

## SELEKTYWNE RODZAJE AUTOFAGII

### SELECTIVE KINDS OF AUTOPHAGY

Sławomir BOREK<sup>1</sup>, Maria RUTA-PIOSIK<sup>1</sup>, Ewelina PALUCH<sup>1</sup>,  
Małgorzata PIETROWSKA-BOREK<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Zakład Fizjologii Roślin, Wydział Biologii, Uniwersytet im Adama Mickiewicza  
w Poznaniu

<sup>2</sup>Katedra Biochemii i Biotechnologii, Wydział Rolnictwa i Bioinżynierii,  
Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu

*Streszczenie:* Autofagia jest to proces fizjologiczny zachodzący w komórkach drożdży, zwierząt i roślin. W trakcie autofagii dochodzi do degradacji różnych elementów komórki takich jak cytoplazma, organelle komórkowe, czy różnego rodzaju kompleksy białkowe i inne makromolekuły. W warunkach optymalnych autofagia zachodzi z niewielką intensywnością, ale ulega ona wyraźnemu nasileniu w wyniku działania różnych czynników stresowych; zarówno abiotycznych jak i biotycznych. Modelowym przykładem stresu, który wzmacnia autofagię jest głód cukrowcowy lub azotowy. Autofagia została odkryta w latach 60-tych ubiegłego wieku i przez dziesięciolecia uważana była za proces, podczas którego różne elementy komórki ulegają degradacji w sposób nieselektywny i zmasowany np. w warunkach głodu. Taka kontrolowana autodestrukcja umożliwia przeżycie w niekorzystnych warunkach stresowych. Jednakże wyniki badań zrealizowanych w ciągu ostatnich kilkunastu lat jednoznacznie dowodzą, że autofagia może być też procesem, w którym elementy komórki ulegają degradacji w sposób wybiórczy tzn. użytkowane są tylko te elementy komórki, które są uszkodzone, zużyte lub nie są już w komórce potrzebne. Selektywne rodzaje autofagii mają istotne znaczenie w obrocie metabolicznym i w utrzymaniu homeostazy komórki. Poszczególne rodzaje selektywnej autofagii mają swoje nazwy, które najczęściej pochodzą od nazw elementów komórki ulegających degradacji. Dla przykładu, podczas peksofagii wybiórczej dekompozycji ulegają peroksosomy, w trakcie mitofagii – mitochondria, rybofagii – rybosomy, retikulofagii – retikulum endoplazmatyczne, itd. Selektywne rodzaje autofagii badano początkowo w komórkach drożdży i zwierząt, ale odkrycia dokonane w ciągu ostatnich kilku lat potwierdziły występowanie różnych rodzajów autofagii selektywnej także w komórkach roślinnych. W niniejszym artykule przedstawiono skondensowany i najnowszy stan wiedzy dotyczący poszczególnych rodzajów autofagii selektywnej zachodzących w komórkach drożdży, zwierząt i roślin. Szczególną jednak uwagę zwrócono na nowe osiągnięcia dotyczące komórek roślinnych.

*Słowa kluczowe:* autofagosom, białka Atg, mitofagia, peksofagia

*Summary:* Autophagy is a physiological process that occurs in yeast, animal and plant cells. During autophagy several cell components such as the cytoplasm, organelles or various types of protein complexes and other macromolecules are degraded. Autophagy occurs at a basal level under optimal conditions, but it is markedly enhanced as a result of various abiotic and biotic stress factors. Autophagy is considerably induced mainly under sugar and nitrogen starvation. Autophagy was discovered in the 60s of the last century and for decades was considered as a process in which the various cell components are degraded in massive and non-selective manner, e.g. during starvation conditions. Such a controlled self-destruction allows surviving in adverse conditions. However, the results of research carried out over the last several years clearly show that autophagy can also be a process, in which the cell components are broken down in a selective manner, i.e. they are degraded only those elements of the cells that are damaged, nonfunctional or are no longer needed in the cell. Selective kinds of autophagy play an important role in the metabolic turnover and in cell homeostasis. The several kinds of selective autophagy have their own names, which mostly come from the names of the cell components which undergo degradation. For example, during pexophagy the peroxisomes are selectively degraded, during mitophagy – mitochondria, ribophagy – ribosomes, reticulophagy – endoplasmic reticulum, etc. Selective kinds of autophagy were initially investigated in yeast and animal cells, but the discoveries made in the last few years have confirmed the occurrence of various kinds of selective autophagy also in plant cells. This article presents a condensed and state of the art for the various kinds of selective autophagy occurring in yeast, animal and plant cells. However, particular attention was paid to the new achievements on plant cells.

*Key words:* Atg proteins, autophagosome, mitophagy, pexophagy

## WSTĘP

Autofagia, czyli samo-zjadanie, jest konserwatywnym zjawiskiem występującym w komórkach drożdży, zwierząt i roślin i polega przede wszystkim na degradacji fragmentów cytoplazmy wraz z występującymi w niej organellami, kompleksami białkowymi i innymi makromolekułami. Pomimo tego, że autofagia znana jest od lat 60-tych dwudziestego wieku to do niedawna uważano, że jest to proces, podczas którego różne komponenty komórki degradowane są w sposób nieselektywny. Dopiero badania z ostatnich lat dostarczyły wielu informacji molekularnych i fizjologicznych wskazujących na funkcjonowanie w komórkach selektywnych rodzajów autofagii. Termin *autofagia selektywna* jest rozumiany jako proces autofagii, w którym degradowane są tylko wybrane organelle, agregaty białkowe lub makromolekuły [8, 32, 65, 67, 77, 87, 119]. W pierwszej kolejności selektywne rodzaje autofagii odkryto u drożdży i zwierząt. Natomiast selektywne rodzaje autofagii w komórkach roślinnych opisywane są dopiero w ostatnich kilku latach. Pierwsze dane dotyczące selektywnej, autofagicznej degradacji kompleksów białkowych w komórkach roślinnych pochodzą z roku 2006 [113], a pierwsze dowody na występowanie np. peksofagii (autofagicznej degradacji peroksyosomów; poniżej) w komórkach roślinnych pojawiły się w literaturze na przełomie lat 2013 i 2014 [52, 105, 127].

U ssaków autofagia odgrywa ważną rolę podczas normalnego wzrostu i rozwoju, począwszy już od wczesnej embriogenezy [102]. Jest istotna w utrzymaniu dobrego stanu zdrowia, gdyż jej sprawny przebieg zapobiega rozwojowi wielu chorób, w tym raka, chorób wątroby, mięśni, serca, chorób neurodegeneracyjnych (np. choroba Huntingtona), zapalnych, zakażeń patogenem i starzeniu [5, 6, 24, 85]. U roślin autofagia uczestniczy w obrocie składników komórek i działa jako mechanizm kontroli jakości. Funkcjonuje również w niektórych procesach rozwojowych, takich jak dojrzewanie pyłku, starzenie i śmierci komórki; w tym także w programowanej śmierci komórki [32, 37, 51, 69, 99]. Autofagia w warunkach normalnych zachodzi z niewielką intensywnością, ale w wyniku działania różnego rodzaju abiotycznych i biotycznych czynników stresowych (np. głód węglowy lub azotowy, zasolenie, susza, wysoka temperatura, patogen, reaktywne formy tlenu) następuje wyraźne nasilenie się tego procesu [32, 35, 40, 69, 93, 94, 129]. Zasadniczo autofagia jest procesem degradacyjnym, ale znane są też jej funkcje biosyntetyczne. Przykładem może być transport cytoplazma-wakuola, podczas którego prekursorzy białek enzymatycznych przenoszone są z cytoplazmy do wakuoli (poniżej) [31, 114].

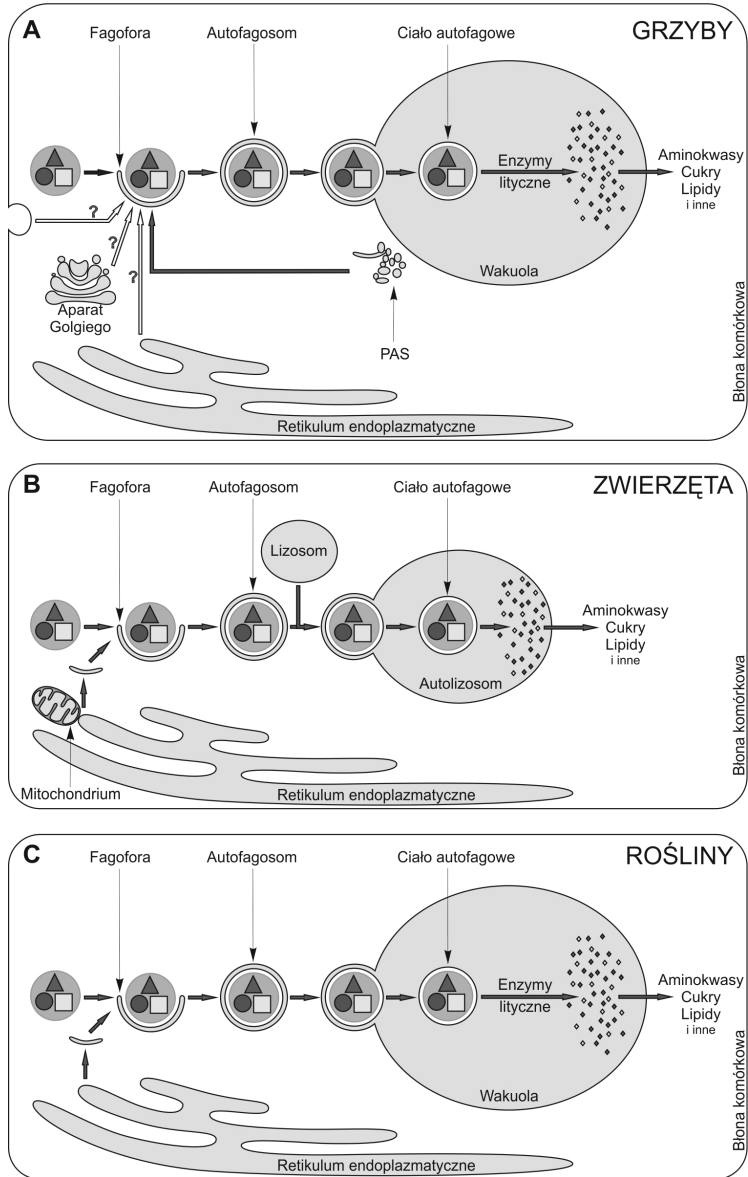
## TYPY AUTOFAGII

### MAKROAUTOFAGIA

Degradacja fragmentu cytoplazmy wraz z organellami, kompleksami białkowymi lub makromolekułami na drodze makroautofagii rozpoczyna się od pojawienia się w cytoplazmie wydłużonego, pęcherzyka zbudowanego z pojedynczej, dwuwarstwowej błony lipidowo-białkowej, który ulegając elongacji otacza fragment cytoplazmy z organellami komórkowymi i/lub kompleksami białkowymi. Tworzy się fagofora, czyli struktura o kształcie filiżanki (ang. *cup-shaped*). U drożdży fagofora wykształca się z pęcherzyków pojawiających się w bezpośrednim sąsiedztwie wakuoli. Miejsce to nazywane jest PAS (ang. *Phagophore Assembly Site*) [31, 35, 65, 74]. Jednak według niektórych autorów skrót PAS odnoszony jest nie do miejsca, ale do małych pęcherzyków nazywanych strukturami pre-autofagosomalnymi (ang. *Pre-autophagosome Structure*), które pojawiają się w sąsiedztwie wakuoli [29, 30]. Zdarza się też, że obie wyżej wymienione nazwy używane są jako synonimy [98, 101]. Istnienie PAS potwierdzono wyłącznie u grzybów [31]. Nie do końca jednak wiadomo jaka jest proveniencja błony powiększającej się fagofory [1, 97]. Sugeruje się, że donorem błony dla wydłużającej się fagofory jest retikulum endoplazmatyczne, aparat Golgiego lub błona komórkowa [97, 101] (ryc. 1A). Kolejnym etapem makroautofagii jest powstanie autofagosomu, czyli w pełni wykształconego pęcherzyka o podwójnej błonie lipidowo-białkowej, który zawiera ładunek prze-

znaczony do degradacji [31, 40, 54, 59, 60, 67, 77, 97, 101, 104, 111]. Wyniki najnowszych badań pokazują, że miejscem formowania się autofagosomów w komórkach ssaków jest rejon kontaktu retikulum endoplazmatycznego i mitochondrium [36] (ryc. 1B). Podejrzewa się, że również u roślin źródłem błony dla powiększającej się fagofory, a w konsekwencji autofagosomu, jest retikulum endoplazmatyczne [59, 60] (ryc. 1C). Wykształcony autofagosom u zwierząt łączy się z lizosomem. Powstaje autolizosom, wewnątrz którego następuje degradacja ładunku [54, 60, 82, 116] (ryc. 1B). U grzybów (ryc. 1A) i u roślin (ryc. 1C) autofagosom nie łączy się z lizosomem, lecz z wakuolą poprzez fuzję zewnętrznej błony autofagosomu z tonoplastem. W wakuoli lub w autolizosomie wewnętrzna błona autofagosomu wraz z zawartością tworzy ciało autofagowe, które zostaje błyskawicznie zdegradowane w wyniku działania enzymów litycznych [10, 31, 35, 54, 65, 67, 77, 104]. Według niektórych jednak autorów autolizosomy występują również w komórkach roślinnych (np. w zawieszynie komórkowej BY-2 tytoniu) i podobnie jak autofagosomy, mogą one łączyć się z centralną wakuolą lityczną [121].

Pomimo wielu lat badań, niektóre aspekty autofagii pozostają nadal niewyjaśnione. Przykładem może tutaj być nie do końca poznany etap kształtowania się fagofory i mechanizmów indukujących pojawianie się tej struktury. Również nie do końca poznana jest funkcja białek związanych z autofagią (ang. *Autophagy-related proteins*, Atg). Jak do tej pory zidentyfikowano 38 genów *ATG* [35, 66, 119]. Szczegółowy opis roślinnych genów *ATG*, białek Atg i ich funkcji znajduje się w pracy przeglądowej Lv i wsp. 2014 [69]. Geny *ATG* w większości mają charakter konserwatywny, tzn. wykazują wysokie podobieństwo u drożdży, zwierząt i roślin [4, 87]. Do genów konserwatywnych, zidentyfikowanych zarówno u drożdży jak i u ssaków, zaliczyć można geny *ATG1-ATG10*, *ATG12*, *ATG14*, *ATG16*, oraz *ATG18* [45]. Około 16-18 genów *ATG* jest wspólna dla różnych rodzajów autofagii, włączając tutaj nieselektywną makroautofagię oraz niektóre rodzaje autofagii selektywnej. Mówiąc bardziej dokładnie, produkty kodowane przez te wspólne geny zaangażowane są w formowanie autofagosomu i dlatego określane są jako rdzeniowe dla autofagii [4, 31, 35, 69]. Rdzeniowe dla autofagii u drożdży białka Atg można pogrupować w kilka funkcjonalnych kategorii: *i*) Atg1/kompleks ULK (Atg1, Atg11, Atg13, Atg17, Atg29 i Atg31) kompleks inicjujący i regulujący formowanie autofagosomu; *ii*) Atg9 i jego system cyklizacji (Atg2, Atg9 i Atg18) pełni funkcję w dostarczaniu błony do powiększającej się fagofory po zasocjowaniu kompleksu Atg1 ze strukturą PAS; *iii*) kompleks PtdIns i kinazy 3 (PtdIns3K) (Vps34, Vps15, Vps30/Atg6 i Atg14) działający na etapie powstawania pęcherzyków PAS i uczestniczący w angażowaniu białek wiążących PtdIns3P z PAS; *iv*) Atg8 i system koniugacji ubikwityny (Atg3, Atg4, Atg7 i Atg8) oraz *v*) Atg12 i system koniugacji ubikwityny (Atg5, Atg7, Atg10, Atg12 i Atg16) uczestniczące w rozwoju autofagosomu [31].



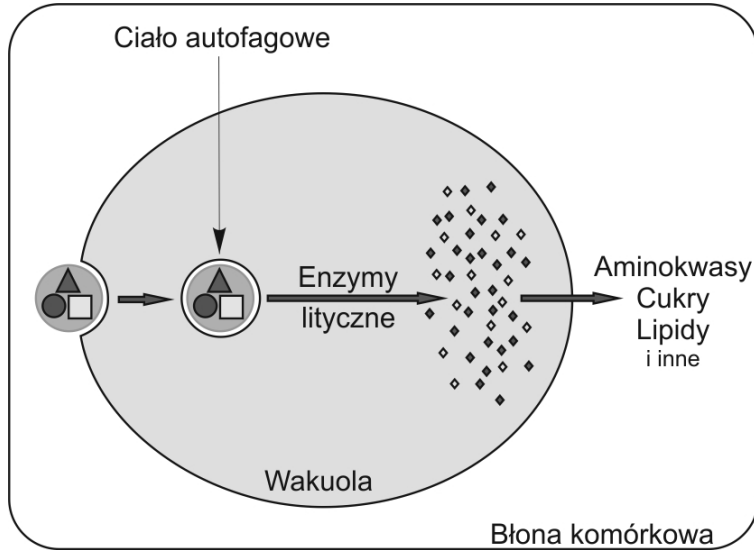
**RYCINA 1.** Schemat przebiegu makroautofagii w komórkach grzybów (A), zwierząt (B) i roślin(C). PAS – miejsce w pobliżu wakuoli w którym pojawiają się fagofory (z ang. *Phagophore Assembly Site*); ? – prawdopodobne źródła błony lipidowo-białkowej dla wydłużającej się fagofory  
**FIGURE 1.** Schematic representation of macroautophagy in cells of yeast (A), animals (B) and plants (C). PAS – Phagophore Assembly Site located near the vacuole; ? – possible sources of plasma membrane for the elongating phagophore

Jednym z najlepiej poznanych białek uczestniczących zarówno w autofagii nieselektywnej jak i selektywnej jest białko Atg8. Zaliczane jest ono do białek rdzeniowych, gdyż pełni istotną funkcję w formowaniu autofagosomu [4, 32, 65, 77, 83]. Około 25% białek Atg zaangażowanych w powstawanie autofagosomu reprezentowane jest przez Atg8 [83]. U drożdży zidentyfikowano jedno białko Atg8, u *Drosophila* i *Caenorhabditis elegans* dwie izoformy białka Atg8, u człowieka siedem izoform (a właściwie siedem homologów Atg8, podzielonych na podrodziny: LC3, GABARAP i GATE-16), a u *Arabidopsis thaliana* stwierdzono występowanie dziewięciu izoform białka Atg8 [4, 12, 32, 77]. Białko Atg8 przyłączane jest do powiększającej się fagofory, zarówno do błony wewnętrznej jak i zewnętrznej. Miejszem wiązania Atg8 jest fosfatydyloetanolamina (PE). Powstanie kompleksu Atg8-PE możliwe jest po wcześniejszej proteolitycznej modyfikacji C-końcowej reszty argininowej prekursora Atg8. Modyfikacja ta katalizowana jest przez Atg4 [65, 82, 83, 101]. U drożdży w warunkach dobrego odżywienia Atg8 występuje w formie niezwiązanej, natomiast pod wpływem głodu azotowego wyraźnie wzrasta jego poziom w komórce i większość Atg8 przekształcone zostaje w kompleks Atg8-PE [83]. Po połączeniu Atg8 z fagoforą wchodzi ono w interakcje z różnymi receptorami/adaptorami (w tym z innymi białkami Atg) umożliwiającymi rozpoznanie elementów komórki przeznaczonych do autofagicznej degradacji [4, 32, 65, 77, 83]. Po wykształceniu się autofagosomu Atg8 lokalizowane jest wyłącznie wewnątrz autofagosomu, gdyż Atg8 odłączone zostaje od błony zewnętrznej autofagosomu [40, 66, 83]. Białko Atg8 lokalizowane jest również w ciałach autofagowych i dlatego wykorzystywane jest w wielu badaniach jako marker autofagii, zarówno nieselektywnej jak i selektywnej [9, 32, 35, 77, 82]. Zwierzęcym homologiem białka Atg8 jest LC3 (ang. *Light Chain 3*). Jest to białko zaangażowane w funkcjonowanie mikrotubul i występuje we wszystkich typach tkanek. Formowanie się fagofory indukuje konwersję LC3-I do LC3-II, która polega na przyłączeniu fosfatydyloetanolaminy. LC3-II lokalizowane jest w błonie autofagosomu i zapewnia jego strukturalną stabilność. Po połączeniu autofagosomu z lizosomem, LC3-II zlokalizowane w świetle autolizosomu ulega degradacji, natomiast LC3-II znajdujące się po stronie cytoplazmatycznej błony autolizosomu jest odzyskiwane i jako LC3-I może być ponownie wykorzystane w procesie autofagii [11]. LC3 w badaniach traktowany jest często jako marker autofagosomów w komórkach zwierzęcych [11, 54].

## MIKROAUTOFAGIA

Podczas tego procesu nie powstają autofagosomy, lecz fragment cytoplazmy lub fragment cytoplazmy z organellami zostaje wchłonięty do wakuoli poprzez zagłębienie tonoplastu. W świetle wakuoli powstaje pęcherzyk otoczony pojedynczą błoną, który nazywany jest ciałem autofagowym [10, 40, 57, 65, 80, 98] (ryc. 2).

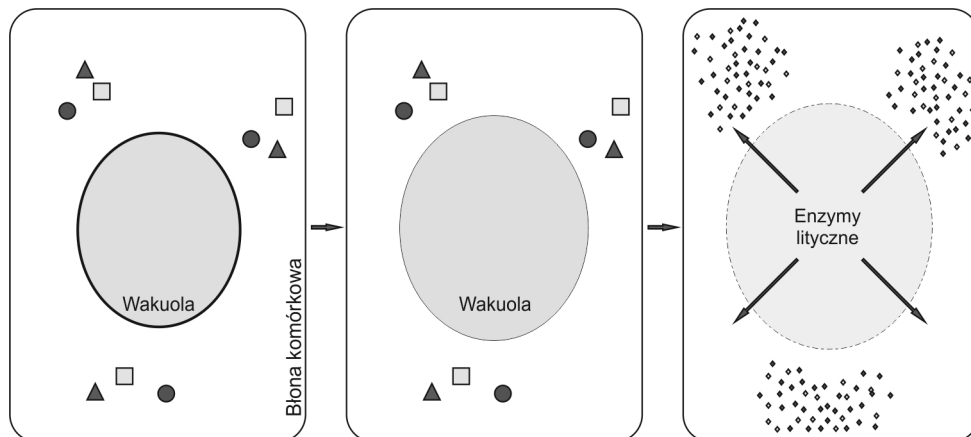
Mikroautofagia wydaje się przebiegać w podobny sposób zarówno w komórkach grzybów, zwierząt jak i roślin. Jednakże ilość danych literaturowych dotyczących mikroautofagii jest znacznie mniejsza niż zakres informacji na temat makroautofagii.



**RYCINA 2.** Schemat przebiegu mikroautofagii  
**FIGURE 2.** Schematic representation of microautophagy

## MEGAAUTOFAGIA

Jest to typ autofagii nieselektywnej powodujący spustoszenie w komórce. W jego trakcie następuje powiększanie się wakuoli oraz zmiana w przepuszczalności tonoplastu, który staje się znacznie mniej selektywny a nawet dochodzić może do przerwania jego ciągłości. Konsekwencją tego jest uwolnienie wakuolarnych enzymów litycznych, które całkowicie degradują zawartość komórki [115, 125] (ryc. 3), a w niektórych przypadkach również ścianę komórkową [116]. Do megaaufagii dochodzi w komórkach, w których wcześniej nastąpiła już makro- lub mikroautofagia [115]. Zjawisko megaaufagii poprzedzane jest zwykle syntezą enzymów takich jak proteazy cysteinowe, proteazy serynowe, endonukleazy (RNazy, DNazy), kwaśne fosfatazy czy lipazy [125]. Ten typ nieselektywnej autofagii odgrywa kluczową rolę w programowanej śmierci komórek roślinnych. Uczestniczy w ksylogeniezie, kształtowaniu się aerenchymy, rozwoju floemu, formowaniu komórek czapeczki korzeniowej i podczas starzenia komórek zawierających chloroplasty [115].



RYCINA 3. Schemat przebiegu megaautofagii

FIGURE 3. Schematic representation of megaautophagy

## RODZAJE AUTOFAGII SELEKTYWNEJ

Selektywne rodzaje autofagii zachodzić mogą na drodze makroautofagii i/lub mikroautofagii i podczas tych procesów w preferencyjny sposób degradowane są konkretne komponenty komórki. Jak do tej pory zidentyfikowano selektywną autofagię całych organelli komórkowych (peroksosomy, mitochondria, rybosomy, chloroplasty, oleosomy, lizosomy, jądro komórkowe), fragmentów organelli (elementy retikulum endoplazmatycznego, chloroplastów, jądra komórkowego), agregatów białkowych, makromolekuł (antocyjany, porfiryny), patogenów, a także innych obcych struktur komórkowych (elementy plemników). Zdarza się, że w literaturze wprowadza się dodatkowe pojęcia, które mają sprecyzować opisywany proces. Stosuje się np. termin makropeksofagia czy mikropeksofagia, dla selektywnej, autofagicznej degradacji peroksosomów. Pojawiają się też propozycje, aby autofagosomy uczestniczące w różnych rodzajach selektywnej autofagii nazywać np. peksofagosomami, mitofagosomami czy ksenofagosomami, pomimo tego, że źródło błony czy przebieg formowania się tych struktur podczas różnych rodzajów autofagii selektywnej są często identyczne jak podczas indukowanej głodem, nieselektywnej, masowej, autofagicznej degradacji komponentów komórki [54].

## PEKSOFAGIA

Peksofagia jest procesem polegającym na wybiórczej degradacji peroksosomów. Są to organelle niezwykle dynamiczne, bowiem wraz ze zmianą ich otoczenia (zarówno wewnątrz, jak i zewnątrzkomórkowego) ich liczba może ulegać



bardzo dużym zmianom. Proces peksosfagii najlepiej został poznany u metylotroficznych drożdży, które mogą odżywiać się alkoholem metylowym (*Pichia pastoris*, *Hansenula polymorpha* lub *Saccharomyces cerevisiae*) [74, 87, 98, 100, 112]. Dzięki łatwej indukcji proliferacji peroksysosomów u drożdży metylotroficznych, organizmy te stanowią doskonały model badawczy do analiz przebiegu peksosfagii. Poprzez dodanie alkoholu metylowego lub kwasu oleinowego do pożywki wzrostowej w łatwy sposób można spowodować wzrost liczby peroksysosomów w komórkach. W równie łatwy sposób można indukować spadek liczby peroksysosomów. Jest to możliwe dzięki wyeliminowaniu z pożywki czynnika proliferującego [19, 74, 100, 112]. Alkohol metylowy lub kwas oleinowy można zastąpić innym związkami, będącym źródłem węgla w pożywce np. glukozą lub alkoholem etylowym. W warunkach naturalnych zmiana liczebności peroksysosomów jest przejawem adaptacji drożdży do warunków środowiska [100, 112]. W komórkach zwierzęcych natomiast, badanie peksosfagii możliwe jest po uprzedniej proliferacji peroksysosomów uzyskanej poprzez zastosowanie odpowiednich medykamentów [19]. Badania dotyczące peksosfagii w komórkach roślinnych do niedawna nie były wykonywane, gdyż w przeciwieństwie do drożdży bardzo trudno jest wywołać w komórkach roślinnych wstępną proliferację peroksysosomów, aby później móc badać ich degradację [98].

Wyróżnia się dwie odmiany peksosfagii tj. mikropeksosfagię i makropeksosfagię [19, 26, 30, 31, 87, 98, 100, 112]. Dodanie glukozy do pożywki indukuje makropeksosfagię np. u *Hansenula polymorpha* lub mikropeksosfagię u *Pichia pastoris*, natomiast alkohol etylowy stymuluje proces makropeksosfagii u obu tych gatunków [26, 100]. Mikropeksosfagia jest procesem zachodzącym zdecydowanie wolniej od makropeksosfagii. Dodatkowo, przebieg mikropeksosfagii uzależniony jest od nowo syntetyzowanych białek np. funkcjonalnych proteaz (w świetle wakuoli) oraz funkcjonalnej kinazy PI3 [19]. W mikropeksosfagii wyróżnia się aparat mikropeksosfagowy (ang. *Micropexophagy Apparatus*, MIPA), który jest niezbędny do pochłonięcia peroksysosomów przez wakuolę [26, 29, 30, 80, 88, 98, 100]. W uproszczeniu, aparat ten 'domyka' zagłębienie tonoplastu w którym znajdują się peroksysosomy [74]. Głównymi elementami MIPA są białka Atg8 oraz Atg26, które są istotne zarówno w procesie mikropeksosfagii jak i podczas makropeksosfagii [29]. Uruchomienie procesu mikropeksosfagii lub makropeksosfagii w komórce może być determinowane źródłem węgla a także odpowiednim poziomem ATP w komórce. U metylotroficznego gatunku drożdży *Pichia pastoris* podwyższony poziom ATP indukuje proces mikropeksosfagii, natomiast obniżona zawartość ATP stymuluje makropeksosfagię. Z uwagi na konieczność reorganizacji błony wakuoli podczas mikropeksosfagii sugeruje się, że proces ten wymaga większego nakładu energii niż makropeksosfagia [112]. U *Pichia pastoris* poziom ATP jest dla indukcji peksosfagii czynnikiem o wiele bardziej znaczącym niż rodzaj wykorzystywanego do wzrostu źródła węgla. Dodatkowo stwierdzono, że w warunkach wysokiego poziomu ATP w komórkach tego grzyba pojawia się tendencja do degradacji wszystkich peroksysosomów, niezależnie od stanu ich zużycia. Z kolei niski poziom

ATP pozwala komórkom *Pichia pastoris* powrócić do stanu, w którym utrzymują normalny metabolizm na pożywce zawierającej alkohol metylowy [100].

U grzyba *Pichia pastoris* białkiem zaznaczającym (zwanym też białkiem receptorowym lub markerowym) peroksysomy przeznaczone do wybiórczej degradacji jest Atg30 [28, 29]. Białko to ulega zakotwiczeniu w błonie peroksysomu poprzez interakcje z białkami zwanymi peroksynami (PEX3 i PEX14) [29, 74]. Białko to pełni istotną funkcję w kształtowaniu się zarówno aparatu mikropeksosofagowego MIPA, jak i w powstawaniu autofagosomu (makropeksosofagia). Ulega ono wielokrotnej fosforylacji, która jest niezbędna dla zajścia peksosofagii, oraz wchodzi w interakcje z Atg11, Atg17 [29] i Atg8 (marker autofagosomu) [28]. U *Saccharomyces cerevisiae* białkiem markerowym dla peksosofagii jest Atg36, którego miejscem dokowania w błonie peroksysomu jest PEX3. Atg36 ulega również niezbędnej fosforylacji [28], wiąże białko Atg11 i prawdopodobnie również białko Atg8 [81]. U *Hansenula polymorpha* istotną rolę w peksosofagii odgrywa tylko białko PEX14, gdyż PEX3 jest usuwane z peroksysomów i nie podlega degradacji na drodze makropeksosofagii [74]. Białka Atg30 i Atg36 są specyficzne tylko dla komórek grzybowych, gdyż nie znaleziono ich homologów u innych organizmów [29, 77, 81, 119]. U ssaków receptorem peroksysomów przeznaczonych do peksosofagii jest białko NBR1, które przyłącza się do ubikwitynowanych białek błony peroksysomu [23]. Wcześniej wiadomo było, że NBR1 jest receptorem również dla innych elementów komórek zwierzęcych podlegających selektywnej, autofagicznej degradacji, gdyż może ono przyłączać się do różnych ubikwitynowanych białek [108, 130]. Roślinny homolog NBR1 został niedawno zidentyfikowany również u *Arabidopsis thaliana* [32, 108], a w zawieszynie komórek BY-2 tytoniu (*Nicotiana tabacum*) znaleziono białko Joka2 (hybrydowy homolog zwierzęcych NBR1 i p62) [130, 131]. Jednakże nie wiadomo czy NBR1 i Joka2 są istotne podczas peksosofagii u roślin [77]. Sugeruje się, że takim znacznikiem peroksysomów przeznaczonych do peksosofagii w komórkach roślinnych może być Atg8, które jest jednocześnie markerowym białkiem autofagosomu. W niektórych publikacjach dotyczących peksosofagii u roślin podkreśla się współwystępowanie Atg8 i peroksysomów, a w szczególności peroksysomów zagregowanych ze sobą. Takie dane stanowią silną przesłankę za uznaniem Atg8 jako markera peroksysomów, które przeznaczone są do degradacji w komórkach roślinnych. Jednakże nie wiadomo do jakiego białka lub białek peroksysomalnych Atg8 miałoby się przyłączać [3, 52, 105, 127].

Pomimo niejasności dotyczących białka receptorowego dla peroksysomów w komórkach roślinnych, to zjawisko peksosofagii u roślin zostało potwierdzone. Zachodzenie peksosofagii u roślin udowodnione zostało niedawno i zaobserwowano je w komórkach modelowej rośliny *Arabidopsis thaliana* [3, 61, 119]. Zachodzenie selektywnej, autofagicznej degradacji peroksysomów w celu ich recyklingu, jest niezbędne dla poprawnego rozwoju organizmów roślinnych [127] poczynając już od fazy kiełkowania nasion a skończywszy na utrzymaniu homeostazy u dojrzałych

osobników. Peksofagia w komórkach roślinnych jest elementem systemu kontroli jakości peroksysomów [3, 61, 105]. Przykładem dużego znaczenia peksofagii podczas wzrostu organizmów roślinnych jest np. usuwanie peroksysomów, które zostały uszkodzone w wyniku działania reaktywnych form tlenu (ang. *Reactive Oxygen Species*, ROS) [105, 119, 127]. Nadmienić tutaj należy, że peroksysomy są istotnym komponentem systemu detoksykacji ROS w komórkach roślinnych. Zawierają one katalazę rozkładającą  $H_2O_2$  generowany m.in. podczas  $\beta$ -oksydacji kwasów tłuszczowych, która u roślin zachodzi właśnie w peroksysomach [33, 49]. W peroksysomach rozkładany jest również  $H_2O_2$  powstający w trakcie fotorespiracji zachodzącej w fotosyntetyzujących częściach roślin [43, 49]. U niektórych mutantów *Arabidopsis* (*peup1*, *peup2* i *peup4*; ang. *peroxisome unusual positioning*) zaobserwowano wzrost liczby peroksysomów lub tendencję peroksysomów do tworzenia agregatów. Stwierdzono też, że wyżej wymienione mutanty są identyczne z mutantami *Arabidopsis* z upośledzonym przebiegiem autofagii (odpowiednio: *atg2*, *atg18a* i *atg7*; ang. *autophagy-related*). Wzrost liczby peroksysomów u mutantu *peup1* jednoznacznie dowodzi, że autofagiczna degradacja tych organelli jest upośledzona. Jednocześnie w zagregowanych peroksysomach stwierdzono wzrost zawartość nieaktywnej katalazy, a to powodowało, że peroksysomy u mutantów zawierały więcej ROS, a ich komponenty były znacznie bardziej utlenione niż u roślin typu dzikiego. Podobną agregację peroksysomów można również wywołać u roślin typu dzikiego poprzez egzogenne aplikowanie  $H_2O_2$ . Zagregowane peroksysomy pojawiają się też u mutantu *Arabidopsis* (*cat2*) z obniżoną aktywnością katalazy. Zaobserwowano również (przy użyciu technik fluorescencyjnych) częste współwystępowanie zagregowanych peroksysomów i Atg8 (markera autofagosomu). Wyżej przytoczone dane jednoznacznie świadczą o tym, że uszkodzone przez  $H_2O_2$  peroksysomy są selektywnie degradowane w procesie autofagii w komórkach roślinnych [105]. Do identycznych wniosków doszedł też zespół innych badaczy [127], który prowadził badania na nieco innym zestawie mutantów *Arabidopsis* (*atg2*, *atg5*, *atg7* i *atg9*). Zważywszy na fakt, że peksofagii u roślin ulegają peroksysomy, których komponenty zostały uszkodzone przez ROS, przypuszczać można, że sygnałem uruchamiającym sekwencję zdarzeń prowadzących do utylizacji tych organelli w wakuoli jest wzrost poziomu  $H_2O_2$  generowanego wewnątrz peroksysomów [61]. Nie można jednak wykluczyć innych sygnałów uruchamiających peksofagię u roślin. Wykazano, że peksofagii u *Arabidopsis* ulegają peroksysomy z niefunkcjonalną proteazą LON2. Jest to proteaza działająca wewnątrz peroksysomu i pełni bardzo istotną funkcję w degradacji różnych białek peroksysomalnych. Przykładem mogą tutaj być niektóre enzymy cyklu glioksydanowego (liaza izocytrynianowa, syntaza jabłczanowa) czy  $\beta$ -oksydacji kwasów tłuszczowych (tiolaza) [27]. Rozkład niektórych białek w peroksysomach jest bardzo ważny, gdyż podczas kiełkowania nasion i w trakcie wzrostu siewki peroksysomy (zwane też glioksysomami) uczestniczą w roz-

kładzie zapasowych lipidów ( $\beta$ -oksydacja kwasów tłuszczowych i cykl glioksylanowy), natomiast w tkankach fotosyntetyzujących starszych roślin są już jedną z organelli zaangażowanych w fotorespirację i niektóre enzymy nie są już potrzebne. U *Arabidopsis* typu dzikiego, gdy peroksosomy w miarę rozwoju rośliny zmieniają swoją funkcję, obserwuje się zanik (liaza izocytrynianowa, syntaza jabłczanowa) lub znaczące obniżenie (tiolaza) zawartości wyżej wymienionych enzymów. U mutantu *Arabidopsis lon2* pozbawionego działającej proteazy LON2 stwierdzono, że wyżej wymienione trzy enzymy również zanikają, ale nie wskutek działania LON2, lecz dlatego, że całe peroksosomy degradowane są w procesie peksofagii. Natomiast u podwójnego mutantu *lon2atg*, u którego autofagia nie zachodzi, obserwuje się utrzymywanie wyżej wymienionych enzymów na stałym poziomie [27]. Autorzy tych badań jednoznacznie konkludują, że selektywna, autofagiczna degradacja peroksosomów ulega nasileniu w komórkach *Arabidopsis*, gdy peroksosomy nie zawierają proteazy LON2. Peksofagia została również zaobserwowana w zawieszinie komórek tytoniu BY-2. Stwierdzono, że znaczna pula peroksosomów ulega autofagicznej degradacji zarówno w warunkach optymalnego wzrostu komórek tytoniu, jak i w warunkach głodu cukrowego [120]. Przypuszcza się też, że peksofagia może zachodzić w komórkach głodzonych osi zarodkowych kiełkujących nasion różnych gatunków łubinu (*Lupinus* spp) [14, 15, 17]. Podstawowym materiałem zapasowym w nasionach łubinu jest białko, ale nasiona te zawierają też spore ilości tłuszczu, w którego rozkład podczas kiełkowania nasion zaangażowane są peroksosomy (glioksyosomy). W sztucznie wywołanych warunkach głodu cukrowego, osie zarodkowe nasion łubinu zawierają znacznie więcej tłuszczu niż osie odżywione sacharozą. Świadczy to o ograniczeniu jego degradacji w warunkach głodu [14, 17]. Jednocześnie obserwacje ultrastruktury komórek tych organów pokazują, że ciała autofagowe wewnątrz wakuol zawierają organelle, które mniej lub bardziej jednoznacznie zidentyfikowane mogą być jako peroksosomy [15, 16].

## MITOFAGIA

Mitofagia jest rodzajem selektywnej autofagii, podczas której degradacji ulegają mitochondria. Jest to proces o bardzo istotnym znaczeniu w komórce, gdyż uczestniczy w usuwaniu uszkodzonych, starych lub mało wydajnych mitochondriów. Jest zatem systemem kontroli jakości działania tych organelli [35, 45, 86, 87, 98]. Sprawna degradacja uszkodzonych mitochondriów zapobiegać może apoteozie, gdyż komórka nie jest wtedy narażona np. na działanie uwalnianego do cytoplazmy cytochromu c [19, 98]. Usuwanie uszkodzonych lub wysłużonych mitochondriów jest też jednym z istotnych elementów kontroli poziomu ROS w komórce [98], gdyż organelle te oprócz energii wytwarzają również ROS i tym samym mogą wywierać

bardzo negatywny wpływ na inne komponenty komórki [45, 98]. Selektowna degradacja mitochondriów jest ważna podczas normalnego rozwoju i różnicowania niektórych komórek. Przykładem mogą tutaj być erytrocyty i retikulocyty [45, 86]. Nieefektywne natomiast usuwanie uszkodzonych mitochondriów jest cechą świadczącą o starzeniu się komórki [19], a zaburzenia w kontroli jakości mitochondriów w neuronach dopaminergicznych uważane są za przyczynę wielu chorób neurodegeneracyjnych [98].

Mitofagia może zachodzić na drodze makromitofagii lub mikromitofagii [31]. Doświadczenia prowadzone na *Saccharomyces cerevisiae* pozwoliły na identyfikację białek, które są niezbędne do zainicjowania mitofagii. Pierwszym opisanym białkiem niezbędnym w mitofagii u drożdży było UTH1, uważane za swoisty induktor omawianego procesu [53]. Kolejnym białkiem jest AUP1 – fosfataza zlokalizowana w przestrzeni międzybłonowej [109]. Najnowsze jednak badania wskazują, że markerem mitochondriów przeznaczonych do degradacji jest białko Atg32 [28, 31, 45, 47, 86, 119]. Jest to białko zakotwiczone w zewnętrznej błonie otoczki mitochondrialnej, którego N-koniec skierowany jest do cytoplazmy. Białko to po uprzedniej fosforylacji [28] wchodzi w interakcje z Atg11 i Atg8 (markerem autofagosomu) [28, 31, 45, 86, 98, 119]. Atg32 łączy się z Atg8 za pomocą znajdującego się w domenie cytoplazmatycznej tetrapeptydu WQAI [45, 86]. Innym białkiem związanym z mitofagią u drożdży jest białko Atg33, które podobnie jak Atg32 związane jest z zewnętrzną błoną mitochondrium [31, 98] i być może jest ono istotne podczas mitofagii w starzejących się komórkach drożdży [48]. Jak do tej pory nie potwierdzono występowania Atg32 ani w komórkach zwierzęcych ani w komórkach roślinnych [31, 119]. Za zwierzęce receptory mitochondriów przeznaczonych do selektywnej, autofagicznej degradacji uważa się takie białka jak FUNDC1, BNIP3, BNIP3L/NIX, SQSTM1/p62, PARK2 oraz PINK1 [31]. Najmniej wiadomo na temat receptorów roślinnych, ponieważ nie wykryto w tych organizmów żadnego z wyżej wymienionych białek grzybowych czy zwierzęcych [119]. Niedawno jednak odkryto u *Arabidopsis* białko Atg11 i potwierdzono jego udział w indukowanej starzeniem mitofagii u roślin [63, 64]. Mutanty *Arabidopsis atg11* wykazują przedwczesne starzenie oraz większą wrażliwość na ograniczone zasoby węgla lub azotu. W wyniku indukcji procesu starzenia poprzez zaciemnienie, u mutantu *atg11* nie wykazano różnic zarówno w ilości białek mitochondrialnych jak i liczebności mitochondriów w komórce, względem roślin typu dzikiego. W trakcie starzenia Atg11 widoczny był w wakuolach roślin typu dzikiego, ale nie był obserwowany w wakuolach mutantów *atg11*. Jednakże współwystępowanie Atg11, Atg101, Atg1, Atg13 oraz Atg8 potwierdza zaangażowanie tych białek w oczyszczanie komórek roślinnych z mitochondriów [63, 64]. Dokładny jednak mechanizm regulujący mitofagię u roślin nie jest znany i nadal nie wiadomo co może być receptorem/receptorami mitochondriów przeznaczonych do degradacji na drodze mitofagii u roślin [77].

## RYBOFAGIA

Rybofagia jest selektywnym rodzajem makroautofagii podczas której w wybiórczy sposób degradacji ulegają rybosomy. Są to organelle bardzo licznie występujące w cytoplazmie. Bardzo często obserwowane też są w autofagosomach, dlatego powszechnie przyjmowano, że rybosomy ulegają autofagii w sposób nieselektywny. Jednakże badania wykonane na głodzonych komórkach *Saccharomyces cerevisiae* pokazały, że rybosomy mogą też być degradowane w procesie autofagii w sposób wybiórczy [55]. Rybofagia ma bardzo duże znaczenie dla komórek, ponieważ pozwala na usunięcie нефункциональных rybosomów lub ich podjednostek. Rybofagia jest więc jednym z elementów umożliwiających utrzymanie homeostazy komórki [18, 58, 71]. Rybofagia zachodzi zarówno w warunkach normalnych jak również podczas niedostatku substancji odżywczych [18, 32, 58, 71, 90]. W warunkach głodu rybofagia została zaobserwowana po raz pierwszy u drożdży. Stwierdzono u tych organizmów, że w procesie autofagii rybosomy ulegają intensywniejszej degradacji niż pozostałe elementy komórki, co jednoznacznie wskazało na wybiórczy sposób degradacji tych organeli [55].

W odmienny sposób przebiega zapoczątkowanie degradacji małej i dużej podjednostki rybosomu. Aby duża podjednostka mogła być zutylizowana w procesie rybofagii u drożdży, to najpierw musi do niej być przyłączona ubikwityna. Istotna jest tutaj ligaza Rep5 lub jakieś inne niezidentyfikowane jeszcze ligazy. Kolejnym etapem jest de-ubikwitynizacja dużej podjednostki, katalizowana przez proteolityczny kompleks Ubp3-Bre5 [22, 32, 89, 90]. Odłączenie ubikwityny od dużej podjednostki rybosomu jest niezbędne do zajęcia kolejnych etapów rybofagii. Mianowicie de-ubikwitynizacja umożliwia inicjację powstawania autofagosomu (stadium fagofory), lub jeśli zachodzi ona nieco później to jest niezbędna do całkowitego wykształcenia się autofagosomu. W przeciwieństwie do dużej podjednostki rybosomu, podjednostka mała w ogóle nie ulega ubikwitynizacji [22, 32]. Kolejne etapy rybofagii zdają się przebiegać tak samo dla obu podjednostek. Mutanty autofagiczne drożdży *atg7* wykazują bowiem zredukowaną degradację obu podjednostek rybosomów [32]. Spośród białek Atg istotne dla przebiegu rybofagii są Atg1, Atg7 i być może również Atg19 [18, 97].

Proces rybofagii jest zależny od rybonukleaz (RNaz) z rodziny T2. Są to acidofilne enzymy występujące u eukariontów, które odpowiedzialne są za degradację RNA zarówno transportowego (tRNA) jak i rybosomalnego (rRNA). Mutacja w obrębie rybonukleaz T2 powoduje akumulację rRNA w lizosomach danio pręgowanego (ryba) oraz w lizosomach ludzkich [32, 38]. Funkcja RNaz T2 w procesie rybofagii została potwierdzona również u *Tetrahymena* (orzęsek). U mutantów T2 zaobserwowano akumulację rRNA w warunkach głodu, która jest prawdopodobnie efektem zablokowania rybofagii [2, 32]. Jak do tej pory nie ma jednoznacznych dowodów na występowanie rybofagii u roślin, niemniej jednak

potwierdzony jest udział RNS2 (konserwatywna RNaza z rodziny T2) w degradacji rRNA u *Arabidopsis* [18, 41, 71]. RNaza ta zlokalizowana jest zarówno w wakuoli jak i w retikulum endoplazmatycznym. U mutantu *Arabidopsis* z brakującą RNazą RNS2 (*rns2*) stwierdzono wydłużenie czasu funkcjonowania rRNA (o 60%), akumulację RNA w wakuoli oraz nasilenie nieselektywnej makroautofagii. Przypuszcza się, że nasiloną autofagia u mutantu *rns2* kompensuje brak rybofagii i umożliwia metaboliczny obrót rybosomów w sposób nieselektywny [32, 41, 71].

## RETIKULOFAGIA

Retikulofagia jest rodzajem selektywnej makroautofagii, podczas której mogą być degradowane komponenty retikulum endoplazmatycznego (ER). Proces ten jest stosunkowo trudny do badania, ponieważ może on być rozpatrywany w bardzo różnych kontekstach, w zależności od przyczyny jego indukcji. U drożdży retikulofagia rozpatrywana może być jako odpowiedź komórki na chemicznie wywołany stres-ER, oraz podczas odbudowy retikulum endoplazmatycznego po ustąpieniu tego szczególnego rodzaju stresu. Retikulofagia może być odpowiedzią na akumulację agregatów białkowych w retikulum endoplazmatycznym, ale rozpatrywana też jest jako odpowiedź komórki na deficyt substancji odżywczych [97]. U roślin retikulofagia może być zaangażowana w bezpośredni transport różnego rodzaju substancji z retikulum do wakuoli (z ominięciem aparatu Golgiego). Uczestniczyć więc może w biogenezie wakuoli, jak również może być ważnym procesem zachodzącym podczas wzrostu i rozwoju roślin, zarówno w warunkach normalnych jak i podczas różnego rodzaju stresów biotycznych i abiotycznych. Szczególnym rodzajem takiego bezpośredniego transportu z retikulum do wakuoli u roślin może być deponowanie białek w wakuoli, np. białek zapasowych nasion. Udział procesów autofagicznych w tym aspekcie jest również rozważany. Byłby więc to przykład niedegradacyjnej roli procesów autofagicznych [76]. Tak szerokie spektrum potencjalnych funkcji retikulofagii powoduje, że niemożliwe jest opisanie jednego, wspólnego schematu przebiegu tego procesu. Należy też mieć na uwadze fakt, że retikulum endoplazmatyczne jest lub może być źródłem błony dla powiększającej się fagofory – niezbędnego elementu procesu makroautofagii (powyżej, ryc. 1A-C), zarówno tej nieselektywnej, jak i różnego rodzaju jej selektywnych rodzajów.

W proces retikulofagii zaangażowane mogą być rdzeniowe białka Atg takie jak Atg1, Atg5, Atg8, Atg12, Atg16 [18], Atg19 i Atg20 [97]. U *Arabidopsis* Atg8 wiąże się z dwoma białkami ATI1 i ATI2 (ang. *Atg8-Interacting Protein*). Są to białka specyficzne dla roślin. Stosując białko zielonej fluorescencji (ang. *Green Fluorescent Protein*, GFP) stwierdzono, że w warunkach normalnych ATI1 i ATI2 są częściowo zasocjowane z błoną retikulum endoplazmatycznego. Jednakże podczas indukowanego ciemnością głodu węglowego białka te zasocjowane były z nowo powstającymi

sferycznymi strukturami (nazwanymi ‘ciałami zawierającymi ATI’). Struktury te dynamicznie przemieszczały się po powierzchni retikulum, a następnie były transportowane do centralnej wakuoli. W ciałach zawierających ATI nie stwierdzono markerów światła cystern retikulum endoplazmatycznego mających C-końcówką sekwencję HDEL. Analiza fluorescencyjnych znaczników, specyficznych dla poszczególnych organelli i autofagosomów wykazała ponadto brak współwystępowania w komórce ciał zawierających ATI oraz aparatów Golgiego, mitochondriów, peroksysomów i typowych autofagosomów [42].

## CHLOROFAGIA

Jest to rodzaj autofagii, podczas której w sposób wybiórczy degradowane są chloroplasty. Dane literaturowe na temat selektywnej, autofagicznej utylizacji całych chloroplastów (i innych plastydów) są raczej skromne. Badania wykonane na *Arabidopsis* pokazały, że w warunkach normalnego wzrostu i rozwoju rośliny chlorofagia umożliwia usuwanie z komórek dysfunkcyjnych chloroplastów, stanowiąc istotny element kontroli jakości tych organelli. W badaniach tych wykorzystano np. mutanty *tic40* z brakującym komponentem wewnętrznej błony otoczki uczestniczącym w imporcie białek do chloroplastów [84]. Podobną utylizację nieprawidłowo działających chloroplastów stwierdzono u mutantu *mex1* (*maltose excess 1*) z brakującym transporterem maltozy w wewnętrznej błonie otoczki chloroplastowej. Mutanty te miały o ok. 50% mniej chloroplastów w komórkach mezofilu dojrzałych liści w porównaniu do komórek roślin typu dzikiego. Obserwacje ultrastruktury pokazały, że w cytoplazmie komórek mutantu *mex1* znajdują się spęczniałe chloroplasty ze zdeformowanymi tylakoidami, a w obrębie wakuoli zaobserwowano pozostałości po zdegradowanych chloroplastach [107]. Przypuszcza się, że chlorofagia może być istotnym elementem obrotu metabolicznego w komórkach starzejących się. Chloroplasty zawierają ok. 80% całkowitego azotu w liściach i są głównym źródłem odzyskiwanego azotu podczas starzenia liści. W badaniach przeprowadzonych na autofagicznym, podwójnym mutancie *Arabidopsis* (*atg4a4b-1*) starzenie indukowano poprzez zaciemnianie liści. U mutantu tego stwierdzano występowanie całych chloroplastów (ale też ich komponentów) w wakuoli. Takiej akumulacji nie zaobserwowano w wakuolach komórek roślinach typu dzikiego [121]. Autofagiczna degradacja chloroplastów może też być istotna podczas infekcji i reakcji obronnych roślin. Chloroplasty są źródłem ROS, które powstrzymują rozwój patogenów i infekcji oraz są miejscem syntezy wielu molekuł sygnalnych (np. kwas salicylowy, kwas jasmonowy) niezbędnych w reakcjach obronnych. Badania z awirulentnym patogenem bakteryjnym *Pst* DC3000 (*AvrRps4*) pokazały, że u *Arabidopsis* autofagia może być zaangażowana w usuwanie uszkodzonych chloroplastów ułatwiając ponowne wykorzystanie azotu, może powodować akumulację ROS i molekuł sygnalnych uczestniczących w reakcjach obronnych [25].



Badając proces autofagicznej degradacji plastydów zaobserwowano, że częściej niż całe plastydy wakuolarnej degradacji ulegają tylko niektóre elementy plastydów. Zaobserwowano, że w komórkach *Arabidopsis* w warunkach głodu węglowego wewnątrz i na powierzchni chloroplastów tworzą się struktury zawierające białko ATI1. Jest to jednak inne białko ATI niż te, które pojawia się na powierzchni retikulum endoplazmatycznego. Ciała te zawierają również różne białka stromy chloroplastu, ale nie stwierdzono w nich występowania Rubisco. Chloroplastowe ciała ATI są transportowane do wakuoli w wyniku zachodzenia procesów autofagicznych. Stosując znakowanie ATI1 białkiem zielonej fluorescencji (ATI1-GFP) wykazano lokalizację chloroplastowych ciał ATI w centralnej wakuoli komórek roślin typu dzikiego, natomiast u mutantu autofagicznego *atg5* takiej lokalizacji nie zaobserwowano. Przypuszcza się, że recykling niektórych białek chloroplastowych, w opisany wyżej sposób, może przyczyniać się do ochrony aparatu fotosyntetycznego, w szczególności w warunkach stresu (np. zasolenia czy głodu węglowego) [78]. Innym przykładem degradacji w centralnej wakuoli komponentów chloroplastów jest rozkład Rubisco. Zaobserwowano odłączanie się sferycznych struktur od starzejących się chloroplastów, ale innych niż ciała ATI i przemieszczanie się ich do wakuoli. Obiekty te nazywane są 'ciałami zawierającymi Rubisco' (ang. *Rubisco Containing Body*, RCB). Stosując techniki fluorescencyjne (z zastosowaniem GFP-Atg8 i DsRed – marker stromy chloroplastu), oraz wykorzystując autofagicznego mutantu *Arabidopsis atg5* jednoznacznie udowodniono, że transport RCB do wakuoli odbywa się wskutek zachodzenia procesów autofagicznych [98]. Stwierdzono również, że autofagiczna degradacja Rubisco jest tylko jednym z możliwych mechanizmów utylizacji białek stromy chloroplastu zachodzącej podczas starzenia się liści (zasadniczym mechanizmem jest wewnątrzchloroplastowa proteoliza) [62]. Proces ten jednakże może ulegać wyraźnej intensyfikacji w warunkach stresu (np. głód, zasolenie) [126]. Kolejnym przykładem autofagicznej degradacji komponentów chloroplastów jest utylizacja skrobi. W chloroplastach skrobia syntetyzowana jest ciągu dnia, a w nocy następuje jej rozkład do maltozy i glukozy. Jest to tzw. skrobia tranzytoryczna i jak do tej pory powszechnie przyjmowano, że jej rozkład zachodzi wyłącznie wewnątrz chloroplastów. Jednakże traktowanie siewek *Nicotiana benthamiana* inhibitorem autofagii (3-metyloadenina) lub wyciszenie w nich genów *ATG* powodowało wyraźną akumulację skrobi. Więcej skrobi pod koniec nocy zawierały też mutanty *Arabidopsis atg2*, *atg5* i *atg9*, w porównaniu do roślin typu dzikiego. Takie obserwacje jednoznacznie wskazywały na udział autofagii w rozkładzie skrobi. Jednakże stosując techniki mikroskopowe (elektronowe i fluorescencyjne) stwierdzono, że degradacji nie ulegają całe chloroplasty, lecz tylko drobne sferyczne struktury zawierające skrobię (ang. *Small Starch Granule-Like Structure*, SSSL), które lokalizowane były poza chloroplastami, a ich rozkład zachodził w centralnej wakuoli [123].

Najnowsze dane literaturowe związane z autofagią i plastydami zdają się otwierać przed naukowcami zupełnie nowe obszary badań. Istnieją bowiem informacje

wskazujące na to, że plastydy nie tylko mogą ulegać degradacji w procesie autofagii, ale one same mogą taki proces przeprowadzać. Papini i van Doorn [91] opublikowali w roku 2015 obrazy ultrastruktury na których widać wyraźne, liczne, krystaliczne ziarnistości w peroksysomach i pojedyncze, bardzo duże krystaloidy w chloroplastach. Formułują oni na tej podstawie kontrowersyjną hipotezę, że krystaloidy w chloroplastach są skutkiem wcześniejszego, autofagicznego pochłonięcia peroksysomów lub innych plastydów przez te organelle. Zagadnienie to z pewnością wymaga dalszych badań.

## LIPOFAGIA

Lipofagia jest rodzajem selektywnej autofagii, w której degradacji ulegają ciała tłuszczowe (zwane też ciałami olejowymi, oleosomami, lub kroplami tłuszczu). Ciała tłuszczowe odgrywają istotną rolę w magazynowaniu energii oraz składników odżywczych u grzybów, roślin i zwierząt. Zawierają one głównie triacyloglicerole, a u zwierząt również estry steroli (np. cholesterolu). Zaangażowane są one w metabolizm tłuszczowy, utrzymywanie homeostazy, a u ssaków ich nieprawidłowy obrót powodować może wiele chorób [106]. Do niedawna uważano, że degradacja ciał tłuszczowych odbywa się w cytoplazmie, w wyniku działania lipaz [7, 124]. Jednakże badania wykonane na hepatocytach myszy (zarówno typu dzikiego, jak i z wyciszonym genem *ATG7*) potwierdziły udział procesu makroautofagii (makrolipofagii) w degradacji ciał tłuszczowych. Badania mikroskopowe hepatocytów myszy pozwoliły zidentyfikować trzy rodzaje autofagosomów. Niektóre z nich zawierały wyłącznie ciała tłuszczowe (drugi rodzaj autofagosomów zawierał ciała tłuszczowe i inne elementy komórki, a trzecia grupa autofagosomów w ogóle nie zawierała ciał tłuszczowych) [106]. Autofagiczną degradację ciał tłuszczowych potwierdzono również u grzybów i roślin. U drożdży rosnących na pożywce wzbogaconej w kwas oleinowy (indukuje on biosyntezę triacylogliceroli i powstawanie ciał tłuszczowych) stwierdzono degradację ciał tłuszczowych w procesie mikroautofagii. W procesie tym uczestniczyło wiele rdzeniowych dla autofagii białek Atg, ale nie było wśród nich Atg11 i Atg20. Świadczy to jednoznacznie o odmienności tego procesu od retikulofagii, peksofagii czy mitofagii, pomimo tego, że ciała tłuszczowe zlokalizowane są w bezpośrednim sąsiedztwie retikulum endoplazmatycznego, peroksysomów i mitochondriów [117]. U mutantów autofagicznych ryżu (*atg7-1*) zaobserwowano spowolnienie dojrzewania ziaren pyłku i męską sterylność z powodu zablokowania degradacji ciał olejowych w komórkach tapetum. W warunkach normalnych autofagiczna degradacja ciał olejonych jest bowiem niezbędna do prawidłowej regulacji metabolicznej i podaży substancji odżywczych w rozwijających się pręcikach [37, 56]. W pomejotycznych komórkach tapetum ryżu tworzą się struktury podobne do autofagosomów oraz pojawiają się liczne ciała olejowe we-

wnętrz wakuol. Natomiast u mutantów ryżu *atg7-1* nie zaobserwowano takich procesów [56]. Lipofagię zidentyfikowano również u *Auxenochlorella protothecoides* – jednokomórkowej, miksotroficznej mikroalgi. Organizm ten wykazuje zdolności fotoautotroficzne gdy jest ekspozycyjny na działanie światła. Jednakże przy ograniczeniu dostępności azotu i odżywieniu glukozą organizm ten staje się heterotroficzny. Zmiana środowiska powodująca heterotrofię indukuje szybki wzrost komórek glonu i akumulację tłuszczu (>50% suchej masy). Z kolei zmiana z trybu heterotroficznego na autotroficzny (HA; z ang. *Heterotrophy-to-Autotrophy*) stymuluje wiele zmian morfologicznych, anatomicznych i biochemicznych, w tym radykalny i szybki spadek zawartości tłuszczu. Dzięki zastosowaniu mikroskopii elektronowej, zaobserwowano pojawianie się w komórkach wakuol autofagicznych podczas procesu HA. Obserwowana degradacja ciał olejowych przebiegała na drodze mikroautofagii, gdyż stwierdzono pochłanianie ciał olejowych przez wakuole wskutek tworzenia się wpukleń tonoplastu [128].

## LIZOFAGIA

Lizosomy są to organelle zawierające enzymy hydrolityczne i uczestniczą one w degradacji różnych komponentów komórki. Zaangażowane są m. in. w proces selektywnej jak i nieselektywnej autofagii komórkach zwierzęcych. Prawdopodobnie funkcjonujące lizosomy oddzielają enzymy lityczne od pozostałych elementów komórki. Jednakże lizosomy uszkodzone mogą w sposób niekontrolowany uwalniać swoją zawartość do cytozolu, powodując tym samym poważne zaburzenia w strukturze i metabolizmie komórki. Przykładem lizosomalnych enzymów są katepsyny, których uwolnienie do cytozolu wywołuje apoptozę [39]. Takie wadliwe lizosomy usuwane są z komórki w procesie zwanym lizofagią, która jest selektywnym rodzajem makroautofagii. Lizofagię badano jak do tej pory tylko w kultywowanych *in vitro* liniach komórkowych ssaków (J774, MEF, NIH3T3, HeLa, Plat-E), a uszkodzenia lizosomów wywoływano chemicznie. Proces lizofagii prawdopodobnie jest zależny od ubikwityny i uczestniczą w nim białka LC3 (zwierzęcym homologiem rodziny białek Atg8) i p62. Nie wiadomo jednak w jaki sposób ubikwityna przyłącza się do uszkodzonych lizosomów i jaki jest udział białek Atg w lizofagii [39, 44, 72, 87].

## NUKLEOFAGIA

Nukleofagia jest rodzajem selektywnej autofagii, podczas której degradacji ulegają uszkodzone lub nieużywane części jądra komórkowego, a nawet całe jądra. Organelle te odpowiedzialne są za przechowywanie i ekspresję genomu. Dlatego zachowanie jego pełnej funkcjonalności jest szczególnie istotne niemalże dla każdej

żywej komórki. Nukleofagia zachodzić może zarówno na drodze mikro- jak i makroautofagii, ale też w sposób opisany dla megaautofagii [79]. W zależności jednak od mechanizmu dostarczania fragmentów jądra do wakuoli lub lizosomu i w zależności od natury ładunku wyróżnia się kilka odmian nukleofagii. Opisaną u *Saccharomyces cerevisiae* odmianą mikronukleofagii jest tzw. fragmentaryczna mikroautofagia jądra (ang. *Piecemeal Microautophagy of the Nucleus*, PMN). Proces ten inicjowany jest przez połączenie błon jądra komórkowego i wakuoli poprzez interakcje pomiędzy tonoplastowym komponentem Vac8 i elementem otoczki jądrowej – Nvj1. Kolejnym etapem jest powstanie inwaginacji tonoplastu, w którym znajdzie się fragment otoczki jądrowej i pewna część nukleoplazmy. Inwaginacja tonoplastu pogłębia się i przekształca się w wewnątrz wakuolarny pęcherzyk składający się z trzech błon (tonoplast i dwie błony otoczki jądrowej) i porcji nukleoplazmy. Jądro komórkowe i wakuola oddzielają się, a zawartość pęcherzyka wewnątrz wakuoli ulega degradacji. PMN umożliwia dostarczenie do wakuoli takich składników jądra, które są odseparowane przez otoczkę jądrową, a w pewnych stadiach rozwojowych nie są potrzebne. Przykładem takiego ładunku może być granularne jąderko, które wzbogacone jest w pre-rybosomy. Jednakże takie komponenty jak chromatyna, kompleksy porów otoczki jądrowej lub elementy wrzeciona kariokinetycznego nie ulegają degradacji wskutek PMN [79]. Efektywna degradacja elementów jądra podczas PMN wymaga ekspresji rdzeniowych dla autofagii genów *ATG*. Jednakże udział białek Atg zdaje się być ograniczony tylko do końcowych stadiów tego procesu, a mianowicie do etapu odrywania się fragmentu jądra komórkowego i zamykania się tonoplastu [79]. Inną odmianą mikronukleofagii jest tzw. nukleofagia późna. Ta odmiana nukleofagii zachodzi u *Saccharomyces cerevisiae* podczas wydłużonego głodu azotowego (20-24h). W przeciwieństwie do PMN, nukleofagia późna zachodzi bez udziału Vac8 i Nvj1, a tym samym bez ścisłej integracji tonoplastu i otoczki jądrowej [79]. U *Saccharomyces cerevisiae* zachodzić też może tzw. programowana destrukcja jądra (ang. *Programmed Nuclear Destruction*, PND). Ta odmiana nukleofagii zachodzi w komórkach, które wskutek głodu azotowego wytwarzają spory. Diploidalna komórka drożdży wytwarza cztery spory, a ich powstanie poprzedzone jest wytworzeniem czterech jąder na drodze mejozy. Jednakże w pewnych warunkach suboptymalnego odżywienia węglowego powstają tylko dwie spory, a dwa pozostałe jądra ulegają degradacji wskutek uwolnienia do cytoplazmy litycznej zawartości wakuoli. Ten sposób degradacji elementów komórki nie jest specyficzny dla jąder komórkowych, lecz jest to proces megaautofagii [79]. U grzybów nitkowatych (np. u *Aspergillus oryzae*, *Magnaporthe oryzae*) zachodzić może autofagiczna degradacja całego jądra komórkowego. Grzyby te zbudowane są z komórek zawierających wiele jąder, więc usunięcie niektórych z nich nie wywołuje negatywnych skutków, a wręcz przeciwnie, jest to sposób pozyskiwania substancji odżywczych przez niektóre komórki. Degradacja jądra u tych grzybów zachodzi na drodze makronukleofagii, gdyż potwierdzono pojawianie się autofagosomów i Atg8 (markera autofagosomu) [79].

Występowanie nukleofagii zaobserwowano również u organizmów zwierzęcych. U *Tetrahymena thermophila* (modelowy protist zwierzęcy, orzęsek) występować mogą dwa amitotyczne jądra (duże i małe). Podczas rozmnażania płciowego jądro duże ulega programowanej degradacji (PND), ale nie wyklucza się powstania również autofagosomów, wskazujących na proces makronukleofagii. W badaniach prowadzonych na fibroblastach myszy zaobserwowano np. występowanie histonów H1 w niektórych autofagosomach. A w komórkach występującego u człowieka kostniakomiesaka (nowotwór kości) potwierdzono makroautofagiczną degradację nietypowych, małych jąder [79]. W literaturze brak jest jakichkolwiek informacji na temat występowania nukleofagii w komórkach roślinnych.

## AGREFAGIA

Jest to rodzaj selektywnej makroautofagii, podczas której degradacji ulegają niefunkcjonalne agregaty białkowe. Głównym sposobem usuwania z komórki uszkodzonych białek jest ich ubikwitynizacja i degradacja przez proteasomy 26S. Jednakże białka o niewłaściwej strukturze mogą wykazywać tendencję do tworzenia agregatów, których degradacja przez proteasomy jest mało efektywna lub niemożliwa. Ponadto agregaty białkowe mogą ograniczać lub blokować działanie proteasomów, a ich akumulacja w komórkach zwierzęcych może być przyczyną chorób neurodegeneracyjnych. Spadkowi wydajności proteasomów często towarzyszy nasilenie autofagii, podczas której w wybiórczy sposób degradowane są agregaty białkowe [70]. U roślin jedną z przyczyn tworzenia się niefunkcjonalnych agregatów białkowych są oksydacyjne uszkodzenia białek wywoływane przez różne stresy abiotyczne, a ich nasilony autofagiczny rozkład obserwowany jest w warunkach głodu [32]. Warty nadmienia jest fakt, że degradacja agregatów białkowych zachodząca w warunkach głodu (cukrowego, azotowego, fosforowego) w komórkach BY-2 tytoniu była pierwszym opisanym rodzajem selektywnej autofagii u roślin [113].

Istotnymi elementami agrefagii w komórkach ssaków są białka p62, BR1, OPTN, NDP52 i Tollip. Pełnią one funkcję receptorów agregatów białkowych i są też adaptorami wchodzącymi w interakcje z LC3 lub GABARAP podczas kształtowania się autofagosomu [70]. Agrefagia u roślin nie została jeszcze tak dobrze poznana jak u zwierząt, ale u *Arabidopsis* zidentyfikowano homolog zwierzęcego NBR1. Roślinny NBR1 (AtNBR1, At4g24690) jest strukturalną i funkcjonalną hybrydą zwierzęcego p62 i NBR1 i może wiązać się z Atg8 i ubikwitynowanymi białkami [32]. Innym roślinnym receptorem/adaptorem istotnym podczas agrefagii jest białko Joka2, które zostało zidentyfikowane u tytoniu. Podobnie jak AtNBR1 jest ono hybrydą zwierzęcych p62 i NBR1 i wchodzi w interakcje z Atg8 i ubikwityną. [32, 131]. Zaobserwowano wzrost ekspresji *Joka2* w komórkach tytoniu podczas głodu azotowego i siarkowego, co może wskazywać na udział

agrefagii w roślinnych reakcjach obronnych zwiększających tolerancję na stresy środowiskowe [32, 131]. Nadmienić jednak należy, że NBR1 (zarówno roślinne jak i zwierzęce) i Joka2 mogą łączyć się z różnymi białkami, które ulegają ubikwitynizacji. Nie można zatem wykluczyć udziału tych dwóch białek w innych rodzajach selektywnej autofagii, np. w peksofagii.

## ZYMOFAGIA

Jest to rodzaj selektywnej autofagii, który chroni komórki trzustki przed obumieraniem w stanach zapalnych. Główną funkcją trzustki jest synteza i sekrecja enzymów trawiennych, które syntetyzowane są jako zymogeny (np. tripsynogen), czyli enzymy nieaktywne. Zymogeny akumulowane są w komórkach trzustki w formie granul, aż do czasu ich sekrecji. Granule zymogenu są potencjalnie niebezpieczne, gdyż aktywacja enzymów trawiennych wewnątrz komórek trzustki prowadzi do samostrawienia organu i okolicznych tkanek (ostre zapalenie trzustki). Zymofagia, czyli selektywna degradacja granul zymogenu, uruchamiana jest w komórkach pęcherzyków wydzielniczych trzustki w stanach zapalnych i prowadzi do odseparowania i zdegradowania granul zawierających aktywowane zymogeny, chroniąc tym samym komórki trzustki przed samozniszczeniem. Zymofagię badano w komórkach genetycznie modyfikowanych myszy (ELAI-VMP1) oraz w kultywowanych *in vitro* liniach komórkowych (linia komórek C57BL6J myszy i linia modelowych komórek trzustki AR42J szczura). U zwierząt zapalenie trzustki wywoływane było poprzez iniekcje ceruleiny. Wykazano, że zymofagia chroni komórki trzustki zarówno poprzez zapobiegnię aktywowaniu tripsynogenu, ale też wskutek usuwania granul zawierających już aktywną tripsynę. Występowanie zymofagii potwierdzono również u człowieka podczas ostrego zapalenia trzustki. Białkami uczestniczącymi w zymofagii są: związane z autofagią białko VMP1, zależna od ubikwityny proteaza USP9x i białko wiążące ubikwitynę p62. Zaobserwowano, że VMP1 wchodzi w interakcje z USP9x, co wskazuje na udział ubikwityny w mechanizmie rozpoznawania i selekcji granul zymogenu podczas tworzenia się autofagosomu [34].

## ALLOFAGIA

Jest to rodzaj selektywnej makroautofagii umożliwiający eliminację z komórki obcych (nie swoich) komponentów. Najlepiej poznanym przykładem allofagii jest selektywna, autofagiczna degradacja ojcowskich mitochondriów i innych komponentów plemnika, zachodząca bezpośrednio po zapłodnieniu i podczas wczesnej embriogenezy. W trakcie zapłodnienia komórki jajowej, plemnik dostarcza nie tylko materiał genetyczny, ale też inne komponenty komórkowe, takie jak mitochon-

dria, centriole czy cytoplazmę. Badania przeprowadzone na modelowym nicieniu *Caenorhabditis elegans* pokazały, że już w pierwszych minutach po zapłodnieniu pojawiają się autofagosomy. Tworzą się one w pobliżu komponentów plemnika i w bezpośrednim sąsiedztwie miejsca w którym plemnik wniknął do komórki jajowej. W autofagosomach zidentyfikowano przede wszystkim ojcowskie mitochondria, ale też inne wyspecjalizowane organelle pochodzące z plemników. Zawartość autofagosomów ulegała lizosomalnej degradacji w trakcie wczesnej embriogenezy. Mitochondria pochodzące od matki, czyli te znajdujące się w komórce jajowej od samego początku jej istnienia, nie były degradowane. Zatem dziedziczenie genów mitochondrialnych jest skutkiem autofagicznej eliminacji mitochondrialnych genów ojcowskich, która zachodzi bezpośrednio po zapłodnieniu. W zygotach *Caenorhabditis elegans* z upośledzonym przebiegiem autofagii, ojcowskie mitochondria i zgromadzony w nich materiał genetyczny występowały w komórkach aż do stadium larwalnego. W badaniach tych wykorzystano autofagicznego mutantą *lgg1* lub komórki z wyciszoną ekspresją LGG-1 i LGG-2. Białka te są homologami LC3 (homolog Atg8). Stwierdzono również, że LGG-1 i LGG-2 występują już w komórce jajowej przed zapłodnieniem, pochodzą więc od matki [96, 102, 103].

Istotnym elementem allofagii jest przyłączenie ubikwityny do komponentów plemnika wewnątrz zapłodnionej komórki jajowej. U *Caenorhabditis elegans* ubikwitynizacji nie ulegają jednak mitochondria i ciągle nie wiadomo co jest sygnałem kierującym te organelle do powstających autofagosomów. Wiadomo natomiast, że w allofagii uczestniczy UNC-51 (homolog Atg1/ULK1), Atg5, Atg7 i Atg18. Stwierdzono również, że w oocytach myszy tuż po zapłodnieniu pojawiają się takie markery autofagii jak LC3, GABARAP, p62 i K63-ubikwityna. Taki wynik sugeruje zachodzenie allofagii również u ssaków i wskazuje na konserwatywność tego procesu wśród zwierząt [96, 102, 103]. Inne badania potwierdziły gromadzenie się p62 i LC3 wokół ojcowskich mitochondriów bezpośrednio po zapłodnieniu komórek jajowych myszy. Jednakże mitochondria nie ulegały lizosomalnej degradacji bezpośrednio po zapłodnieniu, lecz rozprzestrzeniały się w zygocie i trwały do stadium moruli [68].

## KSENOFAGIA

Zasadniczo, ksenofagia jest procesem selektywnej, makroautofagicznej degradacji różnych patogenów (bakterie i wirusy). Jednakże w szerszym znaczeniu, podczas ksenofagii rozkładane są też inne obce, ale niemikrobiologiczne objekty (np. związki żelaza). Ten szczególny rodzaj ksenofagii nosi nazwę ferrytynofagii [73]. Wyróżnia się też symbiofagię, czyli autofagiczną degradację symbiotycznego partnera [11]. Pomimo tego, że patogeny wykształciły różne mechanizmy ułatwiające im przeżycie w komórkach gospodarza, to mogą one być przechwytywane przez

autofagosomy i dostarczane do kompartmentów litycznych (np. autolizosomy u zwierząt), gdzie ulegają degradacji. Ksenofagia jest więc komórkowym mechanizmem obronnym przeciwko mikroorganizmowi znajdującym się w cytozolu i jest elementem odporności wrodzonej i nabytej [54]. W komórkach zwierzęcych patogeny mogą też być utylizowane podczas fagocytozy (w skrócie nazywaną LAP; ang. *LC3 Associated Phagocytosis*). Jest to proces bardzo podobny do ksenofagii, ale podczas LAP z lizosomami łączą się fagosomy, które tworzą się z plazmalemy i zbudowane są z pojedynczej błony. Natomiast w trakcie ksenofagii, z lizosomami łączą się autofagosomy, które powstają z fagofory w cytozolu i zbudowane są z błony podwójnej. Podczas LAP degradacji ulegają patogeny, które zlokalizowane są poza komórką, natomiast w trakcie ksenofagii niszczone są mikroorganizmy, które wcześniej przedostały się do wnętrza komórki [11, 54]. Nie można też wykluczyć, że oba te procesy zachodzą mogą w komórce jednocześnie [54]. Do strategii umożliwiających przeżycie patogenów wewnątrz komórki gospodarza zalicza się: *i*) lizę i uwolnienie się z fagosomów lub wakuoli, *ii*) modyfikacje fagosomów oraz *iii*) przeżycie w kwaśnym środowisku kompartmentów degradacyjnych komórki. Szczegółowe informacje na temat bakterii i stosowanych przez nie wyżej wymienionych strategii zostały zawarte w publikacji przeglądowej Pareja i Colombo 2013 [92].

Kluczowym etapem ksenofagii jest rozpoznanie bakterii w obrębie komórki gospodarza. Uważa się, że w komórkach zwierzęcych kluczowe są tutaj białka LC3 i p62. Zatem wykorzystywane są te same białka receptorowe/adaptorowe, które są istotne podczas autofagicznej degradacji białek i agregatów białkowych (agerfagia; punkt 3.9.) [92]. Przykładem bakterii, która eliminowana może być w procesie ksenofagii jest *Salmonella enterica* (*S. typhimurium*). Po wnikięciu bakterii do cytozolu komórki zwierzęcej, zostaje ona pokryta licznymi cząsteczkami ubikwityny, a do ubikwitynowanych białek przyłączają się następnie p62, NDP52 (z ang. *Nuclear Dot Protein 52 kDa*) i optineuryna (OPTN). Są to białka receptorowe/adaptorowe, wiążące się z LC3, który zasocjowany jest z błoną rosnącej fagofory (kształtującego się autofagosomu). W podobny sposób ksenofagii ulegać mogą również *Streptococcus pyogenes* i *Shigella flexneri* [92].

Podczas ksenofagii bakterii uczestniczą różne białka Atg, takie jak Atg9 (potwierdzone w ksenofagii *Salmonella*) [54], Atg5 (*Shigella*) czy Atg5, Atg8 i Atg12 (*Burkholderia cenocepacia*) [92]. Stwierdzono też, że pomimo sprawnie funkcjonującej autofagii i LAP w komórkach gospodarza, bakteriom udaje się uniknąć degradacji. Przypuszcza się, że oprócz trzech wyżej wymienionych strategii unikania przez bakterie degradacji podczas LAP [92], istnieje też dodatkowy mechanizm umożliwiający przeżycie bakterii, polegający na obniżeniu ekspresji genów *ATG* gospodarza. Niższą ekspresję *ATG* stwierdzono np. podczas infekcji ludzkich limfocytów *Francisella tularensis*. Obniżoną ekspresję genów *ATG* (*ATG5*, *ATG8* i *ATG12*) powoduje też *Burkholderia cenocepacia* w komórkach pacjentów chorych na mukowiscydozę. U takich pacjentów stwierdzono również obniżony



poziom ekspresji *ATG* i dysfunkcjonalną autofagię w komórkach nabłonkowych nawet w warunkach braku infekcji, co może być jedną z przyczyn większej przeżywalności *Burkholderia* u chorych na mukowiscydozę [92].

Ksenofagii mogą ulegać także wirusy lub ich niektóre komponenty. Białka wirusowe mogą stymulować lub ograniczać autofagiczną eliminację tych patogenów. Stwierdzono, że wydajność autofagii wzrasta podczas infekcji wirusem grypy, dengi (choroba tropikalna), czy podczas wzmożonej ekspresji białka HBx wirusa B zapalenia wątroby. Stymulacja autofagii wywołana jest przez wirusowe białko (np. NS4A lub HBx). Zakażone komórki są w takich okolicznościach chronione przed apoptozą, a to daje wirusom więcej czasu na replikację. Natomiast białko ICP34.5 wirusa opryszczki spowalnia autofagię poprzez interakcje z białkiem Beclin1 (analog drożdżowego Atg6 u ssaków). Ograniczenie autofagii jest jedną z możliwych strategii przeżycia wirusa i uniknięcia reakcji obronnych gospodarza [54]. Stwierdzono również, że podczas infekcji wirusem C zapalenia wątroby istotne są takie białka związane z autofagią jak Beclin1, Atg4B, Atg5 czy Atg12, ale białka te wykorzystywane są przez wirusa do zainicjowania jego replikacji [54].

Wiedza dotycząca udziału procesów autofagicznych w reakcjach obronnych u roślin jest znacznie skromniejsza niż zakres danych dotyczący komórek zwierzęcych. Wiadomo jednak, że procesy autofagiczne mogą być jednym z elementów obrony roślin przed atakiem patogenów. U roślin atak patogena doprowadzać może m. in. do tzw. reakcji nadwrażliwości, podczas której komórka roślinna obumiera, powstrzymując tym samym rozprzestrzenianie się infekcji. Jest to swoisty rodzaj programowanej śmierci komórki roślinnej. Szereg badań wskazuje na udział autofagii w stymulowaniu lub ograniczaniu reakcji nadwrażliwości w komórkach roślinnych [46, 51, 110, 122]. Jednakże nie ma żadnych danych, jak do tej pory, które potwierdziłyby lub wykluczyłyby występowanie ksenofagii w komórkach roślinnych.

## TRANSPORT CYTOPLAZMA-WAKUOLA

Transport cytoplazma-wakuola (ang. *Cytoplasm-to-vacuole-targeting*, Cvt) jest jednym z pierwszych dobrze zbadanych rodzajów selektywnej autofagii u drożdży i polega on na dostarczaniu do wakuoli różnych białek. Jednakże ładunek dostarczony do wakuoli nie ulega degradacji, gdyż organella ta jest docelowym miejscem działania transportowanych w ten sposób białek. Cvt jest więc przykładem biosyntetycznej, a nie degradacyjnej funkcji autofagii. W trakcie Cvt istotną funkcję pełnią pęcherzyki zbudowane z podwójnej błony, ale nie nazywa się ich autofagosomami, lecz pęcherzykami Cvt. Formowanie pęcherzyków Cvt następuje w PAS (miejsce formowania się fagofory) [31, 114]. Białkami transportowanymi z cytoplazmy do wakuoli mogą być np. prekursor aminopeptydaz (np. Ape1, Ape4). Proces Cvt rozpoczyna się od powstania dodekamerów prApe1 (prekursor Ape1). Dodekamery

łączą się następnie w większy kompleks, do którego przyłączają się inne wakuolarnie hydrolazy (np. Ape4 czy  $\alpha$ -mannozydaza). Receptorem/adaptorem takiego kompleksu jest Atg19, które przyłącza się do prApe1 i powoduje przesuwanie się ładunku w kierunku PAS. Następnie Atg19 wchodzi w interakcje z Atg11 i Atg8, umożliwiając tym samym przyłączenie ładunku do fagofory i wykształcenie się pęcherzyka Cvt [31, 114]. Zewnętrzna błona pęcherzyka Cvt ulega fuzji z tonoplastem, a do wnętrza wakuoli uwolnione zostaje ciało Cvt (analog ciała autofagowego), które ulega częściowej destrukcji przez Atg15 – wakuolarną lipazę. Degradacji ulegają Atg8 i Atg11, natomiast prApe1 po proteolitycznej obróbce staje się aktywnym enzymem [114].

### INNE RODZAJE AUTOFAGII SELEKTYWNEJ

Antocyjaniny (roślinne barwniki z grupy flawonoidów) syntetyzowane są w cytoplazmie, ale miejscem ich deponowania w komórce jest wakuola, w której występują w formie rozpuszczonej i pod postacią inkluzji (ang. *Anthocyanin Vacuolar Inclusion*, AVI). Siewki autofagicznych mutantów *Arabidopsis* (*atg5*, *atg9*, *atg10*) akumulują wyraźnie mniej AVI niż rośliny typu dzikiego. Zastosowanie induktora powstawania AVI, jakim jest ortowanadian sodu, nie wywołuje zwiększenia liczebności AVI u mutantów, tak jak ma to miejsce u roślin typu dzikiego [95]. Takie dane sugerują, że w transport antocyjanin do wakuoli zaangażowane mogą być procesy autofagiczne (ale ładunek nie ulegałby degradacji) [32, 95]. Jednakże analiza transkryptomyczna pokazała, że u autofagicznych mutantów *Arabidopsis* następuje wyraźne obniżenie ekspresji genów kodujących kluczowe enzymy i białka regulatorowe zaangażowane w biosyntezę flawonoidów, a nadekspresja odpowiedniego czynnika transkrypcyjnego (PRODUCTION OF ANTOCYJANIN PIGMENT1) przywraca akumulację antocyjanin w wakuolach mutantów [75]. Wobec takich danych narastają wątpliwości, czy procesy autofagiczne uczestniczą w transporcie antocyjanin do wakuoli. Gdyby jednak udział procesów autofagicznych w transporcie antocyjanin do wakuoli został potwierdzony, to byłby to przykład niedegradacyjnej funkcji autofagii.

W komórkach roślinnych autofagicznej degradacji ulegać mogą porfiryny. Wolny hem (żelazoporfiryna) w komórkach roślinnych może być toksyczny, ale obserwuje się jego przejściową akumulację podczas reakcji na abiotyczne czynniki stresowe. Jako grupa prostetyczna wielu białek oraz jako molekula sygnałna hem stanowi element systemu obrony komórki przed reaktywnymi formami tlenu. Abiotyczne czynniki stresowe powodują również indukcję ekspresji błonowych białek TSPO, pełniących regulatorowe funkcje w różnych reakcjach obronnych. Białka te mogą też wiązać hem [118] i inne porfiryny, i uważa się, że są to białka odpowiedzialne za utrzymanie stężenia wolnego hemu na odpowiednio niskim, nietoksycznym poziomie. Badania wykonane na autofagicznym mutancie *Arabidopsis atg5*, pokazały, że kompleksy

TSPO i hemu są degradowane w trakcie autofagii. Lokalizowano je w autofagosomach, a po zastosowaniu konkanamycyny A również w ciałach autofagowych. Stosując techniki mikroskopowe i fluorescencyjne stwierdzono też współwystępowanie TSPO i Atg8e [32, 118, 119]. Sugeruje się, że TSPO w komórkach roślinnych pełni funkcję autofagicznego receptora porfiryń (a przynajmniej tych porfiryń, które są dla komórek roślinnych toksyczne) [119].

## AUTOFAGIA ZALEŻNA OD CHAPERONÓW

Autofagia zależna od chaperonów (ang. *Chaperone-Mediated Autophagy*, CMA) występuje tylko w komórkach ssaków i jest jednym ze sposobów selektywnej, lizosomalnej degradacji białek. Jest to proces, który przebiega odmiennie od opisywanych w tym artykule różnych rodzajów makro- czy mikroautofagii, gdyż podczas CMA nie powstają autofagosomy czy inwaginacje błony lizosomu, lecz przeznaczone do degradacji białka transportowane są bezpośrednio z cytoplazmy do lizosomu. W przebiegu CMA nie uczestniczą białka Atg, lecz istotnym elementem tego procesu są chaperony (zwane też białkami opiekuńczymi). Białka-substraty, które mogą być degradowane podczas CMA muszą mieć specyficzny, pentapeptydowy motyw, do którego przyłącza się konstytutywny chaperon hsc70. Zaznaczone w ten sposób białko kierowane jest do powierzchni lizosomu. W błonie lizosomu zakotwiczone jest białko-receptor LAMP-2A. Przyłączenie się przeznaczonego do degradacji białka do cytozolowego ogona tego receptora powoduje rozprostowanie białka i powstanie błonowego kompleksu umożliwiającego przeniesienie ładunku do wnętrza lizosomu. Transmembranowy kompleks transportujący białko do lizosomu składa się z kilku LAMP-2A. Wewnątrz lizosomu białko ulega degradacji [13, 20, 21, 50, 87].

CMA ma istotne znaczenie w obrocie metabolicznym i w systemie kontroli jakości, usuwając z komórki uszkodzone i нефunkcjonalne białka. CMA jest przez to ważnym elementem systemu regulacji metabolizmu komórkowego, wpływającym na poziom różnych enzymów, czynników transkrypcyjnych i wielu innych białek. Zaburzenia w przebiegu CMA zwiększają wrażliwość komórek na różnego rodzaju stresy i mogą być istotne w rozwoju chorób nowotworowych i neurodegeneracyjnych [13, 20, 21]. CMA i inne rodzaje autofagii zachodzą z bazową wydajnością podczas normalnego wzrostu i rozwoju organizmu, ale ulegają wyraźnemu nasileniu podczas deficytu substancji odżywczych. Zaobserwowano, że w warunkach głodu w komórkach ssaków w pierwszej kolejności szybkim, ale raczej krótkotrwałemu nasileniu ulega makroautofagia. Natomiast intensyfikacja CMA rozpoczyna się później, przebiega w sposób łagodniejszy, a sam proces może trwać kilka dni [13, 21]. Przypuszcza się, że jednym z substratów CMA są białka Atg, a ich dekompozycja podczas CMA jest możliwą przyczyną szybkiego spadku wydajności makroautofagii podczas deficytu substancji odżywczych [13].

## PODSUMOWANIE

Wyniki badań wykonanych w ostatnich latach jednoznacznie wskazują na to, że spojrzenie na autofagię musiało ulec zmianie. Autofagia umożliwia bowiem nie tylko przeżycie komórki w warunkach głodu cukrowego czy azotowego, ale jest też niezwykle istotnym procesem biorącym udział w obrocie metabolicznym, w utrzymaniu homeostazy komórki, czy też w reakcjach obronnych. Te funkcje autofagii związane są jednak z bardzo precyzyjnym i wybiórczym degradowaniem poszczególnych komponentów komórki. O ile ogólny schemat przebiegu autofagicznej degradacji poszczególnych organelli komórkowych, kompleksów białkowych czy makromolekuł jest już w miarę dobrze poznany, to nadal wiele pytań pozostaje bez odpowiedzi. Przykładem może być relatywnie skromniejsza wiedza dotycząca receptorów poszczególnych komponentów komórkowych i sposobu ich ‘naznaczania’ do autofagicznej degradacji. Przez wiele lat uważano, że autofagia jest procesem konserwatywnym i zachodzi bardzo podobnie u różnych, niespokrewnionych ze sobą grup organizmów. Często wiedzę dotyczącą autofagii np. u drożdży ekstrapolowano np. na komórki roślinne. Przykładem może tutaj być zakładanie już wiele lat temu, że peksofagia czy mitofagia zachodzą w komórkach roślinnych. Wprawdzie przebieg obu tych procesów potwierdzono już u roślin, ale okazuje się, że np. receptory czy adaptory dla roślinnych peroksysomów i mitochondriów są odmienne niż te u grzybów czy w komórkach zwierzęcych. Dlatego też aktualne i przyszłe badania nad początkowymi etapami różnych rodzajów selektywnej autofagii w komórkach grzybów, zwierząt, a w szczególności roślin zdają się być niezwykle istotne dla dokładnego poznania przebiegu autofagii.

## PODZIĘKOWANIA

Publikacja związana z grantem Narodowego Centrum Nauki nr N N310 003540 realizowanego w latach 2011-2014

## LITERATURA

- [1] ALERS S, WASSELBORG S, STORK B. ATG13 Just a companion, or an executor of the autophagic program? *Autophagy* 2014; 10: doi: 10.4161/auto.28987
- [2] ANDERSEN KL, COLLINS K. Several RNase T2 enzymes function in induced tRNA and rRNA turnover in the ciliate *Tetrahymena*. *Mol Biol Cell* 2012; 23: 36-44.
- [3] AVIN-WITTENBERG T, FERNIE AR. At long last: evidence for pexophagy in plants. *Mol Plant* 2014; 7: 1257-1560.
- [4] AVIN-WITTENBERG T, HONIG A, GALILI G. Variations on a theme: plant autophagy in comparison to yeast and mammals. *Protoplasma* 2012; 249: 285-299.

- [5] BACKUES SK, KLIONSKY DJ. Autophagy gets in on the regulatory act. *J Mol Cell Biol* 2011; **3**: 76-77.
- [6] BADADANI M. Autophagy mechanism, regulation, functions and disorders. *ISRN Cell Biol* 2012; ID 927064, doi: 10.5402/2012/927064
- [7] BARROS M, FLEURI LF, MACEDO G. Seed lipases: sources, applications and properties a review. *Braz J Chem Engin* 2010; **27**: 15-29.
- [8] BASSHAM DC, CRESPO JL. Autophagy in plants and algae. *Front Plant Sci* 2014; doi:10.3389/fpls.2014.00679
- [9] BASSHAM DC. Methods for analysis of autophagy in plants. *Methods* 2014; doi: 10.1016/j.ymeth.2014.09.003
- [10] BASSHAM DC. Plant autophagy – more than a starvation response. *Curr Opin Plant Biol* 2007; **10**: 587-593.
- [11] BAUCKMAN KA, OWUSU-BOAITEY N, MYSOREKAR IU. Selective autophagy: xenophagy. *Methods* 2015; **75**: 120-127.
- [12] BEHREND S, FULDA S. Receptor proteins in selective autophagy. *Int J Cell Biol* 2012; ID 673290: doi: 10.1155/2012/673290
- [13] BEJARANO E, CUERVO AM. Chaperone-mediated autophagy. *Proc Am Thorac Soc* 2010; **7**: 29-39.
- [14] BOREK S, KUBALA S, KUBALA S, RATAJCZAK L. Comparative study of storage compound breakdown in germinating seeds of three lupine species. *Acta Physiol Plant* 2011; **33**: 1953-1968.
- [15] BOREK S, PALUCH E, PUKACKA S. Asparagine slows down the decomposition of autophagic bodies in sugar starved embryo axes of lupin (*Lupinus* spp). 6th Conference of the Polish Society of Experimental Plant Biology, 16-19.09.2013, Łódź, *BioTechnologia JBCBB* **94(3)**: 319.
- [16] BOREK S, PALUCH E, PUKACKA S. Does pexophagy (autophagic degradation of peroxisomes) occur in cells of lupin sugar-starved embryo axes? Abstract Book, Poster Presentations. Plant Biology Europe FESPB/EPSO 2014 Congress, 22-26.06.2014, Dublin, Irlandia.
- [17] BOREK S, PUKACKA S, MICHALSKI K. Regulation by sucrose of storage compounds breakdown in germinating seeds of yellow lupine (*Lupinus luteus* L.), white lupine (*Lupinus albus* L.) and Andean lupine (*Lupinus mutabilis* Sweet). II. Mobilization of storage lipid. *Acta Physiol Plant* 2012; **34**: 1199-1206.
- [18] CEBOLLERO E, REGGIORI F, KRAFT C. Reticulophagy and ribophagy: Regulated degradation of protein production factories. *Int J Cell Biol* 2012; ID 182834, doi:10.1155/2012/182834
- [19] CUERVO AM. Autophagy: many paths to the same end. *Mol Cell Biochem* 2004; **263**: 55-72.
- [20] CUERVO AM. Chaperone-mediated autophagy: selectivity pays off. *Trends Endocrinol Metab* 2010; **21**: 142-150.
- [21] CUERVO AM, WONG E. Chaperone-mediated autophagy: roles in disease and aging. *Cell Research* 2014; **24**: 92-104.
- [22] DARGEMONT C, OSSAREH-NAZARI B. Cdc48/p97, a key actor in the interplay between autophagy and ubiquitin/proteasome catabolic pathways. *Biochim Biophys Acta* 2012; **1823**: 138-144.
- [23] DEOSARAN E, LARSEN KB, HUA R, SARGENT G, WANG Y, KIM S, LAMARK T, JAUREGUI M, LAW K, LIPPINCOTT-SCHWARTZ J, BRECH A, JOHANSEN T, KIM PK. NBR1 acts as an autophagy receptor for peroxisomes. *J Cell Sci* 2013; **126**: 939-952.
- [24] DING Q, BAO J, ZHAO W, HU Y, LU J, CHEN X. Natural autophagy regulators in cancer therapy: a review. *Phytochem Rev* 2015; **14**: 137-154.
- [25] DONG J, CHEN W. The role of autophagy in chloroplast degradation and chlorophagy in immune defenses during *Pst* DC3000 (*AvrRps4*) Infection. *PLoS ONE* 2013; **8**: doi: 10.1371/journal.pone.0073091
- [26] DUNN JR. WA, CREGG JM, KIEL JAKW, VAN DER KLEI II, OKU M, SAKAI Y, SIBIRNY Y, STASYK OV, VEENHUIS M. Pexophagy: the selective autophagy of peroxisomes. *Autophagy* 2005; **1**: 75-83.
- [27] FARMER LM, RINALDI MA, YOUNG PG, DANAN CH, BURKHART SE, BARTEL B. Disrupting autophagy restores peroxisome function to an *Arabidopsis lon2* mutant and reveals a role for the LON2 protease in peroxisomal matrix protein degradation. *Plant Cell* 2013; **25**: 4085-4100.
- [28] FARRÉ JC, BURKENROAD A, BURNETT SF, SUBRAMANI S. Phosphorylation of mitophagy and pexophagy receptors coordinates their interaction with Atg8 and Atg11. *EMBO Rep* 2013; **14**: 441-449.

- [29] FARRÉ JC, MANJITHAYA R, MATHEWSON RD, SABRAMANI S. PpAtg30 tags peroxisomes for turnover by selective autophagy. *Dev Cell* 2008; **14**: 365-376.
- [30] FARRÉ JC, SUBRAMANI S. Peroxisome turnover by micropexophagy: An autophagy-related process. *Trends Cell Biol* 2004; **14**: doi:10.1016/j.tcb.2004.07.014
- [31] FENG Y, HE D, YAO Z, KLIONSKY DJ. The machinery of macroautophagy. *Cell Res* 2014; **24**: 24-41.
- [32] FLOYD BE, MORRIS SC, MACINTOSH GC, BASSHAM DC. What to eat: Evidence for selective autophagy in plant. *J Integr Plant Biol* 2012; **54**: 907-920.
- [33] GRAHAM IA. Seed storage oil mobilization. *Annu Rev Plant Biol* 2008; **59**: 115-142.
- [34] GRASSO D, ROPOLLO A, RÉ AL, BOGGIO V, MOLEJÓN MI, IOVANNA JL, GONZALES CD, URRUTIA R, VACCARO MI. Zymophagy, a novel selective autophagy pathway mediated by VMP1-USP9x-p62, prevents pancreatic cell death. *J Biol Chem* 2011; **286**: 8308-8324.
- [35] GUIMARAES RS, DELORME-AXFORD E, KLIONSKY DJ, REGGIORI F. Assays for the biochemical and ultrastructural measurement of selective and nonselective types of autophagy in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Methods* 2015; **75**: 141-150.
- [36] HAMASAKI M, FARUTA N, MATSUDA A, NEZU A, YAMAMOTO A, FUJITA N, OOMORI H, NODA T, HARAGUCHI T, HIRAOKA Y, AMANO A, YOSHIMORI T. Autophagosomes form at ER-mitochondria contact sites. *Nature* 2013; **495**: 389-393.
- [37] HANAMATA S, KURUSU T, KUCHITSU K. Roles of autophagy in male reproductive development in plants. *Front Plant Sci* 2014; doi:10.3389/fpls.2014.00457
- [38] HAUD N, KARA F, DIEKMANN S, HENNEKE M, WILLER JR, HILLWIG MS, GREGG RG, MACINTOSH GC, GÄRTNER J, ALIA A, HURLSTONE AFL. RNase2 mutant zebrafish model familial cystic leukoencephalopathy and reveal a role for RNase T2 in degrading ribosomal RNA. *PNAS* 2011; **108**: 1099-1103.
- [39] HASEGAWA J, MAEJIMA I, IWAMOTO R, YOSHIMORI T. Selective autophagy: Lipophagy. *Methods* 2015; **75**: 128-132.
- [40] HE C, KLIONSKY DJ. Regulation mechanisms and signaling pathways of autophagy. *Annu Rev Genet* 2009; **43**: 67-93.
- [41] HILLWIG MS, CONTENTO AL, MEYER A, EBANY D, BASSHAM DC, MACINTOSH GC. RNS2, a conserved member of the RNase T2 family, is necessary for ribosomal RNA decay in plants. *Proc Nat Acad Sci USA* 2011; **108**: 1093-1098.
- [42] HONIG A, AVIN-WITTENBERG T, UFAZ S, GALILI G. A new type of compartment, defined by plant-specific Atg8-interacting proteins, is induced upon exposure of *Arabidopsis* plants to carbon starvation. *Plant Cell* 2012; **24**: 288-303.
- [43] HU J, BAKER A, BARTEL B, LINKA N, MULLEN RT, REUMANN S, ZOLMAN BK. Plant peroxisomes: biogenesis and function. *Plant Cell* 2012; **24**: 2279-2303.
- [44] HUNG YH, CHEN LMW, YANG JY, YANG WY. Spatiotemporally controlled induction of autophagy-mediated lysosome turnover. *Nature Commun* 2013; doi:10.1038/ncomms3111
- [45] ISHIHARA N, MIZUSHIMA N. A receptor for eating mitochondria. *Dev Cell* 2009; **17**: 1-2.
- [46] JANAWAD CS, JYOTHI G, MANU TG, MURALI R. Autophagy is the emerging role in plant defense against pathogen attack. *Glob J Biol Agri Health Sci* 2012; **1**: 33-39.
- [47] KANKI T, KLIONSKY DJ. The molecular mechanism of mitochondria autophagy in yeast. *Mol Microbiol* 2010; **75**: 795-800
- [48] KANKI T, WANG K, BABA M, BARTHOLOMEW CR, LYNCH-DAY MA, DU Z, GENG J, MAO K, YANG Z, YEN WL, KLIONSKY DJ. A genomic screen for yeast mutants defective in selective mitochondria autophagy. *Mol Biol Cell* 2009; **20**: 4730-4738.
- [49] KAUR N, REUMANN S, HU J. Peroxisome biogenesis and function. *The Arabidopsis Book, American Society of Plant Biologists, Rockville* 2009; doi:10.1199/tab.0123
- [50] KAUSHIK S, BANDYOPADHYAY U, SRIDHAR S, KIFFIN R, MARTINEZ-VICENTE M, KON M, ORENSTEIN SJ, WONG E, CUERVO AM. Chaperone-mediated autophagy at a glance. *J Cell Sci* 2011; **124**: 495-499.
- [51] KHAN MS, HEMALATHA S. Autophagy: molecular insight and role in plant programmed cell death and defense mechanism. *Int Res J Biol Sci* 2015; **4**: 78-83.
- [52] KIM J, LEE H, LEE HN, KIM SH, SHIN KD, CHUNG T. Autophagy-related proteins are required for degradation of peroxisomes in *Arabidopsis* hypocotyls during seedling growth. *Plant Cell* 2013; **25**: 4956-4966.

- [53] KISSOVA I, DEFFIEU M, MANON S, CAMOUGRAND N. Uth1p is involved in the autophagic degradation of mitochondria. *J Biol Chem* 2004; **279**: 39068-39074
- [54] KLIONSKY DJ, ABDALLA FC, ABELIOVICH H ET ALL. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy. *Autophagy* 2012; **8**: 445-544.
- [55] KRAFT C, DEPLAZES A, SOHRMANN M, PETER M. Mature ribosomes are selectively degraded upon starvation by an autophagy pathway requiring the Ubp3p/Bre5p ubiquitin protease. *Nat Cell Biol* 2008; **10**: 602-610.
- [56] KURUSU T, KOYANO T, HANAMATA S, KUBO T, NOGUCHI Y, YAGI C, NAGATA N, YAMAMOTO T, OHNISHI T, OKAZAKI Y, KITAHATA N, ANDO D, ISHIKAWA M, WADA S, MIYAO A, HIROCHIKA H, SHIMADA H, MAKINO A, SAITO K, ISHIDA H, KINOSHITA T, KURATA N, KUCHITSU K. OsATG7 is required for autophagy-dependent lipid metabolism in rice postmeiotic anther development. *Autophagy* 2014; **10**: 878-888.
- [57] KWON SI, PARK OK. Autophagy in plants. *J Plant Biol* 2008; **51**: 313-320.
- [58] LAFONTAINE DLJ. A 'garbage can' for ribosomes: how eukaryotes degrade their ribosomes. *Trends Biochem Sci* 2010; **35**: 267-277.
- [59] LE BARS R, MARION J, LE BORGNE R, SATIAT-JEUNEMAITRE B, BIANCHI MW. ATG5 defines a phagophore domain connected to the endoplasmic reticulum during autophagosome formation in plants. *Nature Commun* 2014; **5**: doi:10.1038/ncomms5121
- [60] LE BARS R, MARION J, SATIAT-JEUNEMAITRE B, BIANCHI MW. Folding into autophagosome: ATG5 sheds light on how plants do it. *Autophagy* 2014; **10**: 1861-1863.
- [61] LEE HN, KIM J, CHUNG T. Degradation of plant peroxisomes by autophagy. *Front Plant Sci* 2014; doi: 10.3389/fpls.2014.00139
- [62] LEE TA, VANDE WATERING SW, BRUSSLAN JA. Stromal protein degradation is incomplete in *Arabidopsis thaliana* autophagy mutants undergoing natural senescence. *BMC Res Notes* 2013; **6**: 17.
- [63] LI F, CHUNG T, VIESTRA RD. AUTOPHAGY-RELATED11 plays a critical role in general autophagy- and senescence-induced mitophagy in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 2014; **26**: 788-807.
- [64] LI F, VIESTRA RD. *Arabidopsis* ATG11, a scaffold that links the ATG1-ATG13 kinase complex to general autophagy and selective mitophagy. *Autophagy* 2014; **10**: 1466-1467.
- [65] LI F, VIESTRA RD. Autophagy: a multifaceted intracellular system for bulk and selective recycling. *Trends Plant Sci* 2012; **17**: 1360-1385.
- [66] LIPPAI M, LÖW P. The role of the selective adaptor p62 and ubiquitin-like proteins in autophagy. *Bio Med Res Int* 2014; ID 832704, doi:10.1155/2014/832704
- [67] LIU Y, BASSHAM DC. Autophagy: pathways for self-eating in plant cells. *Annu Rev Plant Biol* 2012; **63**: 215-237.
- [68] LUO SM, GE ZJ, WANG ZW, JIANG ZZ, WANG ZB, OUYANG YC, HOU Y, SCHATTEN H, SUN QY. Unique insights into maternal mitochondrial inheritance in mice. *PNAS* 2013; **110**: 13038-13043.
- [69] LV X, PU X, QIN G, ZHU T, LIN H. The roles of autophagy in development and stress responses in *Arabidopsis thaliana*. *Apoptosis* 2014; **19**: 905-921.
- [70] LYSTAD AH, SIMONSEN A. Assays to monitor aggregatephagy. *Methods* 2015; **75**: 112-119.
- [71] MACINTOSH GC, BASSHAM SC. The connection between ribophagy, autophagy and ribosomal RNA decay. *Autophagy* 2011; **7**: 1-2.
- [72] MAEJIMA I, TAKAHASHI A, OMORI H, KIMURA T, TAKABATAKE Y, SAITOH T, YAMAMOTO A, HAMASAKI M, NODA T, ISAKA Y, YOSHIMORI T. Autophagy sequesters damaged lysosomes to control lysosomal biogenesis and kidney injury. *EMBO J* 2013; **32**: 2336-2347.
- [73] MANCIAS JD, WANG X, GYGI SP, HARPER JW, KIMMELMAN AC. Quantitative proteomics identifies NCOA4 as a cargo receptor mediating ferritinophagy. *Nature* 2014; **509**: 105-109.
- [74] MANJITHAYA R, NAZARKO TY, FAREE JC, SUBRAMANI S. Molecular mechanism and physiological role of pexophagy. *FEBS Lett* 2010; **584**: 1367-1373.
- [75] MASCLAUX-DAUBRESSE C, CLÉMENT G, ANNE P, ROUTABOUL JM, GUIBOILEAU A, SOULAY F, SHIRASU K, YOSHIMOTO K. Stitching together the Multiple dimensions of autophagy using metabolomics and transcriptomics reveals impacts on metabolism, development, and plant responses to the environment in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 2014; **26**: 1857-1877.
- [76] MICHAELI S, AVIN-WITTENBERG T, GALILI G. Involvement of autophagy in the direct ER to vacuole protein trafficking route in plants. *Front Plant Sci* 2014; **5**: doi:10.3389/fpls.2014.00134

- [77] MICHAELI S, GALILI G. Degradation of organelles or specific organelle components via selective autophagy in plant cell. *Int J Mol Sci* 2014; **15**: 7624-7638.
- [78] MICHAELI S, HONIG A, LEVANONY H, PELED-ZEHAZI H, GALILI G. *Arabidopsis* ATG8-INTERACTING PROTEIN1 is involved in autophagy-dependent vesicular trafficking of plastid proteins to the vacuole. *Plant Cell* 2014; **26**: 4084-4101.
- [79] MIJALJICA D, DEVENISH RJ. Nucleophagy at a glance. *J Cell Sci* 2013; **126**: 4325-4330.
- [80] MIJALJICA D, PRESCOTT M, DEVENISH RJ. Microautophagy in mammalian cells: revisiting a 40-year-old conundrum. *Autophagy* 2011; **7**: 673-682.
- [81] MOTLEY AM, NUTTALL JM, HETTEMA EM. Atg36: the *Saccharomyces cerevisiae* receptor for pexophagy. *Autophagy* 2012; **8**: 1680-1681.
- [82] NAGY P, VARGA A, KOVACS AL, TAKATS S, JUHASZ G. How and why to study autophagy in *Drosophila*: it's more than just a garbage chute. *Methods* 2014; doi: 10.1016/j.ymeth.2014.11.016
- [83] NAIR U, YEN W-L, MARI M, CAO Y, XIE Z, BABA M, REGGIORI F, KLIONSKY DJ. A role for Atg8-PE deconjugation in autophagosome biogenesis. *Autophagy* 2012; **8**: 780-793.
- [84] NIWA Y, KATO T, TABATA S, SEKI M, KOBAYASHI M, SHINOZAKI K, MORIYASU Y. Disposal of chloroplasts with abnormal function into the vacuole in *Arabidopsis thaliana* cotyledon cells. *Protoplasma* 2004; **223**: 229-232.
- [85] OCHABA J, LUKACSOVICH T, CSIKOS G, ZHENG S, MARGULIS J, SALAZAR L, MAO K, LAU AL, YEUNG SY, HUMBERT S, SAUDOU F, KLIONSKY DJ, FINKBEINER S, ZEITLIN SO, MARSH JL, HOUSMAN DE, THOMPSON LM, STEFFAN JS. Potential function for the Huntingtin protein as a scaffold for selective autophagy. *PNAS* 2014; **111**: 16889-16894.
- [86] OKAMOTO K, KONDO-OKAMOTO N, OHSUMI Y. Mitochondria-anchored receptor Atg32 mediates degradation of mitochondria via selective autophagy. *Dev Cell* 2009; **17**: 87-97.
- [87] OKAMOTO K. Organellophagy: eliminating cellular building blocks via selective autophagy. *J Cell Biol* 2014; **205**: 435-445.
- [88] OKU M, SAKAI Y. Peroxisomes as dynamic organelles: autophagic degradation. *FEBS J* 2010; **277**: 3289-3294.
- [89] OSSAREH-NAZARI B, BONZEC M, COHEN M, DOKUDOVSKAYA S, DELALANDE F, SCHAEFFER C, VAN DORSSELAER A, DARGEMONT C. Cdc48 and Ufd3, new partners of the ubiquitin protease Ubp3, are required for ribophagy. *EMBO Rep* 2010; **11**: 548-554.
- [90] OSSAREH-NAZARI B, NIÑO CA, BENGTON MH, LEE JW, JOAZEIRO CAP, DARGEMONT C. Ubiquitylation by the Ltn1 E3 ligase protects 60S ribosomes from starvation-induced selective autophagy. *J Cell Biol* 2014; **204**: 909-917.
- [91] PAPINI A, VAN DOORN WG. Crystalloids in apparent autophagic plastids: remnants of plastids or peroxisomes? *J Plant Physiol* 2015; **174**: 36-40.
- [92] PAREJA MEM, COLOMBO MI. Autophagic clearance of bacterial pathogens: molecular recognition of intracellular microorganisms. *Front Cell Infect Microbiol* 2013; doi:10.3389/fcimb.2013.00054
- [93] PATRZYLA P, SETA-KOSELKA A, BETLEJ A, SPACZYŃSKI M, SKÓRZYŃSKA-POLIT E. Autofagia u roślin w warunkach stresu. *Post Biol Kom* 2014; **41**: 445-462.
- [94] PEI D, ZHANG W, SUN H, WEI X, YUE J, WANG H. Identification of autophagy-related genes ATG4 and ATG8 from wheat (*Triticum aestivum* L.) and profiling of their expression patterns responding to biotic and abiotic stresses. *Plant Cell Rep* 2014; **33**: 1697-1710.
- [95] POURCEL L, IRANI NG, LU Y, RIEDL K, SCHWARTZ S, GROTEWOLD E. The formation of anthocyanic vacuolar inclusions in *Arabidopsis thaliana* and implications for the sequestration of anthocyanin pigments. *Mol Plant* 2010; **3**: 78-90.
- [96] RAWI SA, LOUVET-VALLÉE S, DJEDDI A, SACHSE M, CULETTO E, HAJJAR C, BOYD L, LEGOUIS R, GALY V. Allophagy: a macroautophagic process degrading spermoid-inherited organelles. *Autophagy* 2012; **8**: 421-423.
- [97] REGGIORI F, KLIONSKY DJ. Autophagic processes in yeast: mechanism, machinery and regulation. *Genetic* 2013; **194**: 341-361.



- [98] REUMANN S, VOITSEKHOVSKAJA O, LILLO C. From signal transduction to autophagy of plant cell organelles: lessons from yeast and mammals and plant-specific features. *Protoplasma* 2010; **247**: 233-256.
- [99] RUDNICKA KW, SZCZĘSNA E, MISZCZYK E, MIKOŁAJCZYK-CHMIELA M. Apoptoza i autofagia – mechanizmy i metody detekcji. *Post Biol Kom* 2011; **38**: 247-265.
- [100] SAKAI Y, OKU M, VAN DER KLEI IJ, KIEL AJK. Pexophagy: Autophagic degradation of peroxisomes. *Biochim Biophys Acta* 2006; **1763**: 1767-1775.
- [101] SANCHEZ-WANDELMER J, KTISTAKIS NT, REGGIORI F. ERES: sites for autophagosome biogenesis and maturation? *J Cell Sci* 2015; **128**: 185-192.
- [102] SATO M, SATO K. Dynamic regulation of autophagy and endocytosis for cell remodeling during early development. *Traffic* 2013; **14**: 479-486.
- [103] SATO M, SATO K. Maternal inheritance of mitochondrial DNA. Degradation of paternal mitochondria by allogeneic organelle autophagy, allophagy. *Autophagy* 2012; **8**: 424-425.
- [104] SEAY M, PATEL S, DINESH-KUMAR SP. Autophagy and plant innate immunity. *Cell Microbiol* 2006; **8**: 899-906.
- [105] SHIBATA M, OIKAWA K, YOSHIMOTO K, KONDO M, MANO S, YAMADA K, HAYASHI M, SAKAMOTO W, OHSUMI Y, NISHIMURA M. Highly oxidized peroxisomes are selectively degraded via autophagy in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 2013; **25**: 4967-4983.
- [106] SINGH R, KAUSHIK S, WANG Y. Autophagy regulates lipid metabolism. *Nature* 2009; **458**: 1131-1135.
- [107] STETTLER M, EICKE S, METTLER T, MESSERLI G, HÖRTENSTEINER S, ZEEMAN SC. Blocking the metabolism of starch breakdown products in *Arabidopsis* leaves triggers chloroplast degradation. *Mol Plant* 2009; **2**: 1233-1246.
- [108] SVENNING S, LAMARK T, KRAUSE K, JOHANSEN T. Plant NBR1 is a selective autophagy substrate and a functional hybrid of the mammalian autophagic adapters NBR1 and p62/SQSTM1. *Autophagy* 2011; **7**: 993-1010.
- [109] TAL R, WINTER G, ECKER N, KLIONSKY DJ, ABELIOVICH H. Aup1p, a yeast mitochondrial protein phosphatase homolog, is required for efficient stationary phase mitophagy and cell survival. *J Cell Biol* 2007; **282**: 5617-5624.
- [110] TEH OK, HOFIUS D. Membrane trafficking and autophagy in pathogen-triggered cell death and immunity. *J Exp Bot* 2014; doi:10.1093/jxb/ert441
- [111] THOMPSON AR, VIESTRA RD. Autophagic recycling: lessons from yeast help define the process in plants. *Curr Opin Plant Biol* 2005; **8**: 165-173.
- [112] TILL A, LAKHANI R, BURNETT SF, SUBRAMANI S. Pexophagy: The selective degradation of peroxisomes. *Int J Cell Biol* 2012; doi:10.1155/2012/512721
- [113] TOYOOKA K, MORIYASU Y, GOTO Y, TAKEUCHI M, FAKUDA H, MATSUOKA K. Protein aggregates are transported to vacuoles by a macroautophagic mechanism in nutrient-starved plant cells. *Autophagy* 2006; **2**: 96-106.
- [114] UMEKAWA M, KLIONSKY DJ. The Cytoplasm-to-Vacuole targeting pathway: a historical perspective. *Int J Cell Biol* 2012; doi:10.1155/2012/142634
- [115] VAN DOORN WG, WOLTERING EJ. Many ways to exit? Cell death categories in plants. *Trends Plant Sci* 2005; **10**: 117-122.
- [116] VAN DOORN WG, WOLTERING EJ. What about the role of autophagy in PCD? *Trends Plant Sci* 2010; **15**: 361-362.
- [117] VAN ZUTPHEN T, TODDE V, DE BOER R, KREIM M, HOFBAUER HF, WOLINSKI H, VEENHUIS M, VAN DER KLEI IJ, KOHLWEIN SD. Lipid droplet autophagy in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell* 2014; doi:10.1091/mbc.E13-08-0448
- [118] VANHEE C, ZAPOTOCZNY G, MASQUELIER D, GHISLAIN M, BATOKO H. The *Arabidopsis* multistress regulator TSPO is a heme binding membrane protein and a potential scavenger of porphyrins via an autophagy-dependent degradation mechanism. *Plant Cell* 2011; **23**: 785-805.
- [119] VELJANOVSKI V, BATOKO H. Selective autophagy of non-ubiquitylated targets in plants: looking for cognate receptor/adaptor proteins. *Front Plant Sci* 2014; doi:10.3389/fpls.2014.00308

- [120] VOITSEKHOVSKAJA OV, SCHIERMEYER A, REUMANN S. Plant peroxisomes are degraded by starvation-induced and constitutive autophagy in tobacco BY-2 suspension-cultured cells. *Front Plant Sci* 2014; doi:10.3389/fpls.2014.00629
- [121] WADA S, ISHIDA H, IZUMI M, YOSHIMOTO K, OHSUMI Y, MAE T, MAKINO A. Autophagy plays a role in chloroplast degradation during senescence in individually darkened leaves. *Plant Physiol* 2009; **149**: 885-893.
- [122] WANG J, MA C, ZHANG M, YANG L, CHEN W. Atg5 is required to limit cell death induced by *Pseudomonas syringae* in *Arabidopsis* and may be mediated by the salicylic acid pathway. *Acta Physiol Plant* 2015; **37**:1731, doi:10.1007/s11738-014-1731-5
- [123] WANG Y, YU B, ZHAO J, GUO J, LI Y, HAN S, HUANG L, DU Y, HONG Y, TANG D, LIU Y. Autophagy contributes to leaf starch degradation. *Plant Cell* 2013; doi:10.1105/tpc.112.108993
- [124] WEIDBERG H, SHVETS E, ELAZAR Z. Lipophagy: Selective catabolism designed for lipids. *Dev Cell* 2009; **16**: 628-630.
- [125] WIERZCHOWIECKA M, SAMARDAKIEWICZ S, WOŹNY A. Programowana śmierć komórki roślinnej – proces o “wielu twarzach”. *Kosmos* 2008; **57**: 43-52.
- [126] YAMANE K, MITSUYA S, TANIGUCHI M, MIYAKE H. Salt-induced chloroplast protrusion is the process of exclusion of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase from chloroplasts into cytoplasm in leaves of rice. *Plant Cell Environ* 2012; **35**: 1663-1671.
- [127] YOSHIMOTO K, SHIBATA M, KONDO M, OIKAWA K, SATO M, TOYOOKA K, SHIRASU K, NISHIMURA M, OHSUMI Y. Organ-specific quality control of plant peroxisomes is mediated by autophagy. *J Cell Sci* 2014; **127**: 1161-1168.
- [128] ZHAO L, DAI J, WU Q. Autophagy-like processes are involved in lipid droplet degradation in *Auxenochlorella protothecoides* during the heterotrophy-autotrophy transition. *Front Plant Sci* 2014; doi:10.3389/fpls.2014.00400
- [129] ZHOU J, WANG J, YU J-Q, CHEN Z. Role and regulation of autophagy in heat stress responses of tomato plants. *Front Plant Sci* 2014; doi: 10.3389/fpls.2014.00174
- [130] ZIENTARA-RYTTER K, ŁUKOMSKA J, MONIUSZKO G, GWOZDECKI R, SUROWIECKI P, LEWANDOWSKA M, LISZEWSKA F, WAWRZYŃSKA A, SIRKO A. Identification and functional analysis of Joka2, a tobacco member of the family of selective autophagy cargo receptors. *Autophagy* 2011; doi: 10.4161/auto.7.10.16617
- [131] ZIENTARA-RYTTER K, SIRKO A. Significant role of PB1 and UBA domains in multimerization of Joka2, a selective autophagy cargo receptor from tobacco. *Front Plant Sci* 2014; doi:10.3389/fpls.2014.00013

*Redaktor prowadzący – Michał Nowicki*

*Otrzymano: 17.04.2015*

*Przyjęto: 23.04.2015*

*Sławomir Borek*

*Zakład Fizjologii Roślin, Wydział Biologii*

*Uniwersytet im Adama Mickiewicza*

*ul. Umultowska 89, 61-614 Poznań*

*email: borek@amu.edu.pl*

*tel.: +48 61 829 5893*

*fax: +48 61 829 5887*