



СИБІРНИЙ

Андрій Андрійович – доктор біологічних наук, професор, академік НАН України, директор Інституту біології клітини НАН України

МЕХАНІЗМИ АВТОФАГІЇ, АБО САМОПОЇДАННЯ – ПОСТІЙНОЇ ДЕГРАДАЦІЇ КЛІТИННОГО МАТЕРІАЛУ, БЕЗ ЯКОЇ ЖИТТЯ НЕМОЖЛИВЕ

Нобелівська премія з фізіології і медицини 2016 р.

Лауреатом Нобелівської премії в галузі фізіології і медицини 2016 р. став професор Токійського технологічного інституту Йосінорі Осумі (Yoshinori Ohsumi) з формулюванням «за відкриття механізмів автофагії». Він з'ясував основні етапи цього процесу та ідентифікував гени, що беруть участь на окремих його етапах. Виявлено чинники середовища, що регулюють автофагію. Крім неспецифічної (загальної) автофагії, ідентифіковано селективні процеси деградації ендоплазматичного ретикулуму, рибосом, а також певних органел (мітохондрій, пероксисом, ліпідних гранул, ядра). У лабораторії автора огляду відкрито кілька нових генів, залучених в автофагію деградацію пероксисом (пексофагію). В огляді розглянуто також практичне значення вивчення механізмів автофагії для медицини і біотехнології.

Ключові слова: автофагія, пексофагія, Atg-білки, неспецифічна (загальна) та селективні типи автофагії, Нобелівська премія, Й. Осумі.

Відомо, що життя включає в себе процеси постійного синтезу та деградації. Як клітина синтезує білки, як відбувається біогенез органел, ми знаємо непогано. Вчені, які відкрили основні закономірності процесів синтезу білка та його регуляції, були неодноразово відзначені найвищою нагородою в науці – Нобелівською премією. Набагато менше ми знаємо, як клітина деградує білки та клітинні органели. Нормальний перебіг процесів життєдіяльності передбачає постійну деградацію білків та органел. Порушення цих процесів призводить до патологічних станів, у тому числі численних захворювань. Однак для чого потрібна така деградація? Справа в тому, що клітинні білки мають обмежений період «активного життя», коли вони перебувають у правильній просторовій конформації і можуть виконувати свої функції. Через певний час, найчастіше декілька днів, білки втрачають правильну конформацію внаслідок

денатурації, і щоб уникнути негативних наслідків для клітини, такі білки мають бути розщеплені до амінокислот, які в подальшому використовуватимуться для побудови нових білків з правильною конформацією. І доки існує життя, доти й відбуваються ці різноспрямовані процеси біосинтезу та деградації.

Розрізняють два основні типи деградації білків. В еукаріотичній клітині це протеасомна деградація, що відбувається в цитоплазмі, та автофагія, що відбувається в спеціальній органелі — лізосомі або вакуолі. Розглянемо коротко кожен з цих шляхів.

Нобелівські премії за відкриття протеасомної деградації білків та автофагії

Цитоплазматична деградація білків здійснюється у величезному мультиензимному комплексі, відомому як протеасома. Білок, що підлягає деградації, спочатку зв'язується зі спеціальним білком убіквітином, після чого утворений комплекс зв'язується з протеасомою, де і відбувається деградація [1]. За відкриття ролі убіквітину в протеасомній деградації білків ізраїльтяни Аарон Чехановер (Aaron Ciechanover) та Аврам Гершко (Avram Hershko) і американець Ірвін Роуз (Irwin A. Rose) були удостоєні Нобелівської премії з хімії в 2004 р. У 2008 р. А. Чехановер відвідав Україну, побував у Львові та Києві, взяв участь у роботі XII Міжнародного конгресу з дріжджів, на якому виступив з пленарною доповіддю. У 2009 р. А. Чехановера обрано іноземним членом НАН України.

Протеасоми відповідають за деградацію білків з неправильною просторовою конформацією, зокрема денатурованих білків, а також чужорідних білків. У відповідь на стресові чинники, такі як тепловий або оксидативний стрес, різні типи інфекції, білки теплового шоку ідентифікують білки з неправильною просторовою конформацією і беруть участь в їх доставці до протеасом, де ці білки деградує. Порушення протеасомної деградації вважають однією з причин таких захворювань, як рак мозку (астроцитом), нейродегенеративні



Йосінорі Осумі (Yoshinori Ohsumi) — нобелівський лауреат у галузі фізіології і медицини 2016 р.

хвороби (синдроми Паркінсона, Альцгеймера), аутизм та міопатія. Один з інгібіторів дії протеасом, бортезоміб (MG132), виявився ефективним лікарським засобом для лікування множинної мієломи і може застосовуватися також для лікування раку підшлункової залози та деяких аутоімунних захворювань [2, 3].

Автофагія (дослівно з гр. *самопоїдання*) є альтернативним механізмом деградації клітинного матеріалу, переважно білків великого розміру та цілих органел. Відкриття цього явища (1963 р.), його морфологічний опис і власне сама назва належать бельгійському біохіміку Кристіану Де Дюву (Christian De Duve), який відкрив також два види органел — лізосоми і пероксисоми. Він показав, що під час автофагії клітинний матеріал поглинається і деградує в гідролітичному компартменті тваринної клітини — лізосомі. За свої відкриття Де Дюв у 1974 р. був нагороджений Нобелівською премією в галузі фізіології і медицини.

Однак, крім цитологічних особливостей автофагії, молекулярні механізми процесу тривалий час залишалися невідомими. Для

з'ясування цих механізмів слід було вибрати зручний об'єкт досліджень, яким виявилися дріжджі — найпростіші одноклітинні еукаріоти. Першим, кому вдалося описати гени, специфічно залучені в автофагію, був японський дослідник Йосінорі Осумі — цьогорічний нобелівський лауреат у галузі фізіології і медицини. Він ізолював мутанти дріжджів *Saccharomyces cerevisiae* з пошкодженням автофагії та ідентифікував основні гени цього процесу [4]. Майже одночасно з ним такі мутанти та відповідні гени ідентифікували німецький учений М. Тумм [5], група голландських дослідників [6], а кілька років потому також і автор цієї статті [7]. Номенклатуру та класифікацію генів, що беруть участь в автофагії у дріжджів, наведено в спеціальній статті [8], співавторами якої є основні учасники цих досліджень. Американський дослідник Д. Кліонський (D. Klionsky) відкрив явище переносу цитозольних білків до вакуолі (відповідник лізосом тварин), що бере участь у процесингу деяких активних вакуолярних гідролаз, як, наприклад, амінопептидази I та альфа-манозидази (процес, відомий в англійській літературі як Cvt pathway, або Cytoplasm to vacuole targeting). Цей шлях є видозміною специфічної автофагії [9].

Згадані вище дослідники описали основні гени, що беруть участь в автофагії у дріжджів, але провідна роль у цьому, безумовно, належить Йосінорі Осумі. На самому початку йому вдалося знайти зручну модель для досліджень. Нею виявилися мутанти *S. cerevisiae* з дефектом вакуолярних протеїназ [10]. У таких штамів білки, призначені для деградації, потрапляють до вакуолі, але не деградують, а накопичуються в ній. Використовуючи ці штам, Й. Осумі зі співавторами ізолювали мутанти з пошкодженням автофагії та ідентифікували перші 15 генів, необхідні для цього процесу [4]. Ці гени виявилися ключовими, причому більшість з них мають гомологи в ДНК рослин, тварин та людини.

Автофагія, подібно до протеасомної деградації білків, бере участь у рециклізації клітинного матеріалу. Цей матеріал виконує не лише структурну, а й енергетичну функцію [11]. По-

шкодження автофагії також викликає оксидативний стрес, ушкодження ДНК і нестабільність геному [12]. Мутанти дріжджів з пошкодженою автофагією мало відрізняються за швидкістю росту від диких штамів у багатому на поживні речовини середовищі, однак швидко гинуть в умовах голодування за джерелами вуглецю або азоту [13]. У мутантів рослин пошкоджена автофагія також знижує стійкість до нестачі поживних речовин, і крім того, призводить до хлорозу, пожовтіння листя та зниженої врожайності [14]. Подібним чином інактивація *ATG* генів у нематоди *Caenorhabditis elegans* веде до зниження виживання за умов голодування [15]. Миші, гомозиготно дефектні за генами *ATG5* або *ATG7*, помирали впродовж декількох годин після народження, оскільки не могли витримати голодування до початку споживання їжі після народження [16].

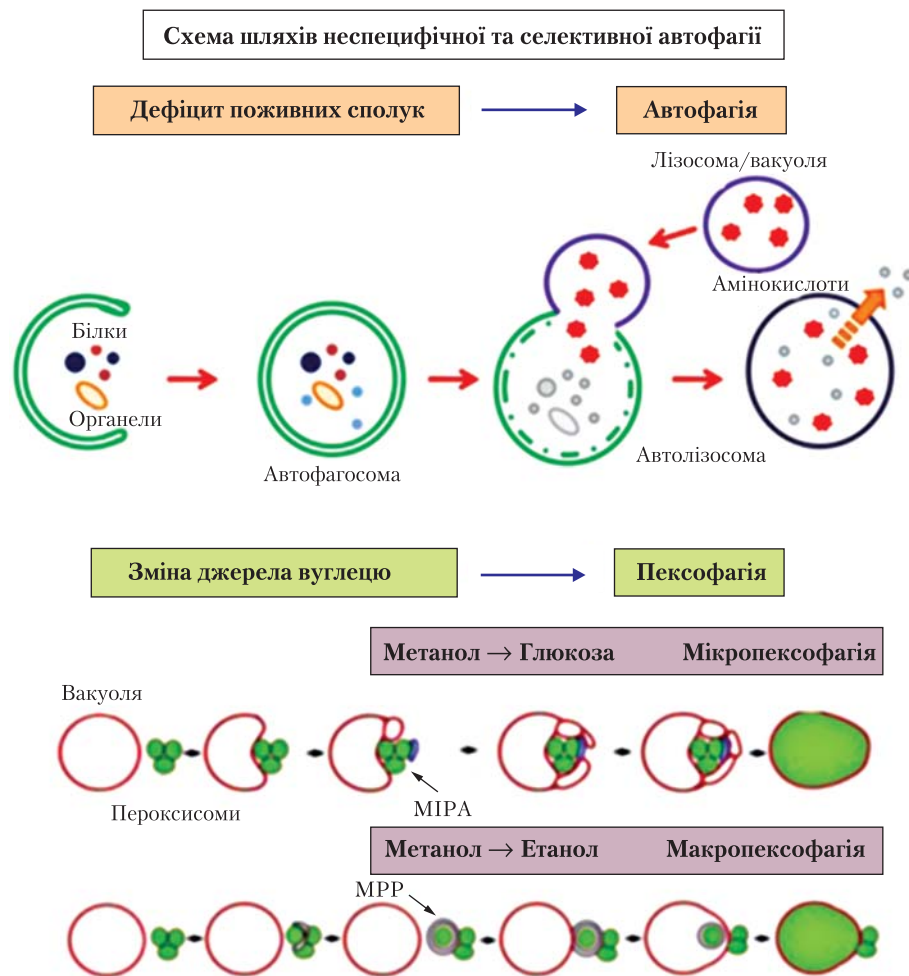
Основні етапи загальної (неспецифічної) автофагії

Як уже зазначалося, вивчення механізмів автофагії, що включає деградацію цитозольних білків та органел, є однією з «гарячих точок» сучасної клітинної біології. Читачеві можна порадити численні огляди з проблем автофагії [7, 17–23]. Автофагія є консервативним механізмом постійної неспецифічної деградації білків та органел. Схему загальної автофагії, яку також називають макроавтофагією, наведено на рисунку.

У дріжджів автофагію можна активувати шляхом голодування за азотом. Проте цей процес відбувається постійно в будь-якому середовищі, оскільки бере участь у підтриманні життєдіяльності клітини як базова клітинна функція оновлення клітинного матеріалу [21, 24]. Основні етапи та компоненти загальної (неспецифічної) автофагії у дріжджів можна подати як такі стадії [18]:

1. Сигнальні білки, необхідні для індукції автофагії: протеїнкіназа Tor1, протеїнкіназа A, Sch9, Tap42 і фосфатаза типу 2A.

2. Упаковка білка або органели, що підлягає деградації (Atg19, Atg11 і Atg8).



Схеми неспецифічної (загальної) автофагії та двох типів специфічної пексофагії (мікропексофагія і макропексофагія)

3. Утворення преавтофагосомної структури (Atg1, Atg11, Atg13, Atg17, Atg29 і Atg31).

4. Зародження везикул (Atg6, Atg9 і фосфатиділінозитол-3-кіназа).

5. Розвиток та дозрівання везикул (Atg35, Atg6, Atg7, Atg8, Atg10, Atg12, Atg14 і Atg16).

6. Рециркуляція білків (Atg1, Atg2, Atg18, Atg23 і Atg27).

7. Гомотипове злиття ізольуючої мембрани (Tlg2).

8. Доставка та гетеротипове злиття між автофагосомою і вакуолею (vSNARE та tSNARE, Ccz1, Mon1, комплекс HOPS).

9. Внутрішньовакуолярна деградація везикул (Atg15, протеїназа А і протеїназа В).

Класифікація білків, що беруть участь в автофагії (так званих Atg-білків – AuToPhaGy-related), свого часу була досить важливою роботою, адже дала змогу уніфікувати номенклатуру в цій галузі досліджень [8]. На сьогодні описано 42 Atg-білки, з яких лише 17 необхідні для усіх типів автофагії, тоді як решта – специфічні, оскільки вони або задіяні у специфічних шляхах селективної автофагії, або є видоспецифічними.

У еукаріотів регуляція росту клітини у відповідь на наявність поживних речовин та стресових чинників залежить від протеїнкінази Tor [25]. У разі росту в багатому на поживні речо-

вини середовищі комплекс, що включає Tor (TORC1), гальмує макроавтофагію, однак дозволяє відбуватися біосинтетичному Cvt шляху доставки до вакуолі резидентних ферментів. Основними ефекторами Tor є білки так званого комплексу Atg1 [26]. Він необхідний для всіх типів автофагії, а його основна частина складається з Ser/Thr протеїнкіназ Atg1 і Atg13. За умов достатнього забезпечення поживними речовинами TORC1 блокує макроавтофагію, при цьому відбувається гіперфосфорилування Atg13. У разі лімітування поживних речовин рівень фосфорилування Atg13 зменшується, що збільшує його спорідненість до Atg1. Утворений низькофосфорильований комплекс Atg1/Atg13 ініціює макроавтофагію.

Піонерська роль у дослідженні механізму дії білків Atg1 та Atg13 в ініціації автофагії належить нобелівському лауреату Й. Осумі. Зокрема, він показав, що кіназна активність Atg1 необхідна для автофагії та Cvt шляху [27]. Й. Осумі також провів функціональний аналіз гена *ATG13* і виявив функціональні домени відповідного білка, зокрема N-кінцевий NORMA домен, що відповідає за зв'язування з білком Atg9, а також C-кінцевий район, що відповідає за зв'язування з білками Atg1 та Atg17 [21]. Таким чином утворюється преавтофагосома, яку інакше називають PAS.

Наступний етап автофагії полягає в утворенні двомембранних везикул, відомих також як фагофор. Основний внесок у дослідження цього етапу автофагії також належить Й. Осумі. Встановлено, що фагофор відбирає (секвеструє) білки та органели з цитозолю. Процес розпочинається з перенесення білків та ліпідів до преавтофагосоми PAS [28]. Комплекс, що контролює цей процес, складається з Ser/Thr протеїнкінази Vps15, фосфоїнозитол-3-кінази класу III Vps34, а також білків Atg6 і Atg14 [29]. Надалі відбуваються дві реакції. У першій з них протеаза Atg4 процесує убіквітиноподібний білок Atg8 так, що він ковалентно зв'язується з фосфатидилетаноламіном за участю білків Atg3, Atg7, Atg5, Atg10, Atg12 у преавтофагосомі [30]. До того ж двоспиральний (coiled-coil) білок Atg16 нековалентно зв'язується з

кон'югатом Atg5/Atg12. Показано, що для росту везикули необхідне зв'язування фосфатидилетаноламіну з Atg8 на мембрані і утворення комплексу Atg5/Atg12/Atg16 [31]. Цей комплекс утворює тимчасову оболонку, надаючи таким чином форму мембрані фагофора. В подальшому інтегральні мембранні білки Atg9 та Atg27 і асоційований з мембраною білок Atg23 переносяться у вигляді невеликих мембранних везикул до фагофора і включаються до його складу [32]. Багато білків, що беруть участь у рості фагофора, зокрема Atg8 і комплекс Atg5/Atg12/Atg16, вивільняються з нього за участю білків Atg1, Atg2 і Atg18. Частина Atg8 залишається всередині сформованого фагофора, переноситься до вакуолі, де й деградує. Після завершення утворення автофагосом з подвійною мембраною відбувається її злиття з мембраною вакуолі. У цьому процесі беруть участь білки комплексів SNARE та HOPS [33]. Таке злиття закінчується доставкою матеріалу, що має деградувати, до матриксу вакуолі, де відбувається розщеплення за участю багатьох протеїназ: протеїнази А, протеїнази В, карбоксипептидази S, карбоксипептидази Y [34, 35].

Отже, основними учасниками процесу автофагії є Atg-білки. Водночас, як видно з наведеного матеріалу, в цьому процесі задіяні також інші білки, що беруть участь, зокрема, у шляхах секреції, ендоцитозу, а також у функціонуванні цитоскелета. Ці шляхи забезпечують автофагію мембранами, здійснюють транспорт автофагосом, а також гідроліз субстратів автофагії [36]. У тварин виявлено також спеціальний вид неспецифічної (загальної) автофагії – так звану автофагію, опосередковану шаперонами, в якій беруть участь білок-шаперон Hsc70, білки-кошаперони та зв'язаний з лізосомами мембранний білок 2A [37].

Сигнальні шляхи та регуляція загальної автофагії

Як уже зазначалося, неспецифічна автофагія відбувається постійно, але посилюється за умов голодування, що веде, зокрема, до активації утворення автофагосом. Є два сигнальні

шляхи, що розпізнають рівень забезпечення клітини поживними речовинами: TOR та Ras-cAMP-РКА.

Комплекс TOR 1 (TORC1) чутливий до інгібування антибіотиком рапаміцином. Інактивація TORC1 рапаміцином стимулює автофагію навіть за наявності достатньої кількості поживних сполук. Це відкриття також належить Йосінорі Осумі [38]. За відсутності антибіотика TOR активується амінокислотами, що веде до гальмування автофагії. У дріжджів TORC1 гальмує загальну автофагію завдяки взаємодії з комплексом Atg1/ULK, а також унаслідок фосфорилування Tap42, що приводить до активації протеїнфосфатази PP2A, яка є негативним регулятором автофагії [39]. Другий сигнальний шлях Ras-cAMP-РКА у дріжджів є гетеротетрамером, що складається з регуляторної субодиниці Vsu1 і трьох каталітичних субодиниць Trk1, Trk2, Trk3. За достатнього рівня поживних речовин утворюється значна кількість cAMP, яка зв'язується з Vsu1 і знімає інгібування РКА (протеїнкіназа А). Це, у свою чергу, веде до гальмування автофагії, індукованої за допомогою гальмування TOR у дріжджів [40]. Інгібування автофагії через Ras/РКА-шлях відбувається за посередництва білка Atg1. Цей білок локалізується в цитозолі за наявності достатньої кількості поживних речовин, тоді як за умов голодування Atg1 локалізується в автофагосомі. Крім протеїнкінази А, в контролі забезпечення клітин дріжджів поживними речовинами бере участь протеїнкіназа Sch9. Одночасна інактивація РКА і Sch9 індукує автофагію, яка додатково може зростати після інактивації TORC1 [41]. Вважають, що Ras/РКА і Sch9 регулюють автофагію на рівні транскрипції.

Крім стресу, спричиненого недостатнім рівнем забезпечення поживними речовинами, автофагію у тваринних клітинах можуть ініціювати брак інсуліну або гормонів росту, зниження клітинного вмісту АТФ, а також інші стресові чинники, зокрема стрес ендоплазматичного ретикулуму, гіпоксія, оксидативний стрес, а також інфекція патогенних чинників (вірусів або бактерій) [36].

Загальна автофагія регулюється на транскрипційному та посттранскрипційному рівнях. Зокрема, стрес, викликаний браком поживних речовин, активує транскрипцію гена автофагосомного маркера Atg8. У цей процес залучений транскрипційний фактор FoxO, який додатково активує транскрипцію цілої низки генів автофагії [42]. У дріжджів селективна трансляція транскрипційного фактора Gcn4 за допомогою фосфорилування білка ініціації трансляції eIF2 α є необхідною для автофагії. Відомо, що транскрипційний фактор Gcn4 активує транскрипцію генів, задіяних в автофагії, таких як *ATG1*, *ATG13* та *APE1* [43]. Серед посттранскрипційних чинників, що регулюють автофагію, слід відзначити ковалентну модифікацію білків, зокрема ацетилювання, фосфорилування [36].

Селективні типи автофагії

Виявлено також кілька селективних типів автофагії. Одним із них є біосинтетичний Cvt шлях доставки у вакуолю деяких резидентних ферментів. Інші шляхи є біодеградативними, як деградація пероксисом (пексофагія), мітохондрій (мітофагія), ендоплазматичного ретикулуму (ER-фагія), рибосом (рибофагія), ліпідних гранул (ліпофагія) та поетапна мікроавтофагія ядра [17, 44, 45]. В усіх цих процесах важливим етапом є розпізнавання білка чи органели, що підлягатиме деградації. Після розпізнавання білки автофагії Atg беруть участь у сортуванні маркованого матеріалу і доставці його до лізосом (вакуолей). У цьому процесі також задіяний актин цитоскелета, чого немає в процесі загальної неспецифічної макроавтофагії. Наприклад, функції та морфологія мітохондрій дріжджів змінюються залежно від умов росту. Мітофагія активується після перенесення клітин із середовища з дихальними субстратами в середовище з глюкозою в стаціонарній фазі за умов дефіциту азоту. Важливою функцією мітофагії є елімінація мітохондрій, що містять підвищені кількості реактивних форм кисню [46]. Мітофагія відбувається за участю неселективної макроавтофагії, а також

селективних процесів мікро- та макромітофагії [47]. У *S. cerevisiae* ідентифіковано кілька білків, що задіяні лише в мітофагії, зокрема рецептор Atg32 [48].

Під час автофагії частини ендоплазматичного ретикулуму можуть селективно упаковуватися в автофагосоми, переважно за наявності в ретикулумі білків, що не виявляють вторинної структури (unfolded protein response, UPR), або за умов голодування. Відповідні дані також уперше отримав Й. Осумі [49]. За певних умов ЕР-фагія залежить від актину, що вказує на селективність процесу. Тривалий час вважали, що рибосоми деградують за допомогою неспецифічної автофагії, однак за певних умов цей процес відбувається за участю селективного механізму [50]. В автофагії 60S- та 40S-рибосомних субодиниць задіяні основні Atg-білки загальної автофагії, а також специфічні білки, зокрема убіквітинова протеаза Ubr3 та її кофактор Bre3, що взаємодіють з рецептором Atg19 [51]. Автофагія ліпідних гранул (ліпофагія) має безпосереднє значення для забезпечення клітин енергією в умовах голодування за джерелом вуглецевого живлення. Раніше вважали, що основну роль у деградації ліпідних гранул відіграють цитозольні ліпази, однак тепер стає зрозумілим, що важлива роль у цьому процесі належить також автофагії. У ліпофагії у тваринних клітинах задіяні білки Atg5, Atg7 та Atg12 [45]. Для дріжджів показано роль вакуолярної ліпази Atg15 в регуляції ліпофагії [52].

Навіть ядро зазнає вакуолярної деградації. Виявлено, що голодування дріжджів веде до «відщипування» та наступної деградації у вакуолях фрагментів ядра в процесі поетапної мікроавтофагії ядра (Piecemeal Microautophagy of the Nucleus, PMN). Цей процес залежить від основних Atg-білків, залучених у загальну автофагію, а також Atg11, що вказує на селективність процесу [53]. У процесі PMN виникають ядерно-вакуолярні контакти (Nuclear-Vacuolar Junctions, NVJ) внаслідок взаємодії вакуолярного мембранного білка Vac8 і білка зовнішньої поверхні ядерної мембрани Nvj1 [54]. Голодування підвищує рівень Nvj1 і зумов-

лює його зв'язування з білками Osh1 та Tsc13. У результаті частина Nvj1 проростає у вакуолі, утворюючи пухирець, який відщипується і потрапляє безпосередньо в матрикс вакуолі, де згодом деградує.

Пексофагія

Автор цієї статті та його колеги, що працюють у галузі автофагії, найбільше заангажовані в дослідження механізмів одного з високоселективних і специфічних процесів автофагії, а саме, автофагійної деградації пероксисом, або пексофагії. Дріжджі, зокрема метилотрофні (здатні рости на середовищі з метиловим спиртом як єдиним джерелом вуглецю і енергії), є зручними модельними системами для вивчення механізмів пексофагії. Пероксисоми — це клітинні органели, присутні практично в усіх еукаріотичних клітинах. Можна дати і таке визначення: пероксисоми — це органели, що не містять ДНК, а характерними ензимами пероксисом є оксидази, які генерують перекис водню, а також каталаза, що детоксифікує перекис.

Важливими характеристиками пероксисом дріжджів є наявність ферментів β-окиснення жирних кислот та гліоксилатного шляху [55]. У метилотрофних дріжджів пероксисоми містять також деякі ферменти окиснення метанолу (алкогольоксидаза, каталаза) та асиміляції формальдегіду (дигідроксіацетонсинтаза, або пероксисомна транскетолаза), а також деякі ферменти пентозофосфатного шляху (крім транскетолази це також пероксисомна трансальдолаза і, можливо, пероксисомні ізоформи пентулозофосфатпімерази та пентозофосфатізомерази [56]). Дріжджі, особливо метилотрофні, є дуже зручними модельними системами для вивчення біогенезу та автофагійної деградації пероксисом (пексофагії). У разі росту в середовищі з глюкозою ці організми містять зазвичай одну невеличку пероксисому, яка займає не більш як 1% об'єму клітини, натомість перенесення клітин у середовище з метанолом зумовлює ріст і поділ пероксисом, так що за умов росту клітин в хемостаті на метанолі пе-

роксисоми можуть займати до 80 % об'єму клітини [57].

Перенесення клітин із середовища з метанолом до середовища з глюкозою або етанолом викликає масивну деградацію пероксисом (пексофагію), однак хоча б одна пероксисома уникає такої деградації і залишається в клітинах. У дріжджів *Komagataella (Pichia) pastoris* розрізняють два морфологічні типи пексофагії: мікропексофагію і макропексофагію [13, 18, 23, 58] (див. рис.). Отже, пексофагія є дуже селективним типом автофагії.

Під час макропексофагії, спричиненої перенесенням клітин із середовища з метанолом у середовище з етанолом, індивідуальні пероксисоми оточуються двомембранними структурами, що дає початок пексофагосомам, які надалі зливаються з вакуолями, що призводить до деградації пексофагосоми разом з усім вмістом пероксисоми. Під час мікропексофагії, що відбувається після перенесення клітин із середовища з метанолом до середовища з глюкозою, кластери пероксисом поглинаються секвеструючими мембранами разом зі специфічним апаратом мікропексофагії (Microperoxophagy Apparatus, МІРА). Цей апарат також був відкритий нобелівським лауреатом Й. Осумі [59]. Злиття вакуолярних секвеструючих мембран та МІРА доставляє пероксисоми всередину вакуолі для деградації МІРА.

Під час пексофагії утворюється специфічна преавтофагосомна структура PAS, що відрізняється від PAS інших типів автофагії. Специфічна до пексофагії PAS утворюється білками Atg11, Atg17 і Atg30 [60, 61]. Більшість етапів пексофагії є такими ж самими, як і в загальній (неспецифічній) автофагії (див. вище). Водночас виявлено кілька генів і відповідних білків, що специфічно залучені лише у пексофагію, зокрема Atg24, Atg25, Atg26, Atg28, Atg30 та Atg35. Три з перелічених шести білків були відкриті українськими вченими в лабораторії автора (Atg26, Atg28, Atg35), що є пріоритетним досягненням української клітинної біології [62–64]. Ген і білок Atg24 *P. pastoris* виявлено під час мікропексофагії в комплексі пексофагосоми з вакуолею. Цей білок містить



Лауреат Нобелівської премії професор Йосінорі Осумі (справа) та професор Андрій Сибірний під час XIV Міжнародного конгресу з дріжджів. о. Аваджі, Японія, вересень 2016 р.

фосфатидилінозитол-3-фосфат-зв'язуючий домен [65]. Дефект білка Atg24 блокує пексофагію після формування пексофагосоми, але перед злиттям з вакуолею.

Ген *ATG25 Ogataea (Hansenula) polymorpha* специфічно залучений в макропексофагію. Він кодує двоспіральний (coiled-coil) білок, що діє як селективний фактор у процесі макропексофагії [66]. Цей білок локалізований у пексофагосомах і переноситься туди через PAS. Atg25 бере участь у завершенні секвестрації пероксисом або в злитті пексофагосоми з вакуолярною мембраною [67].

Ген *ATG26* кодує фермент стерол-глюкозилтрансферазу [62, 68], що бере участь у пексофагії у *P. pastoris*, але не у алканзасвоюючих дріжджів *Yarrowia lipolytica*. Показано, що у *P. pastoris* *ATG26* необхідний для деградації лише великих пероксисом, що накопичуються в середовищі з метанолом [69, 70]. Показано, що білок *P. pastoris* Atg26 необхідний для елонгації PAS до МІРА під час мікропексофагії [71]. Висловлено гіпотезу, що у *P. pastoris* стеролглюкозида в процесі еволюції набули нової функції, пов'язаної з полегшенням елонгації дуже довгих подвійних мембран PAS, що необхідно в разі потреби деградувати величезні пероксисоми в клітинах, які росли в середовищі з метанолом [70].

Ген *P. pastoris* *ATG28* кодує специфічний для пексофагії білок, а його відсутність пошкоджує як макро-, так і мікропексофагію, водночас практично не впливаючи на загальну автофагію, що активується азотним голодуванням клітин [61, 72]. *Atg28p* містить двоспіральний (coiled-coil) домен, що може брати участь в олігомеризації і білок-білковій взаємодії. Цей мотив є функціонально важливим, оскільки його модифікація призводить до втрати функціональної активності. *Atg28* бере участь у формуванні одного або кількох білкових комплексів, специфічних для пексофагії, взаємодіючи зі специфічним білком для мікропексофагії *Atg35* [64]. *Atg28* виявляє комплексну внутрішньоклітинну локалізацію. У більшості клітин у середовищі з метанолом цей білок локалізований у цитозолі. Однак у деяких клітин він локалізований у точкових структурах невідомої природи, асоційованих з вакуолями, а також на вакуолях. У рідкісних випадках *Atg28* може бути локалізований у матриксі вакуолей.

Ще одним специфічним для пексофагії білком є *Atg30*. Його специфічність пов'язана зі взаємодією з пероксидами (білки, необхідні для біогенезу пероксисом) *Pex3* і *Pex14*, що локалізуються на пероксисомній мембрані [60, 73]. Гомеостаз пероксисом, тобто координація між процесами біогенезу та деградації цієї органели, залежить від 64 N-кінцевих амінокислот білка дріжджів *O. polymorpha* *Pex14* [74]. Напевно, контроль пексофагії відбувається за участю білкового комплексу, що включає пероксини *Pex3* і *Pex14*, рецептор *Atg30*, каркасні білки *Atg11* і *Atg17*, а також білки фагофора *Atg8* і *Atg37* [75].

Специфічний для мікропексофагії білок *Atg35 P. pastoris* виявився першим білком автофагії з ядерною локалізацією [64]. Мутанти з дефектом цього білка виявляли нормальну макропексофагію, тоді як мікропексофагія була пошкодженою. Встановлено, що *Atg35* необхідний для мікропексофагії на етапі утворення МІРА [64]. Цікаво, що надекспресія *ATG35*, а також делеція цього гена подібною мірою гальмують мікропексофагію. *Atg35* містить потен-

ційний сигнал ядерної локалізації. У клітин, що ростуть у середовищі з глюкозою, він локалізується на окремих точкових структурах ядерної мембрани. Така локалізація залежить від білків *Atg17* та *Atg28*, з якими *Atg35* взаємодіє, причому основна роль у цій потрібній взаємодії належить білку *Atg28* [64, 69].

У *P. pastoris* нами виявлено ще один новий ген, умовно позначений *PDG1* (Peroxisome DeGradation). Ген *PDG1* кодує білок з мембранною локалізацією. Делеція цього гена приводить до порушення деградації пероксисом [58] (О. Стасик, А. Сибірний, неопубліковане спостереження). У *O. polymorpha* транскрипційний репресор *Tip1* бере участь у макропексофагії [76]. Пошкодження ортологів репресорів катаболітної репресії *S. cerevisiae* *MIG1* і *MIG2* також веде до пошкодження пексофагії [77]. Водночас мутанти *O. polymorpha* з пошкодженням генів *MIG1* та *MIG2* не виявляли порушення глюкозної катаболітної репресії, що дозволяє припустити різну роль відповідних білків у пекарських та метилотрофних дріжджів.

Розпізнавання (сенсинг) і сигналізація в процесі мікро- і макропексофагії у дріжджів

Як уже зазначалося, пексофагія є високоселективним процесом. У *P. pastoris* мікропексофагія ініціюється глюкозою, а макропексофагія — етанолом, тоді як у інших видів дріжджів (*S. cerevisiae*, *O. polymorpha*) макропексофагія ініціюється глюкозою [19]. Клітини якимось чином розпізнають глюкозу та етанол і використовують цей сигнал для активування *Atg* та інших білків, потрібних специфічно для мікро- чи макропексофагії, та багатьох білків загальної автофагії. Ці механізми, особливо у метилотрофних дріжджів, вивчені мало. Було встановлено, що обидва типи сенсорів, залучених у GPCR систему (*Gpr1* та *Gpr2*), а також трансцептори (*Snf3* та *Rgt2*) необхідні для правильного функціонування індукованої глюкозою пексофагії у *S. cerevisiae*, оскільки делеція відповідних генів призводила до порушення цьо-

го процесу [78, 79]. Ортологи сенсорних білків Gpr1 та Gpr2 GPCR-системи було також виявлено у *P. pastoris*. Водночас делеції відповідних генів не мали впливу на мікропексофагію [79]. Отже, механізми розпізнавання глюкози у *S. cerevisiae* та *P. pastoris* відрізняються один від одного.

У *P. pastoris* виявлено два транспортери гексоз — Hxt1 та Hxt2. Делеція *HXT1*, але не *HXT2*, призводила до конститутивної експресії алкогольоксидази в середовищі з глюкозою, водночас деградація цього ферменту не була ушкодженою [80]. *P. pastoris* містить лише один ортолог генів сенсорів глюкози *S. cerevisiae* *SNF3* і *RGT2*, позначений як *GSS1* (Glucose Sensor) [81]. Мутантний штаб з делецією гена *GSS1* виявляв пошкодження росту на глюкозі та глюкозну катаболітну репресію. Виявилось також, що клітини мутанта *gss1Δ* виявляли пошкодження пексофагії в середовищі з глюкозою, натомість макропексофагія в середовищі з етанолом не була пошкодженою. Зроблено висновок, що *Gss1* задіяний у механізмі мікропексофагії у *P. pastoris* [81].

Подібно до сенсорів *S. cerevisiae* *Snf3* та *Rgt2*, сенсор *Gss1* містить 12 трансмембранних доменів, а також довгу (200 амінокислотних залишків) С-кінцеву цитозольну послідовність. Делеція 150 залишків цієї послідовності у *Gss1* зберігає сигнальні функції *Gss1* білка. Висловлено припущення, що С-кінцева цитозольна послідовність сенсора *Gss1* відіграє іншу роль, ніж у гомологічних білках інших видів дріжджів [82].

У *O. polymorpha* виявлено два сенсори гексоз — *Gcr1* та *Hxs1* [63, 83]. Делеція відповідних генів лише сповільнювала, але не зупиняла повністю пексофагію, викликану глюкозою. Водночас, як вказувалося вище, пексофагія у цього виду дріжджів була повністю відсутньою у мутантів з делецією генів *MIG1* і *MIG2* [77].

Поки що невідомо, який конкретно метаболіт є сигнальною молекулою при ініціації пексофагії в середовищі з глюкозою. Це може бути сама глюкоза або ж її метаболіт. Спостереження, що ензиматично неактивна фосфофруктокіназа відновлює мікропексофагію без віднов-

лення росту *P. pastoris* на глюкозі, свідчить, що такий метаболіт має бути на шляху катаболізму глюкози перед утворенням фруктозо-1,6-бісфосфату [58, 84].

Наші знання про сигналізацію під час викликані глюкозою пексофагії у дріжджів є дуже обмеженими. Встановлено, що мітоген-активована протеїнкіназа *Slt2* (*Mpk1*) необхідна для пексофагії, але не для загальної неспецифічної автофагії у *P. pastoris*. Також показано, що для пексофагії потрібні деякі інші компоненти глюкозного сигнального шляху (*Pkc1*, *Vkc1*, *Mkk1*, *Mkk2*) [18].

Етанол ініціює пексофагію лише у метилотрофних дріжджів. Однак ми взагалі нічого не знаємо про розпізнавання етанолу в інших видів дріжджів. Відомо однак, що етанол сильно і специфічно індукуює деякі білки у *S. cerevisiae*, наприклад, глюкокіназа індукується етанолом у 25 разів [85]. У *S. cerevisiae* етанол репресує *PDC1*, що кодує піруватдекарбоксілазу, за участю специфічної регуляторної послідовності ERA [86], а у *Kluyveromyces lactis* етанол специфічно репресує *ADH3*, що кодує мітохондріальну алкогольдегідрогеназу [87]. У метилотрофних дріжджів етанол, крім пексофагії, специфічно репресує синтез ферментів метаболізму метанолу [88]. Невідомо, чи існує певний специфічний етанольний сенсор на цитоплазматичній мембрані. Не виключено, що сенсором етанолу може бути якийсь внутрішньоклітинний білок, у тому числі й фермент метаболізму цього спирту. У метилотрофних дріжджів *Pichia methanolica* (*Pichia pinus* МН4) відомі мутанти з пошкодженням репресії етанолом синтезу ферментів метилотрофного метаболізму [89, 90]. У мутанта *adh1* етанол і метанол утилізуються одночасно внаслідок утворення гібридних пероксисом, що містять ферменти метаболізму обох спиртів. Водночас клітини *ecr1* мутантів на суміші обох спиртів спочатку утилізують метанол, а етанол утилізується після використання метанолу. Не виключено, що ген *ECR1* кодує білок-сенсор етанолу. Ізольовано мутанти з пошкодженням окремих етапів катаболізму етанолу [88, 91]. Показано, що пексофагія в середовищі з ета-

нолом пошкоджена у мутантів *icl1* з дефектом ізоцитратліази, що може свідчити про роль ізоцитрату в ініціації пексофагії в середовищі з етанолом. Можна сподіватися, що дослідження в галузі сигнальних механізмів пексофагії триватимуть, і в найближчому майбутньому ми дізнаємося про механізми розпізнавання та сигналізації пексофагії, викликаної глюкозою та етанолом.

Можливі використання явища автофагії в медицині та біотехнології

Як уже зазначалося, автофагія є універсальним механізмом рециклізації конструктивних матеріалів клітини. Тому очевидно, що порушення цього процесу може призводити до різних патологічних станів у людини. Встановлено, що автофагія захищає організм від різних патологій, таких як інфекції, рак, нейродегенеративні захворювання, серцево-судинні хвороби, та передчасного старіння [18, 92]. Однак за деяких патологій автофагія може бути смертельно небезпечною. Є ціла низка захворювань людини в результаті мутацій у генах *Atg*, що залучені в автофагію, зокрема синдром Вісі, спастичний парепарез, пошкодження лізосомних функцій та ін. [92]. Вважається, що порушена автофагія — одна з причин синдромів Паркінсона, Альцгеймера та Хантінгтона [93–95]. Автофагія відіграє важливу роль у контролі виникнення та розвитку злоякісних пухлин. Зокрема, ген *ATG6 (BECN1)* діє як супресор розвитку деяких пухлин [96]. Водночас розвиток дея-

ких пухлин залежить від ефективної автофагії, тому її пошкодження може мати позитивний вплив на перебіг хвороби. Зокрема, дефект гена *ATG7* приводив до послаблення розвитку карцином легенів на моделі мишей [97].

Поки що ми маємо мало даних про можливе біотехнологічне значення автофагії. Відомо однак, що автофагія важлива для ефективності другої алкогольної ферментації дріжджів при виробництві шампанських вин [98]. Пошкодження автофагії бензойною кислотою може бути однією з причин гальмування цією сполукою росту дріжджів, що псують харчові продукти [99]. Показано, що делеція або дизрупція гена *O. polymorpha ATG13*, який бере участь в ініціації загальної автофагії та пексофагії, приводить до активації алкогольної ферментації пентодного цукру ксилози, не впливаючи на ферментацію глюкози [100]. Можна припустити, що білок *Atg13* якимось чином залучений, крім автофагії, також у регуляцію алкогольної ферментації ксилози, принаймні у *O. polymorpha*. Механізм цього важливого для біотехнології феномену поки що незрозумілий.

Отже, нові знання в галузі автофагії, закладені нобелівським лауреатом у галузі фізіології і медицини 2016 р. Йосінорі Осумі та розвинуті іншими авторами, в тому числі й українськими вченими, дозволяють сподіватися на їх ефективне використання для лікування деяких захворювань, а також у біотехнології для підвищення продуктивності дріжджів, цвілевих грибів та рослин.

REFERENCES

1. Ciechanover A. Proteolysis: from the lysosome to ubiquitin and the proteasome. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2005. **6** (1): 79.
2. Chen D., Frezza M., Schmitt S., Kanwar J., Dou Q.P. Bortezomib as the first proteasome inhibitor anticancer drug: current status and future perspectives. *Curr. Cancer Drug Targets.* 2011. **11** (3): 239.
3. Accardi F., Toscani D., Bolzoni M., Dalla Palma B., Aversa F., Giuliani N. Mechanism of Action of Bortezomib and the New Proteasome Inhibitors on Myeloma Cells and the Bone Microenvironment: Impact on Myeloma-Induced Alterations of Bone Remodeling. *Biomed. Res. Int.* 2015. **2015**:172458.
4. Tsukada M., Ohsumi Y. Isolation and characterization of autophagy-defective mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett.* 1993. **333** (1–2): 169.
5. Thumm M., Egner R., Koch B., Schlumpberger M., Straub M., Veenhuis M., Wolf D.H. Isolation of autophagocytosis mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett.* 1994. **349** (2): 275.

6. Titorenko V.I., Keizer I., Harder W., Veenhuis M. Isolation and characterization of mutants impaired in the selective degradation of peroxisomes in the yeast *Hansenula polymorpha*. *J. Bacteriol.* 1995. **177** (2): 357.
7. Kulachkovsky A.R., Moroz O.M., Sibirny A.A. Impairment of peroxisome degradation in *Pichia methanolica* mutants defective in acetyl-CoA synthetase or isocitrate lyase. *Yeast.* 1997. **13** (11): 1043.
8. Klionsky D.J., Cregg J.M., Dunn W.A. Jr., Emr S.D., Sakai Y., Sandoval I.V., Sibirny A., Subramani S., Thumm M., Veenhuis M., Ohsumi Y. A unified nomenclature for yeast autophagy-related genes. *Dev. Cell.* 2003. **5** (4): 539.
9. Klionsky D.J., Cueva R., Yaver D.S. Aminopeptidase I of *Saccharomyces cerevisiae* is localized to the vacuole independent of the secretory pathway. *J. Cell Biol.* 1992. **119** (2): 287.
10. Takeshige K., Baba M., Tsuboi S., Noda T., Ohsumi Y. Autophagy in yeast demonstrated with proteinase-deficient mutants and conditions for its induction. *J. Cell Biol.* 1992. **119** (2): 301.
11. Qu X., Zou Z., Sun Q., Luby-Phelps K., Cheng P., Hogan R.N., Gilpin C., Levine B. Autophagy gene-dependent clearance of apoptotic cells during embryonic development. *Cell.* 2007. **128** (5): 931.
12. Mathew R., Karantza-Wadsworth V., White E. Role of autophagy in cancer. *Nat. Rev. Cancer.* 2007. **7** (12): 961.
13. Sibirny A.A. Mechanisms of autophagy and pexophagy in yeasts. *Biochemistry.* 2011. **76**: 1279.
14. Bassham D.C., Laporte M., Marty F., Moriyasu Y., Ohsumi Y., Olsen L.J., Yoshimoto K. Autophagy in development and stress responses of plants. *Autophagy.* 2006. **2** (1): 2.
15. Kang C., You Y.J., Avery L. Dual roles of autophagy in the survival of *Caenorhabditis elegans* during starvation. *Genes Dev.* 2007. **21** (17): 2161.
16. Levine B., Kroemer G. Autophagy in the pathogenesis of disease. *Cell.* 2008. **132** (1): 27.
17. Kiel J.A. Autophagy in unicellular eukaryotes. *Philos. Trans. R. Soc. B.* 2010. **365**: 819.
18. Manjithaya R., Nazarko T.Y., Farre J.C., Subramani S. Molecular mechanism and physiological role of pexophagy. *FEBS Lett.* 2010. **584** (7): 1367.
19. Sibirny A.A. Pexophagy sensing and signaling in the methylotrophic yeasts. In: Brocard C., Hartig A. (eds). *Molecular Machines Involved in Peroxisome Biogenesis and Maintenance*. (Berlin: Springer, 2014). P. 507–527.
20. Till A., Lakhani R., Burnett S.F., Subramani S. Pexophagy: the selective degradation of peroxisomes. *Int. J. Cell Biol.* 2012. **2012**: 1.
21. Suzuki K., Akioka M., Kondo-Kakuta C., Yamamoto H., Ohsumi Y. Fine mapping of autophagy-related proteins during autophagosome formation in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Cell Sci.* 2013. **126** (11): 2534.
22. Suzuki K., Nakamura S., Morimoto M., Fujii K., Noda N.N., Inagaki F., Ohsumi Y. Proteomic profiling of autophagosome cargo in *Saccharomyces cerevisiae*. *PLoS One.* 2014. **9** (3): e91651.
23. Oku M., Sakai Y. Pexophagy in yeasts. *Biochim. Biophys. Acta.* 2016. **1863** (5): 992.
24. Aksam E.B., Koek A., Kiel J.A., Jourdan S., Veenhuis M., van der Klei I.J. A peroxisomal lon protease and peroxisome degradation by autophagy play key roles in vitality of *Hansenula polymorpha* cells. *Autophagy.* 2007. **3** (2): 96.
25. Schmelzle T., Hall M.N. TOR, a central controller of cell growth. *Cell.* 2000. **103** (2): 253.
26. Cebollero E., Reggiori F. Regulation of autophagy in yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim. Biophys. Acta.* 2009. **1793** (9): 1413.
27. Kabeya Y., Kamada Y., Baba M., Takikawa H., Sasaki M., Ohsumi Y. Atg17 functions in cooperation with Atg1 and Atg13 in yeast autophagy. *Mol. Biol. Cell.* 2005. **16** (5): 2544.
28. Suzuki K., Kamada Y., Ohsumi Y. Studies of cargo delivery to the vacuole mediated by autophagosomes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Dev. Cell.* 2002. **3** (6): 815.
29. Kihara A., Noda T., Ishihara N., Ohsumi Y. Two distinct Vps34 phosphatidylinositol 3-kinase complexes function in autophagy and carboxypeptidase Y sorting in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Cell Biol.* 2001. **152** (3): 519.
30. Ohsumi Y. Molecular dissection of autophagy: two ubiquitin-like systems. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2001. **2** (3): 211.
31. Hanada T., Noda N.N., Satomi Y., Ichimura Y., Fujioka Y., Takao T., Inagaki F., Ohsumi Y. The Atg12-Atg5 conjugate has a novel E3-like activity for protein lipidation in autophagy. *J. Biol. Chem.* 2007. **282** (52): 37298.
32. Reggiori F., Tucker K.A., Stromhaug P.E., Klionsky D.J. The Atg1-Atg13 complex regulates Atg9 and Atg23 retrieval transport from the pre-autophagosomal structure. *Dev. Cell.* 2004. **6** (1): 79.
33. Wickner W. Membrane fusion: five lipids, four SNAREs, three chaperones, two nucleotides, and a Rab, all dancing in a ring on yeast vacuoles. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 2010. **26**: 115.
34. Epple U.D., Eskelinen E.L., Thumm M. Intravacuolar membrane lysis in *Saccharomyces cerevisiae*. Does vacuolar targeting of Cvt17/Aut5p affect its function? *J. Biol. Chem.* 2003. **278** (10): 7810.
35. Polupanov A.S., Nazarko V.Y., Sibirny A.A. *CCZ1*, *MON1* and *YPT7* genes are involved in pexophagy, the Cvt pathway and non-specific macroautophagy in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Cell Biol. Int.* 2011. **35**: 311.
36. He C., Klionsky D.J. Regulation mechanisms and signaling pathways of autophagy. *Annu. Rev. Genet.* 2009. **43**: 67.

37. Kaushik S., Cuervo A.M. Chaperone-mediated autophagy: a unique way to enter the lysosome world. *Trends Cell Biol.* 2012. **22** (8): 407.
38. Noda T., Ohsumi Y. Tor, a phosphatidylinositol kinase homologue, controls autophagy in yeast. *J. Biol. Chem.* 1998. **273** (7): 3963.
39. Yorimitsu T., He C., Wang K., Klionsky D.J. Tap42-associated protein phosphatase type 2A negatively regulates induction of autophagy. *Autophagy.* 2009. **5** (5): 616.
40. Schmelzle T., Beck T., Martin D.E., Hall M.N. Activation of the RAS/cyclic AMP pathway suppresses a TOR deficiency in yeast. *Mol. Cell Biol.* 2004. **24** (1): 338.
41. Yorimitsu T., Zaman S., Broach J.R., Klionsky D.J. Protein kinase A and Sch9 cooperatively regulate induction of autophagy in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Biol. Cell.* 2007. **18** (10): 4180.
42. Mammucari C., Milan G., Romanello V., Masiero E., Rudolf R., Del Piccolo P., Burden S.J., Di Lisi R., Sandri C., Zhao J., Goldberg A.L., Schiaffino S., Sandri M. FoxO3 controls autophagy in skeletal muscle in vivo. *Cell Metab.* 2007. **6** (6): 458.
43. Natarajan K., Meyer M.R., Jackson B.M., Slade D., Roberts C., Hinnebusch A.G., Marton M.J. Transcriptional profiling shows that Gcn4p is a master regulator of gene expression during amino acid starvation in yeast. *Mol. Cell Biol.* 2001. **21** (13): 4347.
44. Kraft C., Reggiori F., Peter M. Selective types of autophagy in yeast. *Biochim. Biophys. Acta.* 2009. **1793** (9): 1404.
45. Singh R., Cuervo A.M. Lipophagy: connecting autophagy and lipid metabolism. *Int. J. Cell Biol.* 2012. **2012**: 282041.
46. Rambold A.S., Lippincott-Schwartz J. Mechanisms of mitochondria and autophagy crosstalk. *Cell Cycle.* 2011. **10** (23): 4032.
47. Tolkovsky A.M. Mitophagy. *Biochim. Biophys. Acta.* 2009. **1793** (9): 1508.
48. Kanki T., Klionsky D.J. Atg32 is a tag for mitochondria degradation in yeast. *Autophagy.* 2009. **5** (8): 1201.
49. Hamasaki M., Noda T., Baba M., Ohsumi Y. Starvation triggers the delivery of the endoplasmic reticulum to the vacuole via autophagy in yeast. *Traffic.* 2005. **6** (1): 56.
50. 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** (5): 602.
51. Baxter B.K., Abeliovich H., Zhang X., Stirling A.G., Burlingame A.L., Goldfarb D.S. Atg19p ubiquitination and the cytoplasm to vacuole trafficking pathway in yeast. *J. Biol. Chem.* 2005. **280** (47): 39067.
52. Maeda Y., Oku M., Sakai Y. A defect of the vacuolar putative lipase Atg15 accelerates degradation of lipid droplets through lipolysis. *Autophagy.* 2015. **11** (8): 1247.
53. Krick R., Muehe Y., Prick T., Bremer S., Schlotterhose P., Eskelinen E.L., Millen J., Goldfarb D., Thumm M. Piece-meal microautophagy of the nucleus requires the core macroautophagy genes. *Mol. Biol. Cell.* 2008. **19** (10): 4492.
54. Roberts P., Moshitch-Moshkovitz S., Kvam E., O'Toole E., Winey M., Goldfarb D.S. Piece-meal microautophagy of nucleus in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Biol. Cell.* 2003. **14** (1): 129.
55. Sibirny A.A. Yeast peroxisomes: structure, functions and biotechnological opportunities. *FEMS Yeast Res.* 2016. **16** (4): fow038.
56. Russmayer H. et al. Systems-level organization of yeast methylotrophic lifestyle. *BMC Biol.* 2015. **13**: 80.
57. Veenhuis M., Van Dijken J.P., Harder W. The significance of peroxisomes in the metabolism of one-carbon compounds in yeasts. *Adv. Microb. Physiol.* 1983. **24**: 1.
58. Dunn W.A. Jr., Cregg J.M., Kiel J.A., van der Klei I.J., Oku M., Sakai Y., Sibirny A.A., Stasyk O.V., Veenhuis M. Pexophagy: the selective autophagy of peroxisomes. *Autophagy.* 2005. **1** (2): 75.
59. Mukaiyama H., Baba M., Osumi M., Aoyagi S., Kato N., Ohsumi Y., Sakai Y. Modification of a ubiquitin-like protein Paz2 conducted micropexophagy through formation of a novel membrane structure. *Mol. Biol. Cell.* 2004. **15** (1): 58.
60. Farre J.C., Manjithaya R., Mathewson R.D., Subramani S. PpAtg30 tags peroxisomes for turnover by selective autophagy. *Dev. Cell.* 2008. **14** (3): 365.
61. Nazarko T.Y., Farre J.C., Subramani S. Peroxisome size provides insights into the function of autophagy-related proteins. *Mol. Biol. Cell.* 2009. **20** (17): 3828.
62. Stasyk O.V., Nazarko T.Y., Stasyk O.G., Krasovska O.S., Warnecke D., Nicaud J.M., Cregg J.M., Sibirny A.A. Sterol glucosyltransferases have different functional roles in *Pichia pastoris* and *Yarrowia lipolytica*. *Cell Biol. Int.* 2003. **27** (11): 947.
63. Stasyk O.G., Maidan M.M., Stasyk O.V., Van Dijck P., Thevelein J.M., Sibirny A.A. Identification of hexose transporter-like sensor HXS1 and functional hexose transporter HXT1 in the methylotrophic yeast *Hansenula polymorpha*. *Eukaryot. Cell.* 2008. **7**(4): 735.

64. Nazarko V.Y., Nazarko T.Y., Farre J.C., Stasyk O.V., Warnecke D., Ulaszewski S., Cregg J.M., Sibirny A.A., Subramani S. Atg35, a micropexophagy-specific protein that regulates micropexophagic apparatus formation in *Pichia pastoris*. *Autophagy*. 2011. **7** (4): 375.
65. Ano Y., Hattori T., Oku M., Mukaiyama H., Baba M., Ohsumi Y., Kato N., Sakai Y. A sorting nexin PpAtg24 regulates vacuolar membrane dynamics during pexophagy via binding to phosphatidylinositol-3-phosphate. *Mol. Biol. Cell*. 2005. **16** (2): 446.
66. Monastyrska I., Kiel J.A., Krikken A.M., Komduur J.A., Veenhuis M., van der Klei I.J. The *Hansenula polymorpha* ATG25 gene encodes a novel coiled-coil protein that is required for macropexophagy. *Autophagy*. 2005. **1** (2): 92.
67. Sakai Y., Oku M., van der Klei I.J., Kiel J.A. Pexophagy: autophagic degradation of peroxisomes. *Biochim. Biophys. Acta*. 2006. **1763** (12): 1767.
68. Oku M., Warnecke D., Noda T., Müller F., Heinz E., Mukaiyama H., Kato N., Sakai Y. Peroxisome degradation requires catalytically active sterol glucosyltransferase with a GRAM domain. *EMBO J*. 2003. **22** (13): 3231.
69. Nazarko T.Y., Farre J.C., Polupanov A.S., Sibirny A.A., Subramani S. Autophagy-related pathways and specific role of sterol glucoside in yeasts. *Autophagy*. 2007. **3** (3): 263.
70. Nazarko T.Y., Polupanov A.S., Manjithaya R.R., Subramani S., Sibirny A.A. The requirement of sterol glucoside for pexophagy in yeast is dependent of the species and nature of peroxisome inducers. *Mol. Biol. Cell*. 2007. **18** (1): 106.
71. Yamashita S., Oku M., Wasada Y., Ano Y., Sakai Y. PI4P-signaling pathway for the synthesis of a nascent membrane structure in selective autophagy. *J. Cell Biol*. 2006. **173** (5): 709.
72. Stasyk O.V., Stasyk O.G., Mathewson R.D., Farre J.C., Nazarko V.Y., Krasovska O.S., Subramani S., Cregg J.M., Sibirny A.A. Atg28, a novel coiled-coil protein involved in autophagic degradation of peroxisomes in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Autophagy*. 2006. **2** (1): 30.
73. Burnett S.F., Farre J.C., Nazarko T.Y., Subramani S. Peroxisomal Pex3 activates selective autophagy of peroxisomes via interaction with the pexophagy receptor Atg30. *J. Biol. Chem*. 2015. **290** (13): 8623.
74. van Zutphen T., Veenhuis M., van der Klei I.J. Pex14 is the sole component of the peroxisomal translocon that is required for pexophagy. *Autophagy*. 2008. **4** (1): 63.
75. Nazarko T.Y. Atg37 regulates the assembly of the pexophagic receptor protein complex. *Autophagy*. 2014. **10** (7): 1348.
76. Leao-Helder A.N., Krikken A.M., van der Klei I.J., Kiel J.A., Veenhuis M. Transcriptional down-regulation of peroxisome numbers affects selective peroxisome degradation in *Hansenula polymorpha*. *J. Biol. Chem*. 2003. **278** (42): 40749.
77. Stasyk O.G., van Zutphen T., Ah Kang H., Stasyk O.V., Veenhuis M., Sibirny A.A. The role of *Hansenula polymorpha* MIG1 homologues in catabolite repression and pexophagy. *FEMS Yeast Res*. 2007. **7** (7): 1103.
78. Nazarko V.Y., Futej K.O., Thevelein J.M., Sibirny A.A. Differences in glucose sensing and signaling for pexophagy between the baker's yeast *Saccharomyces cerevisiae* and the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Autophagy*. 2008. **4** (3): 381.
79. Nazarko V.Y., Thevelein J.M., Sibirny A.A. G-protein-coupled receptor Gpr1 and G-protein Gpa2 of cAMP-dependent signaling pathway are involved in glucose-induced pexophagy in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Cell Biol. Int*. 2008. **32** (5): 502.
80. Zhang P., Zhang W., Zhou X., Bai P., Cregg J.M., Zhang Y. Catabolite repression of Aox in *Pichia pastoris* is dependent on hexose transporter PpHxt1 and pexophagy. *Appl. Environ. Microbiol*. 2010. **76** (18): 6108.
81. Polupanov A.S., Nazarko V.Y., Sibirny A.A. Gss1 protein of the methylotrophic yeast *Pichia pastoris* is involved in glucose sensing, pexophagy and catabolite repression. *Int. J. Biochem. Cell Biol*. 2012. **44** (11): 1906.
82. Polupanov A.S., Sibirny A.A. Cytoplasmic extension peptide of *Pichia pastoris* glucose sensor Gss1 is not compulsory for glucose signalling. *Cell Biol. Int*. 2014. **38** (2): 172.
83. Stasyk O.V., Stasyk O.G., Komduur J., Veenhuis M., Cregg J.M., Sibirny A.A. A hexose transporter homologue controls glucose repression in the methylotrophic yeast *Hansenula polymorpha*. *J. Biol. Chem*. 2004. **279** (9): 8116.
84. Yuan W., Tuttle D.L., Shi Y.J., Ralph G.S., Dunn W.A. Jr. Glucose-induced microautophagy in *Pichia pastoris* requires the alpha-subunit of phosphofructokinase. *J. Cell Sci*. 1997. **110** (16): 1935.
85. Herrero P., Flores L., de la Cera T., Moreno F. Functional characterization of transcriptional regulatory elements in the upstream region of the yeast GLK1 gene. *Biochem. J*. 1999. **343** (2): 319.
86. Liesen T., Hollenberg C.P., Heinisch J.J. ERA, a novel cis-acting element required for autoregulation and ethanol repression of *PDC1* transcription in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Microbiol*. 1996. **21** (3): 621.
87. Saliola M., Getuli C., Mazzoni C., Fantozzi I., Falcone C. A new regulatory element mediates ethanol repression of *KIADH3*, a *Kluyveromyces lactis* gene coding for a mitochondrial alcohol dehydrogenase. *FEMS Yeast Res*. 2007. **7** (5): 693.

88. Tolstorukov I.I., Efremov B.D., Benevolensky S.V., Titorenko V.I., Sibirny A.A. Mutants of methylotrophic yeast *Pichia pinus* defective in C₂ metabolism. *Yeast*. 1989. **5**(3): 179.
89. Sibirny A.A., Titorenko V.I., Efremov B.D., Tolstorukov I.I. Multiplicity of mechanisms of carbon catabolite repression involved in the synthesis of alcohol oxidase in the methylotrophic yeast *Pichia pinus*. *Yeast*. 1987. **3**(4): 233.
90. Sibirny A.A., Titorenko V.I., Teslyar G.E., Petrushko V.I., Kucher M.M. Methanol and ethanol utilization in methylotrophic yeast *Pichia pinus* wild-type and mutant strains. *Arch. Microbiol.* 1991. **156**(6): 455.
91. Sibirny A.A. Genetic control of methanol and ethanol metabolism in the yeast *Pichia pinus*. In: Proc. 6th Int. Symp. on Genetics of Industrial Microorganisms. (Strasbourg: Soc. Franc. Microbiol., 1990). V. I. P. 545–554.
92. Jiang P., Mizushima N. Autophagy and human diseases. *Cell Res.* 2014. **24**(1): 69.
93. Lynch-Day M.A., Mao K., Wang K., Zhao M., Klionsky D.J. The role of autophagy in Parkinson's disease. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 2012. **2**(4): a009357.
94. Wolfe D.M., Lee J.H., Kumar A., Lee S., Orenstein S.J., Nixon R.A. Autophagy failure in Alzheimer's disease and the role of defective lysosomal acidification. *Eur. J. Neurosci.* 2013. **37**(12): 1949.
95. Cortes C.J., La Spada A.R. The many faces of autophagy dysfunction in Huntington's disease: from mechanism to therapy. *Drug Discov. Today*. 2014. **19**(7): 963.
96. White E. The role for autophagy in cancer. *J. Clin. Invest.* 2015. **125**(1): 42.
97. Gasparre G., Romeo G., Rugolo M., Porcelli A.M. Learning from oncocytic tumors: why choose inefficient mitochondria? *Biochim. Biophys. Acta.* 2011. **1807**(6): 633.
98. Cebollero E., Gonzalez R. Autophagy: from basic research to its application in food biotechnology. *Biotechnol Adv.* 2007. **25**(4): 396.
99. Abeliovich H., Gonzalez R. Autophagy in food biotechnology. *Autophagy*. 2009. **5**(7): 925.
100. Kurylenko O., Semkiv M., Ruchala J., Hryniv O., Kshanovska B., Abbas C., Dmytruk K., Sibirny A. New approaches for improving the production of the 1st and 2nd generation ethanol by yeast. *Acta Biochim. Pol.* 2016. **63**: 31.

Стаття надійшла 18.11.2016.

A.A. Sibirny

Institute of Cell Biology of National Academy of Sciences of Ukraine (Lviv)

MECHANISMS OF AUTOPHAGY OR SELF-EATING, PERMANENT
DEGRADATION OF CELL MATERIAL THAT IS INDISPENSABLE TO LIFE

Nobel Prize in Physiology and Medicine for 2016

Nobel prize in physiology and medicine in 2016 was awarded to the Honorary Professor of Tokyo Institute of Technology Yoshinori Ohsumi for discovery of the mechanisms of autophagy. He elucidated the main steps of this process and identified genes involved in these particulate steps. The environmental stimuli which regulate autophagy were identified. In addition to general (non-specific) autophagy, selective processes involved in degradation of endoplasmic reticulum, ribosomes and some organelles (mitochondria, peroxisomes, lipid droplets, nuclei) have been found. The laboratory of the author of present review discovered several genes involved in autophagic peroxisome degradation (pexophagy). The review also describes potential utilization of autophagy in medicine and biotechnology.

Keywords: autophagy, pexophagy, Atg proteins, non-specific (general) and selective types of autophagy, Nobel prize, Y. Ohsumi.