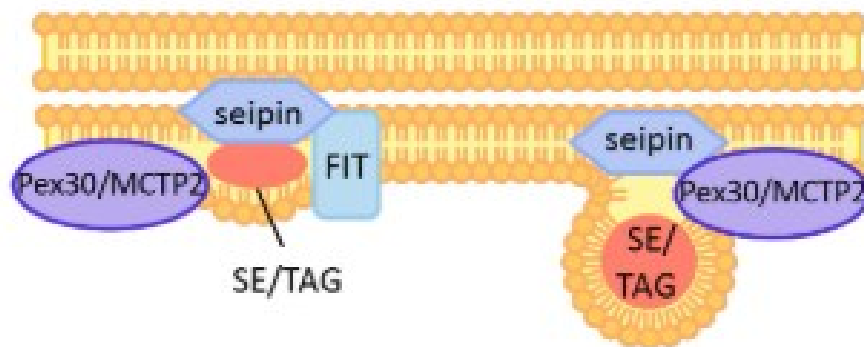
Obrázek 6 Tvorba struktur volných mastných kyselin lipidovou kapkou (LB) za přítomnosti peroxisomu, který je neschopný oxidovat mastné kyseliny (převzato a upraveno podle Binns et al., 2022).

Lze tedy předpokládat, že *gnarls* jsou formovány v přítomnosti peroxisomů neschopných metabolizovat mastné kyseliny a pexopodia slouží jako místo pro oxidaci mastných kyselin a jejich přenesení do peroxisomu, čímž se kompletně vyhnou průchodu cytosolem (Binns et al., 2006).

5.2 Vznik LDs

Nascentní LDs vznikají pučením z ER. Jejich biogeneze zahrnuje kooperaci peroxinu Pex30 se seipin proteinem Fld1, který je v komplexu s membránovým proteinem ER Ldb16 a FIT proteiny (Obr. 7; Szymanski et al., 2007; Wang et al., 2018). Pro svoji formaci využívají, stejně jako peroxisomy, ER protein Pex30, což nasvědčuje lokalizaci biogeneze LDs a peroxisomů do stejné subdomény ER (Joshi et al., 2018). Po maturaci obvykle zůstanou s těmito subdoménami spojeny (Jacquier et al., 2011; Joshi et al., 2018).

Tento seipin komplex Fld1/Ldb16 stabilizuje membránové spojení mezi ER a LDs. Při jeho absenci se tvoří abnormální LDs, určuje směr pučení LDs, vytváří difuzní bariéru řídicí sestavení LDs a řídí distribuci proteinů a enzymů jako např. Pah1 (Grippa et al., 2015; Wang et al., 2014; Wang et al., 2018; Wolinski et al., 2015). Pah1 reguluje produkci TAG tím, že mění kyselinu fosfatidovou (PA) na diacylglycerol (DAG), což je prekurzor pro TAG (Adeyo et al., 2011; Karanasios et al., 2013; Wolinski et al., 2015). FIT proteiny Scs3 a Yft2 nejspíš regulují množství DAG v místech biogeneze LDs, jelikož akumulace DAG je pro buňku toxická (Choudhary et al., 2015). TAG jako neutrální lipid nezůstává ve fosfolipidové vrstvě membrány, ale hromadí se mezi dvěma listy membrány, kde tvoří jádro LDs (Cohen et al., 2019).



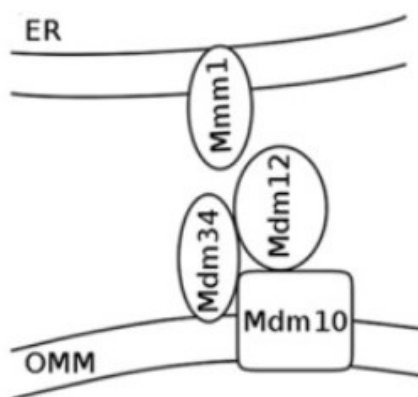
Obrázek 7 Biogeneze LDs. Neutrální lipidy jako triacylglycerol (TAG) a sterolové estery (SE) se shlukují v membráně ER a tvoří jádra LDs. Tyto subdomény jsou obohaceny o seipin, FIT proteiny a Pex30. Po dokončení maturace LDs zůstávají spojeny s těmito Pex30, seipin subdoménami (převzato a upraveno podle Joshi and Cohen et al., 2019).

6 MCSs peroxisomu a mitochondrie

Peroxisom a mitochondrii funkčně propojuje jejich metabolismus. Produktem β -oxidace, která probíhá v peroxisomech, je acetyl-CoA, což je výchozí substrát citrátového cyklu (TCA cyklus), který probíhá v mitochondriích (Marchesini et al., 2003). Díky této blízké souvislosti není překvapivé, že peroxisom a mitochondrie sdílí některé proteiny, např. proteiny důležité pro dělení těchto organel, a že spolu navazují membránový kontakt (Ast et al., 2013). Místa kontaktu peroxisomu s mitochondrií nejsou rozmístěna náhodně, vyskytují se v místech kontaktu mitochondrie a ER označovaných ERMES a v místech syntézy acetyl-CoA dehydrogenací pyruvátu komplexem PDH (Cohen et al., 2014; Kresze and Ronft, 1981). Kontakt peroxisomů s mitochondriemi se také ukázal podstatným pro pexofagii (Liu et al., 2018).

6.1 ERMES

ERMES je vazebným komplexem ER a mitochondrie. Skládá se ze 4 podjednotek Mdm10, Mdm34, Mmm1 a Mdm12 a drží tyto dvě membrány v blízkosti (Obr. 8; Kornmann et al., 2009). Integrovaní β -barely Mdm10 a Mdm34 připojený periferně jsou vnější mitochondriální membránové proteiny. Mdm12 je mitochondriální cytosolický komponent komplexu a Mmm1 je integrovaný v ER membráně (Ellenrieder et al., 2016; Kornmann et al., 2009; Mattiazzi Ušaj et al., 2015).



Obrázek 8 Struktura komplexu ERMES. Mdm10 spolu s Mdm34 jsou mitochondriálními membránovými proteiny. Mdm12 je cytosolický protein a Mmm1 je protein membrány ER (převzato a upraveno podle Mattiazzi Ušaj et al., 2015).

ERMES je lokalizován v subdoménách a přímo či nepřímo zajišťuje syntézu a translokaci glycerofosfolipidů, import proteinů, mitofagii a vápníkovou signalizaci (Achleitner et al., 1999; Boldogh et al., 2003; Kornman et al., 2009).

ERMES kolokalizuje s fosfatidylserin dekarboxylázou Psd1, která přeměňuje fosfatidylserin (PS), syntetizovaný v membráně ER, na fosfatidylethanolamin (PE) po jeho transportu do mitochondrie. PE je poté převeden zpět do ER a přeměněn na fosfatidylcholin (PC), což je nejhojnější fosfolipid v membránách buňky (Vance, 1990). Předpokládá se tedy, že ERMES figuruje

v transportu fosfolipidů, zda ho přímo umožňuje však zůstává sporné (Kawano et al., 2018; Kornmann et al., 2009; Okamoto et al., 2009). Existují dva modely, jak by mohl probíhat fosfolipidový transfer Kawano et al., 2018).

Podle prvního modelu *lipid carrier model* se jedná o dynamický proces, kdy Mmm1 extrahuje lipid z membrány, který se otočí, a tím se přenesení na Mdm12 a poté na Mdm34 (Kawano et al., 2018). Podle druhého modelu *continuous conduit model* se jedná o nedynamický stabilní proces přenosu hydrofobním tunelem, který vede všemi třemi podjednotkami ERMES do vnější membrány mitochondrie (Kawano et al., 2018).

Možnost funkce ERMES v biogenezi a regulaci importu proteinů naznačuje protein Mdm10, který je nezávisle na ERMES také součástí komplexu SAM. Komplex SAM vkládá proteiny do vnější mitochondriální membrány a pomáhá jejich sestavení (Kornmann et al., 2009; Meisinger et al., 2007). Bylo prokázáno, že Mdm10 střídavě váže komplex SAM a komplex ERMES svými opačnými vazebnými místy, což značí separaci funkcí ERMES a komplexu SAM (Ellenrieder et al., 2016).

Mitofagie je selektivní autofagie, kdy dochází k degradaci poškozených mitochondrií. Umělá spojka ER a mitochondrie v kmenech s mutací komplexu ERMES částečně obnoví mitofagii. Dále bylo zjištěno, že podjednotka komplexu ERMES Mmm1 kolokalizuje s cytosolickým proteinem Atg8, který pomáhá formaci mitofagosomu. Mitofagosom je mitochondrie již obalená dvojitou membránou fagoforu, připravena na splynutí s vakuolou a degradaci (Reggiori and Klionsky, 2013). Komplex ERMES tedy kolokalizuje s místy vzniku mitofagosomu a je možné, že mu dodává lipidy pro jeho rostoucí membránu (Böckler and Westermann, 2014).

Za regulační podjednotku komplexu ERMES se považuje Rho GTPáza Gem1 vázající vápník. Je lokalizována do vnější membrány mitochondrie a součástí její cytosolické domény jsou dva *EF-hand* motivy spojující dvě GTPázové domény. Tyto motivy váží vápník, a tím umožňují vápníkovou signalizaci (Frederic et al., 2004; Kornmann et al., 2011; Murley et al., 2013; Stroud et al., 2011).

Velikost a počet ERMES subdomén je regulován MCSs MECA, které řídí distribuci mitochondriální sítě (Casler et al., 2025; Lackner et al., 2013). V nepřítomnosti kontaktů MECA se mitochondriální síť rozpadá a zmenšená se nachází blíže středu buňky dále od vázaného ER na PM. Komplexů ERMES tedy vzniká méně, mají však větší velikost. Zároveň je narušen transport lipidů (Casler et al., 2025).

6.2 PerMit

6.2.1 Pex11

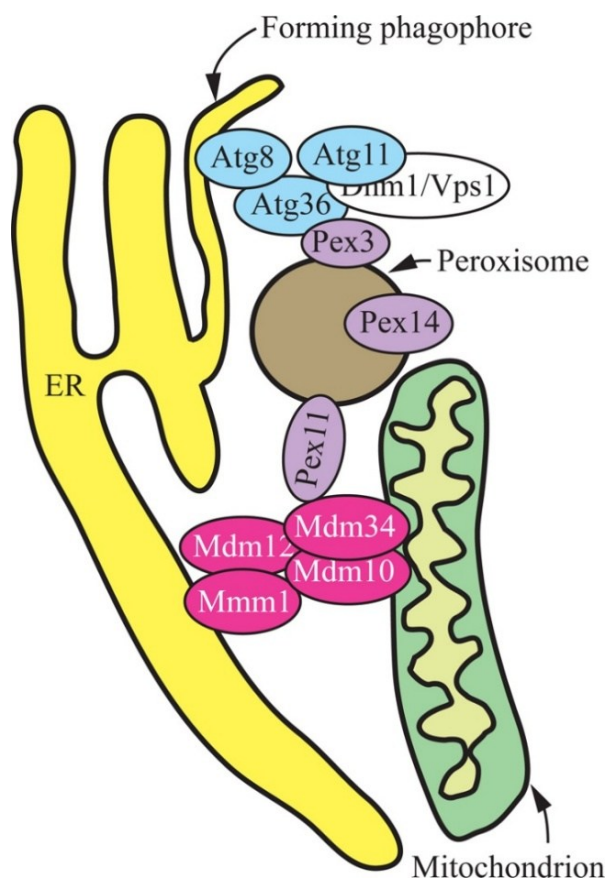
Na vytváření kontaktních míst peroxisomu a mitochondrie se podílí integrální protein peroxisomální membrány Pex11 a protein komplexu ERMES Mdm34 (Obr. 9; Mattiazzi Ušaj et al., 2015). K tomuto zjištění vedly experimenty s kmeny s deletovaným genem *PEX11*. V nemutovaných buňkách 30 % peroxisomů asociovalo s ERMES. V buňkách s delecí *pex11Δ* se počet snížil na polovinu, tedy na 15 % z původních 30 %. Z těchto výsledků lze předpokládat, že se Pex11 podílí na vytváření MCSs peroxisomu a mitochondrie, kterým bylo dáno označení PerMit (Cohen et al., 2014; Mattiazzi Ušaj et al., 2015; Shai et al., 2018).

Vazebný partner proteinu Pex11 byl identifikován díky studiu interakcí Pex11 a dalších membránových proteinů. Konkrétně byla použita kvasinková membránová dvouhybridní analýza a bimolekulární fluorescenční komplementace (BiFC). Byla tak zjištěna fyzická interakce mezi Pex11 a Mdm34. Při označení N-terminálního konce Mdm34 nebyla interakce pozorována. Mdm34 tedy váže Pex11 tímto N-terminálním koncem. To dává vznik MCSs PerMit. V později publikované studii byly identifikovány konkrétní interagující úseky obou proteinů, 51-100 AMK v Pex11 a 343-359 AMK v Mdm34 (Liu et al., 2018; Mattiazzi Ušaj et al., 2015).



Obrázek 9 Membránové kontaktní místo peroxisomu a mitochondrie PerMit. Mdm34, Mdm10 a Mdm12 jsou mitochondriální složky komplexu ERMES, který váže mitochondrii k ER. Pex11, protein peroxisomální membrány, interaguje s Mdm34 a tvoří tak kontakt peroxisomu a mitochondrie (převzato a upraveno podle Mattiazzi Ušaj et al., 2015).

Pro pexofagii, selektivní autofagickou degradaci peroxisomu, je nezbytné, aby peroxisom určený na degradaci, byl připojen na ERMES (Obr. 10). Toto je podpořeno zjištěním, že poškození komplexu ERMES mutací Mdm34 vede ke ztrátě asociace peroxisomu k mitochondrii a výraznému defektu pexofagie (Liu et al., 2018). Pexofagie probíhá následujícím způsobem: Pex3 váže receptor pexofagie Atg36, který spolu se *scaffold* autofagickým proteinem Atg11 umožňuje asociaci specifické GTPázy Vps1 k peroxisomu. Atg11 dále podporuje vazbu receptoru Atg36 na Atg8, který je lokalizován na tvořící se fagoforové membráně. Tato vazba umožní přiblížení peroxisomu k fagoforu, jeho růst kolem peroxisomu, následné uzavření peroxisomu v autofagosomu a nakonec degradaci peroxisomu ve vakuole díky splynutí autofagosomu s vakuolou (Liu et al., 2018; Mao et al., 2014).



Obrázek 10 Proces pexofagie (degradace peroxisomu) a proteiny nutné pro tento proces. Peroxin Pex3, receptor pexofagie Atg36, specifická GTPáza Vps1, protein Atg11 a Atg8, lokalizován na tvořící se fagoforové membráně vystupující z ER. Připojení peroxisomu přes Pex11 na Mdm34, které je součástí komplexu ERMES (Mdm10, Mdm34, Mdm12, Mmm1) spojujícího mitochondrii a ER, je nezbytné pro správnou funkci pexofagie (převzato a upraveno podle Liu et al., 2018; Mao et al., 2014).

6.2.2 Pex34 a Fzo1

Nadměrná produkce Pex34, integrálního membránového proteinu peroxisomu, a Fzo1, mitofusinu vnější membrány mitochondrie, snížila pohyblivost těchto organel, což naznačuje jejich nadměrnou asociaci (Rapaport et al., 1998; Shai et al., 2018; Tower et al., 2011). Pex34 a Fzo1 jsou tedy potencionálními vazebnými proteiny v MCSs peroxisomu a mitochondrie (Alsayyah et al., 2024; Shai et al., 2018). I když jsou tyto dva proteiny považovány za vazebné, mutace Fzo1 nijak neovlivňuje funkci Pex34, který je lokalizován do subdomén a ovlivňuje β -oxidaci. Nezávislost těchto proteinů zvyšuje pravděpodobnost, že nepůsobí ve stejném komplexu. To naznačuje existenci dalších stále neobjevených vazebných proteinů či komplexů (Shai et al., 2018).

Nadměrná produkce Pex34, nikoli však Fzo1, vedla nejen k zvýšení počtu PerMit, ale i k zvýšení produkce CO_2 . To naznačuje, že kontakty PerMit obsahující Pex34 transportují acetyl-CoA, produkt β -oxidace, z peroxisomů do mitochondrií, kde se degraduje na CO_2 a H_2O

díky TCA cyklu (Marchesini et al., 2003; Shai et al., 2018). I když Shai et al. (2018) zjistili, že nadměrná produkce Fzo1 nijak neovlivňuje hodnoty CO₂, aktuálnější studie kontaktů PerMit obsahujících vazebný protein Fzo1 předpokládá jeho funkci v transportu acetyl-CoA do mitochondrie a ve fúzi mitochondrií (Alsayyah et al., 2024).

Pda1, podjednotka pyruvát dehydrogenázového (PDH) komplexu, je lokalizována v subdoménách v mitochondriální matrix, kde se nachází i zbytek PDH komplexu. PDH komplex přeměňuje pyruvát na acetyl-CoA. Označením GFP značkou bylo zjištěno, že Pex3 a Pda1 subdomény, které jsou blízko membrány, kolokalizují, z čehož plyne, že peroxisomy asociují s místy acetyl-CoA syntézy (Cohen et al., 2014).

Zároveň je acetyl-CoA do mitochondrie transportován přes MCSs PerMit obsahující Pex34. Tento membránový kontakt tedy může sloužit jako alternativní zdroj acetyl-CoA pro mitochondrii nebo maximalizaci koncentrace acetyl-CoA v subdoménách mitochondrie ve prospěch TCA cyklu (Cohen et al., 2014; Shai et al., 2018). Existují dvě dráhy transportu acetyl-CoA do mitochondrie. V první dráze peroxisomální citrat-syntáza (Cit2) přeměňuje acetyl-CoA na citrát, který je transportován do mitochondrie. V druhé dráze peroxisomální karnitin transferáza (Cat2) přeměňuje acetyl-CoA na acetylkarnitin, který je transportován do mitochondrie (Kunze et al., 2006; Roermund et al., 1995). Po delecí každé z drah a nadměrné produkci Pex34 bylo prokázáno, že PerMit kontakty bohaté na Pex34 přenášejí do mitochondrie citrát (Alsayyah et al., 2024; Shai et al., 2018).

Přesná funkce a význam MCSs PerMit obsahujících mitochondriální Fzo1 je doposud nejasná. Avšak bylo prokázáno, že Fzo1 je přítomen asi v 10 % PerMit kontaktů a že asociuje s peroxisomálním Fzo1, a tím tvoří homotypický kontakt PerMit (Alsayyah et al., 2024).

Tyto kontakty jsou řízeny nenasyceností mastných kyselin; když je nízká, kontaktů ubývá. Když je naopak vysoká, kontaktů přibývá, Fzo1 se hromadí na peroxisomech a pravděpodobně umožňuje transport citrátu z peroxisomu do mitochondrie díky místům PerMit (Alsayyah et al., 2024; Cavellini et al., 2017). Citrát v mitochondrii vstupuje ihned do TCA cyklu a udržuje tím mitochondriální membránový potenciál, který stimuluje fúzi mitochondrií. Tím neutralizuje dopady vysoké nenasycenosti mastných kyselin týkající se fluidity a správné funkce mitochondriální membrány (Aguilar et al., 2006; Alsayyah et al., 2024).

7 MCSs peroxisomu a vakuoly

Existence membránových kontaktních míst peroxisomu a vakuoly v kvasince *Saccharomyces cerevisiae* donedávna nebyla zcela jasná, avšak relativně nedávné studie použitím *split-GFP* a *split Venus complementation assay* jejich existenci potvrdily a tyto MCSs dostala označení PerVale (Kakimoto et al., 2018; Shai et al., 2018). Nová studie navíc identifikovala vakuolární protein Cvm1 figurující v některých MCSs vakuoly včetně PerVale a v homeostáze membrány (Bisinski et al., 2022).

U kvasinky *Hansenula polymorpha* byl membránový kontakt zaznamenán v kontextu degradace peroxisomu vakuolou při nedostatku dusíku (Bellu et al., 2001). Kromě toho byl relativně nedávno popsán tento kontakt také při podmínkách vyvolávajících proliferaci a masivní růst peroxisomů. V této studii byl také identifikován protein, který je nejen lokalizován výhradně na místa kontaktu vakuoly a peroxisomu, ale je i součástí vazebného komplexu, který váže obě organely. Nejspíš hraje roli i v samotném vzniku těchto MCSs, která dostala u *H. polymorpha* označení VAPCONS. Tento protein je peroxisomální membránový protein Pex3 (Obr. 1D; Obr. 11; více o Pex3 v kapitolách 3 a 4; Wu et al., 2019). Zde se nabízí možnost navazujícího výzkumu, zda je tomu tak i u *S. cerevisiae*.

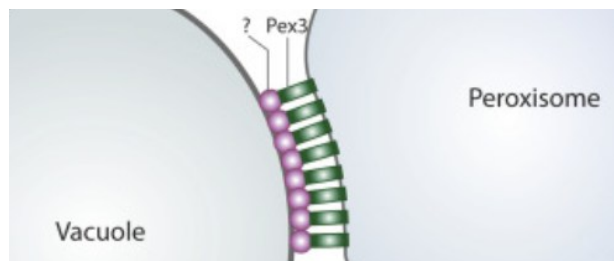
7.1 VAPCONS

Hansenula polymorpha je methylotrofní kvasinka schopná na rozdíl od kvasinky *S. cerevisiae* produkce velkých peroxisomů při specifické kultivaci v médiu obsahujícím methanol jako hlavní zdroj uhlíku (Singh et al., 2020; Veenhuis et al., 1978).

V exponenciálně rostoucích nemutovaných kvasinkách *H. polymorpha* na glukózovém médiu MCSs VAPCONS pozorována nebyla, v těchto podmínkách byl pozorován jen kontakt peroxisomů s ER a PM. Avšak po přenesení buněk *H. polymorpha* na methanol obsahující médium došlo k tomu, že jeden malý peroxisom, typický pro glukózové médium, rapidně zvětšil svůj objem a zároveň vytvořil MCSs s vakuolou (Veenhuis et al., 1978; Wu et al., 2019). 8 hodin po přenesení na methanolvé médium bylo fluorescenční mikroskopií (FM) živých buněk prokázáno hromadné zvýšení asociací peroxisomů a vakuol (Wu et al., 2019).

Pro nalezení konkrétního vazebného proteinu těchto MCSs byly pomocí fluorescenčního mikroskopu pozorovány různé proteiny fúzané s GFP, konkrétně Pmp47, Pex11, Pex3 a Pex14, zda nejsou lokalizovány do míst kontaktu. Z pozorovaných proteinů byl pouze Pex3 lokalizován výhradně do kontaktních míst s vakuolou, ostatní proteiny byly rovnoměrně rozmístěny po celém povrchu peroxisomu nebo tvořily shluky mimo místa kontaktů VAPCONS. Správnost získaných dat z FM byla podložena detailní analýzou za použití korelační světelně-elektronové mikroskopie.

Po transferu kvasinek zpět na glukózové médium MCSs ubylo a objevily se menší peroxisomy. Avšak ty peroxisomy, které nadále tvořily kontakt s vakuolou, stále obsahovaly proteiny Pex3 lokalizované do místa kontaktu. To dokazuje, že Pex3 je složkou vazebného komplexu MCSs peroxisomu a vakuoly (Wu et al., 2019).



Obrázek 11 Membránové kontaktní místo mezi vakuolou a peroxisomem VAPCONS u *Hansenula polymorpha*, které je tvořeno peroxisomálním membránovým proteinem Pex3 a zatímco neznámou vakuolární složkou (převzato a upraveno podle Wu et al., 2018).

Pex3 hraje roli i ve formaci míst VAPCONS. To bylo dokázáno použitím buněk rostoucích na glukózovém médiu, ve kterém, jak již bylo zmíněno výše, nejsou MCSs VAPCONS tvořena. V těchto buňkách byl díky vlivu silného promotoru nadměrně produkován Pex3, a to skutečně vedlo k zvýšení počtu VAPCONS. Jako kontrola byl použit Pex14 a jeho nadměrnou produkcí počet VAPCONS ovlivněn nebyl (Wu et al., 2019).

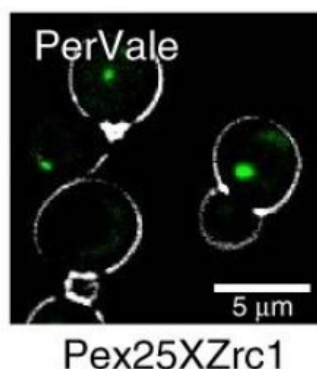
Jelikož jsou místa VAPCONS tvořena ve chvíli, kdy se peroxisom zvětšuje, jejich funkcí je nejspíše dodávání lipidů pro rychle se formující membránu peroxisomu (Wu et al., 2019). Tato funkce není u MCSs vakuoly žádným překvapením, protože vCLAMP, MCSs mitochondrie a vakuoly, také figurují v lipidovém transportu. Konkrétně představují alternativní cestu přenosu lipidů do mitochondrie při ztrátě komplexu ERMES (Elbaz-Alon et al., 2014; Hönscher et al., 2014). Přesný mechanismus, složení a funkce VAPCONS zatím nejsou plně objasněny, což otevírá možnost pro navazující výzkum.

7.2 PerVale

Split Venus complementation assay identifikovala existenci potencionálního kontaktního místa peroxisomu a vakuoly PerVale (Obr. 12; Shai et al., 2018). Tato metoda funguje na principu označení organelových markerů (typických proteinů, které se hojně vyskytují na membráně dotýčné organely) polovinou fluoroforu (Venus proteinu). Takto byly označeny právě peroxisom a vakuola. Aby tento fluorofor vydával fluorescenční signál, musí se jeho dvě poloviny dostat do těsné blízkosti. Až v tento moment se dokáží spojit a vydávat signál (Kerppola, 2006; Ohashi and Mizuno, 2014; Shai et al., 2018).

Tato blízkost může být nalezena právě v kontaktních místech membrán. *Split Venus* metodou lze zjistit pouze možnost existence MCSs, ne však konkrétní vazebné proteiny a funkce. Další nevýhodou je samotný Venus protein. Když je složen, stává se z něj silný umělý vazebný protein, který je nereverzibilní (Kudla and Bock, 2016; Shai et al., 2018). Proto byl jako kontrola použit reverzibilní fluorescenční protein IFP1.4, který stejně jako *split Venus* potvrdil existenci PerVale (Shai et al., 2018; Tchekanda et al., 2014).

Pro vyobrazení MCSs PerVale byl zvolen peroxisomální Pex25 z použitých proteinů peroxisomu (Ant1, Pex3, Pex11, Pex25, Pex30) a vakuolární Zrc1 z použitých proteinů vakuoly (Mam3, Vph1, Zrc1) (Shai et al., 2018).



Obrázek 12 Pár membránových proteinů Pex25 peroxisomu a Zrc1 vakuoly, označených polovinou Venus proteinu, který dokáže po spojení signalizovat. Zelený signál značí kontaktní místa peroxisomů a vakuol PerVale (převzato a upraveno podle Shai et al., 2018).

Bisinski et al. (2022) stanovili, že protein Cvm1 je součástí několika MCSs vakuoly. Zjistili, že je pod vlivem silného promotoru lokalizován do hned několika shluků na vakuolární membráně, ne vždy v blízkosti jen jedné organely. Známá asociace proteinu Cvm1 již byla s mitochondrií, kde je součástí vCLAMP ne však vCLAMP obsahující Ypt7-Vps39-Tom40, ale spíše jiného vazebného komplexu (Bisinski et al., 2022; González Montoro et al., 2018). S cílem identifikovat se kterými dalšími organelami tvoří kontakt, byla provedena jeho kolokalizace s několika dalšími organelovými markery. Pozorována byla kolokalizace Cvm1 s proteinem Sec63 jaderného ER, které tvoří s vakuolou MCSs označena NVJ, a také právě s proteinem Pex3 peroxisomu, který tvoří s vakuolou MCSs PerVale (Bisinski et al., 2022; Pan et al., 2000).

Jako kontrola byla použita *split Venus* metoda (Kerppola, 2006; Ohashi and Mizuno, 2014). Půlkou proteinu Venus byl znovu označen vakuolární protein Zrc1 a druhou půlkou peroxisomální protein Pex25. Takto signálem označená MCSs kolokalizovala s proteinem Cvm1, z čehož vyplývá, že protein Cvm1 je součástí vazebného komplexu MCSs peroxisomu a vakuoly. Avšak Cvm1 nekolokalizoval se všemi signálem označenými MCSs peroxisomu a vakuoly, jeho nepřítomnost tedy naznačuje existenci více typů MCSs PerVale (Bisinski et al., 2022).

Bylo prokázáno, že protein Cvm1 ovlivňuje hladiny sfingolipidů a podílí se na sfingolipidové homeostáze. Například delece genu *CVM1* vedla k významnému poklesu hladiny ceramidů a nadměrná exprese *CVM1* vedla k významnému zvýšení této hladiny (Bisinski et al., 2022). Regulace biosyntézy sfingolipidů je podstatný děj, protože sfingolipidy (na rozdíl od lipidů jako TAG a SE) nejsou zásobními lipidy v buňce, ale hlavně tvoří složku plazmatické membrány (Farese and Walther, 2009; van der Rest et al., 1995). Při snížení sfingolipidů se zvýší množství vakuolárních MCSs obsahujících Cvm1. To nasvědčuje existenci regulačního mechanismu, který dokáže kompenzovat nedostatek sfingolipidů zvýšením počtu MCSs (Bisinski et al., 2022).

8 Závěr

V této práci byly shrnuty informace o dosud známých membránových kontaktních místech peroxisomu v kvasince *Saccharomyces cerevisiae*, konkrétně kontaktech peroxisomu s ER, PM, mitochondrií, LDs a vakuolou. Byla zmíněna také MCSs související s peroxisomem, tedy komplex ERMES, který podjednotkou Mdm34 váže peroxin Pex11, komplex Fld1/Ldb16, spojující *de novo* biogenezi peroxisomu a LDs z ER s využitím proteinu Pex30 a komplex MECA, který zajišťuje podmínky pro správný obrat lipidů.

Hlavní prostor byl věnován peroxisomálním MCSs, která hrají roli v různých buněčných procesech. Komplex Pex30 umožňuje a reguluje *de novo* biogenezi peroxisomů správným zakřivením membrány v místech vzniku PPVs. Komplex Inp1-Pex3 figuruje v buněčné dědičnosti přichycením peroxisomu k plazmatické membráně. Pexopodia a *gnarls* představují invazivní kontakt peroxisomu s jádry LDs, čímž efektivně propojují metabolismy obou organel. Pex11 působící v místech PerMit je nezbytný pro správnou pexofagii. Pex34 a Fzo1 působící v místech PerMit jsou klíčové pro transfer acetyl-CoA do mitochondrie. Kontaktní místa u *H. polymorpha* VAPCONS, která jsou tvořena peroxinem Pex3, pravděpodobně dodávají lipidy z vakuoly rychle se zvětšujícímu peroxisomu. Cvm1 protein, působící hned v několika MCSs vakuoly včetně PerVale, se podílí na homeostáze sfingolipidů.

Fakt, že většina organel navazuje více než jedno kontaktní místo s ostatními organelami, otevírá otázku a prostor pro navazující výzkum konkrétního složení existujících MCSs a jejich reálného počtu, například zatím neznámé složení MCSs PerVale neobsahujících protein Cvm1. Vazebný partner proteinu Cvm1 kontaktů PerVale také dosud nebyl nalezen, stejně jako vazební partneři dalších proteinů kontaktních míst, viz Pex34 v MCSs PerMit, Pex3 tvořící VAPCONS či další složky komplexu Inp1-Pex3.

Aktuální studie, např. Bisinski et al. (2022), Casler et al. (2024), Alsayyah et al. (2024) se také intenzivně zabývají funkcí MCSs a potvrzují, že MCSs hrají důležitou roli v homeostáze lipidů a buněčném metabolismu.

9 Seznam použité literatury

- Adeyo O, Horn PJ, Lee S, Binns DD, Chandrahas A, Chapman KD, Goodman JM. The yeast lipin orthologue Pah1p is important for biogenesis of lipid droplets. *J Cell Biol.* 2011 Mar 21;192(6):1043-55. doi: 10.1083/jcb.201010111. PMID: 21422231; PMCID: PMC3063132.
- Agrawal G, Fassas SN, Xia ZJ, Subramani S. Distinct requirements for intra-ER sorting and budding of peroxisomal membrane proteins from the ER. *J Cell Biol.* 2016 Feb 1;212(3):335-48. doi: 10.1083/jcb.201506141. PMID: 26833788; PMCID: PMC4748575.
- Agrawal G, Subramani S. De novo peroxisome biogenesis: Evolving concepts and conundrums. *Biochim Biophys Acta.* 2016 May;1863(5):892-901. doi: 10.1016/j.bbamcr.2015.09.014. Epub 2015 Sep 14. PMID: 26381541; PMCID: PMC4791208.
- Aguilar PS, de Mendoza D. Control of fatty acid desaturation: a mechanism conserved from bacteria to humans. *Mol Microbiol.* 2006 Dec;62(6):1507-14. doi: 10.1111/j.1365-2958.2006.05484.x. PMID: 17087771.
- Achleitner G, Gaigg B, Krasser A, Kainersdorfer E, Kohlwein SD, Perktold A, Zellnig G, Daum G. Association between the endoplasmic reticulum and mitochondria of yeast facilitates interorganelle transport of phospholipids through membrane contact. *Eur J Biochem.* 1999 Sep;264(2):545-53. doi: 10.1046/j.1432-1327.1999.00658.x. PMID: 10491102.
- Alsayyah C, Singh MK, Morcillo-Parra MA, Cavellini L, Shai N, Schmitt C, Schuldiner M, Zalckvar E, Mallet A, Belgareh-Touzé N, Zimmer C, Cohen MM. Mitofusin-mediated contacts between mitochondria and peroxisomes regulate mitochondrial fusion. *PLoS Biol.* 2024 Apr 26;22(4):e3002602. doi: 10.1371/journal.pbio.3002602. PMID: 38669296; PMCID: PMC11078399.
- Ast J, Stiebler AC, Freitag J, Bölker M. Dual targeting of peroxisomal proteins. *Front Physiol.* 2013 Oct 18;4:297. doi: 10.3389/fphys.2013.00297. PMID: 24151469; PMCID: PMC3798809.
- Baird D, Stefan C, Audhya A, Weys S, Emr SD. Assembly of the PtdIns 4-kinase Stt4 complex at the plasma membrane requires Ypp1 and Efr3. *J Cell Biol.* 2008 Dec 15;183(6):1061-74. doi: 10.1083/jcb.200804003. PMID: 19075114; PMCID: PMC2600738.
- Bellu AR, Kram AM, Kiel JA, Veenhuis M, van der Klei IJ. Glucose-induced and nitrogen-starvation-induced peroxisome degradation are distinct processes in *Hansenula polymorpha* that involve both common and unique genes. *FEMS Yeast Res.* 2001 Apr;1(1):23-31. doi: 10.1111/j.1567-1364.2001.tb00010.x. PMID: 12702460.
- Binns D, Januszewski T, Chen Y, Hill J, Markin VS, Zhao Y, Gilpin C, Chapman KD, Anderson RG, Goodman JM. An intimate collaboration between peroxisomes and lipid bodies. *J Cell Biol.*

- 2006 Jun 5;173(5):719-31. doi: 10.1083/jcb.200511125. Epub 2006 May 30. PMID: 16735577; PMCID: PMC2063889.
- Bisinski DD, Gomes Castro I, Mari M, Walter S, Fröhlich F, Schuldiner M, González Montoro A. Cvm1 is a component of multiple vacuolar contact sites required for sphingolipid homeostasis. *J Cell Biol.* 2022 Aug 1;221(8):e202103048. doi: 10.1083/jcb.202103048. Epub 2022 Jun 29. PMID: 35766971; PMCID: PMC9247719.
- Böckler S, Westermann B. Mitochondrial ER contacts are crucial for mitophagy in yeast. *Dev Cell.* 2014 Feb 24;28(4):450-8. doi: 10.1016/j.devcel.2014.01.012. Epub 2014 Feb 13. PMID: 24530295.
- Boldogh IR, Nowakowski DW, Yang HC, Chung H, Karmon S, Royes P, Pon LA. A protein complex containing Mdm10p, Mdm12p, and Mmm1p links mitochondrial membranes and DNA to the cytoskeleton-based segregation machinery. *Mol Biol Cell.* 2003 Nov;14(11):4618-27. doi: 10.1091/mbc.e03-04-0225. Epub 2003 Sep 17. PMID: 13679517; PMCID: PMC266777.
- Casler JC, Harper CS, Lackner LL. Mitochondria-plasma membrane contact sites regulate the ER-mitochondria encounter structure. *J Cell Sci.* 2025 May 1;138(9):JCS263685. doi: 10.1242/jcs.263685. Epub 2025 Feb 18. PMID: 39878621; PMCID: PMC11883241.
- Casler JC, Harper CS, White AJ, Anderson HL, Lackner LL. Mitochondria-ER-PM contacts regulate mitochondrial division and PI(4)P distribution. *J Cell Biol.* 2024 Sep 2;223(9):e202308144. doi: 10.1083/jcb.202308144. Epub 2024 May 23. PMID: 38781029; PMCID: PMC11116812.
- Castro IG, Shortill SP, Dziurdzik SK, Cadou A, Ganesan S, Valenti R, David Y, Davey M, Mattes C, Thomas FB, Avraham RE, Meyer H, Fadel A, Fenech EJ, Ernst R, Zarembeg V, Levine TP, Stefan C, Conibear E, Schuldiner M. Systematic analysis of membrane contact sites in *Saccharomyces cerevisiae* uncovers modulators of cellular lipid distribution. *Elife.* 2022 Nov 10;11:e74602. doi: 10.7554/eLife.74602. PMID: 36354737; PMCID: PMC9648973.
- Cavellini L, Meurisse J, Findinier J, Erpapazoglou Z, Belgareh-Touzé N, Weissman AM, Cohen MM. An ubiquitin-dependent balance between mitofusins turnover and fatty acids desaturation regulates mitochondrial fusion. *Nat Commun.* 2017 Jun 13;8:15832. doi: 10.1038/ncomms15832. PMID: 28607491; PMCID: PMC5474747.
- Cohen Y, Klug YA, Dimitrov L, Erez Z, Chuartzman SG, Elinger D, Yofe I, Soliman K, Gärtner J, Thoms S, Schekman R, Elbaz-Alon Y, Zalckvar E, Schuldiner M. Peroxisomes are juxtaposed to strategic sites on mitochondria. *Mol Biosyst.* 2014 Jul;10(7):1742-8. doi: 10.1039/c4mb00001c. Epub 2014 Apr 10. PMID: 24722918.
- David C, Koch J, Oeljeklaus S, Laernsack A, Melchior S, Wiese S, Schummer A, Erdmann R, Warscheid B, Brocard C. A combined approach of quantitative interaction proteomics and

- live-cell imaging reveals a regulatory role for endoplasmic reticulum (ER) reticulon homology proteins in peroxisome biogenesis. *Mol Cell Proteomics*. 2013 Sep;12(9):2408-25. doi: 10.1074/mcp.M112.017830. Epub 2013 May 20. PMID: 23689284; PMCID: PMC3769320.
- De Craene JO, Coleman J, Estrada de Martin P, Pypaert M, Anderson S, Yates JR 3rd, Ferro-Novick S, Novick P. Rtn1p is involved in structuring the cortical endoplasmic reticulum. *Mol Biol Cell*. 2006 Jul;17(7):3009-20. doi: 10.1091/mbc.e06-01-0080. Epub 2006 Apr 19. PMID: 16624861; PMCID: PMC1483037.
- Distel B, Erdmann R, Gould SJ, Blobel G, Crane DI, Cregg JM, Dodt G, Fujiki Y, Goodman JM, Just WW, Kiel JA, Kunau WH, Lazarow PB, Mannaerts GP, Moser HW, Osumi T, Rachubinski RA, Roscher A, Subramani S, Tabak HF, Tsukamoto T, Valle D, van der Klei I, van Veldhoven PP, Veenhuis M. A unified nomenclature for peroxisome biogenesis factors. *J Cell Biol*. 1996 Oct;135(1):1-3. doi: 10.1083/jcb.135.1.1. PMID: 8858157; PMCID: PMC2121017.
- Eisenberg T, Büttner S. Lipids and cell death in yeast. *FEMS Yeast Res*. 2014 Feb;14(1):179-97. doi: 10.1111/1567-1364.12105. Epub 2013 Oct 30. PMID: 24119111; PMCID: PMC4255311. Review.
- Elbaz-Alon Y, Rosenfeld-Gur E, Shinder V, Futerman AH, Geiger T, Schuldiner M. A dynamic interface between vacuoles and mitochondria in yeast. *Dev Cell*. 2014 Jul 14;30(1):95-102. doi: 10.1016/j.devcel.2014.06.007. PMID: 25026036.
- Ellenrieder L, Opaliński Ł, Becker L, Krüger V, Mirus O, Straub SP, Ebell K, Flinner N, Stiller SB, Guiard B, Meisinger C, Wiedemann N, Schleiff E, Wagner R, Pfanner N, Becker T. Separating mitochondrial protein assembly and endoplasmic reticulum tethering by selective coupling of Mdm10. *Nat Commun*. 2016 Oct 10;7:13021. doi: 10.1038/ncomms13021. PMID: 27721450; PMCID: PMC5476798.
- Fagarasanu M, Fagarasanu A, Tam YY, Aitchison JD, Rachubinski RA. Inp1p is a peroxisomal membrane protein required for peroxisome inheritance in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Biol*. 2005 Jun 6;169(5):765-75. doi: 10.1083/jcb.200503083. Epub 2005 May 31. PMID: 15928207; PMCID: PMC2171609.
- Fakieh MH, Drake PJ, Lacey J, Munck JM, Motley AM, Hetttema EH. Intra-ER sorting of the peroxisomal membrane protein Pex3 relies on its luminal domain. *Biol Open*. 2013 Jun 25;2(8):829-37. doi: 10.1242/bio.20134788. PMID: 23951409; PMCID: PMC3744075.
- Farese RV Jr, Walther TC. Lipid droplets finally get a little R-E-S-P-E-C-T. *Cell*. 2009 Nov 25;139(5):855-60. doi: 10.1016/j.cell.2009.11.005. PMID: 19945371; PMCID: PMC3097139.
- Farré JC, Mahalingam SS, Proietto M, Subramani S. Peroxisome biogenesis, membrane contact sites, and quality control. *EMBO Rep*. 2019 Jan;20(1):e46864. doi:

- 10.15252/embr.201846864. Epub 2018 Dec 10. PMID: 30530632; PMCID: PMC6322382.
Review.
- Ferreira JV, Carvalho P. Pex30-like proteins function as adaptors at distinct ER membrane contact sites. *J Cell Biol.* 2021 Oct 4;220(10):e202103176. doi: 10.1083/jcb.202103176. Epub 2021 Aug 17. PMID: 34402813; PMCID: PMC8374871.
- Frederick RL, McCaffery JM, Cunningham KW, Okamoto K, Shaw JM. Yeast Miro GTPase, Gem1p, regulates mitochondrial morphology via a novel pathway. *J Cell Biol.* 2004 Oct 11;167(1):87-98. doi: 10.1083/jcb.200405100. PMID: 15479738; PMCID: PMC2172521.
- Friedman JR, Lackner LL, West M, DiBenedetto JR, Nunnari J, Voeltz GK. ER tubules mark sites of mitochondrial division. *Science.* 2011 Oct 21;334(6054):358-62. doi: 10.1126/science.1207385. Epub 2011 Sep 1. PMID: 21885730; PMCID: PMC3366560.
- González Montoro A, Auffarth K, Hönscher C, Bohnert M, Becker T, Warscheid B, Reggiori F, van der Laan M, Fröhlich F, Ungermann C. Vps39 Interacts with Tom40 to Establish One of Two Functionally Distinct Vacuole-Mitochondria Contact Sites. *Dev Cell.* 2018 Jun 4;45(5):621-636.e7. doi: 10.1016/j.devcel.2018.05.011. PMID: 29870720.
- Gould SJ, Keller GA, Hosken N, Wilkinson J, Subramani S. A conserved tripeptide sorts proteins to peroxisomes. *J Cell Biol.* 1989 May;108(5):1657-64. doi: 10.1083/jcb.108.5.1657. PMID: 2654139; PMCID: PMC2115556.
- Grippa A, Buxó L, Mora G, Funaya C, Idrissi FZ, Mancuso F, Gomez R, Muntanyà J, Sabidó E, Carvalho P. The seipin complex Fld1/Ldb16 stabilizes ER-lipid droplet contact sites. *J Cell Biol.* 2015 Nov 23;211(4):829-44. doi: 10.1083/jcb.201502070. Epub 2015 Nov 16. PMID: 26572621; PMCID: PMC4657162.
- Hammermeister M, Schödel K, Westermann B. Mdm36 is a mitochondrial fission-promoting protein in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell.* 2010 Jul 15;21(14):2443-52. doi: 10.1091/mbc.e10-02-0096. Epub 2010 May 26. PMID: 20505073; PMCID: PMC2903673.
- Hariri H, Rogers S, Ugrankar R, Liu YL, Feathers JR, Henne WM. Lipid droplet biogenesis is spatially coordinated at ER-vacuole contacts under nutritional stress. *EMBO Rep.* 2018 Jan;19(1):57-72. doi: 10.15252/embr.201744815. Epub 2017 Nov 16. PMID: 29146766; PMCID: PMC5757283.
- Helle SC, Kanfer G, Kolar K, Lang A, Michel AH, Kornmann B. Organization and function of membrane contact sites. *Biochim Biophys Acta.* 2013 Nov;1833(11):2526-41. doi: 10.1016/j.bbamcr.2013.01.028. Epub 2013 Feb 1. PMID: 23380708. Review.
- Hettema EH, Girzalsky W, van Den Berg M, Erdmann R, Distel B. *Saccharomyces cerevisiae* pex3p and pex19p are required for proper localization and stability of peroxisomal

- membrane proteins. *EMBO J.* 2000 Jan 17;19(2):223-33. doi: 10.1093/emboj/19.2.223. PMID: 10637226; PMCID: PMC305556.
- Hiltunen JK, Mursula AM, Rottensteiner H, Wierenga RK, Kastaniotis AJ, Gurvitz A. The biochemistry of peroxisomal beta-oxidation in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol Rev.* 2003 Apr;27(1):35-64. doi: 10.1016/S0168-6445(03)00017-2. PMID: 12697341.
- Hoepfner D, Schildknecht D, Braakman I, Philippsen P, Tabak HF. Contribution of the endoplasmic reticulum to peroxisome formation. *Cell.* 2005 Jul 15;122(1):85-95. doi: 10.1016/j.cell.2005.04.025. PMID: 16009135.
- Hönscher C, Mari M, Auffarth K, Bohnert M, Griffith J, Geerts W, van der Laan M, Cabrera M, Reggiori F, Ungermann C. Cellular metabolism regulates contact sites between vacuoles and mitochondria. *Dev Cell.* 2014 Jul 14;30(1):86-94. doi: 10.1016/j.devcel.2014.06.006. PMID: 25026035.
- Hulmes GE, Hutchinson JD, Dahan N, Nuttall JM, Allwood EG, Ayscough KR, Hettema EH. The Pex3-Inp1 complex tethers yeast peroxisomes to the plasma membrane. *J Cell Biol.* 2020 Oct 5;219(10):e201906021. doi: 10.1083/jcb.201906021. PMID: 32970792; PMCID: PMC7659723.
- Choudhary V, Ojha N, Golden A, Prinz WA. A conserved family of proteins facilitates nascent lipid droplet budding from the ER. *J Cell Biol.* 2015 Oct 26;211(2):261-71. doi: 10.1083/jcb.201505067. PMID: 26504167; PMCID: PMC4621845.
- Choudhry SK, de Boer R, van der Klei IJ. Yeast cells contain a heterogeneous population of peroxisomes that segregate asymmetrically during cell division. *J Cell Sci.* 2018 Feb 7;131(3):jcs207522. doi: 10.1242/jcs.207522. PMID: 29361529.
- Jacquier N, Choudhary V, Mari M, Toulmay A, Reggiori F, Schneiter R. Lipid droplets are functionally connected to the endoplasmic reticulum in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Sci.* 2011 Jul 15;124(Pt 14):2424-37. doi: 10.1242/jcs.076836. Epub 2011 Jun 21. PMID: 21693588.
- Jacquier N, Choudhary V, Mari M, Toulmay A, Reggiori F, Schneiter R. Lipid droplets are functionally connected to the endoplasmic reticulum in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Sci.* 2011 Jul 15;124(Pt 14):2424-37. doi: 10.1242/jcs.076836. Epub 2011 Jun 21. PMID: 21693588.
- Jansen RLM, van der Klei IJ. The peroxisome biogenesis factors Pex3 and Pex19: multitasking proteins with disputed functions. *FEBS Lett.* 2019 Mar;593(5):457-474. doi: 10.1002/1873-3468.13340. Epub 2019 Mar 5. PMID: 30776093. Review.

- Jones JM, Morrell JC, Gould SJ. PEX19 is a predominantly cytosolic chaperone and import receptor for class 1 peroxisomal membrane proteins. *J Cell Biol.* 2004 Jan 5;164(1):57-67. doi: 10.1083/jcb.200304111. PMID: 14709540; PMCID: PMC2171958.
- Joshi AS, Cohen S. Lipid Droplet and Peroxisome Biogenesis: Do They Go Hand-in-Hand? *Front Cell Dev Biol.* 2019 May 31;7:92. doi: 10.3389/fcell.2019.00092. PMID: 31214588; PMCID: PMC6554619. Review.
- Joshi AS, Huang X, Choudhary V, Levine TP, Hu J, Prinz WA. A family of membrane-shaping proteins at ER subdomains regulates pre-peroxisomal vesicle biogenesis. *J Cell Biol.* 2016 Nov 21;215(4):515-529. doi: 10.1083/jcb.201602064. Epub 2016 Nov 8. PMID: 27872254; PMCID: PMC5119935.
- Joshi AS, Nebenfuehr B, Choudhary V, Satpute-Krishnan P, Levine TP, Golden A, Prinz WA. Lipid droplet and peroxisome biogenesis occur at the same ER subdomains. *Nat Commun.* 2018 Jul 27;9(1):2940. doi: 10.1038/s41467-018-05277-3. PMID: 30054481; PMCID: PMC6063926.
- Joshi AS. Peroxisomal Membrane Contact Sites in Yeasts. *Front Cell Dev Biol.* 2021 Nov 19;9:735031. doi: 10.3389/fcell.2021.735031. PMID: 34869317; PMCID: PMC8640217. Review
- Kakimoto Y, Tashiro S, Kojima R, Morozumi Y, Endo T, Tamura Y. Visualizing multiple inter-organelle contact sites using the organelle-targeted split-GFP system. *Sci Rep.* 2018 Apr 18;8(1):6175. doi: 10.1038/s41598-018-24466-0. PMID: 29670150; PMCID: PMC5906596.
- Kalutsky MA, Galimzyanov TR, Molotkovsky RJ. A Model of Lipid Monolayer-Bilayer Fusion of Lipid Droplets and Peroxisomes. *Membranes (Basel).* 2022 Oct 13;12(10):992. doi: 10.3390/membranes12100992. PMID: 36295751; PMCID: PMC9612070.
- Karanasios E, Barbosa AD, Sembongi H, Mari M, Han GS, Reggiori F, Carman GM, Siniosoglou S. Regulation of lipid droplet and membrane biogenesis by the acidic tail of the phosphatidate phosphatase Pah1p. *Mol Biol Cell.* 2013 Jul;24(13):2124-33. doi: 10.1091/mbc.E13-01-0021. Epub 2013 May 8. PMID: 23657815; PMCID: PMC3694796.
- Kawano S, Tamura Y, Kojima R, Bala S, Asai E, Michel AH, Kornmann B, Riezman I, Riezman H, Sakae Y, Okamoto Y, Endo T. Structure-function insights into direct lipid transfer between membranes by Mmm1-Mdm12 of ERMES. *J Cell Biol.* 2018 Mar 5;217(3):959-974. doi: 10.1083/jcb.201704119. Epub 2017 Dec 26. PMID: 29279306; PMCID: PMC5839780.
- Kerppola TK. Design and implementation of bimolecular fluorescence complementation (BiFC) assays for the visualization of protein interactions in living cells. *Nat Protoc.* 2006;1(3):1278-86. doi: 10.1038/nprot.2006.201. PMID: 17406412; PMCID: PMC2518326.

- Knoblach B, Rachubinski RA. Determinants of the assembly, integrity and maintenance of the endoplasmic reticulum-peroxisome tether. *Traffic*. 2019 Mar;20(3):213-225. doi: 10.1111/tra.12635. Epub 2019 Jan 15. PMID: 30597694.
- Knoblach B, Sun X, Coquelle N, Fagarasanu A, Poirier RL, Rachubinski RA. An ER-peroxisome tether exerts peroxisome population control in yeast. *EMBO J*. 2013 Sep 11;32(18):2439-53. doi: 10.1038/emboj.2013.170. Epub 2013 Jul 30. PMID: 23900285; PMCID: PMC3770948.
- Knoops K, Manivannan S, Cepinska MN, Krikken AM, Kram AM, Veenhuis M, van der Klei IJ. Preperoxisomal vesicles can form in the absence of Pex3. *J Cell Biol*. 2014 Mar 3;204(5):659-68. doi: 10.1083/jcb.201310148. PMID: 24590171; PMCID: PMC3941047.
- Kong J, Ji Y, Jeon YG, Han JS, Han KH, Lee JH, Lee G, Jang H, Choe SS, Baes M, Kim JB. Spatiotemporal contact between peroxisomes and lipid droplets regulates fasting-induced lipolysis via PEX5. *Nat Commun*. 2020 Jan 29;11(1):578. doi: 10.1038/s41467-019-14176-0. PMID: 31996685; PMCID: PMC6989686.
- Kornmann B, Currie E, Collins SR, Schuldiner M, Nunnari J, Weissman JS, Walter P. An ER-mitochondria tethering complex revealed by a synthetic biology screen. *Science*. 2009 Jul 24;325(5939):477-81. doi: 10.1126/science.1175088. Epub 2009 Jun 25. PMID: 19556461; PMCID: PMC2933203.
- Kornmann B, Osman C, Walter P. The conserved GTPase Gem1 regulates endoplasmic reticulum-mitochondria connections. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011 Aug 23;108(34):14151-6. doi: 10.1073/pnas.1111314108. Epub 2011 Aug 8. PMID: 21825164; PMCID: PMC3161550.
- Kresze GB, Ronft H. Pyruvate dehydrogenase complex from baker's yeast. 1. Purification and some kinetic and regulatory properties. *Eur J Biochem*. 1981 Oct;119(3):573-9. doi: 10.1111/j.1432-1033.1981.tb05646.x. PMID: 7030740.
- Krikken AM, Wu H, de Boer R, Devos DP, Levine TP, van der Klei IJ. Peroxisome retention involves Inp1-dependent peroxisome-plasma membrane contact sites in yeast. *J Cell Biol*. 2020 Oct 5;219(10):e201906023. doi: 10.1083/jcb.201906023. PMID: 32805027; PMCID: PMC7659721.
- Kudla J, Bock R. Lighting the Way to Protein-Protein Interactions: Recommendations on Best Practices for Bimolecular Fluorescence Complementation Analyses. *Plant Cell*. 2016 May;28(5):1002-8. doi: 10.1105/tpc.16.00043. Epub 2016 Apr 20. PMID: 27099259; PMCID: PMC4904677.
- Kunze M, Pracharoenwattana I, Smith SM, Hartig A. A central role for the peroxisomal membrane in glyoxylate cycle function. *Biochim Biophys Acta*. 2006

- Dec;1763(12):1441-52. doi: 10.1016/j.bbamcr.2006.09.009. Epub 2006 Sep 14.
PMID: 17055076.
- Lackner LL, Ping H, Graef M, Murley A, Nunnari J. Endoplasmic reticulum-associated mitochondria-cortex tether functions in the distribution and inheritance of mitochondria. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013 Feb 5;110(6):E458-67. doi: 10.1073/pnas.1215232110. Epub 2013 Jan 22. PMID: 23341591; PMCID: PMC3568303.
- Lahiri S, Chao JT, Tavassoli S, Wong AK, Choudhary V, Young BP, Loewen CJ, Prinz WA. A conserved endoplasmic reticulum membrane protein complex (EMC) facilitates phospholipid transfer from the ER to mitochondria. *PLoS Biol*. 2014 Oct 14;12(10):e1001969. doi: 10.1371/journal.pbio.1001969. PMID: 25313861; PMCID: PMC4196738.
- Liu X, Wen X, Klionsky DJ. ER-mitochondria contacts are required for pexophagy in *Saccharomyces cerevisiae*. *Contact (Thousand Oaks)*. 2018 Jan-Dec;2:10.1177/2515256418821584. doi: 10.1177/2515256418821584. Epub 2019 Jan 8. PMID: 30859155; PMCID: PMC6408953.
- Mao K, Liu X, Feng Y, Klionsky DJ. The progression of peroxisomal degradation through autophagy requires peroxisomal division. *Autophagy*. 2014 Apr;10(4):652-61. doi: 10.4161/auto.27852. Epub 2014 Jan 21. PMID: 24451165; PMCID: PMC4091152.
- Marchesini S, Poirier Y. Futile cycling of intermediates of fatty acid biosynthesis toward peroxisomal beta-oxidation in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem*. 2003 Aug 29;278(35):32596-601. doi: 10.1074/jbc.M305574200. Epub 2003 Jun 20. PMID: 12819196.
- Markin VS, Kozlov MM, Borovjagin VL. On the theory of membrane fusion. The stalk mechanism. *Gen Physiol Biophys*. 1984 Oct;3(5):361-77. PMID: 6510702.
- Martinez Marshall MN, Emmerstorfer-Augustin A, Leskoske KL, Zhang LH, Li B, Thorner J. Analysis of the roles of phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate and individual subunits in assembly, localization, and function of *Saccharomyces cerevisiae* target of rapamycin complex 2. *Mol Biol Cell*. 2019 Jun 1;30(12):1555-1574. doi: 10.1091/mbc.E18-10-0682. Epub 2019 Apr 10. Erratum in: *Mol Biol Cell*. 2019 Dec 1;30(25):3074. doi: 10.1091/mbc.E18-10-0682-corr. Erratum in: *Mol Biol Cell*. 2022 Oct 1;33(12):cor4. doi: 10.1091/mbc.E18-10-0682_Corr. PMID: 30969890; PMCID: PMC6724684.
- Mast FD, Jamakhandi A, Saleem RA, Dilworth DJ, Rogers RS, Rachubinski RA, Aitchison JD. Peroxins Pex30 and Pex29 Dynamically Associate with Reticulons to Regulate Peroxisome Biogenesis from the Endoplasmic Reticulum. *J Biol Chem*. 2016 Jul 22;291(30):15408-27. doi: 10.1074/jbc.M116.728154. Epub 2016 Apr 29. PMID: 27129769; PMCID: PMC4957030.

- Mattiazzi Ušaj M, Brložnik M, Kaferle P, Žitnik M, Wolinski H, Leitner F, Kohlwein SD, Zupan B, Petrovič U. Genome-Wide Localization Study of Yeast Pex11 Identifies Peroxisome-Mitochondria Interactions through the ERMES Complex. *J Mol Biol.* 2015 Jun 5;427(11):2072-87. doi: 10.1016/j.jmb.2015.03.004. Epub 2015 Mar 10. PMID: 25769804; PMCID: PMC4429955.
- McCammon MT, Veenhuis M, Trapp SB, Goodman JM. Association of glyoxylate and beta-oxidation enzymes with peroxisomes of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol.* 1990 Oct;172(10):5816-27. doi: 10.1128/jb.172.10.5816-5827.1990. PMID: 2211514; PMCID: PMC526899.
- Meinecke M, Cizmowski C, Schliebs W, Krüger V, Beck S, Wagner R, Erdmann R. The peroxisomal importomer constitutes a large and highly dynamic pore. *Nat Cell Biol.* 2010 Mar;12(3):273-7. doi: 10.1038/ncb2027. Epub 2010 Feb 14. PMID: 20154681.
- Meisinger C, Pfannschmidt S, Rissler M, Milenkovic D, Becker T, Stojanovski D, Youngman MJ, Jensen RE, Chacinska A, Guiard B, Pfanner N, Wiedemann N. The morphology proteins Mdm12/Mmm1 function in the major beta-barrel assembly pathway of mitochondria. *EMBO J.* 2007 May 2;26(9):2229-39. doi: 10.1038/sj.emboj.7601673. Epub 2007 Apr 5. PMID: 17410204; PMCID: PMC1864972.
- Motley AM, Hetteema EH. Yeast peroxisomes multiply by growth and division. *J Cell Biol.* 2007 Jul 30;178(3):399-410. doi: 10.1083/jcb.200702167. Epub 2007 Jul 23. PMID: 17646399; PMCID: PMC2064844.
- Motley AM, Nuttall JM, Hetteema EH. Pex3-anchored Atg36 tags peroxisomes for degradation in *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J.* 2012 Jun 29;31(13):2852-68. doi: 10.1038/emboj.2012.151. Epub 2012 May 29. PMID: 22643220; PMCID: PMC3395097.
- Murley A, Lackner LL, Osman C, West M, Voeltz GK, Walter P, Nunnari J. ER-associated mitochondrial division links the distribution of mitochondria and mitochondrial DNA in yeast. *Elife.* 2013 May 14;2:e00422. doi: 10.7554/eLife.00422. PMID: 23682313; PMCID: PMC3654481.
- Obeid LM, Okamoto Y, Mao C. Yeast sphingolipids: metabolism and biology. *Biochim Biophys Acta.* 2002 Dec 30;1585(2-3):163-71. doi: 10.1016/s1388-1981(02)00337-2. PMID: 12531550.
- Ohashi K, Mizuno K. A novel pair of split venus fragments to detect protein-protein interactions by in vitro and in vivo bimolecular fluorescence complementation assays. *Methods Mol Biol.* 2014;1174:247-62. doi: 10.1007/978-1-4939-0944-5_17. PMID: 24947387.

- Okamoto K, Kondo-Okamoto N, Ohsumi Y. Mitochondria-anchored receptor Atg32 mediates degradation of mitochondria via selective autophagy. *Dev Cell*. 2009 Jul;17(1):87-97. doi: 10.1016/j.devcel.2009.06.013. PMID: 19619494.
- Otzen M, Rucktäschel R, Thoms S, Emmrich K, Krikken AM, Erdmann R, van der Klei IJ. Pex19p contributes to peroxisome inheritance in the association of peroxisomes to Myo2p. *Traffic*. 2012 Jul;13(7):947-59. doi: 10.1111/j.1600-0854.2012.01364.x. Epub 2012 Apr 26. PMID: 22486971.
- Pan X, Roberts P, Chen Y, Kvam E, Shulga N, Huang K, Lemmon S, Goldfarb DS. Nucleus-vacuole junctions in *Saccharomyces cerevisiae* are formed through the direct interaction of Vac8p with Nvj1p. *Mol Biol Cell*. 2000 Jul;11(7):2445-57. doi: 10.1091/mbc.11.7.2445. PMID: 10888680; PMCID: PMC14931.
- Phillips MJ, Voeltz GK. Structure and function of ER membrane contact sites with other organelles. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2016 Feb;17(2):69-82. doi: 10.1038/nrm.2015.8. Epub 2015 Dec 2. PMID: 26627931; PMCID: PMC5117888. Review.
- Prinz WA, Toulmay A, Balla T. The functional universe of membrane contact sites. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2020 Jan;21(1):7-24. doi: 10.1038/s41580-019-0180-9. Epub 2019 Nov 15. PMID: 31732717; PMCID: PMC10619483. Review.
- Pu J, Ha CW, Zhang S, Jung JP, Huh WK, Liu P. Interactomic study on interaction between lipid droplets and mitochondria. *Protein Cell*. 2011 Jun;2(6):487-96. doi: 10.1007/s13238-011-1061-y. Epub 2011 Jul 12. PMID: 21748599; PMCID: PMC4875178.
- Rapaport D, Brunner M, Neupert W, Westermann B. Fzo1p is a mitochondrial outer membrane protein essential for the biogenesis of functional mitochondria in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem*. 1998 Aug 7;273(32):20150-5. doi: 10.1074/jbc.273.32.20150. PMID: 9685359.
- Raychaudhuri S, Prinz WA. Nonvesicular phospholipid transfer between peroxisomes and the endoplasmic reticulum. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008 Oct 14;105(41):15785-90. doi: 10.1073/pnas.0808321105. Epub 2008 Oct 3. PMID: 18836080; PMCID: PMC2572964.
- Reggiori F, Klionsky DJ. Autophagic processes in yeast: mechanism, machinery and regulation. *Genetics*. 2013 Jun;194(2):341-61. doi: 10.1534/genetics.112.149013. PMID: 23733851; PMCID: PMC3664846.
- Saraya R, Capińska MN, Kiel JA, Veenhuis M, van der Klei IJ. A conserved function for Inp2 in peroxisome inheritance. *Biochim Biophys Acta*. 2010 May;1803(5):617-22. doi: 10.1016/j.bbamcr.2010.02.001. Epub 2010 Feb 11. PMID: 20153784.
- Sato Y, Shibata H, Nakatsu T, Nakano H, Kashiwayama Y, Imanaka T, Kato H. Structural basis for docking of peroxisomal membrane protein carrier Pex19p onto its receptor Pex3p. *EMBO J*.

- 2010 Dec 15;29(24):4083-93. doi: 10.1038/emboj.2010.293. Epub 2010 Nov 19. PMID: 21102411; PMCID: PMC3018794.
- Scorrano L, De Matteis MA, Emr S, Giordano F, Hajnóczky G, Kornmann B, Lackner LL, Levine TP, Pellegrini L, Reinisch K, Rizzuto R, Simmen T, Stenmark H, Ungermann C, Schuldiner M. Coming together to define membrane contact sites. *Nat Commun*. 2019 Mar 20;10(1):1287. doi: 10.1038/s41467-019-09253-3. PMID: 30894536; PMCID: PMC6427007. Review.
- Shai N, Yifrach E, van Roermund CWT, Cohen N, Bibi C, IJlst L, Cavellini L, Meurisse J, Schuster R, Zada L, Mari MC, Reggiori FM, Hughes AL, Escobar-Henriques M, Cohen MM, Waterham HR, Wanders RJA, Schuldiner M, Zalckvar E. Systematic mapping of contact sites reveals tethers and a function for the peroxisome-mitochondria contact. *Nat Commun*. 2018 May 2;9(1):1761. doi: 10.1038/s41467-018-03957-8. PMID: 29720625; PMCID: PMC5932058
- Singh R, Manivannan S, Krikken AM, de Boer R, Bordin N, Devos DP, van der Klei IJ. *Hansenula polymorpha* Pex37 is a peroxisomal membrane protein required for organelle fission and segregation. *FEBS J*. 2020 May;287(9):1742-1757. doi: 10.1111/febs.15123. Epub 2019 Nov 26. PMID: 31692262; PMCID: PMC7318627.
- Stroud DA, Oeljeklaus S, Wiese S, Bohnert M, Lewandrowski U, Sickmann A, Guiard B, van der Laan M, Warscheid B, Wiedemann N. Composition and topology of the endoplasmic reticulum-mitochondria encounter structure. *J Mol Biol*. 2011 Nov 4;413(4):743-50. doi: 10.1016/j.jmb.2011.09.012. Epub 2011 Sep 16. PMID: 21945531.
- Szymanski KM, Binns D, Bartz R, Grishin NV, Li WP, Agarwal AK, Garg A, Anderson RG, Goodman JM. The lipodystrophy protein seipin is found at endoplasmic reticulum lipid droplet junctions and is important for droplet morphology. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007 Dec 26;104(52):20890-5. doi: 10.1073/pnas.0704154104. Epub 2007 Dec 18. PMID: 18093937; PMCID: PMC2409237.
- Tam YY, Fagarasanu A, Fagarasanu M, Rachubinski RA. Pex3p initiates the formation of a preperoxisomal compartment from a subdomain of the endoplasmic reticulum in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem*. 2005 Oct 14;280(41):34933-9. doi: 10.1074/jbc.M506208200. Epub 2005 Aug 8. PMID: 16087670.
- Tchekanda E, Sivanesan D, Michnick SW. An infrared reporter to detect spatiotemporal dynamics of protein-protein interactions. *Nat Methods*. 2014 Jun;11(6):641-4. doi: 10.1038/nmeth.2934. Epub 2014 Apr 20. PMID: 24747815.
- Tower RJ, Fagarasanu A, Aitchison JD, Rachubinski RA. The peroxin Pex34p functions with the Pex11 family of peroxisomal divisional proteins to regulate the peroxisome population in yeast. *Mol Biol Cell*. 2011 May 15;22(10):1727-38. doi: 10.1091/mbc.E11-01-0084. Epub 2011 Mar 25. PMID: 21441307; PMCID: PMC3093324.

- Valm AM, Cohen S, Legant WR, Melunis J, Hershberg U, Wait E, Cohen AR, Davidson MW, Betzig E, Lippincott-Schwartz J. Applying systems-level spectral imaging and analysis to reveal the organelle interactome. *Nature*. 2017 Jun 1;546(7656):162-167. doi: 10.1038/nature22369. Epub 2017 May 24. PMID: 28538724; PMCID: PMC5536967.
- van der Rest ME, Kamminga AH, Nakano A, Anraku Y, Poolman B, Konings WN. The plasma membrane of *Saccharomyces cerevisiae*: structure, function, and biogenesis. *Microbiol Rev*. 1995 Jun;59(2):304-22. doi: 10.1128/mr.59.2.304-322.1995. PMID: 7603412; PMCID: PMC239363.
- van der Zand A, Braakman I, Tabak HF. Peroxisomal membrane proteins insert into the endoplasmic reticulum. *Mol Biol Cell*. 2010 Jun 15;21(12):2057-65. doi: 10.1091/mbc.e10-02-0082. Epub 2010 Apr 28. PMID: 20427571; PMCID: PMC2883949.
- van der Zand A, Gent J, Braakman I, Tabak HF. Biochemically distinct vesicles from the endoplasmic reticulum fuse to form peroxisomes. *Cell*. 2012 Apr 13;149(2):397-409. doi: 10.1016/j.cell.2012.01.054. PMID: 22500805.
- van Roermund CW, Elgersma Y, Singh N, Wanders RJ, Tabak HF. The membrane of peroxisomes in *Saccharomyces cerevisiae* is impermeable to NAD(H) and acetyl-CoA under in vivo conditions. *EMBO J*. 1995 Jul 17;14(14):3480-6. doi: 10.1002/j.1460-2075.1995.tb07354.x. PMID: 7628449; PMCID: PMC394415.
- Vance JE. Phospholipid synthesis in a membrane fraction associated with mitochondria. *J Biol Chem*. 1990 May 5;265(13):7248-56. PMID: 2332429.
- Veenhuis M, van Dijken JP, Pilon SA, Harder W. Development of crystalline peroxisomes in methanol-grown cells of the yeast *Hansenula polymorpha* and its relation to environmental conditions. *Arch Microbiol*. 1978 May 30;117(2):153-63. doi: 10.1007/BF00402303. PMID: 678021.
- Vizeacoumar FJ, Torres-Guzman JC, Bouard D, Aitchison JD, Rachubinski RA. Pex30p, Pex31p, and Pex32p form a family of peroxisomal integral membrane proteins regulating peroxisome size and number in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell*. 2004 Feb;15(2):665-77. doi: 10.1091/mbc.e03-09-0681. Epub 2003 Nov 14. PMID: 14617799; PMCID: PMC329287.
- Vizeacoumar FJ, Torres-Guzman JC, Tam YY, Aitchison JD, Rachubinski RA. YHR150w and YDR479c encode peroxisomal integral membrane proteins involved in the regulation of peroxisome number, size, and distribution in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Biol*. 2003 Apr 28;161(2):321-32. doi: 10.1083/jcb.200210130. Epub 2003 Apr 21. PMID: 12707309; PMCID: PMC2172915.

- Voeltz GK, Prinz WA, Shibata Y, Rist JM, Rapoport TA. A class of membrane proteins shaping the tubular endoplasmic reticulum. *Cell*. 2006 Feb 10;124(3):573-86. doi: 10.1016/j.cell.2005.11.047. Erratum in: *Cell*. 2007 Aug 24;130(4):754. PMID: 16469703.
- Wang CW, Miao YH, Chang YS. Control of lipid droplet size in budding yeast requires the collaboration between Fld1 and Ldb16. *J Cell Sci*. 2014 Mar 15;127(Pt 6):1214-28. doi: 10.1242/jcs.137737. Epub 2014 Jan 16. PMID: 24434579.
- Wang S, Idrissi FZ, Hermansson M, Grippa A, Ejsing CS, Carvalho P. Seipin and the membrane-shaping protein Pex30 cooperate in organelle budding from the endoplasmic reticulum. *Nat Commun*. 2018 Jul 27;9(1):2939. doi: 10.1038/s41467-018-05278-2. PMID: 30054465; PMCID: PMC6063905.
- Wolinski H, Hofbauer HF, Hellauer K, Cristobal-Sarramian A, Kolb D, Radulovic M, Knittelfelder OL, Rechberger GN, Kohlwein SD. Seipin is involved in the regulation of phosphatidic acid metabolism at a subdomain of the nuclear envelope in yeast. *Biochim Biophys Acta*. 2015 Nov;1851(11):1450-64. doi: 10.1016/j.bbaliip.2015.08.003. Epub 2015 Aug 12. PMID: 26275961.
- Won J, Choi Y, Yun Y, Lee HH. Biochemical Characterization of the Num1-Mdm36 Complex at the Mitochondria-Plasma Membrane Contact Site. *Mol Cells*. 2021 Apr 30;44(4):207-213. doi: 10.14348/molcells.2021.0016. PMID: 33827993; PMCID: PMC8112169.
- Wróblewska JP, Cruz-Zaragoza LD, Yuan W, Schummer A, Chuartzman SG, de Boer R, Oeljeklaus S, Schuldiner M, Zalckvar E, Warscheid B, Erdmann R, van der Klei IJ. *Saccharomyces cerevisiae* cells lacking Pex3 contain membrane vesicles that harbor a subset of peroxisomal membrane proteins. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res*. 2017 Oct;1864(10):1656-1667. doi: 10.1016/j.bbamcr.2017.05.021. Epub 2017 May 26. PMID: 28552664; PMCID: PMC7611440.
- Wu H, Carvalho P, Voeltz GK. Here, there, and everywhere: The importance of ER membrane contact sites. *Science*. 2018 Aug 3;361(6401):eaan5835. doi: 10.1126/science.aan5835. PMID: 30072511; PMCID: PMC6568312. Review.
- Wu H, de Boer R, Krikken AM, Akşit A, Yuan W, van der Klei IJ. Peroxisome development in yeast is associated with the formation of Pex3-dependent peroxisome-vacuole contact sites. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res*. 2019 Mar;1866(3):349-359. doi: 10.1016/j.bbamcr.2018.08.021. Epub 2018 Sep 1. PMID: 30595161.