

**Univerzita Karlova**  
**Přírodovědecká fakulta**

Studijní program: Speciální chemicko-biologické obory  
Studijní obor: Molekulární biologie a biochemie organismů



**Natálie Kostová**

Autofagie v abiotickém stresu u rostlin

Autophagy in plant abiotic stress

Bakalářská práce

Školitel: RNDr. Michal Hála, Ph.D.

Praha, 2021

## **Prohlášení**

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

V Praze, 10. 8. 2021

Podpis

## **Poděkování**

Chtěla bych poděkovat vedoucímu mé bakalářské práce RNDr. Michalu Hálovi, Ph.D. za odborné vedení, trpělivost a cenné rady při psaní této práce. Dále bych chtěla poděkovat rodině a přátelům za podporu během celé doby mého bakalářského studia.

## **Abstrakt**

Autofagie je buněčný mechanismus, v rámci kterého se buňka zbavuje svých poškozených nebo nežádoucích součástí. Ty jsou obaleny dvojitou membránou a je vytvořen tzv. autofagozom, který je transportován do vakuoly, kde dochází k degradaci nebo recyklaci jeho obsahu. Autofagie běží v podstatě v průběhu celého života rostliny, avšak v případě potřeby, například v reakci na stresové podmínky, dochází k jejímu výraznému zintenzivnění. Jedná se o poměrně složitě regulovaný mechanismus, který, zejména u rostlin, stále ještě nebyl kompletně popsán.

Významnou roli hraje autofagie právě při působení stresových podmínek. Zejména působení abiotického stresu má významnou roli v životě rostliny. Rostliny jsou nepohyblivé organismy, a proto si musí vyvíjet mechanismy umožňující jim přežít v nepříznivých podmínkách. V reakci na různé typy stresů můžeme pozorovat odlišné zapojení autofagie, ať už se jedná o likvidaci špatně sbalených proteinů, remobilizaci živin nebo antioxidační mechanismus. Autofagie je navíc, vedle tolerance rostlin vůči působení stresu, důležitá také pro regulaci stresové paměti.

**Klíčová slova:** autofagie, abiotický stres, rostliny, mechanismy resistance, stresová paměť

## **Abstract**

Autophagy is a cellular mechanism when cell gets rid of its damaged or unwanted components. These are wrapped into a double membrane and creates so-called autophagosome, which is transported to the vacuole, where its contents are degraded or recycled. Autophagy runs essentially through whole life of the plant, but if it is necessary, for example in response to stressful conditions, it is significantly intensified. It is relatively complexly regulated mechanism, which, especially in plants, still has not been completely described.

Autophagy plays an important role under the influence of stress conditions. Especially, the effects of abiotic stress play an important role in plant life. Plants are immobile organisms so they must therefore develop mechanisms to enable them to survive in adverse conditions. In response to different types of stress, we can observe different roles in the involvement of autophagy, whether it is disposal of poorly folded proteins, remobilization of nutrients or antioxidant mechanism. Autophagy is also especially important for the process of stress memory and regulation.

**Keywords:** autophagy, abiotic stress, plants, mechanisms of resistance, stress memory

## **Seznam použitých zkratk**

ATG – geny související s autofagií, z anglického autophagy-related genes

BiP – vazebný protein, z anglického binding protein

CVT – transportní dráha do vakuoly, z anglického cytoplasm to vacuole targeting

ER – endoplazmatické retikulum

ERAD – mechanismus odstraňování nefunkčních proteinů, z anglického endoplasmic reticulum associated protein degradation

GAPC – glyceraldehyd-3-fosfát-dehydrogenáza

HSP – protein tepelného šoku, z anglického heat shock protein

MV – methyl viologen

PDC – programovaná buněčná smrt, z anglického programmed cell death

PE – fosfatidylethanolamin

RCB pathway – transportní dráha do vakuoly, z anglického Rubisco-containing body

ROS – reaktivní formy kyslíku, z anglického reactive oxygen species

SNARE – proteiny účastnící se splývání membránových váčků, z anglického soluble *N*-ethyl maleimide sensitive factor attachment protein receptor

TOR – protein-kináza, z anglického target of rapamycin

UPR – proces reakce na nesbalené proteiny, z anglického unfolded protein response

# Obsah

|   |    |
|---|----|
| 1. Úvod .....   | 1  |
| 2. Obecný úvod do autofagie .....                       | 2  |
| 3. Abiotický stres .....                                | 3  |
| 4. Mechanismus autofagie .....                          | 6  |
| 4.1. Typy mechanismů autofagie .....                    | 11 |
| 5. Role autofagie v podmínkách abiotického stresu ..... | 12 |
| 5.1. Likvidace špatně sbalených proteinů .....          | 12 |
| 5.2. Remobilizace živin .....                           | 14 |
| 5.3. Antioxidační role autofagie .....                  | 17 |
| 5.4. Stresová paměť .....                               | 20 |
| 6. Závěr .....  | 22 |
| 7. Seznam použité literatury .....                      | 24 |

## 1. Úvod

Tématem této bakalářské práce je autofagie v abiotickém stresu u rostlin. Vzhledem ke svému sesilnému způsobu života si rostliny musely vytvořit nejrůznější obranné mechanismy pro přežití. Na rozdíl od živočichů se nemohou pohybovat a musí tudíž čelit různým stresovým podmínkám. Stresové faktory mohou být biotické, např. škůdci nebo patogeny, nebo abiotické. V této práci bych se ráda zaměřila právě na abiotické stresové faktory a jejich vliv na rostliny. Jedním z mechanismů v boji proti abiotickému stresu je autofagie. Jedná se o konzervovaný proces vyskytující se u všech eukaryot. Cílem autofagie je dopravit nejrůznější cytoplazmatické součásti do lysozomů u živočišných buněk nebo do vakuol u rostlinných buněk a poté zajistit jejich degradaci nebo recyklaci.

Studium autofagie v poslední době nabývá na intenzitě. Porozumění mechanismům autofagie v reakci na abiotický stres má velký význam pro hospodářství, jelikož je ovlivněna výnosnost plodin. Cílem této práce je shrnout poznatky v oblasti autofagie při působení abiotického stresu u rostlin, proto se nejprve pokusím objasnit mechanismus autofagie a představit abiotický stres a následně nejdůležitější úlohy autofagie při jeho působení.



## 2. Obecný úvod do autofagie

Autofagie v doslovném překladu znamená “jíst, trávit sám sebe”. Jedná se tedy o proces, při kterém jsou tráveny nejrůznější buněčné součásti. Děje se tak zejména při potřebě zbavit se poškozených proteinů a organel nebo při nutnosti recyklovat některé látky. K autofagii dochází zejména při vystavení rostlin stresovým podmínkám nebo v rámci vývoje (Avin-Wittenberg, 2019, review).

Pro porozumění molekulárním mechanismům autofagie byly prováděny výzkumy primárně na *S. cerevisiae*. Genetickou analýzou se zabývalo několik laboratoří současně, což vedlo ke vzniku široké škály pojmenování genů, které se na těchto procesech podílejí. Takto velký počet názvů začal být pro vědce matoucí nejen při výzkumu kvasinkových systémů, a proto byla zavedena jednotná nomenklatura genů a proteinů spojených s autofagií. Nově se tedy geny a proteiny označují ATG nebo Atg, což značí geny související s autofagií. Ve starších studiích se můžeme setkat s tím, že geny jsou označovány například APG, AUT nebo CVT (Klionsky et al., 2003).

Orthology kvasinkových ATG genů byly nalezeny také u rostlin. Studie provedená na rostlině *A. thaliana* ukázala, že mutantní rostliny v těchto genech vykazují zrychlené stárnutí a vysokou citlivost na růst při nedostatečných výživových podmínkách, což naznačuje důležitost těchto genů v případech, kdy je nezbytná remobilizace uhlíku a dusíku (Doelling et al., 2002).

U rostlin se rozlišují tři typy autofagie – mikroautofagie, makroautofagie a megautofagie. Při mikroautofagii jsou cytoplazmatické součásti obklopené invaginací tonoplastu (vakuolární membránou) a poté uvolněny do lumen vakuoly, kde vytváří jednomembránová autofagická tělíska. V rámci makroautofagie je tvořen útvar obalený dvojitou membránou. Nejprve se nazývá fagofor - má miskovitou strukturu a po plném vytvoření dvojité membrány se nazývá autofagosom, který poté může putovat do vakuoly. Vnější membrána poté splývá s tonoplastem. Autofagické tělísko, nyní jednomembránové, se uvolňuje do vakuolárního lumen pro degradaci a recyklaci jeho obsahu (Avin-Wittenberg, 2019, review). V této práci bude pojem autofagie dále označován právě makroautofagie, která je u rostlin také nejvíce studována. Třetím typem autofagie je pak megautofagie, kdy dochází k rozpadu tonoplastu a uvolnění vakuolárních enzymů do cytoplazmy. Jde o extrémní případ autofagie, která probíhá v rámci PCD nebo například v reakci na napadení patogeny (Avin-Wittenberg, 2019, review).

### 3. Abiotický stres

Rostliny žijí ve svém životním prostředí, ve kterém jsou vystaveny vnějším prostorovým podmínkám a vnějším faktorům. Na tyto faktory musí rostlina reagovat a zároveň se s nimi i ovlivňuje navzájem. Podmínky pro růst a vývoj rostliny jsou ovlivňovány abiotickými faktory, interakcí s živými organismy, ale i činností člověka. Jelikož jsou podmínky pro růst a vývoj na naší planetě značně rozmanité, významným faktorem je zeměpisná poloha rostliny. Ta spadá pod fyzicko-geografické a půdně-klimatické faktory, které určují typické podmínky stanoviště (nadmořská výška, proudění vzduchu, mořské proudy, délka dne, geologický podklad). Těmto různým podmínkám se rostliny v rámci evoluce přizpůsobovaly. Došlo k evoluční adaptaci, kdy se znaky zafixovaly i na úrovni genů. Evoluční adaptace se pak odráží ve všech úrovních života rostliny. V rámci ontogeneze ovlivňují její délku, průběh i mechanismy, kterými probíhá, metabolické procesy, ale i vnější stavbu a vnitřní struktury rostliny. Díky tomu je pak rostlina schopna se přizpůsobit aktuálním podmínkám na stanovišti (Pavlová, 2005).

Jestli rostlina na daném stanovišti přežije, závisí na působení extrémních podmínek, kdy je rostlina nucena aktivovat obranné reakce. Tato situace se nazývá stres. Stres je charakterizován jako stav, kdy na rostlinu působí zátěžové, tj. stresové faktory neboli stresory (Pavlová, 2005). Většinou se nejedná o ustálený, jednoduše popsatelný stav, ale spíše jde o dynamický proces, protože u rostlin rostoucích v přírodních podmínkách působí často více stresorů současně. Přisedlý způsob života rostlin, jejich větší mezidruhová variabilita a heterogenita vnitřního prostředí způsobuje, že je u nich problematika stresu mnohem komplikovanější než u živočichů. Pro studium stresu je důležitý přenos podnětů vyvolávajících stres na rozhraní orgánů rostliny s vnějším prostředím a poté přenos signálu uvnitř rostliny. Poté je možné pozorovat, že různé stresové faktory pronikají do různých rostlin různou měrou, což je dáno především tím, že odlišné druhy rostlin mají vyvinuté nejrůznější obranné mechanismy (Procházka a kol., 1998).

Obecně se rozlišují stresory abiotické a biotické. Mezi biotické stresory se řadí působení patogenů, konkurenčních druhů rostlin nebo poškozování rostlin živočichy. Abiotické stresory jsou fyzikální nebo chemické povahy. Řadí se mezi ně míra ozáření, extrémní teploty, nedostatek vody, nedostatek kyslíku, nedostatek esenciálních minerálních prvků v půdě, nadbytek iontů v půdě, pH půdního roztoku, přítomnost toxických látek a mechanické účinky větru (Pavlová, 2005).

Pro to, aby rostlina byla schopná přežít působení stresorů, vyskytuje se u ní komplex obranných mechanismů tvořících rezistenci neboli odolnost. Spadá do ní avoidance a tolerance. Termín avoidance byl převzat z angličtiny a popisuje schopnost vyhnout se stresu. V průběhu evoluce došlo k tomu, že pokud byly rostliny často vystaveny nepříznivým podmínkám, kterým se snažily přizpůsobit, došlo postupně ke genetickému zafixování těchto znaků. Proto tyto znaky potom můžeme vidět i u rostlin, které se s působením stresu ještě nesetkaly. Jako příklady těchto znaků se uvádí zanoření průduchů pod rovinu pokožky, typ listů nebo specifické složení kutikuly. Působení některých stresorů však může vést i k dlouhodobé a trvalé změně fenotypu i v rámci ontogeneze. Takovými příklady jsou třeba prodloužení internodií u zastíněných rostlin nebo menší plocha listové čepele u rostlin vyvíjejících se při nedostatku vody. Druhým termínem je tolerance, která je charakterizována jako schopnost rostliny aktivně odolávat aktuálnímu působení stresoru. Proces, kterým rostlina získává toleranci, se nazývá aklimace neboli otužování. Rostlina se snaží znovu dosáhnout rovnovážného stavu odpovídajícímu změněným podmínkám. Jedná se tedy o reverzibilní proces. Příklady tolerance jsou změna pozice chloroplastů v buňce při extrémně vysokých ozářenostech nebo zavírání průduchů při nedostatku vody (Pavlová, 2005).

Děj, kterým rostlina odpovídá na aktuální působení stresoru, se nazývá stresová reakce, vede k toleranci a můžeme u ní rozlišit několik fází. První fáze se nazývá poplachová. Rostlina rozezná působení stresoru, jelikož došlo k narušení funkcí a buněčných struktur. Pomocí signálních drah je informace předána do ostatních částí rostliny a následuje fáze restituční. Rostlina aktivuje své obranné mechanismy, aby mohla i nadále v podmínkách působení stresoru existovat. To vede k otužování, získání maximální odolnosti a toleranci stresoru. Tato fáze se nazývá fáze rezistence. Díky získání odolnosti pak rostlina může v nepříznivých podmínkách přežít. Pokud však stresor působí dlouhodobě a velmi silně, rostlina nemá dostatek energie, nedokáže odolávat působení stresoru, dochází k vyčerpání a smrti. Průběh i výsledek stresové reakce závisí na více faktorech současně. Zohledňuje se především charakter stresoru, jeho velikost, rychlost jeho nástupu a doba působení. Pro výsledek je také důležitý genotyp rostliny, její vývojové stádium a fyziologický stav. V přírodních podmínkách na rostlinu ale nikdy nepůsobí jen jeden stresor, většinou se jedná o souhru několika stresů najednou. Je vidět, že na jiné typy stresů může rostlina reagovat stejnými projevy. Navíc otužování vůči jednomu stresu může přispět i k větší odolnosti ke stresům dalším. Projevy

stresu u rostlin mohou být velmi variabilní, nejvýraznějším znakem však bývá přechodné nebo trvalé zastavení růstu, což je obvykle způsobeno tím, že rostliny potřebují energii místo k růstu využít k obranným mechanismům (Pavlová, 2005).

Změny, kterými rostlina v rámci reakce na stresové faktory projde, mohou přetrvávat ještě i hodně dlouho po skončení jejich působení a návratu do optimálních podmínek, někdy se tyto změny udržují i po celý zbytek vegetačního období. Vystavení určitým typům stresu může mít ale v některých případech i pozitivní efekt na vývoj, například při klíčení nebo tvorbě květních orgánů. Je tím zvýšena reprodukční schopnost rostliny a možnost úspěšnější kompetice. Už v evoluci totiž byly rostliny vystaveny působení stresorů a některé z nich se dokonce staly důležité pro řízení fyziologických procesů rostlin a neměly vliv na zvýšení odolnosti. Díky tomu si můžeme uvědomit, že není snadné posoudit příznivost nebo nepříznivost vnějších faktorů pro rostliny (Procházka a kol., 1998).

Objasnění mechanismů, kterými rostliny reagují na stres, a manipulace s těmito mechanismy za účelem zvýšení produktivity rostlin v suboptimálním prostředí bylo žádoucí jak z vědeckého tak z komerčního hlediska. Se zvyšující se populací musí totiž zemědělství být schopno uživit více lidí a zároveň konkurovat rozvoji měst o ornou půdu. Dopad prostředí na produktivitu rostlin je zřejmý při srovnání rekordních a průměrných výnosů. Rekordní výnosy lze očekávat za optimálních podmínek, kdežto průměrné výnosy lze spojit s působením stresu. Jeho působení může snížit průměrnou produktivitu o 65 – 87% v závislosti na plodině. Úspěšné použití biotechnologických postupů může vést k vývoji plodin odolných vůči stresu (Buchanan et al., 2000).

Změny metabolismu a vývoje vyvolané stresem lze často připsat změněným vzorům genové exprese. V reakci na stres jsou některé geny exprimovány silněji a některé jsou potlačovány. Proteinové produkty genů vyvolaných stresem se často hromadí v reakci na nepříznivé podmínky. Funkce těchto proteinů a mechanismy, které regulují jejich expresi, jsou v současné době hlavním tématem výzkumu fyziologie stresu. Ačkoli se většina studií zaměřovala na aktivaci transkripce genové exprese, objevují se důkazy, že akumulace genových produktů je ovlivněna také posttranskripčními regulačními mechanismy, které zvyšují množství specifických mRNA, zvyšují translaci, stabilizují proteiny, mění aktivitu proteinů nebo jejich kombinace (Buchanan et al., 2000).

## 4. Mechanismus autofagie

Proces autofagie může být rozdělen do několika kroků. Prvním z nich je iniciace. Ukázalo se, že obecnou reakcí buněk na nepříznivé podmínky je vznik autofagických tělísek. Jejich vznik mohou spustit různé faktory. Těmi jsou zejména nedostatek nutrientů, jako je například dusík nebo některé aminokyseliny (Takeshige et al., 1992). U rostlin byla také například prokázána zvýšená degradace proteinů v reakci na nedostatek sacharózy (Moriyasu and Ohsumi, 1996). Jako další krok následuje zformování autofagozomu. Dynamika membrán v rámci autofagie je vysoce konzervovaný proces od kvasinek po rostliny a živočichy. Nejprve jsou různé složky cytoplazmy odděleny specifickou membránou. Ta je velmi tenká, podobná Golgiho cisternám a nazývá se fagofor. Prodlužování fagoforu vede ke kompletnímu oddělení požadované části cytoplazmy a vzniku autofagozomu. Autofagozom je poté už typická dvoumembránová organela (Mizushima, 2007, review).

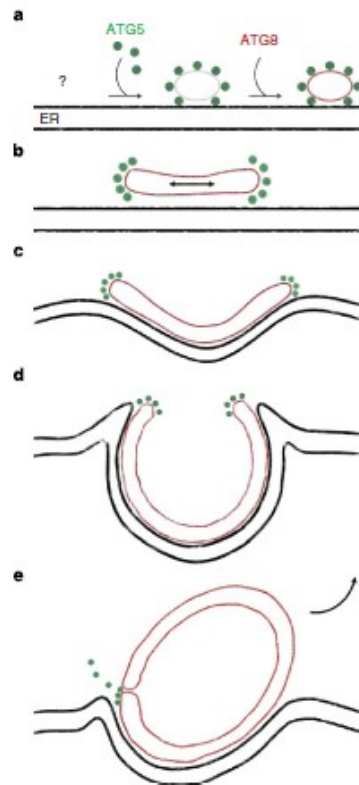
Autofagie může sloužit jako degradační dráha, kdy jsou nepotřebné nebo poškozené součásti cytoplazmy dopravovány do vakuoly k degradaci nebo k recyklaci, nebo jako tzv. Cvt (z anglického cytoplasm to vacuole targeting) dráha, kdy jsou do vakuoly dopravovány rezidentní vakuolární enzymy (Harding et al., 1995). Pomocí biologických a morfologických analýz se ukazuje, že tyto dvě dráhy sdílí podobný mechanismus pro dopravu proteinů do vakuoly (Harding et al., 1996). Hlavním rozdílem v těchto drahách je, že Cvt dráha je aktivní za vegetativních růstových podmínek, kdežto autofagická dráha je navozena při strádání. V obou těchto drahách hraje roli protein AUT7p, který umožňuje vznik vezikulů při adaptaci na zvýšené degradační potřeby buňky. AUT7p je první složkou obou drah při autofagických podmínkách a ukázalo se, že má funkci při rozpínání membrány kolem části cytosolu pro tvorbu autofagosomu. Tvorba proteinu AUT7p je navozena při nedostatku dusíku (Huang et al., 2000).

Vzniku autofagozomu předchází formace pre-autofagozomální struktury. Jen u kvasinek se na ní podílí nejméně pět APG proteinů, které společně hrají zásadní roli při jejím formování (Suzuki et al., 2001). Bylo dokázáno, že některé z těchto proteinů se vyskytují v blízkosti vakuoly v podobě tzv. bodových struktur. Jedním z těchto proteinů je APG1p, který je zodpovědný za vznik autofagozomu z této bodové struktury. APG1 kinázový komplex hraje roli v indukci autofagie i v iniciaci formování autofagozomu. Do pre-autofagozomální struktury je také zahrnut protein AUT7p. Oblast bohatá na tento protein je jedním z kandidátů na pre-autofagozomální strukturu (Suzuki et al., 2001).

Vznik autofagozomu a jeho formování z autofagoforu nebylo u rostlin zatím zcela do detailu popsáno. V tomto procesu však můžeme rozlišit tři fáze. Nejprve dochází k nukleaci, k expanzi a poté k uzavření fagoforu. Model průběhu formace autofagozomu u rostlin byl na základě dostupných dat popsán následujícím způsobem. Jako první se formuje struktura na vnějším povrchu ER, kde byl detekován protein ATG5. Materiál může pocházet z ER, vezikulárního transportu nebo z jiných fúzních událostí v buňce. Poté je k tomuto rostoucímu fagoforu rychle připojen protein ATG8 (Le Bars et al., 2014).

Biogeneze autofagosomu vyžaduje dva konjugační systémy podobné ubiquitinu. Jeden páruje ATG8 s fosfatidylethanolaminem (PE) a druhý páruje ATG12 s ATG5. Konjugaci ATG8 a PE katalyzuje ATG3, což je enzym podobný E2 enzymu. Konjugát ATG8-PE je pro autofagii zásadní. Jádrová oblast ATG3 u *Saccharomyces cerevisiae* je topologicky podobná kanonickým E2 enzymům. V této oblasti jsou dvě části, kde druhá je zodpovědná za vazbu ATG8 (Yamada et al., 2007). Tvorba komplexu ATG12-ATG5 je nezbytná pro podporu lipidace ATG8 (Chung et al., 2010). ATG12-ATG5 pak tvoří heterodimer s ATG16. Umístění komplexu ATG12-ATG5/ATG16 do membrány pak definuje lipidační místo ATG8. Lipidace vyžaduje prekurzor obsahující PI3P. ATG21 se váže přes PI3P na preautofagosomální strukturu. ATG21 přímo interaguje s ATG16 a s ATG8. ATG21 tedy definuje lipidační místo v závislosti na PI3P propojením a uspořádáním komplexu E3 ligázy a ATG8 na preautofagosomální struktuře (Juris et al., 2015).

Počáteční fagofor se rozšiřuje jako převážně planární cisterna, na jejíchž okrajích se nachází komplex ATG5. Přestože v této fázi není známo, zda mezi fagoforem a ER existuje membránové kontinuum, ATG5, ATG8 a ER se dynamicky vyvíjí, jako by byly fyzicky propojeny. Z fagoforické cisterny se stává cisterna ve tvaru misky, rozšiřuje se ve třech směrech a je doprovázená také změnou tvaru ER. Okraje s ATG5 nyní obklopují otvor fagoforu. Následují další tři kroky, které se nejspíš odehrávají současně. ATG5 opouští tuto strukturu, fagoforová membrána je utěsněna a nově formovaný autofagozom opouští ER (Le Bars et al., 2014). Tento průběh je znázorněn na obrázku č. 1.



Obrázek 1 – Model tvorby autofagozomu během makroautofagie u rostlin. Převzato z: Le Bars et al., 2014

Byly identifikovány dva proteiny, které jsou zodpovědné za připojení autofagozomu k mikrotubulům pro následné doručení do vakuoly. Proteiny AUT2p a AUT7p tvoří komplex, který prostřednictvím AUT2p připojuje autofagozom k  $\alpha$  a  $\beta$  tubulinům mikrotubulů (Lang et al., 1998).

Správné dopravení váčků endomembránového systému do vakuol je závislé na působení SNARE proteinů. SNARE proteiny jsou rozděleny do dvou skupin: v-SNARE (vezikulární) umístěné na membráně váčku a t-SNARE (target, cílové) umístěné na cílové membráně. Ty se navzájem rozpoznávají, tvoří komplex a jsou zodpovědné za fúzi membrán, což umožňuje doručit obsah váčku do cílového prostoru. Poté, co je komplex SNARE disociován za spotřeby energie, je v-SNARE recyklován zpět do svého původního kompartmentu. U rostlin byla objevena rodina v-SNARE proteinů VTI1. Ta obsahuje tři proteiny VTI11, VTI12 a VTI13. Ukázalo se, že VTI11 a VTI12 zprostředkovávají různé transportní dráhy, které se ale mohou navzájem nahrazovat ve svých příslušných SNARE komplexech. Avšak aby byla zajištěna životaschopnost, musí být přítomný alespoň nějaký protein z rodiny VTI11 (Surpin et al., 2003). Evolučně konzervovaný komplex upoutávání váčků fungující zejména v posledním stádiu

exocytózy se nazývá exocyst. Homology jeho kanonických podjednotek byly nalezeny také u vyšších rostlin (Eliáš et al., 2003) a bylo potvrzeno, že tvoří komplexy in vivo (Hála et al., 2008) a podílí se na buněčném růstu včetně polarizované expanze pylových láček (Cole et al., 2005). Podle jejich evoluční historie lze podjednotky rostlinných exocyst rozdělit do několika skupin. Zdá se, že rostliny nemají jediný exocystový komplex, ale existuje rozmanitost v jejich variantách (Cvrčková et al., 2012). Bylo potvrzeno, že exocyst funguje v rostlinných buňkách jako komplex a hraje důležitou roli v morfogenezi, jelikož mutanty v podjednotkách vykazují defekty například v etiolovaném prodlužování hypokotylu, vadné klíčení pylu a vadné fenotypy růstu pylové láčky. U *A. thaliana* fungují společně tři homology exocystových podjednotek (SEC3, SEC8 a EXO70A1) (Hála et al., 2008).

Při autofagickém membránovém transportu do vakuoly funguje u *A. thaliana* EXO70B1, což je právě u *A. thaliana* jeden z 23 paralogů EXO70 exocystové podjednotky. Kompartmenty pozitivní na EXO70B1 jsou internalizovány do centrální vakuoly a kolokalizovány s autofagozomálním markerem ATG8f. EXO70B1 vytváří spolu s EXO84b a SEC5 exocystový komplex, který je důležitým regulátorem formace autofagozomu a také důležitý při Golgi nezávislém importu do vakuoly. To dokazuje pozorování, že u EXO70B1 mutanta bylo pozorováno plné potlačení akumulace antokyanů (Kulich et al., 2013).

Klíčovým regulátorem autofagie je protein-kináza TOR (target of rapamycin), která působí jako negativní regulátor autofagie u rostlin a její kinázová aktivita je pro tuto regulaci klíčová (Liu and Bassham, 2010). Je aktivována například v reakci na světlo (Li et al., 2017). Snížená exprese TOR kinázy u *A. thaliana* vede k zastavení růstu rostlin (Deprost et al., 2007).

Nadměrná exprese TOR může potlačovat autofagii navozenou nedostatkem nutrientů a při stresu zasolením a suchem, což naznačuje, že potlačení aktivity TOR je vyžadované pro aktivaci autofagie za těchto podmínek. Naopak nadměrná exprese TOR neměla žádný účinek na autofagii navozenou oxidativním nebo ER stresem, což překvapivě naznačuje, že sama nadměrná exprese TOR není schopná potlačit autofagii navozenou těmito stresy. Pomocí hormonu auxinu, který zvyšuje aktivitu TOR, se dá potvrdit existence dvou cest pro aktivaci autofagie za různých podmínek. Přidání auxinu, v souladu s účinkem nadměrné exprese TOR, inhibovalo autofagii během nedostatku živin, solí a osmotického stresu, ale ne během oxidačního nebo ER stresu. To znamená, že autofagie navozená oxidativním a ER stresem může být regulována prostřednictvím TOR-nezávislé cesty. Auxin potlačuje autofagii



navozenou nedostatkem sacharózy a dusíku a osmotického stresu a to prostřednictvím TOR (Pu et al., 2017).

Procesem autofagie mohou být degradovány i celé organely v případě jejich poškození. Jedná se například o chloroplasty, které mohou být poškozeny slunečním zářením. Tímto poškozením dochází ke zhroucení chloroplastů, které jsou celé transportovány do vakuoly. Tento proces, transport celých chloroplastů do vakuoly, se nazývá chlorofagie. U ATG mutantů k ní nedochází a zhroucené chloroplasty zůstávají akumulované v cytoplazmě. Transport celých chloroplastů do centrální vakuoly je zprostředkován sekvestrováním autofagozomální membránou, na rozdíl od případů, kdy je transportována část stroma prostřednictvím RCB (Rubisco-containing body) dráhy. Chlorofagie může být vyvolána poškozením chloroplastů způsobeným buď umělým viditelným světlem nebo přirozeným slunečním zářením (Izumi et al., 2017).

Také další rostlinné organely, peroxizomy, které hrají klíčovou roli v odbourávání mastných kyselin během post zárodečného růstu pro poskytnutí uhlíku rostlině před nástupem fotosyntézy, mohou být degradovány pomocí autofagie, tzv. pexofagie. K autofagii peroxizomů u *A. thaliana* dochází u hypokotylů například během růstu mladých sazenic. Mutanty defektní v autofagii akumulují přebytečné peroxizomy v hypokotylových buňkách. Dále se ukázalo, že pro degradaci peroxizomálních proteinů ve vakuole je vyžadován ATG7 (Kim et al., 2013).

#### **4.1. Typy mechanismů autofagie**

Proces autofagie v sobě zahrnuje dva základní mechanismy, tedy selektivní a neselektivní autofagii. V rámci neselektivní autofagie dochází k hromadné degradaci cytoplazmatického obsahu. Při selektivní autofagii jsou degradovány zejména buněčné struktury, specifické rozpustné proteiny, poškozené organely nebo proteinové agregáty.

V poslední době se ukazuje, že autofagie je selektivnější proces, než se původně předpokládalo. Selektivní autofagie je zprostředkována pomocí autofagických adaptérů. Mezi hlavní adaptéry se řadí p62 a NBR1, jejichž identifikace pomohla k lepšímu objasnění tohoto procesu. Oba tyto adaptéry jsou selektivně degradovány autofagií a jsou schopné působit jako receptory pro degradaci ubiquitinovaných substrátů. Aby byla zajištěna účinná selektivní autofagie, je potřeba přímá interakce mezi těmito adaptéry a autofagozomálním markerovým proteinem LC3, jejich vlastní schopnost polymerace nebo agregace a jejich schopnost specificky rozpoznávat substráty (Johansen and Lamark, 2011, review). Konkrétní zapojení selektivní autofagie v reakcích na abiotický stres je popsáno také v následujících kapitolách.

## 5. Role autofagie v podmínkách abiotického stresu

Z hlediska zapojení autofagie v reakcích na abiotický stres můžeme rozlišit několik jejích základních úloh, které nastupují v reakci na různé typy stresů. Z mého pohledu jedny z nejrozšířenějších jsou likvidace špatně sbalených proteinů, remobilizace prvků, antioxidační mechanismus nebo stresová paměť.

### 5.1. Likvidace špatně sbalených proteinů

V důsledku stresových podmínek, jako je například tepelný šok, buňky monitorují nesprávně sbalené proteiny, které jsou výsledkem chybné translace, špatného skládání nebo poškození. Špatně sbalené proteiny vážně narušují buněčnou fyziologii, protože exponované hydrofobní zbytky vedou k tvorbě nerozpustných oligomerů a větší agregáty mění základní protein-protein interakce, což způsobuje buněčnou toxicitu. Tyto špatné a potenciálně vysoce toxické proteiny mohou být odstraňovány autofagií (Shaid et al., 2013, review).

Endoplazmatické retikulum je důležitá organela pro sbalování, shromažďování a modifikaci proteinů. Během jejich syntézy na ribozomech je polypeptidům určeno, zda budou sekretovány nebo budou součástí endomembránového systému. Pokud dojde v ER k akumulaci nesbalených proteinů, nazývá se tento stav jako ER stres. Ten může být způsoben teplem nebo látkami jako je například tunikamycin nebo dithiothreitol (Yang et al., 2016). Tato akumulace nesbalených proteinů v ER je spouštěčem autofagie a vyvolává reakci zvanou odpověď na nesbalené proteiny (UPR). Látkou, která spouští ER stres a posléze autofagii, je inositol vyžadující enzym 1b (IRE1b). Tento enzym primárně spouští autofagii při teplotním šoku. Naopak zvýšená exprese proteinu vázajícího imunoglobulin (BIP), který kóduje heat shock protein 70 (HSP70), autofagii redukuje (Yang et al., 2016).

Autofagie ovlivňuje další hlavní degradační cestu zahrnující systém ubiquitin-proteazom a to odstraněním 26S proteazomů. 26S proteazom je u *A. thaliana* degradován autofagií zprostředkovanou ATG8. Tento proces byl nazván proteafagie. U *A. thaliana* byla pozorována depozice proteazomů do vakuol cestou vyžadující součásti autofagického aparátu. Tento transport může být zahájen odděleně hladověním na dusík a chemickou nebo genetickou inhibicí proteazomu, což značí odlišné indukční mechanismy. Inhibované proteazomy se stávají značně ubiquitinovanými a následný autofagický obrat je zprostředkován ubiquitinovým receptorem RPN10. Inhibice proteazomu stimuluje komplexní ubiquitinaci komplexu, přičemž následná proteafagie vyžaduje proteazomovou podjednotku RPN10, která

může současně vázat jak ATG8, tak ubiquitin. RPN10 u *A. thaliana* tedy nejspíš působí jako selektivní autofagický receptor, který cílí na neaktivní 26S proteazomy souběžnými interakcemi s ubiquitinovanými proteazomovými podjednotkami a lipidovaným ATG8 lemujičím obalující autofagické membrány (Marshall et al., 2015).

Selektivní autofagie je zprostředkována autofagickými adaptéry, jako je například p62 nebo NBR1. P62 a NBR1 jsou samy o sobě selektivními substráty autofagie, ale také působí jako receptory nákladu pro degradaci jiných substrátů. Podrobnější analýza rostlinného homologu NBR1 k savčímu NBR1 (z anglického neighbor of BRCA1 gene) ukázala jejich strukturní podobnost, avšak některé funkční vlastnosti sdílí se savčím p62 (Svenning et al., 2011). Narušení NBR1 u *A. thaliana* způsobuje zvýšenou citlivost na spektrum abiotických stresů. NBR1 obsahuje doménu vázající ubiquitin a poškozená stresová tolerance autofagických mutantů vedla k tomu, že při stresových podmínkách docházelo v nerozpustné proteinové frakci ke zvýšení akumulace agregátů buněčných proteinů pozitivních na NBR1 a ubiquitin. Autofagie zprostředkovaná NBR1 směřuje ubiquitinované proteinové agregáty, které jsou s největší pravděpodobností odvozené od denaturovaných a jinak poškozených nepůvodních proteinů tvořících se za stresových podmínek (Zhou et al., 2013).

Je známo, že selektivní autofagie funguje při kontrole kvality proteinů cílenou degradací špatně sbalených a potenciálně toxických proteinů. Při zkoumání role a regulace autofagie u rostliny rajčete (*Solanum lycopersicum*) v toleranci teplotního stresu bylo zjištěno, že teplotní stres indukuje expresi ATG genů a akumulaci autofagosomů. U rajčete byly identifikovány homology dvou důležitých proteinů spojených s autofagií – ATG5 a ATG7 a homology pro NBR1 a WRKY33. Indukovaným umlčením genů ATG5 a ATG7 dochází k částečnému blokování autofagie a byla zjištěna zvýšená citlivost rajčete na tepelný stres. U rostlin s potlačenou autofagií byla více ohrožena fotosyntetická účinnost a kapacita při teplotním stresu než u kontrolních rostlin. Umlčení receptoru selektivní autofagie NBR1, který se zaměřuje na ubiquitinované proteinové agregáty, také narušilo tepelnou toleranci rajčete. Byla více než dvojnásobně zvýšena hladina nerozpustných proteinů po vystavení teplotnímu stresu. Teplem indukovaná autofagie je způsobena kooperativní spoluprací proteinů WRKY33 a ATG a hraje zásadní roli při toleranci tepla, pravděpodobně prostřednictvím selektivního odstranění teplem indukovaných proteinových agregátů. Umlčení WRKY33 vedlo ke zvýšené akumulaci

nerozpustných proteinů při vystavení teplotnímu stresu. WRKY33 proteiny tedy hrají pozitivní roli při teplem navozeném formování autofagozomů (Zhou et al., 2014).

U *A. thaliana* byly identifikovány 3 proteiny (ATI3) spojené s ATG8 obsahující speciální motiv, který je zásadní pro interakci s ATG8. Jejich homology se nacházejí pouze u dvouděložných rostlin. Při narušení ATI3 dochází k ohrožení teplotní tolerance, avšak nezmění se růst ani vývoj rostliny. ATI3 interaguje s UBAC2A (doména spojená s ubiquitinem na C konci) a UBAC2B, což je skupina konzervovaných proteinů ER zapojených do ERAD dráhy u lidí. Zvýšené hladiny UBAC2 indukují tvorbu autofagozomů značených ATG8 a ATI3. Na základě pozorování se předpokládá, že ATI3 a UBAC2 zprostředkovávají selektivní autofagickou cestu s důležitou rolí v reakcích na stres rostlin. Rostlinné ATI3 proteiny pravděpodobně působí jako receptory selektivní autofagie zaměřující se na specifické buněčné složky během rostlinného stresu. Stejně jako u savčích buněk, kde jsou UBAC2 součástí ERAD, byla i v rostlinných buňkách zjištěna jejich lokalizace v ER. Tepelný stres vyvolal tvorbu ATG8 značených ATI3 a UBAC2 bodových struktur, které s největší pravděpodobností představují fagofory nebo autofagozomy, které obsahují ATI3 a UBAC2 (Zhou et al., 2018).

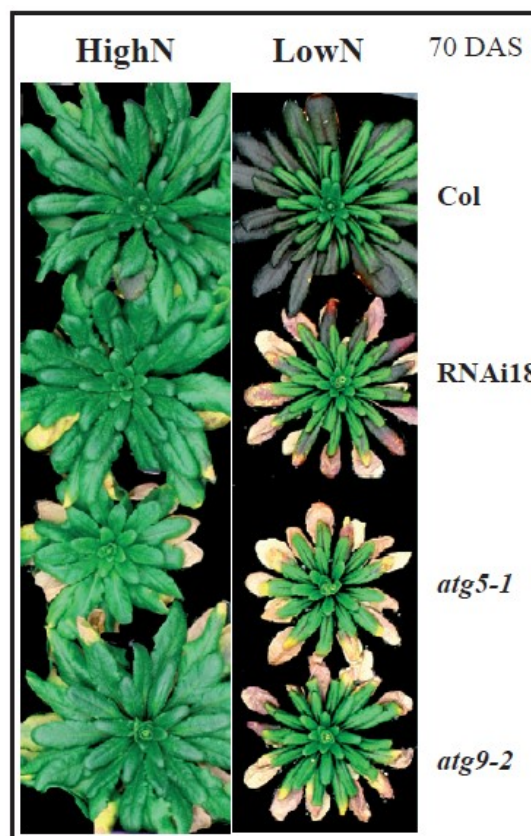
V reakci na teplo nebo na činitla způsobující ER stres aktivují rostliny *A. thaliana* transkripční faktory asociované s ER a faktor sestřihu RNA, IRE1b. IRE1b spojuje mRNA kódující bZIP60, základní doménu obsahující transkripční faktor spojený s rozvinutou proteinovou odpovědí v rostlinách. BZIP60 je vyžadován pro up-regulaci vazebného proteinu 3 (BIP3) v reakci na ER stres a ztrátové mutace v IRE1b nebo bodové mutace v místě sestřihu mRNA bZIP60 jsou defektní v indukcii BIP3. Tato zjištění ukazují, že bZIP60 je v rostlinách aktivován sestřihem RNA a poskytuje příležitosti pro monitorování a modulaci stresových reakcí v rostlinách (Deng et al., 2011).

## 5.2. Remobilizace živin

Rostliny jsou statické a nemohou uniknout z dosahu působení velkého množství biotických i abiotických stresů, kterým jsou vystaveny po celé své růstové období. Aby se vypořádaly s těmito exogenními stresy a mohly přežít měnící se podmínky prostředí, je pro ně nutná recyklace a mobilizace živin z orgánu do orgánu, zejména ze stárnoucích orgánů do sinků, po celou dobu života rostliny. Remobilizace je potřebná také pro dobrou produkci semen. Těmto procesům dopomáhá právě autofagie (Chen et al., 2019, review).

Většina studií se při zkoumání remobilizace živin zaměřuje zejména na dusík. Ten patří mezi jedny z nejdůležitějších minerálních živin pro rostliny (Divito and Sadras, 2014). Při nedostatku dusíku dochází také v rámci senescence k remobilizaci živin (Diaz et al., 2008).

Pro potvrzení role autofagie při remobilizaci dusíku bylo zkoumáno několik autofagických mutantů *A. thaliana*, které byly pěstovány při nízkých a vysokých koncentracích dusičnanů. Výsledky studie ukazuje obrázek č. 2, kde Col značí rostliny divokého typu a zbylé tři jednotlivé autofagické mutanty. Mutanty vykazovaly rychlejší a dřívější stárnutí listů než divoké typy a účinnost remobilizace dusíku u nich byla také znatelně nižší než u divokého typu (Guiboileau et al., 2012).



Obrázek 2 – Časný senescenční fenotyp mutantů s defektem autofagie za podmínek vysokých a nízkých koncentrací dusičnanů. Převzato z: Guiboileau et al., 2012

Další studie provedená u *A. thaliana* pěstované za podmínek nízké a vysoké koncentrace dusičnanů se soustředila na metabolity, enzymatickou aktivitu a obsah proteinů. Stav uhlíku a dusíku byl u autofagických mutantů ovlivněn ještě před tím, než byly pozorovány jakékoli viditelné příznaky stárnutí. Autofagické mutanty hromadily větší množství amoniaku,

aminokyselin a proteinů než rostliny divokého typu. Tato pozorování ukazují, že ATG mutanty akumulují fyziologické a metabolické poruchy. To ukazuje jednak na vedlejší účinky symptomů časného stárnutí listů a jednak přímé účinky defektů autofagické aktivity. Defekt autofagie lze demonstrovat akumulací různých dusíkatých sloučenin (amoniaku, aminokyselin nebo proteinů) v listech. Autofagie tedy zodpovídá za stav uhlíku a dusíku a za obsah proteinů u *A. thaliana* (Guiboileau et al., 2013).

U buněk *A. thaliana* je vyvolána autofagie po hladovění uhlíkem, což také vede k okamžitému zastavení buněčného růstu a k rychlé degradaci buněčných proteinů (Rose et al., 2006). Kvantifikace struktur souvisejících s autofagií ukazuje, že buňky reagují na stresový signál rychlým a masivním, ale přechodným výbuchem autofagické aktivity, který se stresovému signálu přizpůsobuje. Geny související s autofagií jsou na začátku hladovění přechodně up-regulovány. Po hladovění na sacharózu byla pozorována exprese genů AtATG3, AtATG4a, AtATG4b, AtATG7 a AtATG8a – AtATG8i, což jsou ortology kvasinkových genů zapojených do konjugací cesty podobné ubikvitinaci ATG8 a jsou spojeny s tvorbou autofagozomů. Během prvního dne hladovění dochází k degradaci téměř třetiny celkových proteinů. A formace autofagické vakuoly je navozena hladověním na sacharózu. Po autofagické degradaci proteinů vzniká v buňce  $\text{NH}_4^+$ , který je pro buňku toxický. Aby se ho buňka zbavila, pravděpodobně kvůli tomu dochází v buňce k *de novo* syntéze asparaginu (Rose et al., 2006).

Častými typů stresů, které doprovázejí hladovění, jsou vysoká salinita a sucho a i během nich dochází k navození autofagie. U obou těchto stresů dochází ke zvýšení exprese genu spojeného s autofagií *AtATG18a* a následně k tvorbě autofagozomů. Rostlinné mutanty v tomto genu vykazují vyšší citlivost na slané a osmotické podmínky, a proto mohou fungovat v odpovědi rostlin na tyto stresy. Při zkoumání, zda autofagie funguje také při toleranci soli a sucha, bylo zjištěno, že obě tyto podmínky ovlivňují růst, avšak u mutantů daleko výrazněji. Při vystavení suchu mají divoké rostliny listy zelené se správným turgorem, naopak u mutantních rostlin jsou listy postupem času vysušené. Při vystavení solným stresovým podmínkám mají jak divoké tak mutantní rostliny menší vzrůst, ale u mutantních rostlin je růst zpomalen výrazněji. Autofagie je tedy pro rostliny nezbytná, aby mohly tolerovat podmínky s vysokým obsahem solí a sucha. Různé environmentální stresy mohou indukovat autofagii a ta může být regulována odlišnými signálními cestami v různých podmínkách. Při hladovění a solném stresu

je autofagie vedena cestou závislou na NADPH oxidáze zahrnující ROS. Naopak při osmotickém stresu je autofagie regulována cestou nezávislou na NADPH oxidáze a nemusí zahrnovat reaktivní formy kyslíku jako signál (Liu et al., 2009).

Jedním z genů spojených s autofagií je u rostlin AtATG8 a jeho exprese činí rostliny citlivějšími na mírný solný stres a v menší míře na mírný osmotický stres. S touto citlivostí jsou pak spojeny různé změny v kořenové architektuře. Po expozici rostlin solnému stresu totiž divoké rostliny vykazují podstatně silnější zpomalení prodlužování primárních kořenů oproti rostlinám exprimujícím AtATG8. Z toho tedy vyplývá, že inaktivace bazální autofagie je potřebná pro správnou inhibici růstu primárních kořenů v reakci na solný stres (Slavikova et al., 2008).

Vliv stresových podmínek na remobilizaci živin byl zkoumán i u dalších druhů rostlin. U mutantů kukuřice v genu ATG12, který blokuje modifikaci ATG8, byl během nedostatku dusíku a fixního uhlíku narušen autofagický transport a vakuolární štěpení. Fenotypově byly tyto rostliny v podmínkách bohatých na živiny normální a plodné, při nedostatku dusíku byl však růst výrazně pozastaven. Tato studie tedy dokazuje, že vliv nedostatku dusíku výrazně ovlivňuje produktivitu kukuřice (Li et al., 2015).

Další plodinou, u které bylo žádoucí zjistit její vliv autofagie na stresové podmínky, byla rýže. Byla potvrzena autofagická role jejího genu OsATG8 a bylo zjištěno, že se podílí na recyklaci dusíku. Díky těmto výsledkům se předpokládá, že tento gen by mohl sloužit pro molekulární šlechtění rýže (Fan et al., 2020).

Uhlík ovšem není jediným nutrientem, který se rostliny snaží remobilizovat. Častý bývá také nedostatek železa. Rostliny *A. thaliana* defektní v autofagii vykazují výrazně sníženou translokaci železa do semen. Tento problém se týká i dalších prvků jako je například zinek nebo mangan (Pottier et al., 2019).

### **5.3. Antioxidační role autofagie**

Při setkání s oxidačním stresem jsou proteiny značně oxidovány vysoce reaktivními a toxickými reaktivními formami kyslíku (ROS). Takto poškozené proteiny je potřeba rychle a účinně degradovat. Autofagie je právě jedním z hlavních proteolytických systémů, který může oxidované proteiny degradovat.



Oxidační stres je definován jako “vážná nerovnováha mezi tvorbou reaktivních forem kyslíku a antioxidační obranou ve prospěch ROS, která způsobuje nadměrné oxidační poškození biomolekul“ (Halliwell, 2011). Různé stresory, které indukují autofagii, jako je hladovění a hypoxie, mohou zvýšit produkci ROS, kterými jsou například superoxidový anionradikál a peroxid vodíku. ROS jsou molekuly odvozené od kyslíku, které jsou generovány v živých organismech. Jsou obecně vysoce reaktivní a podléhají nescifickým reakcím s biologickými molekulami. Díky své vysoké reaktivitě mají ROS krátkou životnost. ROS je skupina molekul, které jsou volnými radikály a ve svých vnějších orbitalech obsahují nepárové elektrony. Dále sem patří také neradikálové molekuly. Mezi volné radikály patří superoxidový anionradikál ( $O_2^{\bullet-}$ ) a hydroxylový radikál ( $OH^{\bullet}$ ). Peroxid vodíku ( $H_2O_2$ ) je neradikálová ROS. ROS mohou být generovány jak exogenními, tak endogenními faktory. Příklady exogenních faktorů jsou ultrafialové (UV) a ionizující záření, různá farmaceutická činidla a toxiny životního prostředí. Na endogenní úrovni jsou ROS produkovány hlavně během mitochondriálního dýchání. Autofagie indukovaná ROS může být buněčný ochranný mechanismus, který zmírňuje oxidační stres, nebo destruktivní proces. Zvýšené hladiny ROS mohou regulovat autofagii několika různými cestami, jako je aktivace signální kaskády AMPK a komplexu ULK1, oxidace Atg4, narušení interakce Bcl-2/Beclin-1 a porucha mitochondriální homeostázy vedoucí k mitofagii. Aktivace autofagie může zase regulovat oxidační stres recyklací poškozených mitochondrií produkujících ROS. ROS tedy mohou regulovat autofagii a autofagie zase může regulovat oxidační stres (Redza-Dutordoir and Averill-Bates, 2021, review).

Za hlavní ROS regulující autofagii je považován superoxidový anionradikál, jehož hladina stoupá při hladovění (Chen et al., 2009). Jako fyziologická adaptační cesta, která chrání buňky před poškozením vyvolaným stresem, slouží osa autofagie ROS-ATM-CHK2-Beclin 1. Autofagie zprostředkovaná kinázou CHK2 (checkpoint kinase 2) omezuje hladiny ROS během nedostatku živin a také omezuje metabolické výkyvy k udržení homeostáze buněk a tkání. V reakci na stimulaci ROS se CHK2 váže a fosforyluje Beclin 1, čímž podporuje autofagii prostřednictvím uvolnění Beclin 1 z Bcl-2 sekvence. V této dráze tedy funguje ROS jako signální molekula k modulaci autofagického toku. Autofagie zprostředkovaná CHK2 má také neočekávanou roli ve snižování hladin ROS odstraněním poškozených mitochondrií, které jsou nezbytné pro přežití buněk ve stresových podmínkách (Guo et al., 2020).

Nízké dávky expozice ROS stimulují mTORC1, zatímco vysoké koncentrace nebo dlouhodobé působení ROS snižují aktivitu mTORC1 in vivo a v řadě buněčných linií (Li et al., 2010).

Oxidační stres je navozen po ošetření rostlin H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> nebo MV (methyl viologen) (Xiong et al., 2007). H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> může difundovat přes membrány a přímo způsobit poškození buněčných částí, MV přijímá elektrony z PSI v chloroplastech a poté reaguje s kyslíkem za vzniku superoxidu. Mutantní transgenní rostliny RNAi-AtATG18a jsou citlivější na ošetření MV a akumulují vyšší úroveň oxidovaných proteinů ve srovnání s divokým typem. Tato data naznačují, že autofagie se podílí na degradaci oxidovaných proteinů během oxidačního stresu u *A. thaliana*. Oxidované proteiny mohou být transportovány do vakuoly pro degradaci autofagickou cestou. Tímto způsobem mohou buňky eliminovat oxidované proteiny, aby zvýšily své přežití pod silným oxidačním stresem (Xiong et al., 2007).

Hliník je jedním z toxických prvků v půdě. Oxidační stres způsobený hliníkem může poškodit některé buněčné součásti v závislosti na druhu rostliny. V citlivé linii u kukuřice indukoval hliník a oxidační stres buněčnou smrt v buňkách kořenové špičky (Boscolo et al., 2003). Při studiu role autofagie v reakci na stres z hliníku u *A. thaliana* bylo zjištěno, že hliník může zvýšit expresi genů souvisejících s autofagií. Mutanty s defektní autofagií byly citlivější na podmínky s hliníkem a vykazovaly vážnější poškození než rostliny divokého typu, včetně vyšších oxidačních poškození a akumulace ROS. Oddělené listy mutant měly menší schopnost zůstat zelené při ošetření hliníkem. Tyto výsledky naznačují, že hliník může indukovat autofagii, která je nezbytná pro obranné reakce na toxicitu hliníku u *A. thaliana* a může toto poškození zmírnit odstraněním nadprodukce ROS (Ren et al., 2016).

Vzájemná regulace ROS a autofagie byla studována po navození hypoxického stresu u kořenů pšenice. Výsledky ukázaly, že stres z hypoxie způsobil větší zvýšení hladin ROS ve stéle než v kůře a stéle měla také vyšší úroveň autofagie. Dále se také ukázalo, že autofagie by mohla odstranit přebytečné ROS, protože předchozí přidání inhibitoru autofagie zvýšilo hladiny ROS v kořenech a naopak přidání induktoru autofagie hladiny ROS snížilo. Lze tedy říci, že stres z hypoxie indukoval akumulaci ROS, které působí jako signál pro nastartování autofagie. Kromě toho vyšší hladina autofagie usnadňuje eliminaci oxidačního poškození způsobeného nadměrným množstvím ROS a tím zvyšuje přežívání buněk (Lin et al., 2021).

Ukázalo se, že autofagie hraje klíčovou roli v regulaci aktivity kořenového meristému zprostředkované glukózou. V reakci na signalizaci glukózou slouží hladiny ROS zprostředkované autofagií jako centrální regulátor mající dvojí roli v regulaci kořenového systému. Na jedné straně nerovnováha různých druhů ROS nebo akumulace ROS indukovaná vysokými hladinami glukózy oxiduje auxin pro degradaci, zhoršuje aktivitu kořenového meristému a následně inhibuje růst kořene. Na druhé straně vysoké hladiny ROS také posilují konstitutivní autofagii způsobem nezávislým na TOR, aby se zmírnilo oxidační poškození způsobené nadbytkem ROS a zachovala se funkce kořenového meristému za stresových podmínek. Naproti tomu mutanty v genech spojených s autofagií narušují přenos signálu o vysoké hladině glukózy, což může zmírnit jak oxidaci auxinu pomocí ROS, tak konstitutivní autofagii. Tím se zvýší tolerance vůči glukóze, a tedy se zvýší růst kořenů za podmínek s vysokým obsahem glukózy (Huang et al., 2019).

U *A. thaliana* zvýšené hladiny redoxního responzivního transkripčního faktoru 1 (RRTF1) způsobují akumulaci ROS z důvodu působení abiotického stresu. Různé ROS samy stimulují expresi RRTF1, což naznačuje, že RRTF1 zesiluje tvorbu ROS v reakci na stres, který již generuje bazální hladiny ROS (Matsuo et al., 2015).

Další funkci v regulaci autofagie má GAPC (glyceraldehyd-3-fosfát dehydrogenáza). Protein 3 související s autofagií (ATG3) reaguje s cytosolickou GAPC za účelem regulace autofagie u rostlin *Nicotiana benthamiana*. ROS inhibují jejich interakci. Ztlumení GAPC aktivuje autofagii závislou na ATG3, zatímco nadměrná exprese GAPC autofagii u rostlin potlačuje (Han et al., 2015).

#### **5.4. Stresová paměť**

Rostliny si vyvinuly mechanismy, díky kterým si mohou pamatovat minulé stresové události a připravit svou odpověď tak, aby při příštím setkání se stresem mohly reagovat rychleji a silněji. Výzkumy z posledních let odhalují mechanismy získávání a ukládání těchto informací. Roste také porozumění závažnosti souvislosti stresu a paměti (Hilker and Schmölling, 2019, review).

V průběhu evoluce se rostlinné genotypy musely adaptovat na nejrůznější abiotické stresy, jako jsou měnící se světelné podmínky, teplo, sucho, chlad nebo mráz. Genotypová adaptace na stres je výhodná zejména tehdy, pokud se stres vyskytuje pravidelně. Nicméně

jelikož se většina stresových událostí vyskytuje nepravidelně a přechodně, je pro rostliny výhodná genotypová a fenotypová plasticita. Po opakovaném vystavení stresu se rostlina může naučit se s ním vyrovnávat a tím zabránit zhoršení své kondice (Hilker and Schmölling, 2019, review).

Stresová paměť byla studována u *A. thaliana* při působení tepelného stresu a bylo zjištěno, že autofagie je důležitý negativní regulátor tepelné paměti a tím i tolerance vůči následným tepelným stresům. Autofagie zprostředkovává specifickou degradaci proteinů tepelného šoku (HSP), což vede k akumulaci proteinových agregátů po vystavení druhému teplotnímu stresu a k narušení tolerance tepla. Mutanty s poškozenou autofagií vykazují lepší tepelnou paměť. Trvale vysoká hladina HSP u ATG mutantů chrání buněčné proteiny proti škodlivým účinkům působení dalšího teplotního stresu a brání hromadění nerozpustných proteinových agregátů (Sedaghatmehr et al., 2019).

V reakcích rostlin na opakovaný tepelný stres hraje roli selektivní autofagie zprostředkovaná receptorem NBR1, který kontroluje hladiny HSP. U *A. thaliana* byla během fáze zotavení detekována zvýšená akumulace struktur připomínajících autofagická tělíska a obsahujících NBR1. U ATG mutantů byla pozorována vyšší akumulace NBR1, což potvrdilo, že NBR1 je substrátem autofagie a případně receptorem autofagie během zotavení z tepelného stresu. Ztrátová mutace NBR1 vede k silnější paměti na tepelný stres (Thirumalaikumar et al., 2020).

## 6. Závěr

Autofagie je velice zajímavý proces probíhající v buňce. Přestože se jedná o konzervovaný mechanismus, který lze nalézt u kvasinek, živočichů i rostlin, jeho regulace je poměrně složitá. Při vypracovávání této rešerše jsem narazila na více než tři desítky objevených genů účastnících se autofagie. Porozumění mechanismům autofagie patří v posledních letech mezi intenzivně zkoumaná témata v rámci buněčné biologie nejen u rostlin. Jednotlivé kroky jsou přesně regulovány a stačí malý zásah do takto řízeného mechanismu, který se pak může projevit výraznou změnou v celé dráze. Autofagie může být aktivována rychle a přechodně. Jedná se o dynamický proces, který musí být schopen rychlé regulace, aby mohl odpovídat na dočasné požadavky buněk za proměnlivých podmínek. Toho mohou rostliny využívat vzhledem k jejich nemožnosti úniku před nepříznivými podmínkami. Rostliny totiž musí reagovat na přechodné, ale opakující se stresy. Autofagie je zahrnuta téměř ve všech aspektech života rostliny. Z hlediska významu se jedná opravdu o důležitý proces, který běží jak za normálních, tak za stresových podmínek. Za normálních podmínek běží tzv. bazální autofagie, která je zodpovědná za odstranění nepotřebných součástí buňky nebo za remobilizaci živin. V reakci na stresové podmínky běží autofagie kvůli odstranění nechtěného nebo poškozeného materiálu. Odstraňovány nemusí být jen buněčné součásti, ale někdy jsou odstraňovány i celé organely.

Autofagie je tedy velké téma, v rámci kterého už bylo učiněno mnoho poznatků i u rostlin, avšak stále ještě zůstává spousta oblastí a mechanismů, které zbývá objevit nebo objasnit. Je potřeba například zjistit, jestli existují ještě další geny spojené s autofagií.

Po vytvoření mutantů v jednotlivých genech můžeme dobře vidět jejich úlohu v rámci tohoto procesu. Jednotlivé mutanty vykazují odlišné chování na jednotlivé typy stresů. V této práci jsem se zaměřila na zapojení autofagie za stresových podmínek, na to, jaké mechanismy probíhají v reakci na různé typy abiotických stresů.

Autofagie hraje roli ve stresové paměti a u některých rostlin je také zahrnuta v toleranci stresu. Primárně byla autofagie považována za neselektivní, kdy jsou degradovány části cytoplazmy. S identifikací autofagických receptorů u rostlin pak můžeme hovořit o autofagii selektivní.

Funkce genů spojených s autofagií jsou zajímavými tématy pro výzkum, protože regulační dráhy autofagie jsou složité a ne zcela kompletně popsány. Je třeba v těchto výzkumech pokračovat, aby se mechanismus co nejvíce objasnil. Porozumění mechanismům autofagie je důležité i pro zemědělské biotechnologie. Získané poznatky potom mohou být využity ke šlechtění odolnějších rostlin, což může mít velký prospěch pro hospodářství. Díky stresové paměti rostlin je možné je následně adaptovat na nepříznivé podmínky. To poté může mít velký přínos pro zemědělství, kde je vždy snaha o co největší výnosy i při ne zcela ideálních podmínkách. Své využití to může najít například na místech s nedostatkem zemědělské půdy nebo na místech s nepříznivými klimatickými podmínkami.

## 7. Seznam použité literatury

+ knihy, skripta

\* review

\***Avin-Wittenberg, T.** (2019). Autophagy and its role in plant abiotic stress management. *Plant Cell and Environment*, 42(3), 1045–1053.

**Boscolo, P. R. S., Menossi, M., & Jorge, R. A.** (2003). Aluminum-induced oxidative stress in maize. *Phytochemistry*, 62(2), 181-189.

+**BUCHANAN, B. B., GRUISSEM, W., JONES, R. L.** (2000). *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*. West Sussex: John Wiley & Sons

**Cole, R. A., Synek, L., Žárský, V., & Fowler, J. E.** (2005). SEC8, a subunit of the putative arabidopsis exocyst complex, facilitates pollen germination and competitive pollen tube growth. *Plant Physiology*, 138(4), 2005–2018.

**Cvrčková, F., Grunt, M., Bezvoda, R., Hála, M., Kulich, I., Rawat, A., & Žárský, V.** (2012). Evolution of the land plant exocyst complexes. *Frontiers in Plant Science*, 3, 159.

**Deng, Y., Humbert, S., Liu, J. X., Srivastava, R., Rothstein, S. J., & Howell, S. H.** (2011). Heat induces the splicing by IRE1 of a mRNA encoding a transcription factor involved in the unfolded protein response in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(17), 7247–7252.

**Deprost, D., Yao, L., Sormani, R., Moreau, M., Leterreux, G., Bedu, M., Robaglia, C., & Meyer, C.** (2007). The *Arabidopsis* TOR kinase links plant growth, yield, stress resistance and mRNA translation. *EMBO Reports*, 8(9), 864–870.

**Diaz, C., Lemaître, T., Christ, A., Azzopardi, M., Kato, Y., Sato, F., Morot-Gaudry, J. F., le Dily, F., & Masclaux-Daubresse, C.** (2008). Nitrogen recycling and remobilization are differentially controlled by leaf senescence and development stage in *Arabidopsis* under low nitrogen nutrition. *Plant Physiology*, 147(3), 1437–1449.

**Divito, G. A., & Sadras, V. O.** (2014). How do phosphorus, potassium and sulphur affect plant growth and biological nitrogen fixation in crop and pasture legumes? A meta-analysis. *Field Crops Research*, 156, 161–171.

**Doelling, J. H., Walker, J. M., Friedman, E. M., Thompson, A. R., & Vierstra, R. D.** (2002). The APG8/12-activating enzyme APG7 is required for proper nutrient recycling and senescence in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Biological Chemistry*, 277(36), 33105–33114.

**Eliáš, M., Drdová, E., Žiak, D., Bavlínka, B., Hála, M., Cvrčková, F., Soukupová, H., & Žárský, V.** (2003). The exocyst complex in plants. *Cell Biology International*, 27(3), 199–201.

**Fan, T., Yang, W., Zeng, X., Xu, X., Xu, Y., Fan, X., Luo, M., Tian, C., Xia, K., & Zhang, M.** (2020). A rice autophagy gene OsATG8b is involved in nitrogen remobilization and control of grain quality. *Frontiers in Plant Science*, *11*, 588.

**Guiboileau, A., Avila-Ospina, L., Yoshimoto, K., Soulay, F., Azzopardi, M., Marmagne, A., Lothier, J., & Masclaux-Daubresse, C.** (2013). Physiological and metabolic consequences of autophagy deficiency for the management of nitrogen and protein resources in *Arabidopsis* leaves depending on nitrate availability. *New Phytologist*, *199*(3), 683–694.

**Guiboileau, A., Yoshimoto, K., Soulay, F., Bataillé, M. P., Avice, J. C., & Masclaux-Daubresse, C.** (2012). Autophagy machinery controls nitrogen remobilization at the whole-plant level under both limiting and ample nitrate conditions in *Arabidopsis*. *New Phytologist*, *194*(3), 732–740.

**Guo, Q., Wang, S., Zhang, S., Xu, H., Li, X., Guan, Y., Yi, F., Zhou, T., Jiang, B., Bai, N., Ma, M., Wang, Z., Feng, Y., Guo, W., Wu, X., Zhao, G., Fan, G., Zhang, S., Wang, C., Cao, L., O'Rourke, B., Liu, S., Wang, P., Han, S., Song, X., Cao, L.** (2020). ATM - CHK 2-Beclin 1 axis promotes autophagy to maintain ROS homeostasis under oxidative stress. *The EMBO Journal*, *39*(10), e103111.

**Hála, M., Cole, R., Synek, L., Drdová, E., Pečenková, T., Nordheim, A., Lamkemeyer, T., Madlung, J., Hochholdinger, F., Fowler, J. E., & Žárský, V.** (2008). An exocyst complex functions in plant cell growth in *Arabidopsis* and tobacco. *Plant Cell*, *20*(5), 1330–1345.

**Halliwell, B.** (2011). Free radicals and antioxidants - Quo vadis?. *Trends in Pharmacological Sciences*, *32*(3), 125–130.

**Han, S., Wang, Y., Zheng, X., Jia, Q., Zhao, J., Bai, F., Hong, Y., & Liu, Y.** (2015). Cytoplasmic glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenases interact with ATG3 to negatively regulate autophagy and immunity in *Nicotiana benthamiana*. *Plant Cell*, *27*(4), 1316–1331.

**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*, *271*(30), 17621–17624.

**Harding, T. M., Morano, K. A., Scott, S. v, & Klionsky, D. J.** (1995). Isolation and characterization of yeast mutants in the cytoplasm to vacuole protein targeting pathway. *The Journal of cell biology*, *131*(3), 591-602.

**\*Hilker, M., & Schmülling, T.** (2019). Stress priming, memory, and signalling in plants. *Plant Cell and Environment*, *42*(3), 753–761.

**Huang, L., Yu, L. J., Zhang, X., Fan, B., Wang, F. Z., Dai, Y. S., Qi, H., Zhou, Y., Xie, L. J., & Xiao, S.** (2019). Autophagy regulates glucose-mediated root meristem activity by modulating ROS production in *Arabidopsis*. *Autophagy*, *15*(3), 407–422.



**Huang, W.- P., Scott, S. v, Kim, J., & Klionsky, D. J.** (2000). The itinerary of a vesicle component, Aut7p/Cvt5p, terminates in the yeast vacuole via the autophagy/Cvt pathways. *The Journal Of Biological Chemistry*, 275(8), 5845-5851.

**\*Chen, Q., Shinozaki, D., Luo, J., Pottier, M., Havé, M., Marmagne, A., Reisdorf-Cren, M., Chardon, F., Thomine, S., Yoshimoto, K., & Masclaux-Daubresse, C.** (2019). Autophagy and nutrients management in plants. *Cells*, 8(11), 1426.

**Chen, Y., Azad, M. B., & Gibson, S. B.** (2009). Superoxide is the major reactive oxygen species regulating autophagy. *Cell Death and Differentiation*, 16(7), 1040–1052.

**Chung, T., Phillips, A. R., & Vierstra, R. D.** (2010). ATG8 lipidation and ATG8-mediated autophagy in *Arabidopsis* require ATG12 expressed from the differentially controlled ATG12A and ATG12B loci. *Plant Journal*, 62(3), 483–493.

**Izumi, M., Ishida, H., Nakamura, S., & Hidema, J.** (2017). Entire photodamaged chloroplasts are transported to the central vacuole by autophagy. *Plant Cell*, 29(2), 377–394.

**\*Johansen, T., & Lamark, T.** (2011). Selective autophagy mediated by autophagic adapter proteins. *Autophagy*, 7(3), 279-296.

**Juris, L., Montino, M., Rube, P., Schlotterhose, P., Thumm, M., & Krick, R.** (2015). PI3P binding by Atg21 organises Atg8 lipidation . *The EMBO Journal*, 34(7), 955–973.

**Kim, J., Lee, H., Lee, H. N., Kim, S. H., Shin, K. D., & Chung, T.** (2013). Autophagy-related proteins are required for degradation of peroxisomes in *Arabidopsis* hypocotyls during seedling growth. *Plant Cell*, 25(12), 4956–4966.

**Klionsky, D. J., Cregg, J. M., Dunn, W. A., & Emr, S. D.** (2003). Letter to the Editor. *Developmental Cell*, 5, 539-545.

**Kulich, I., Pečenková, T., Sekereš, J., Smetana, O., Fendrych, M., Foissner, I., Höftberger, M., & Žárský, V.** (2013). *Arabidopsis* exocyst subcomplex containing subunit EXO70B1 is involved in autophagy-related transport to the vacuole. *Traffic*, 14(11), 1155–1165.

**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. *The EMBO Journal*, 17(13), 3597-3607.

**le Bars, R., Marion, J., le Borgne, R., Satiat-Jeunemaitre, B., & Bianchi, M. W.** (2014). ATG5 defines a phagophore domain connected to the endoplasmic reticulum during autophagosome formation in plants. *Nature Communications*, 5(1), 1-10.

**Li, F., Chung, T., Pennington, J. G., Federico, M. L., Kaeppler, H. F., Kaeppler, S. M., & Otegui, M. S.** (2015). Autophagic recycling plays a central role in maize nitrogen remobilization. *Plant Cell*, 27(5), 1389–1408.

- Li, M., Zhao, L., Liu, J., Liu, A., Jia, C., Ma, D., Jiang, Y., & Bai, X.** (2010). Multi-mechanisms are involved in reactive oxygen species regulation of mTORC1 signaling. *Cellular Signalling*, 22(10), 1469–1476.
- Li, X., Cai, W., Liu, Y., Li, H., Fu, L., Liu, Z., Xu, L., Liu, H., Xu, T., & Xiong, Y.** (2017). Differential TOR activation and cell proliferation in *Arabidopsis* root and shoot apices. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 114(10), 2765–2770.
- Lin, Z., Wang, Y. L., Cheng, L. S., Zhou, L. L., Xu, Q. T., Liu, D. C., Deng, X. Y., Mei, F. Z., & Zhou, Z. Q.** (2021). Mutual regulation of ROS accumulation and cell autophagy in wheat roots under hypoxia stress. *Plant Physiology and Biochemistry*, 158, 91–102.
- Liu, Y., & Bassham, D. C.** (2010). TOR is a negative regulator of autophagy in *Arabidopsis thaliana*. *PLoS ONE*, 5(7), e11883.
- Liu, Y., Xiong, Y., & Bassham, D. C.** (2009). Autophagy is required for tolerance of drought and salt stress in plants. *Autophagy*, 5(7), 954–963.
- Marshall, R. S., Li, F., Gemperline, D. C., Book, A. J., & Vierstra, R. D.** (2015). Autophagic degradation of the 26S proteasome is mediated by the dual ATG8/ubiquitin receptor RPN10 in *Arabidopsis*. *Molecular Cell*, 58(6), 1053–1066.
- Matsuo, M., Johnson, J. M., Hieno, A., Tokizawa, M., Nomoto, M., Tada, Y., Godfrey, R., Obokata, J., Sherameti, I., Yamamoto, Y. Y., Böhmer, F. D., & Oelmüller, R.** (2015). High REDOX RESPONSIVE TRANSCRIPTION FACTOR1 levels result in accumulation of reactive oxygen species in *Arabidopsis thaliana* shoots and roots. *Molecular Plant*, 8(8), 1253–1273.
- \*Mizushima, N.** (2007). Autophagy: Process and function. *Genes and Development*, 21(22), 2861–2873.
- Moriyasu, Y., & Ohsumi, Y.** (1996). Autophagy in tobacco suspension-cultured cells in response to sucrose starvation. *Plant Physiology*, 111(4), 1233–1241.
- +PAVLOVÁ, L.** (2005). *Fyziologie rostlin*. Univerzita Karlova v Praze: Nakladatelství Karolinum
- Pottier, M., Dumont, J., Masclaux-Daubresse, C., & Thomine, S.** (2019). Autophagy is essential for optimal translocation of iron to seeds in *Arabidopsis*. *Journal of Experimental Botany*, 70(3), 845–858.
- +PROCHÁZKA, S., MACHÁČKOVÁ, I., KREKULE, J., ŠEBÁNEK, J.** (1998). *Fyziologie rostlin*. Praha: Academia
- Pu, Y., Luo, X., & Bassham, D. C.** (2017). Tor-dependent and -independent pathways regulate autophagy in *Arabidopsis thaliana*. *Frontiers in Plant Science*, 8, 1204.

- \*Redza-Dutordoir, M., & Averill-Bates, D. A.** (2021). Interactions between reactive oxygen species and autophagy: Special issue: Death mechanisms in cellular homeostasis. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, 1868(8), 119041.
- Ren, H., Li, Y. nan, Zhao, F. fei, Pu, X. jun, Wei, L. jie, Lv, X., Zhu, F., & Lin, H. hui.** (2016). The role of autophagy in alleviating damage of aluminum stress in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Growth Regulation*, 79(2), 167–175.
- Rose, T. L., Bonneau, L., Der, C., Marty-Mazars, D., & Marty, F.** (2006). Starvation-induced expression of autophagy-related genes in *Arabidopsis*. *Biology of the Cell*, 98(1), 53–67.
- Sedaghatmehr, M., Thirumalaikumar, V. P., Kamranfar, I., Marmagne, A., Masclaux-Daubresse, C., & Balazadeh, S.** (2019). A regulatory role of autophagy for resetting the memory of heat stress in plants. *Plant Cell and Environment*, 42(3), 1054–1064.
- \*Shaid, S., Brandts, C. H., Serve, H., & Dikic, I.** (2013). Ubiquitination and selective autophagy. *Cell Death and Differentiation*, 20(1), 21-30.
- Slavikova, S., Ufaz, S., Avin-Wittenberg, T., Levanony, H., & Galili, G.** (2008). An autophagy-associated Atg8 protein is involved in the responses of *Arabidopsis* seedlings to hormonal controls and abiotic stresses. *Journal of Experimental Botany*, 59(14), 4029–4043.
- Surpin, M., Zheng, H., Morita, M. T., Saito, C., Avila, E., Blakeslee, J. J., Bandyopadhyay, A., Kovaleva, V., Carter, D., Murphy, A., Tasaka, M., & Raikhel, N.** (2003). The VTI family of SNARE proteins is necessary for plant viability and mediates different protein transport pathways. *Plant Cell*, 15(12), 2885–2899.
- Suzuki, K., Kirisako, T., Kamada, Y., Mizushima, N., Noda, T., & Ohsumi, Y.** (2001). The pre-autophagosomal structure organized by concerted function of APG genes is essential for autophasome formation. *The EMBO Journal*, 20(21), 5971-5981.
- Svenning, S., Lamark, T., Krause, K., & Johansen, T.** (2011). Plant NBR1 is a selective autophagy substrate and a functional hybrid of the mammalian autophagic adapters NBR1 and p62/SQSTM1. *Autophagy*, 7(9), 993–1010.
- 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), 301-311.
- Thirumalaikumar, V. P., Gorka, M., Schulz, K., Masclaux-Daubresse, C., Sampathkumar, A., Skirycz, A., Viestra, R. D., & Balazadeh, S.** (2020). Selective autophagy regulates heat stress memory in *Arabidopsis* by NBR1-mediated targeting of HSP90 and ROF1. *Autophagy*, 1-16.
- Xiong, Y., Contento, A. L., Nguyen, P. Q., & Bassham, D. C.** (2007). Degradation of oxidized proteins by autophagy during oxidative stress in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 143(1), 291–299.

**Yamada, Y., Suzuki, N. N., Hanada, T., Ichimura, Y., Kumeta, H., Fujioka, Y., Ohsumi, Y., & Inagaki, F.** (2007). The crystal structure of Atg3, an autophagy-related ubiquitin carrier protein (E2) enzyme that mediates Atg8 lipidation. *Journal of Biological Chemistry*, *282*(11), 8036–8043.

**Yang, X., Srivastava, R., Howell, S. H., & Bassham, D. C.** (2016). Activation of autophagy by unfolded proteins during endoplasmic reticulum stress. *Plant Journal*, *85*(1), 83–95.

**Zhou, J., Wang, J., Cheng, Y., Chi, Y. J., Fan, B., Yu, J. Q., & Chen, Z.** (2013). NBR1-mediated selective autophagy targets insoluble ubiquitinated protein aggregates in plant stress responses. *PLoS Genetics*, *9*(1), e1003196.

**Zhou, J., Wang, J., Yu, J. Q., & Chen, Z.** (2014). Role and regulation of autophagy in heat stress responses of tomato plants. *Frontiers in Plant Science*, *5*, 174.

**Zhou, J., Wang, Z., Wang, X., Li, X., Zhang, Z., Fan, B., Zhu, C., & Chen, Z.** (2018). Dicot-specific ATG8-interacting AT13 proteins interact with conserved UBAC2 proteins and play critical roles in plant stress responses. *Autophagy*, *14*(3), 487–504.