

ARTÍCULO - Tesis Premiadas Convocatoria de Premios RADE 2025

AUTOFAGIA A ESCALA MOLECULAR: EN UNA CÉLULA LIMPIA, TODO FUNCIONA MEJOR

Autophagy at the molecular scale: in a clean cell, everything works better

Juan Ignacio Jiménez-Loygorri*

Tumour Biology Programme, Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas (CNIO), Madrid, España
jjimenezl@cnio.es

RESUMEN

La autofagia es un proceso catabólico conservado en eucariotas y descrito por primera vez por Christian de Duve en 1967, responsable de la degradación lisosomal y el reciclaje de componentes celulares dañados o superfluos. En las últimas décadas se han identificado múltiples vías de autofagia, incluyendo macroautofagia, autofagia mediada por chaperonas (CMA) y microautofagia, que difieren en la forma en la que el material es transportado al lisosoma. La macroautofagia, la más estudiada, implica la formación de autofagosomas de doble membrana regulados por proteínas ATG y redes de señalización como mTORC1 y AMPK. Formas selectivas como la mitofagia permiten la eliminación específica de orgánulos dañados, contribuyendo a la homeostasis celular y la adaptación metabólica. La CMA facilita la degradación selectiva de proteínas mediante motivos KFERQ-like y el receptor lisosomal LAMP-2A, mientras que la microautofagia permite la captación directa de sustratos por el lisosoma o endosomas. La disfunción de la autofagia es un *hallmark* o rasgo distintivo del envejecimiento y se asocia con pérdida de proteostasis y desequilibrios metabólicos. Por el contrario, su activación se ha relacionado con una mayor longevidad y menor incidencia de enfermedades asociadas a la edad, posicionándola como una prometedora diana terapéutica.

PALABRAS CLAVE: Autofagia; Mitofagia; Lisosoma; Homeostasis celular; Envejecimiento; Proteostasis.

ABSTRACT

Autophagy is a conserved catabolic process in eukaryotes first described by Christian de Duve in 1967, responsible for the lysosomal degradation and recycling of damaged or superfluous cellular components. Over the past decades, multiple autophagy pathways have been identified, including macroautophagy, chaperone-mediated autophagy (CMA), and microautophagy, which differ in how cargo is delivered to lysosomes. Macroautophagy, the best-characterized pathway, involves the formation of double-membrane autophagosomes regulated by ATG proteins and signalling hubs such as mTORC1 and AMPK. Selective forms of autophagy, including mitophagy, ensure the targeted removal of dysfunctional organelles, contributing to cellular homeostasis and metabolic adaptation. CMA enables selective protein degradation via KFERQ-like motifs and the lysosomal receptor LAMP-2A, while microautophagy allows direct cargo uptake by endosomal or lysosomal membranes. Dysregulation of autophagy is a hallmark of aging and is associated with impaired proteostasis and metabolic imbalance. Conversely, enhancing autophagy has been shown to extend lifespan and reduce age-related pathologies in model organisms. Thus, understanding the molecular mechanisms regulating autophagy is essential for developing therapeutic strategies to promote healthy aging.

KEYWORDS: Autophagy; Mitophagy; Lysosome; Cellular homeostasis; Aging; Proteostasis.

* El autor fue galardonado con el Premio Ciencias de la Vida y de la Salud en la Convocatoria de Premios a la Investigación RADE 2025 a la mejor tesis doctoral por su tesis *La autofagia selectiva mantiene la homeostasis de la retina durante el envejecimiento fisiológico y la degeneración macular asociada a la edad*.

En 1967, Christian de Duve acuñó el término autofagia, derivado del griego αὐτόφαγος (αὐτό- “uno mismo” -φαγος “comer”), tras observar mediante microscopía electrónica de transmisión vesículas de membrana simple o doble con contenido citoplasmático dentro de las células (Eskelinen *et al.*, 2011). Cincuenta años después, se han descrito decenas de subtipos y vías de autofagia que convergen en la degradación catabólica dentro de los lisosomas de componentes celulares dañados o superfluos para generar macromoléculas que puedan ser reutilizadas: aminoácidos, carbohidratos, lípidos y nucleótidos (Settembre & Perera, 2023). Atendiendo a la manera en la que el material a degradar (carga) entra al lisosoma, se pueden definir los siguientes tres tipos de autofagia: macroautofagia, autofagia mediada por chaperonas (CMA) y microautofagia (MI).

1. MACROAUTOFAGIA

La macroautofagia, a partir de ahora referida como “autofagia”, es un mecanismo eucariota conservado a lo largo de la evolución que se encarga de la degradación de componentes intracelulares de diversos tamaños: proteínas, membranas u orgánulos enteros (Nakatogawa, 2020). Se caracteriza por el aislamiento del cargo a degradar dentro de una vesícula de doble membrana llamada autofagosoma, que eventualmente se fusionara con el lisosoma donde distintas hidrolasas ácidas se encargarán de descomponer el cargo y devolver los productos de degradación al citosol. Los distintas fases de la formación del fagóforo, autofagosoma y su degradación se habían establecido tras ser observadas por microscopía electrónica (Eskelinen *et al.*, 2011), pero fue el descubrimiento de la familia de proteínas ATG (AuTophagy-related Genes) por parte de ganador del Nobel Prof. Yoshinori Ohsumi lo que propulsó el estudio y caracterización molecular de la autofagia (Yamamoto *et al.*, 2023). Esta familia de más de 30 proteínas, junto a otros complejos y centros de señalización, regula todos los pasos del proceso de degradación autofágica, desde la identificación del cargo a degradar, pasando por la formación del autofagosoma y, finalmente, la fusión con el lisosoma.

1.1. Identificación de cargo, aislamiento y degradación mediante autofagia

Mientras que la identificación y marcaje del cargo a degradación puede variar dependiendo del sustrato, los siguientes pasos son comunes a todo tipo de degradación mediada por autofagia:

1. **Iniciación.** La activación e iniciación de la autofagia está regulada principalmente por el Complejo mTORC1 (mechanistic target of rapamycin complex 1) (J. Kim *et al.*, 2011). La falta de nutrientes inactiva mTORC1 lo que reduce la fosforilación de ULK1^{Ser757} (unc-51 like autophagy activating kinase 1), permitiendo su activación y la formación del complejo ULK, que contiene RB1CC1/FIP200, ATG13, ATG101 y al propio ULK1/2.

2. **Nucleación.** La fase de iniciación suele ocurrir en la periferia del retículo endoplasmático (ER), donde el complejo ULK promoverá el reclutamiento de vesículas ATG9⁺, que actúan a modo de cebador y fuente de lípidos para la formación de la doble membrana del autofagosoma (Sawa-Makarska *et al.*, 2020). De manera similar, el complejo ULK también reclutará el complejo phosphatidylinositol 3-kinasa (PI3K) de clase III formado por Beclin1, VPS34, VPS15, ATG14, AMBRA1, entre otros (Baskaran *et al.*, 2014). El Complejo PI3K de clase III se incrustará en la membrana incipiente y VPS34 generará PI(3)P en los sitios de nucleación del autofagosoma (Baskaran *et al.*, 2014).
3. **Elongación.** Las proteínas de la familia PROPPIN (β -propeller polyphosphoinositide-binding proteins; WIPI1-4, WD repeat domain phosphoinositide-interacting protein 1-4) son incrustadas en las regiones ricas en PI(3)P y reclutarán a ATG2 a las membranas autofágicas (Maeda *et al.*, 2019; Osawa *et al.*, 2019; Valverde *et al.*, 2019). ATG2 catalizará la transferencia de lípidos del ER al fagóforo (Valverde *et al.*, 2019), ayudado por ATG9 que actúa como una escramblasa de lípidos (Maeda *et al.*, 2020; Matoba *et al.*, 2020). Además, dos sistemas ubiquitin-like ayudan a la elongación y cierre del autofagosoma. A través del sistema ATG8, ATG4 y la E1-like ATG7 procesan la familia de proteínas ATG8 (LC3, GABARAP) conjugándolas a fosfatidiletanolamina (Yamamoto *et al.*, 2023). El sistema ATG8 actúa junto al complejo ATG12, que incluye a ATG5 y la proteína transmembrana ATG16L1, que tiene una función E3-like promoviendo la conjugación de ATG8-PE a la membrana del fagóforo (Yamamoto *et al.*, 2023). El sistema ESCRT (Endosomal Sorting Complexes Required for Transport) media el cierre del fagóforo para aislar el cargo del resto del citoplasma y formar el autofagosoma (Takahashi *et al.*, 2018; F. Zhou *et al.*, 2019).
4. **Fusión y formación del autolisosoma.** La interacción entre autofagosoma y lisosoma está mediada por el complejo HOPS (homotypic fusion and protein sorting) (Jiang *et al.*, 2014), RAB7 (Z. Wang *et al.*, 2016), PLEKHM1 (McEwan *et al.*, 2015) y EPG5 (Z. Wang *et al.*, 2016). PLEKHM1 y EPG5 contienen regiones LC3-interacting (LIR) que reconocerán las ATG8s que decoran la membrana del autofagosoma (McEwan *et al.*, 2015; Z. Wang *et al.*, 2016). Finalmente, los complejos proteicos SNARE (SNAP REceptors) completarán la fusión de las membranas autofagosomal y lisosomal. YKT6 y STX17 son reclutados a la membrana del autofagosoma e interactúan con STX7 (Matsui *et al.*, 2018) y VAMP7/8 (Itakura *et al.*, 2012) en la membrana del lisosoma, respectivamente, ayudados por la proteína SNARE SNAP29 como anclaje (Morelli *et al.*, 2015).
5. **Reciclaje del cargo.** Las fosfolipasas ácidas lisosomales degradarán la membrana interna del autofagosoma (Ramya & Rajasekharan, 2016). El cargo autofágico será liberado al lumen lisosomal, degradado por distintas hidrolasas ácidas (proteasas, lipasas, nucleasas, glicosidasas, fosfatasas) y los metabolitos resultantes serán transportados de vuelta al citosol (Settembre & Perera, 2023).

1.2. Regulación molecular de la autofagia

Tradicionalmente, la autofagia se ha considerado un mecanismo catabólico activado en respuesta a la falta de nutrientes (Boya *et al.*, 2013). En condiciones anabólicas, mTORC1 fosforila ULK1^{Ser757}, inactivándolo y manteniendo los niveles de autofagia al mínimo (J. Kim *et al.*, 2011). En respuesta al ayuno o falta de nutrientes, AMPK (5' AMP-activated protein kinase) es activada y fosforila dos componentes del complejo mTORC1 (Raptor and TSC2; inactiva) y a ULK1^{Ser317/Ser777} (activa), promoviendo la iniciación de la autofagia por ambos mecanismos (Egan *et al.*, 2011; J. Kim *et al.*, 2011; Stephan *et al.*, 2009). La transcripción de la mayoría de genes involucrados en la autofagia está bajo el control del factor de transcripción EB (TFEB) (Boya *et al.*, 2013). mTORC1 se encuentra anclado a la superficie del lisosoma, donde interacciona con TFEB y lo fosforila, inhibiendo así su translocación al núcleo (Settembre *et al.*, 2012). El ayuno contribuye además a que el complejo mTORC1 se disocie de la membrana lisosomal y se inactive, promoviendo así la translocación nuclear de TFEB y activando la transcripción de un conjunto de genes conocido como CLEAR network (Coordinated Lysosomal Expression and Regulation) (Settembre *et al.*, 2012), que incluye tanto a los ATGs como a componentes estructurales del lisosoma (Bordi *et al.*, 2021; Palmieri *et al.*, 2011). Además, se ha descrito que los distintos complejos y componentes de la maquinaria de autofagia también pueden activarse en respuesta a otros tipos de estrés celular, como infecciones bacterianas (Watson *et al.*, 2012) o hipoxia (Frezza *et al.*, 2011).

1.3. Autofagia selectiva y no selectiva

En primera instancia, la autofagia se describió como un proceso no selectivo mediante el cual se aislaba y degradaba una parte del citoplasma en el lisosoma (Eskelinen *et al.*, 2011). Sin embargo, en las últimas dos décadas se han identificado diversos receptores y efectores moleculares que priorizan la degradación de cargos específicos mediante autofagia, pudiéndose entonces distinguir entre autofagia no selectiva (*bulk*) y autofagia selectiva (D. Narendra *et al.*, 2008; Villarejo-Zori *et al.*, 2021). Las diferentes vías de autofagia selectiva responden a estímulos específicos o requerimientos metabólicos de la célula, e incluye por ejemplo, agrefagia (agregados de proteína o RNA), ER-fagia (ER), mitofagia (mitocondria), lipofagia (gotas lipídicas) o lisofagia (lisosomas dañados) (Villarejo-Zori *et al.*, 2021).

1.4. Mitofagia

Dentro de la autofagia selectiva, la que se ha estudiado de una manera más exhaustiva, por su implicación en la etiopatología de diversas enfermedades, es la mitofagia. La mitocondria es el principal generador bioenergético de las células eucariotas mediante la producción de adenosín trifosfato (ATP), y descienden de una primitiva alfa-proteobacteria endosimbiótica (Muñoz-Gómez *et al.*, 2022; Sagan, 1967). Como tal, este orgánulo presenta

su propio mitoribosoma (en mamíferos 55S, incluyendo una subunidad pequeña 28S y una grande 39S) y un genoma circular de doble cadena (mtDNA), que codifica 13 proteínas esenciales para la fosforilación oxidativa (OXPHOS) (Tan *et al.*, 2023). La mayoría de procesos intracelulares y actividades enzimáticas requieren ATP, y su principal fuente es la OXPHOS. Partiendo de distintos combustibles (aminoácidos, ácidos grasos, carbohidratos), los sustratos son importados a la matriz mitocondrial donde pasarán a través del ciclo de Krebs y diversas reacciones de oxidación generarán electrones que serán acumulados en forma de NADH y FADH₂. La cadena de transporte de electrones (ETC) está compuesta por cuatro complejos (CI-IV), que transferirán dichos electrones para generar un gradiente electroquímico en la membrana interna mitocondrial (IMM) y bombear protones al espacio intermembrana, de manera oxígeno-dependiente. Los protones serán devueltos a la matriz mitocondrial a través de la ATP sintasa-F₁F₀ (CV), que partiendo de adenosín difosfato (ADP) y fosfato inorgánico (P_i), generará finalmente ATP (Spinelli & Haigis, 2018).

La topología mitocondrial de la célula es muy compleja y, generalmente, suele observarse como una intrincada red citoplásmica con eventos de fusión y fisión constantes (Westermann, 2010). La fisión mitocondrial está mediada por el citoesqueleto de actina y el ER, que “estrangulan” a la mitocondria para generar sitios de unión para la GTPasa DRP1 (Dynamin-related protein 1) en la membrana externa mitocondrial (OMM) (Smirnova *et al.*, 2001), donde interaccionará con diversos adaptadores (e.g., MFF, FIS1, MiD49, MiD51). DRP1 formará un anillo en el sitio de constricción e interaccionará con regiones ricas en cardiolipina (CL), remodelando la IMM y OMM para finalmente escindir la nueva mitocondria hija de la materna (Westermann, 2010). Este proceso es necesario, por ejemplo, para separar y degradar trozos de mitocondria dañados en caso de daño localizado (Kleele *et al.*, 2021). Por otro lado, la fusión mitocondrial favorece la formación de una red mitocondrial tubular más compleja, y está mediada por proteínas GTP-dependientes llamadas mitofusinas (MFN1, MFN2) en la OMM (H. Chen *et al.*, 2003), y OPA1 (Optic atrophy 1) en la IMM (Gripic *et al.*, 2004).

La degradación selectiva de mitocondrias enteras mediante autofagia se denomina mitofagia y es activada en respuesta a alteraciones de la homeostasis mitocondrial, señales de desarrollo fisiológico o cambios metabólicos (Uoselis *et al.*, 2023). Tradicionalmente, la mitofagia se ha asociado al daño mitocondrial y la pérdida del potencial de membrana ($\Delta\Psi_m$) (D. Narendra *et al.*, 2008; D. P. Narendra *et al.*, 2010), pero en los últimos años se ha destacado su papel esencial en la adaptación metabólica a los niveles de oxígeno en el microambiente celular (Esteban-Martínez *et al.*, 2017). Atendiendo a la manera en la que la mitocondria interacciona con las ATG8s de la membrana del autofagosoma, se pueden distinguir tres vías de mitofagia: dependiente de PINK1/Parkin, mediada por receptores, o por lípidos.

1.4.1. Mitofagia dependiente de PINK1/Parkin

Esta vía está caracterizada por la poli-ubiquitinación de proteínas de la OMM y se asocia a la pérdida de $\Delta\Psi_m$ que lleva a la despolarización de la membrana mitocondrial inducida, por ejemplo, por tratamiento con protonóforos como CCCP (Carbonyl cyanide *m*-chlorophenyl hydrazone) (D. Narendra *et al.*, 2008; D. P. Narendra *et al.*, 2010). En homeostasis, PINK1 (PTEN-induced kinase 1) es reclutado a la OMM por el complejo translocasa de la membrana externa (TOM) y es internalizado por el complejo translocasa de la membrana interna (TIM). La secuencia de *targeting* mitocondrial (MTS) de PINK1 es escindida por las proteasas PARL (Presenilin Associated Rhomboid Like) (Deas *et al.*, 2011) y MPP (Mitochondrial Processing Peptidase) (Greene *et al.*, 2012), exponiendo así su N-degron terminal que lo hará susceptible a degradación proteasomal (Yamano & Youle, 2013). Cuando se disipa el $\Delta\Psi_m$, la importación por parte de TIM se bloquea y PINK1 completa se acumula en la OMM donde fosforilará proteínas de membrana mono-ubiquitinadas en el residuo Ser65 (Koyano *et al.*, 2014), que es considerado un indicador fiable de los niveles de mitofagia mediada por PINK1/Parkin (Hou *et al.*, 2018). La ubiquitinación basal presente en proteínas de la OMM aún no se comprende bien, ni se han identificado las E3 ubiquitina-ligasas responsables, pero se ha descrito que la deubiquitinasa USP30 es crucial para mantener niveles homeostáticos de proteínas ubiquitinadas en la OMM (Bingol *et al.*, 2014). La fosfo-ubiquitina^{Ser65} recluta a Parkin, una E3 ubiquitina-ligasa que generará cadenas de poli-ubiquitina en las proteínas de la OMM (D. Narendra *et al.*, 2008). Además, la propia Parkin contiene un dominio ubiquitin-like susceptible a fosforilación por PINK1 en un residuo equivalente a la Ser65, y que es esencial para su activación (McWilliams, Barini, *et al.*, 2018). Las cadenas de poli-ubiquitina serán también fosforilables por PINK1, creando una reacción en cadena que acelerará el proceso de mitofagia (McWilliams, Barini, *et al.*, 2018), y reclutando adaptadores de autofagia con dominios LIR, principalmente NDP52 y OPTN (Lazarou *et al.*, 2015), pero SQSTM1/p62 (Geisler *et al.*, 2010) y TAX1BP1 (Le Guerroué *et al.*, 2023) también se han asociado a la mitofagia mediada por PINK1/Parkin. Estos adaptadores promoverán la interacción con el resto de la maquinaria autofágica, la mitocondria será encerrada en el autofagosoma y, finalmente, transportada al lisosoma para su degradación.

1.4.2. Mitofagia mediada por receptores

Las proteínas de la OMM que contienen dominios LIR se conocen como receptores de mitofagia y pueden interaccionar directamente con las ATG8s de los autofagosomas en formación en ese momento, haciendo que la mitocondria sea también degradada. Entre ellos, NIX (BNIP3L; BCL2 interacting protein 3 like) es el más estudiado (Novak *et al.*, 2010) y tiene un papel esencial en la eliminación de mitocondrias superfluas en respuesta a hipoxia (Esteban-Martínez *et al.*, 2017; Novak *et al.*, 2010). La bajada en los niveles de

oxígeno reduce la hidroxilación del factor de transcripción HIF-1 α y su degradación proteasomal, promoviendo su estabilización y la unión a sus cofactores (Taylor & Scholz, 2022). Entre los genes regulados por HIF-1 α se incluyen diversas enzimas metabólicas, *BNIP3L* y su homólogo *BNIP3*, que colaborarán para remodelar el metabolismo celular reduciendo la OXPHOS y promoviendo glucólisis y glutaminólisis (Esteban-Martínez *et al.*, 2017; Taylor & Scholz, 2022; Villarejo-Zori *et al.*, 2020). Este fenómeno ocurre por ejemplo durante la reprogramación metabólica de los progenitores neuronales durante la diferenciación de la retina, que necesitan adaptarse al microambiente hipóxico antes de la vascularización (Esteban-Martínez *et al.*, 2017) o durante la diferenciación de los eritrocitos (Aerbajinai *et al.*, 2003; Sandoval *et al.*, 2008). *BNIP3* presenta gran homología con *NIX*, su regulación transcripcional es similar y actúa como receptor de mitofagia, pero su implicación en los procesos mencionados aún no ha sido elucidada. Sin embargo, ratones deficientes para *BNIP3* presentan alteraciones en el posicionamiento neuronal del cerebro (Singh *et al.*, 2018), un fenotipo similar al observado en la retina de ratones deficientes para *NIX* (Esteban-Martínez *et al.*, 2017). *NIX* presenta mayor afinidad por la ATG8 GABARAPL1 (Novak *et al.*, 2010), mientras que *BNIP3* se une preferencialmente a LC3B (Hanna *et al.*, 2012), y también se ha descrito recientemente como un receptor implicado en la pexofagia (degradación de peroxisomas mediante autofagia) lo que podría explicar el fenotipo más severo observado en ratones deficientes para *NIX* (Wilhelm *et al.*, 2022).

FUNDC1 (FUN14 domain-containing 1) es otro receptor de la OMM que puede unirse directamente a la LC3B en respuesta a hipoxia (L. Liu *et al.*, 2012), y también es capaz de promover la mitofagia de manera indirecta mediante interacciones con DRP1 y OPA1 en respuesta a pérdida de $\Delta\Psi_m$, que promueven la fisión mitocondrial (M. Chen, Chen, *et al.*, 2016). FKBP8 (FK506-binding protein 8) es el único receptor con mayor afinidad por LC3A, y la sobreexpresión de cualquiera de los dos es suficiente para promover la mitofagia (Bhujabal *et al.*, 2017). BCL2L13 (BCL2 like 13) es miembro de la familia de proteínas pro-apoptóticas BCL2 y contiene dos motivos LIR que se pueden unir a LC3B, pero esta unión solo se ha observado coetánea a la activación de la vía dependiente de PINK1/Parkin (Murakawa *et al.*, 2015). No se sabe aún si niveles endógenos de FKBP8 o BCL2L13 por sí mismos pueden promover la mitofagia en respuesta a otros estímulos alternativos como la hipoxia. AMBRA1 es una proteína intrínsecamente desestructurada que participa en la fase de iniciación de la autofagia (complejo PI3K de clase III), pero también puede encontrarse en la OMM y contiene un motivo LIR que interacciona con LC3B en respuesta a la despolarización mitocondrial (Strappazzon *et al.*, 2015). Recientemente se ha descrito que AMBRA1 interacciona físicamente e inhibe al regulador de importación mitocondrial ATAD3A, promoviendo la estabilización de PINK1 en la OMM (Di Rienzo *et al.*, 2022). Por tanto, AMBRA1 está implicado tanto en la mitofagia mediada por receptores como en la dependiente de PINK1/Parkin. PHB2 (Prohibitin-2) es una excepción ya que puede unirse

a LC3B pero se encuentra en la IMM, por tanto se necesita despolarización mitocondrial severa, daño en la membrana o rotura de la OMM para que pueda actuar como receptor de mitofagia (Wei *et al.*, 2017).

1.4.3. Mitofagia mediada por lípidos

La cardiolipina (CL) es un fosfolípido localizado principalmente en la IMM, pero daños en la misma pueden estimular su translocación a la OMM mediada por PLSCR3 (phospholipid scramblase 3), donde podrá interaccionar directamente con LC3A/B/C (Chu *et al.*, 2013). Este fenómeno se ha observado en respuesta al tratamiento con protonóforos (Iriondo *et al.*, 2022) y diversos estímulos pro-apoptóticos (Chu *et al.*, 2013), en paralelo a la activación de la vía dependiente de PINK1/Parkin. Hay controversia respecto a si la interacción entre CL-ATG8s es un mecanismo accesorio para facilitar la mitofagia mediada por PINK1/Parkin o si puede promover la mitofagia en ausencia de estas. Por otro lado, también se ha descrito que la CL interacciona con Beclin1 (Huang *et al.*, 2012) y DRP1 (Stepanyants *et al.*, 2015), lo cual puede favorecer de manera indirecta la mitofagia. La ceramida de cadena larga (CE; C₁₈-CE) generada por CERS1 (ceramide synthase 1) también puede insertarse en la OMM y reclutar a LC3B para promover la formación del autofagosoma (Sentelle *et al.*, 2012), pero la evidencia respecto a su regulación y relevancia fisiológica es limitada.

2. AUTOFAGIA MEDIADA POR CHAPERONAS

Mientras que mediante macroautofagia se pueden degradar también las membranas lipídicas de los orgánulos, la autofagia mediada por chaperonas (CMA) es una vía selectiva que solo permite la degradación de proteínas específicas (Kaushik & Cuervo, 2018). Los sustratos de la CMA deben contener un motivo KFERQ-like en su secuencia de aminoácidos, que será reconocido en el citosol por la chaperona HSC70. El motivo KFERQ-like canónico contiene uno o dos residuos con carga positiva (K, R), uno o dos hidrofóbicos (I, L, V, F), uno o dos con carga negativa (D, E) y una glutamina (Q) en uno de los extremos (Dice, 1990). Alrededor del 45% del proteoma humano contiene motivos KFERQ-like canónicos, y determinadas modificaciones post-traduccionales (PTMs) que alteran las propiedades fisicoquímicas de los aminoácidos pueden generar motivos KFERQ-like (no canónicos) (Kirchner *et al.*, 2019). Aminoácidos fosforilados (S, T, Y) pueden reemplazar a los ácidos D o E (Thompson *et al.*, 2009) y lisinas (K) acetiladas pueden sustituir a la Q terminal (Lv *et al.*, 2011). Adicionalmente, eventos de SUMOilación, ubiquitinación y deubiquitinación pueden enmascarar o revelar motivos KFERQ-like y actuar como moduladores de la degradación de proteínas específicas mediante CMA (Ferreira *et al.*, 2013). Si se tiene en cuenta las PTMs, hasta el 75% del proteoma humano sería susceptible de ser degradado mediante CMA, pero también influye la localización subcelular ya que tan solo aquellos motivos que estén expuestos al citosol y sean accesibles para HSC70

podrán ser reconocidos (Kirchner *et al.*, 2019). Otras co-chaperonas, HSP40 y HSP90 (Agarraberes & Dice, 2001), también se han asociado con el complejo HSC70-KFERQ pero su función y si son indispensables aún se desconoce.

LAMP-2A (Lysosome-associated membrane protein 2, isoform A) es el receptor lisosomal de la CMA, el paso limitante y se describió por primera vez en 1996 (Cuervo & Dice, 1996). La cola citosólica de la isoforma LAMP-2A es capaz de interactuar con HSC70 acoplada al sustrato KFERQ, y este evento promueve su multimerización generando una estructura similar a un túnel en la membrana lisosomal (Bandyopadhyay *et al.*, 2008). HSC70 también se encuentra en el lumen lisosomal y ayudará al complejo LAMP-2 con la linealización y translocación del sustrato al lisosoma (Agarraberes *et al.*, 1997; Cuervo *et al.*, 1997). Tan solo una pequeña fracción de lisosomas LAMP-2A+HSC70+ puede efectuar la CMA (Cuervo *et al.*, 1997), pero los procesos celulares regulados por CMA mediante el remodelado selectivo del proteoma son muy relevantes e incluyen la glucólisis (Schneider *et al.*, 2014), la lipólisis (Kaushik & Cuervo, 2015) y el ciclo celular (C. Park *et al.*, 2015).

Se han descrito también diversos reguladores extralisosomales y moduladores lisosomales de los niveles de CMA. A nivel de expresión, el locus de LAMP-2A se encuentra bajo la regulación de los factores de transcripción NFATc1 (Valdor *et al.*, 2014), NFE2L2/NRF2 (Pajares *et al.*, 2018) (reguladores positivos) y RAR α (Anguiano *et al.*, 2013; Gomez-Sintes *et al.*, 2022) (regulador negativo). La GFAP (Glial fibrillary acidic protein) en forma monomérica y EF1 α (Elongation factor 1 α ; GTP-binding) regulan la estabilidad del multímero LAMP-2A en la membrana lisosomal (Bandyopadhyay *et al.*, 2010). GFAP confiere estabilidad al complejo de translocación LAMP-2A, pero una fracción de GFAP se encuentra también fosforilada y unida a EF1 α . Una subida en los niveles de GTP promueve la liberación del GFAP fosforilado y la fosforilación de la GFAP restante, desestabilizando el complejo LAMP-2A e inhibiendo CMA (Bandyopadhyay *et al.*, 2010). AKT1 es la kinasa responsable de fosforilar a GFAP, y está a su vez regulada por mTORC2 y la fosfatasa PHLPP1 (Arias *et al.*, 2015). Por tanto, un incremento en la actividad de MTORC2-AKT1 reduce los niveles de CMA mientras que la defosforilación de AKT1 por PHLPP1 reducirá los niveles de GFAP fosforilado e incrementará la estabilidad del complejo LAMP-2A (Arias *et al.*, 2015).

3. MICROAUTOPHAGY

La MI se caracteriza por la entrada directa del cargo al lisosoma, sin intermediarios (L. Wang *et al.*, 2023) y se puede clasificar en tres subtipos dependiendo de la dinámica y/o efectores moleculares: protrusión lisosomal, invaginación lisosomal o invaginación endosomal (eMI) (Oku & Sakai, 2018). Los mecanismos que median la MI lisosomal aún no se conocen, pero la eMI se ha podido diseccionar gracias a que comparte mediadores con la CMA (Sahu *et al.*,

2011). Cuando las proteínas con motivos KFERQ-like se unen a HSC70 pueden ser dirigidas al lisosoma, donde serán degradadas mediante CMA, o a endosomas tardíos y cuerpos multivesiculares (MVBs), donde se degradarán mediante eMI (Sahu *et al.*, 2011). El complejo sustrato KFERQ-HSC70 interactuará con la fosfatidilserina (PS) de la membrana endosomal (Morozova *et al.*, 2016) y será invaginado asistido por los sistemas ESCRT-I y -III, activados por VPS4 (vacuolar protein sorting-associated protein 4) (Sahu *et al.*, 2011). Una bajada en los niveles de CMA puede ser compensada por eMI, y viceversa, a través del desvío de cargo de una vía a otra orquestado por la chaperona BAG6 (Krause *et al.*, 2023).

4. AUTOFAGIA Y ENVEJECIMIENTO

En 2013 se publicó la primera versión de los *hallmarks* (rasgos distintivos) del envejecimiento, incluyendo entre ellos la maladaptación a los niveles de nutrientes y la pérdida de proteostasis, causa y consecuencia de una bajada en los niveles de autofagia, respectivamente (López-Otín *et al.*, 2013). Diez años más tarde, en 2023, se publica la versión actualizada incluyendo alteraciones en autofagia como uno de los principales *hallmarks* que promueven el declive en salud asociado al envejecimiento (López-Otín *et al.*, 2023).

Se ha descrito que con la edad bajan los niveles de autofagia y la función lisosomal se ve alterada (Donati *et al.*, 2001; Ott *et al.*, 2016), pero este fenómeno no es ubicuo ya que algunos órganos presentan mayor vulnerabilidad y daño lisosomal (J. T. Chang *et al.*, 2017; Ott *et al.*, 2016). Además, también se ha visto que los niveles de algunos tipos de autofagia selectiva como la mitofagia suben con la edad para responder a determinados estímulos, como la inflamación esteril en el sistema nervioso causada por un aumento en los niveles de mtDNA citosólico (Jiménez-Loygorri *et al.*, 2024). En modelos animales, la delección de genes ATG u otros implicados en autofagia provoca letalidad perinatal, destacando la importancia de este proceso para la supervivencia (Kuma *et al.*, 2017). Por el contrario, estrategias que aumentan la autofagia como la sobreexpresión de ATG5 (Pyo *et al.*, 2013) o la expresión de una variante constitutivamente activa de Beclin1 (Fernández *et al.*, 2018), incrementan la vida media y reducen la incidencia de enfermedades asociadas a la edad. De manera similar se ha descrito que los niveles de CMA bajan durante el envejecimiento (Cuervo & Dice, 2000; Dong *et al.*, 2021), pero hay excepciones como la neuroretina, en la que aumenta con la edad (Rodríguez-Muela *et al.*, 2013).

La autofagia emerge entonces como una nueva diana terapéutica para el tratamiento de las comorbilidades asociadas al envejecimiento y la mejora de la salud de la población general. En este contexto, el estudio detallado de los mecanismos moleculares implicado y su regulación en distintos tejidos resulta esencial para el desarrollo de intervenciones seguras, eficaces y personalizadas. Aunque aún existen desafíos en la traslación de estos hallazgos a la

práctica clínica, las estrategias dirigidas a modular la autofagia, ya sean farmacológicas, nutricionales o basadas en el estilo de vida, representan una estrategia prometedora para promover un envejecimiento saludable y prolongar la esperanza de vida libre de enfermedad.

5. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aerbajinai, W., Giattina, M., Lee, Y. T., Raffeld, M., & Miller, J. L. (2003). The proapoptotic factor Nix is coexpressed with Bcl-xL during terminal erythroid differentiation. *Blood*, 102(2), 712-717. <https://doi.org/10.1182/blood-2002-11-3324>
- Agarraberes, F. A., & Dice, J. F. (2001). A molecular chaperone complex at the lysosomal membrane is required for protein translocation. *Journal of Cell Science*, 114(Pt 13), 2491-2499. <https://doi.org/10.1242/jcs.114.13.2491>
- Agarraberes, F. A., Terlecky, S. R., & Dice, J. F. (1997). An Intralysosomal hsp70 Is Required for a Selective Pathway of Lysosomal Protein Degradation. *The Journal of Cell Biology*, 137(4), 825-834.
- Anguiano, J., Garner, T. P., Mahalingam, M., Das, B. C., Gavathiotis, E., & Cuervo, A. M. (2013). Chemical modulation of chaperone-mediated autophagy by retinoic acid derivatives. *Nature Chemical Biology*, 9(6), 374-382. <https://doi.org/10.1038/nchembio.1230>
- Arias, E., Koga, H., Diaz, A., Mocholi, E., Patel, B., & Cuervo, A. M. (2015). Lysosomal mTORC2/PHLPP1/Akt Regulate Chaperone-Mediated Autophagy. *Molecular Cell*, 59(2), 270-284. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2015.05.030>
- Bandyopadhyay, U., Kaushik, S., Varticovski, L., & Cuervo, A. M. (2008). The chaperone-mediated autophagy receptor organizes in dynamic protein complexes at the lysosomal membrane. *Molecular and Cellular Biology*, 28(18), 5747-5763. <https://doi.org/10.1128/MCB.02070-07>
- Bandyopadhyay, U., Sridhar, S., Kaushik, S., Kiffin, R., & Cuervo, A. M. (2010). Identification of regulators of chaperone-mediated autophagy. *Molecular Cell*, 39(4), 535-547. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2010.08.004>
- Baskaran, S., Carlson, L.-A., Stjepanovic, G., Young, L. N., Kim, D. J., Grob, P., Stanley, R. E., Nogales, E., & Hurley, J. H. (2014). Architecture and dynamics of the autophagic phosphatidylinositol 3-kinase complex. *eLife*, 3, e05115. <https://doi.org/10.7554/eLife.05115>
- Bhujabal, Z., Birgisdottir, Á. B., Sjøttem, E., Brenne, H. B., Øvervatn, A., Habisov, S., Kirkin, V., Lamark, T., & Johansen, T. (2017). FKBP8 recruits LC3A to mediate Parkin-independent mitophagy. *EMBO Reports*, 18(6), 947-961. <https://doi.org/10.15252/embr.201643147>
- Bingol, B., Tea, J. S., Phu, L., Reichelt, M., Bakalarski, C. E., Song, Q., Foreman, O., Kirkpatrick, D. S., & Sheng, M. (2014). The mitochondrial deubiquitinase USP30 opposes parkin-mediated mitophagy. *Nature*, 510(7505), Article 7505. <https://doi.org/10.1038/nature13418>
- Bordi, M., De Cegli, R., Testa, B., Nixon, R. A., Ballabio, A., & Cecconi, F. (2021). A gene toolbox for monitoring autophagy transcription. *Cell Death & Disease*, 12(11), 1044. <https://doi.org/10.1038/s41419-021-04121-9>
- Boya, P., Reggiori, F., & Codogno, P. (2013). Emerging regulation and functions of autophagy. *Nature Cell Biology*, 15(7), Article 7. <https://doi.org/10.1038/ncb2788>
- Chang, J. T., Kumsta, C., Hellman, A. B., Adams, L. M., & Hansen, M. (2017). Spatiotemporal regulation of autophagy during *Caenorhabditis elegans* aging. *eLife*, 6, e18459. <https://doi.org/10.7554/eLife.18459>

- Chen, H., Detmer, S. A., Ewald, A. J., Griffin, E. E., Fraser, S. E., & Chan, D. C. (2003). Mitofusins Mfn1 and Mfn2 coordinately regulate mitochondrial fusion and are essential for embryonic development. *The Journal of Cell Biology*, 160(2), 189-200. <https://doi.org/10.1083/jcb.200211046>
- Chen, M., Chen, Z., Wang, Y., Tan, Z., Zhu, C., Li, Y., Han, Z., Chen, L., Gao, R., Liu, L., & Chen, Q. (2016). Mitophagy receptor FUNDC1 regulates mitochondrial dynamics and mitophagy. *Autophagy*, 12(4), 689-702. <https://doi.org/10.1080/15548627.2016.1151580>
- Chu, C. T., Ji, J., Dagda, R. K., Jiang, J. F., Tyurina, Y. Y., Kapralov, A. A., Tyurin, V. A., Yanamala, N., Shrivastava, I. H., Mohammadyani, D., Qiang Wang, K. Z., Zhu, J., Klein-Seetharaman, J., Balasubramanian, K., Amoscato, A. A., Borisenko, G., Huang, Z., Gusdon, A. M., Cheikhi, A., ... Kagan, V. E. (2013). Cardiolipin externalization to the outer mitochondrial membrane acts as an elimination signal for mitophagy in neuronal cells. *Nature Cell Biology*, 15(10), Article 10. <https://doi.org/10.1038/ncb2837>
- Cuervo, A. M., & Dice, J. F. (1996). A receptor for the selective uptake and degradation of proteins by lysosomes. *Science* (New York, N.Y.), 273(5274), 501-503. <https://doi.org/10.1126/science.273.5274.501>
- Cuervo, A. M., & Dice, J. F. (2000). Age-related Decline in Chaperone-mediated Autophagy*. *Journal of Biological Chemistry*, 275(40), 31505-31513. <https://doi.org/10.1074/jbc.M002102200>
- Cuervo, A. M., Dice, J. F., & Knecht, E. (1997). A population of rat liver lysosomes responsible for the selective uptake and degradation of cytosolic proteins. *The Journal of Biological Chemistry*, 272(9), 5606-5615. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.9.5606>
- Deas, E., Plun-Favreau, H., Gandhi, S., Desmond, H., Kjaer, S., Loh, S. H. Y., Renton, A. E. M., Harvey, R. J., Whitworth, A. J., Martins, L. M., Abramov, A. Y., & Wood, N. W. (2011). PINK1 cleavage at position A103 by the mitochondrial protease PARL. *Human Molecular Genetics*, 20(5), 867-879. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddq526>
- Di Rienzo, M., Romagnoli, A., Ciccocanti, F., Refolo, G., Consalvi, V., Arena, G., Valente, E. M., Piacentini, M., & Fimia, G. M. (2022). AMBRA1 regulates mitophagy by interacting with ATAD3A and promoting PINK1 stability. *Autophagy*, 18(8), 1752-1762. <https://doi.org/10.1080/15548627.2021.1997052>
- Dice, J. F. (1990). Peptide sequences that target cytosolic proteins for lysosomal proteolysis. *Trends in Biochemical Sciences*, 15(8), 305-309. [https://doi.org/10.1016/0968-0004\(90\)90019-8](https://doi.org/10.1016/0968-0004(90)90019-8)
- Donati, A., Cavallini, G., Paradiso, C., Vittorini, S., Pollera, M., Gori, Z., & Bergamini, E. (2001). Age-related changes in the autophagic proteolysis of rat isolated liver cells: Effects of antiaging dietary restrictions. *The Journals of Gerontology. Series A, Biological Sciences and Medical Sciences*, 56(9), B375-383. <https://doi.org/10.1093/gerona/56.9.b375>
- Dong, S., Wang, Q., Kao, Y.-R., Diaz, A., Tasset, I., Kaushik, S., Thiruthuvanathan, V., Zintiridou, A., Nieves, E., Dzieciatkowska, M., Reisz, J. A., Gavathiotis, E., D'Alessandro, A., Will, B., & Cuervo, A. M. (2021). Chaperone-mediated autophagy sustains haematopoietic stem-cell function. *Nature*, 591(7848), Article 7848. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-03129-z>
- Egan, D. F., Shackelford, D. B., Mihaylova, M. M., Gelino, S., Kohnz, R. A., Mair, W., Vasquez, D. S., Joshi, A., Gwinn, D. M., Taylor, R., Asara, J. M., Fitzpatrick, J., Dillin, A., Viollet, B., Kundu, M., Hansen, M., & Shaw, R. J. (2011). Phosphorylation of ULK1 (hATG1) by AMP-activated protein kinase connects energy sensing to mitophagy. *Science* (New York, N.Y.), 331(6016), 456-461. <https://doi.org/10.1126/science.1196371>
- Eskelinen, E.-L., Reggiori, F., Baba, M., Kovács, A. L., & Seglen, P. O. (2011). Seeing is believing: The impact of electron microscopy on autophagy research. *Autophagy*, 7(9), 935-956. <https://doi.org/10.4161/auto.7.9.15760>
- Esteban-Martínez, L., Sierra-Filardi, E., McGreal, R. S., Salazar-Roa, M., Mariño, G., Seco, E., Durand, S., Enot, D., Graña, O., Malumbres, M., Cvekl, A., Cuervo, A. M., Kroemer, G., & Boya, P. (2017). Programmed mitophagy is essential for the glycolytic switch during cell differentiation. *The EMBO Journal*, 36(12), 1688-1706. <https://doi.org/10.15252/embj.201695916>

- Fernández, Á. F., Sebtí, S., Wei, Y., Zou, Z., Shi, M., McMillan, K. L., He, C., Ting, T., Liu, Y., Chiang, W.-C., Marciano, D. K., Schiattarella, G. G., Bhagat, G., Moe, O. W., Hu, M. C., & Levine, B. (2018). Disruption of the beclin 1–BCL2 autophagy regulatory complex promotes longevity in mice. *Nature*, 558(7708), Article 7708. <https://doi.org/10.1038/s41586-018-0162-7>
- Ferreira, J. V., Fôfo, H., Bejarano, E., Bento, C. F., Ramalho, J. S., Girão, H., & Pereira, P. (2013). STUB1/CHIP is required for HIF1A degradation by chaperone-mediated autophagy. *Autophagy*, 9(9), 1349-1366. <https://doi.org/10.4161/auto.25190>
- Frezza, C., Zheng, L., Tennant, D. A., Papkovsky, D. B., Hedley, B. A., Kalna, G., Watson, D. G., & Gottlieb, E. (2011). Metabolic profiling of hypoxic cells revealed a catabolic signature required for cell survival. *PloS One*, 6(9), e24411. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0024411>
- Geisler, S., Holmström, K. M., Skujat, D., Fiesel, F. C., Rothfuss, O. C., Kahle, P. J., & Springer, W. (2010). PINK1/Parkin-mediated mitophagy is dependent on VDAC1 and p62/SQSTM1. *Nature Cell Biology*, 12(2), Article 2. <https://doi.org/10.1038/ncb2012>
- Gomez-Sintes, R., Xin, Q., Jimenez-Loygorri, J. I., McCabe, M., Diaz, A., Garner, T. P., Cotto-Rios, X. M., Wu, Y., Dong, S., Reynolds, C. A., Patel, B., de la Villa, P., Macian, F., Boya, P., Gavathiotis, E., & Cuervo, A. M. (2022). Targeting retinoic acid receptor alpha-corepressor interaction activates chaperone-mediated autophagy and protects against retinal degeneration. *Nature Communications*, 13(1), 4220. <https://doi.org/10.1038/s41467-022-31869-1>
- Greene, A. W., Grenier, K., Aguileta, M. A., Muise, S., Farazifard, R., Haque, M. E., McBride, H. M., Park, D. S., & Fon, E. A. (2012). Mitochondrial processing peptidase regulates PINK1 processing, import and Parkin recruitment. *EMBO Reports*, 13(4), 378-385. <https://doi.org/10.1038/embor.2012.14>
- Griparic, L., van der Wel, N. N., Orozco, I. J., Peters, P. J., & van der Bliek, A. M. (2004). Loss of the Intermembrane Space Protein Mgm1/OPA1 Induces Swelling and Localized Constrictions along the Lengths of Mitochondria*. *Journal of Biological Chemistry*, 279(18), 18792-18798. <https://doi.org/10.1074/jbc.M400920200>
- Hanna, R. A., Quinsay, M. N., Orogo, A. M., Giang, K., Rikka, S., & Gustafsson, Å. B. (2012). Microtubule-associated Protein 1 Light Chain 3 (LC3) Interacts with Bnip3 Protein to Selectively Remove Endoplasmic Reticulum and Mitochondria via Autophagy *. *Journal of Biological Chemistry*, 287(23), 19094-19104. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.322933>
- Hou, X., Fiesel, F. C., Truban, D., Castanedes Casey, M., Lin, W.-L., Soto, A. I., Tacik, P., Rousseau, L. G., Diehl, N. N., Heckman, M. G., Lorenzo-Betancor, O., Ferrer, I., Arbelo, J. M., Steele, J. C., Farrer, M. J., Cornejo-Olivas, M., Torres, L., Mata, I. F., Graff-Radford, N. R., ... Springer, W. (2018). Age- and disease-dependent increase of the mitophagy marker phospho-ubiquitin in normal aging and Lewy body disease. *Autophagy*, 14(8), 1404-1418. <https://doi.org/10.1080/15548627.2018.1461294>
- Huang, W., Choi, W., Hu, W., Mi, N., Guo, Q., Ma, M., Liu, M., Tian, Y., Lu, P., Wang, F.-L., Deng, H., Liu, L., Gao, N., Yu, L., & Shi, Y. (2012). Crystal structure and biochemical analyses reveal Beclin 1 as a novel membrane binding protein. *Cell Research*, 22(3), Article 3. <https://doi.org/10.1038/cr.2012.24>
- Iriondo, M. N., Etxaniz, A., Varela, Y. R., Ballesteros, U., Hervás, J. H., Montes, L. R., Goñi, F. M., & Alonso, A. (2022). LC3 subfamily in cardiolipin-mediated mitophagy: A comparison of the LC3A, LC3B and LC3C homologs. *Autophagy*, 18(12), 2985-3003. <https://doi.org/10.1080/15548627.2022.2062111>
- Itakura, E., Kishi-Itakura, C., & Mizushima, N. (2012). The hairpin-type tail-anchored SNARE syntaxin 17 targets to autophagosomes for fusion with endosomes/lysosomes. *Cell*, 151(6), 1256-1269. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.11.001>
- Jiang, P., Nishimura, T., Sakamaki, Y., Itakura, E., Hatta, T., Natsume, T., & Mizushima, N. (2014). The HOPS complex mediates autophagosome-lysosome fusion through interaction with syntaxin 17. *Molecular Biology of the Cell*, 25(8), 1327-1337. <https://doi.org/10.1091/mbc.E13-08-0447>

- Jiménez-Loygorri, J. I., Villarejo-Zori, B., Viedma-Poyatos, Á., Zapata-Muñoz, J., Benítez-Fernández, R., Frutos-Lisón, M. D., Tomás-Barberán, F. A., Espín, J. C., Area-Gómez, E., Gomez-Duran, A., & Boya, P. (2024). Mitophagy curtails cytosolic mtDNA-dependent activation of cGAS/STING inflammation during aging. *Nature Communications*, 15(1), Article 1. <https://doi.org/10.1038/s41467-024-45044-1>
- Kaushik, S., & Cuervo, A. M. (2015). Degradation of lipid droplet-associated proteins by chaperone-mediated autophagy facilitates lipolysis. *Nature Cell Biology*, 17(6), 759-770. <https://doi.org/10.1038/ncb3166>
- Kaushik, S., & Cuervo, A. M. (2018). The coming of age of chaperone-mediated autophagy. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 19(6), Article 6. <https://doi.org/10.1038/s41580-018-0001-6>
- Kim, J., Kundu, M., Viollet, B., & Guan, K.-L. (2011). AMPK and mTOR regulate autophagy through direct phosphorylation of Ulk1. *Nature Cell Biology*, 13(2), Article 2. <https://doi.org/10.1038/ncb2152>
- Kirchner, P., Bourdenx, M., Madrigal-Matute, J., Tiano, S., Diaz, A., Bartholdy, B. A., Will, B., & Cuervo, A. M. (2019). Proteome-wide analysis of chaperone-mediated autophagy targeting motifs. *PLOS Biology*, 17(5), e3000301. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3000301>
- Kleele, T., Rey, T., Winter, J., Zaganelli, S., Mahecic, D., Perreten Lambert, H., Ruberto, F. P., Nemir, M., Wai, T., Pedrazzini, T., & Manley, S. (2021). Distinct fission signatures predict mitochondrial degradation or biogenesis. *Nature*, 593(7859), Article 7859. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03510-6>
- Koyano, F., Okatsu, K., Kosako, H., Tamura, Y., Go, E., Kimura, M., Kimura, Y., Tsuchiya, H., Yoshihara, H., Hirokawa, T., Endo, T., Fon, E. A., Trempe, J.-F., Saeki, Y., Tanaka, K., & Matsuda, N. (2014). Ubiquitin is phosphorylated by PINK1 to activate parkin. *Nature*, 510(7503), Article 7503. <https://doi.org/10.1038/nature13392>
- Krause, G. J., Kirchner, P., Stiller, B., Morozova, K., Diaz, A., Chen, K.-H., Krogan, N. J., Agullo-Pascual, E., Clement, C. C., Lindenau, K., Swaney, D. L., Dilipkumar, S., Bravo-Cordero, J. J., Santambrogio, L., & Cuervo, A. M. (2023). Molecular determinants of the crosstalk between endosomal microautophagy and chaperone-mediated autophagy. *Cell Reports*, 42(12). <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2023.113529>
- Kuma, A., Komatsu, M., & Mizushima, N. (2017). Autophagy-monitoring and autophagy-deficient mice. *Autophagy*, 13(10), 1619-1628. <https://doi.org/10.1080/15548627.2017.1343770>
- Lazarou, M., Sliter, D. A., Kane, L. A., Sarraf, S. A., Wang, C., Burman, J. L., Sideris, D. P., Fogel, A. I., & Youle, R. J. (2015). The ubiquitin kinase PINK1 recruits autophagy receptors to induce mitophagy. *Nature*, 524(7565), Article 7565. <https://doi.org/10.1038/nature14893>
- Le Guerroué, F., Bunker, E. N., Rosencrans, W. M., Nguyen, J. T., Basar, M. A., Werner, A., Chou, T.-F., Wang, C., & Youle, R. J. (2023). TNIP1 inhibits selective autophagy via bipartite interaction with LC3/GABARAP and TAX1BP1. *Molecular Cell*, 83(6), 927-941.e8. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2023.02.023>
- Liu, L., Feng, D., Chen, G., Chen, M., Zheng, Q., Song, P., Ma, Q., Zhu, C., Wang, R., Qi, W., Huang, L., Xue, P., Li, B., Wang, X., Jin, H., Wang, J., Yang, F., Liu, P., Zhu, Y., ... Chen, Q. (2012). Mitochondrial outer-membrane protein FUNDC1 mediates hypoxia-induced mitophagy in mammalian cells. *Nature Cell Biology*, 14(2), Article 2. <https://doi.org/10.1038/ncb2422>
- López-Otín, C., Blasco, M. A., Partridge, L., Serrano, M., & Kroemer, G. (2013). The Hallmarks of Aging. *Cell*, 153(6), 1194-1217. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.05.039>
- López-Otín, C., Blasco, M. A., Partridge, L., Serrano, M., & Kroemer, G. (2023). Hallmarks of aging: An expanding universe. *Cell*, 186(2), 243-278. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2022.11.001>

- Lv, L., Li, D., Zhao, D., Lin, R., Chu, Y., Zhang, H., Zha, Z., Liu, Y., Li, Z., Xu, Y., Wang, G., Huang, Y., Xiong, Y., Guan, K.-L., & Lei, Q.-Y. (2011). Acetylation targets the M2 isoform of pyruvate kinase for degradation through chaperone-mediated autophagy and promotes tumor growth. *Molecular Cell*, 42(6), 719-730. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2011.04.025>
- Maeda, S., Otomo, C., & Otomo, T. (2019). The autophagic membrane tether ATG2A transfers lipids between membranes. *eLife*, 8, e45777. <https://doi.org/10.7554/eLife.45777>
- Maeda, S., Yamamoto, H., Kinch, L. N., Garza, C. M., Takahashi, S., Otomo, C., Grishin, N. V., Forli, S., Mizushima, N., & Otomo, T. (2020). Structure, lipid scrambling activity and role in autophagosome formation of ATG9A. *Nature Structural & Molecular Biology*, 27(12), 1194-1201. <https://doi.org/10.1038/s41594-020-00520-2>
- Matoba, K., Kotani, T., Tsutsumi, A., Tsuji, T., Mori, T., Noshiro, D., Sugita, Y., Nomura, N., Iwata, S., Ohsumi, Y., Fujimoto, T., Nakatogawa, H., Kikkawa, M., & Noda, N. N. (2020). Atg9 is a lipid scramblase that mediates autophagosomal membrane expansion. *Nature Structural & Molecular Biology*, 27(12), 1185-1193. <https://doi.org/10.1038/s41594-020-00518-w>
- Matsui, T., Jiang, P., Nakano, S., Sakamaki, Y., Yamamoto, H., & Mizushima, N. (2018). Autophagosomal YKT6 is required for fusion with lysosomes independently of syntaxin 17. *The Journal of Cell Biology*, 217(8), 2633-2645. <https://doi.org/10.1083/jcb.201712058>
- McEwan, D. G., Popovic, D., Gubas, A., Terawaki, S., Suzuki, H., Stadel, D., Coxon, F. P., Miranda de Stegmann, D., Bhogaraju, S., Maddi, K., Kirchof, A., Gatti, E., Helfrich, M. H., Wakatsuki, S., Behrends, C., Pierre, P., & Dikic, I. (2015). PLEKHM1 regulates autophagosome-lysosome fusion through HOPS complex and LC3/GABARAP proteins. *Molecular Cell*, 57(1), 39-54. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2014.11.006>
- McWilliams, T. G., Barini, E., Pohjolan-Pirhonen, R., Brooks, S. P., Singh, F., Burel, S., Balk, K., Kumar, A., Montava-Garriga, L., Prescott, A. R., Hassoun, S. M., Mouton-Liger, F., Ball, G., Hills, R., Knebel, A., Ulusoy, A., Di Monte, D. A., Tamjar, J., Antico, O., ... Muqit, M. M. K. (2018). Phosphorylation of Parkin at serine 65 is essential for its activation in vivo. *Open Biology*, 8(11), 180108. <https://doi.org/10.1098/rsob.180108>
- Morelli, E., Ginefra, P., Mastrodonato, V., Beznoussenko, G. V., Rusten, T. E., Bilder, D., Stenmark, H., Mironov, A. A., & Vaccari, T. (2015). Multiple functions of the SNARE protein Snap29 in autophagy, endocytic, and exocytic trafficking during epithelial formation in *Drosophila*. *Autophagy*, 10(12), 2251-2268. <https://doi.org/10.4161/15548627.2014.981913>
- Morozova, K., Clement, C. C., Kaushik, S., Stiller, B., Arias, E., Ahmad, A., Rauch, J. N., Chatterjee, V., Melis, C., Scharf, B., Gestwicki, J. E., Cuervo, A.-M., Zuiderweg, E. R. P., & Santambrogio, L. (2016). Structural and Biological Interaction of hsc-70 Protein with Phosphatidylserine in Endosomal Microautophagy *. *Journal of Biological Chemistry*, 291(35), 18096-18106. <https://doi.org/10.1074/jbc.M116.736744>
- Muñoz-Gómez, S. A., Susko, E., Williamson, K., Eme, L., Slamovits, C. H., Moreira, D., López-García, P., & Roger, A. J. (2022). Site-and-branch-heterogeneous analyses of an expanded dataset favour mitochondria as sister to known Alphaproteobacteria. *Nature Ecology & Evolution*, 6(3), Article 3. <https://doi.org/10.1038/s41559-021-01638-2>
- Murakawa, T., Yamaguchi, O., Hashimoto, A., Hikoso, S., Takeda, T., Oka, T., Yasui, H., Ueda, H., Akazawa, Y., Nakayama, H., Taneike, M., Misaka, T., Omiya, S., Shah, A. M., Yamamoto, A., Nishida, K., Ohsumi, Y., Okamoto, K., Sakata, Y., & Otsu, K. (2015). Bcl-2-like protein 13 is a mammalian Atg32 homologue that mediates mitophagy and mitochondrial fragmentation. *Nature Communications*, 6, 7527. <https://doi.org/10.1038/ncomms8527>
- Nakatogawa, H. (2020). Mechanisms governing autophagosome biogenesis. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 21(8), Article 8. <https://doi.org/10.1038/s41580-020-0241-0>
- Narendra, D. P., Jin, S. M., Tanaka, A., Suen, D.-F., Gautier, C. A., Shen, J., Cookson, M. R., & Youle, R. J. (2010). PINK1 is selectively stabilized on impaired mitochondria to activate Parkin. *PLoS Biology*, 8(1), e1000298. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1000298>

- Narendra, D., Tanaka, A., Suen, D.-F., & Youle, R. J. (2008). Parkin is recruited selectively to impaired mitochondria and promotes their autophagy. *The Journal of Cell Biology*, 183(5), 795-803. <https://doi.org/10.1083/jcb.200809125>
- Novak, I., Kirkin, V., McEwan, D. G., Zhang, J., Wild, P., Rozenknop, A., Rogov, V., Löhr, F., Popovic, D., Occhipinti, A., Reichert, A. S., Terzic, J., Dötsch, V., Ney, P. A., & Dikic, I. (2010). Nix is a selective autophagy receptor for mitochondrial clearance. *EMBO Reports*, 11(1), 45-51. <https://doi.org/10.1038/embor.2009.256>
- Oku, M., & Sakai, Y. (2018). Three Distinct Types of Microautophagy Based on Membrane Dynamics and Molecular Machineries. *BioEssays: News and Reviews in Molecular, Cellular and Developmental Biology*, 40(6), e1800008. <https://doi.org/10.1002/bies.201800008>
- Osawa, T., Kotani, T., Kawaoka, T., Hirata, E., Suzuki, K., Nakatogawa, H., Ohsumi, Y., & Noda, N. N. (2019). Atg2 mediates direct lipid transfer between membranes for autophagosome formation. *Nature Structural & Molecular Biology*, 26(4), 281-288. <https://doi.org/10.1038/s41594-019-0203-4>
- Ott, C., König, J., Höhn, A., Jung, T., & Grune, T. (2016). Macroautophagy is impaired in old murine brain tissue as well as in senescent human fibroblasts. *Redox Biology*, 10, 266-273. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2016.10.015>
- Pajares, M., Rojo, A. I., Arias, E., Díaz-Carretero, A., Cuervo, A. M., & Cuadrado, A. (2018). Transcription factor NFE2L2/NRF2 modulates chaperone-mediated autophagy through the regulation of LAMP2A. *Autophagy*, 14(8), 1310-1322. <https://doi.org/10.1080/15548627.2018.1474992>
- Palmieri, M., Impey, S., Kang, H., di Ronza, A., Pelz, C., Sardiello, M., & Ballabio, A. (2011). Characterization of the CLEAR network reveals an integrated control of cellular clearance pathways. *Human Molecular Genetics*, 20(19), 3852-3866. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddr306>
- Park, C., Suh, Y., & Cuervo, A. M. (2015). Regulated degradation of Chk1 by chaperone-mediated autophagy in response to DNA damage. *Nature Communications*, 6, 6823. <https://doi.org/10.1038/ncomms7823>
- Pyo, J.-O., Yoo, S.-M., Ahn, H.-H., Nah, J., Hong, S.-H., Kam, T.-I., Jung, S., & Jung, Y.-K. (2013). Overexpression of Atg5 in mice activates autophagy and extends lifespan. *Nature Communications*, 4(1), Article 1. <https://doi.org/10.1038/ncomms3300>
- Ramya, V., & Rajasekharan, R. (2016). ATG15 encodes a phospholipase and is transcriptionally regulated by YAP1 in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Letters*, 590(18), 3155-3167. <https://doi.org/10.1002/1873-3468.12369>
- Rodríguez-Muela, N., Koga, H., García-Ledo, L., de la Villa, P., de la Rosa, E. J., Cuervo, A. M., & Boya, P. (2013). Balance between autophagic pathways preserves retinal homeostasis. *Aging Cell*, 12(3), 478-488. <https://doi.org/10.1111/acer.12072>
- Sagan, L. (1967). On the origin of mitosing cells. *Journal of Theoretical Biology*, 14(3), 255-274. [https://doi.org/10.1016/0022-5193\(67\)90079-3](https://doi.org/10.1016/0022-5193(67)90079-3)
- Sahu, R., Kaushik, S., Clement, C. C., Cannizzo, E. S., Scharf, B., Follenzi, A., Potolicchio, I., Nieves, E., Cuervo, A. M., & Santambrogio, L. (2011). Microautophagy of cytosolic proteins by late endosomes. *Developmental Cell*, 20(1), 131-139. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2010.12.003>
- Sawa-Makarska, J., Baumann, V., Coudeville, N., von Bülow, S., Nogellova, V., Abert, C., Schuschnig, M., Graef, M., Hummer, G., & Martens, S. (2020). Reconstitution of autophagosome nucleation defines Atg9 vesicles as seeds for membrane formation. *Science (New York, N.Y.)*, 369(6508), eaaz7714. <https://doi.org/10.1126/science.aaz7714>
- Schneider, J. L., Suh, Y., & Cuervo, A. M. (2014). Deficient chaperone-mediated autophagy in liver leads to metabolic dysregulation. *Cell Metabolism*, 20(3), 417-432. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2014.06.009>

- Settembre, C., & Perera, R. M. (2023). Lysosomes as coordinators of cellular catabolism, metabolic signalling and organ physiology. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 1-23. <https://doi.org/10.1038/s41580-023-00676-x>
- Settembre, C., Zoncu, R., Medina, D. L., Vetrini, F., Erdin, S., Erdin, S., Huynh, T., Ferron, M., Karsenty, G., Vellard, M. C., Facchinetti, V., Sabatini, D. M., & Ballabio, A. (2012). A lysosome-to-nucleus signalling mechanism senses and regulates the lysosome via mTOR and TFEB. *The EMBO Journal*, 31(5), 1095-1108. <https://doi.org/10.1038/emboj.2012.32>
- Singh, A., Azad, M., Shymko, M. D., Henson, E. S., Katyal, S., Eisenstat, D. D., & Gibson, S. B. (2018). The BH3 only Bcl-2 family member BNIP3 regulates cellular proliferation. *PLoS ONE*, 13(10). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0204792>
- Smirnova, E., Griparic, L., Shurland, D. L., & van der Bliek, A. M. (2001). Dynamin-related protein Drp1 is required for mitochondrial division in mammalian cells. *Molecular Biology of the Cell*, 12(8), 2245-2256. <https://doi.org/10.1091/mbc.12.8.2245>
- Spinelli, J. B., & Haigis, M. C. (2018). The multifaceted contributions of mitochondria to cellular metabolism. *Nature Cell Biology*, 20(7), Article 7. <https://doi.org/10.1038/s41556-018-0124-1>
- Stepanyants, N., Macdonald, P. J., Francy, C. A., Mears, J. A., Qi, X., & Ramachandran, R. (2015). Cardiolipin's propensity for phase transition and its reorganization by dynamin-related protein 1 form a basis for mitochondrial membrane fission. *Molecular Biology of the Cell*, 26(17), 3104-3116. <https://doi.org/10.1091/mbc.E15-06-0330>
- Stephan, J. S., Yeh, Y.-Y., Ramachandran, V., Deminoff, S. J., & Herman, P. K. (2009). The Tor and PKA signaling pathways independently target the Atg1/Atg13 protein kinase complex to control autophagy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(40), 17049-17054. <https://doi.org/10.1073/pnas.0903316106>
- Strappazzon, F., Nazio, F., Corrado, M., Cianfanelli, V., Romagnoli, A., Fimia, G. M., Campello, S., Nardacci, R., Piacentini, M., Campanella, M., & Cecconi, F. (2015). AMBRA1 is able to induce mitophagy via LC3 binding, regardless of PARKIN and p62/SQSTM1. *Cell Death and Differentiation*, 22(3), 419-432. <https://doi.org/10.1038/cdd.2014.139>
- Takahashi, Y., He, H., Tang, Z., Hattori, T., Liu, Y., Young, M. M., Serfass, J. M., Chen, L., Gebru, M., Chen, C., Wills, C. A., Atkinson, J. M., Chen, H., Abraham, T., & Wang, H.-G. (2018). An autophagy assay reveals the ESCRT-III component CHMP2A as a regulator of phagophore closure. *Nature Communications*, 9(1), 2855. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-05254-w>
- Tan, B. G., Gustafsson, C. M., & Falkenberg, M. (2023). Mechanisms and regulation of human mitochondrial transcription. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 1-14. <https://doi.org/10.1038/s41580-023-00661-4>
- Taylor, C. T., & Scholz, C. C. (2022). The effect of HIF on metabolism and immunity. *Nature Reviews Nephrology*, 18(9), Article 9. <https://doi.org/10.1038/s41581-022-00587-8>
- Thompson, L. M., Aiken, C. T., Kaltenbach, L. S., Agrawal, N., Illes, K., Khoshnan, A., Martinez-Vincente, M., Arrasate, M., O'Rourke, J. G., Khashwji, H., Lukacsovich, T., Zhu, Y.-Z., Lau, A. L., Massey, A., Hayden, M. R., Zeitlin, S. O., Finkbeiner, S., Green, K. N., LaFerla, F. M., ... Steffan, J. S. (2009). IKK phosphorylates Huntingtin and targets it for degradation by the proteasome and lysosome. *The Journal of Cell Biology*, 187(7), 1083-1099. <https://doi.org/10.1083/jcb.200909067>
- Uoselis, L., Nguyen, T. N., & Lazarou, M. (2023). Mitochondrial degradation: Mitophagy and beyond. *Molecular Cell*, 83(19), 3404-3420. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2023.08.021>
- Valdor, R., Mocholi, E., Botbol, Y., Guerrero-Ros, I., Chandra, D., Koga, H., Gravekamp, C., Cuervo, A. M., & Macian, F. (2014). Chaperone-mediated autophagy regulates T cell responses through targeted degradation of negative regulators of T cell activation. *Nature Immunology*, 15(11), 1046-1054. <https://doi.org/10.1038/ni.3003>

- Valverde, D. P., Yu, S., Boggavarapu, V., Kumar, N., Lees, J. A., Walz, T., Reinisch, K. M., & Melia, T. J. (2019). ATG2 transports lipids to promote autophagosome biogenesis. *The Journal of Cell Biology*, 218(6), 1787-1798. <https://doi.org/10.1083/jcb.201811139>
- Villarejo-Zori, B., Jiménez-Loygorri, J. I., Zapata-Muñoz, J., Bell, K., & Boya, P. (2021). New insights into the role of autophagy in retinal and eye diseases. *Molecular Aspects of Medicine*, 82, 101038. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2021.101038>
- Wang, L., Klionsky, D. J., & Shen, H.-M. (2023). The emerging mechanisms and functions of microautophagy. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 24(3), Article 3. <https://doi.org/10.1038/s41580-022-00529-z>
- Wang, Z., Miao, G., Xue, X., Guo, X., Yuan, C., Wang, Z., Zhang, G., Chen, Y., Feng, D., Hu, J., & Zhang, H. (2016). The Vici Syndrome Protein EPG5 Is a Rab7 Effector that Determines the Fusion Specificity of Autophagosomes with Late Endosomes/Lysosomes. *Molecular Cell*, 63(5), 781-795. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2016.08.021>
- Watson, R. O., Manzanillo, P. S., & Cox, J. S. (2012). Extracellular *M. tuberculosis* DNA targets bacteria for autophagy by activating the host DNA-sensing pathway. *Cell*, 150(4), 803-815. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.06.040>
- Wei, Y., Chiang, W.-C., Sumpter, R., Mishra, P., & Levine, B. (2017). Prohibitin 2 Is an Inner Mitochondrial Membrane Mitophagy Receptor. *Cell*, 168(1-2), 224-238.e10. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.11.042>
- Westermann, B. (2010). Mitochondrial fusion and fission in cell life and death. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 11(12), Article 12. <https://doi.org/10.1038/nrm3013>
- Wilhelm, L. P., Zapata-Muñoz, J., Villarejo-Zori, B., Pellegrin, S., Freire, C. M., Tøye, A. M., Boya, P., & Ganley, I. G. (2022). BNIP3L/NIX regulates both mitophagy and pexophagy. *The EMBO Journal*, 41(24), e111115. <https://doi.org/10.15252/embj.2022111115>
- Yamamoto, H., Zhang, S., & Mizushima, N. (2023). Autophagy genes in biology and disease. *Nature Reviews. Genetics*, 24(6), 382-400. <https://doi.org/10.1038/s41576-022-00562-w>
- Yamano, K., & Youle, R. J. (2013). PINK1 is degraded through the N-end rule pathway. *Autophagy*, 9(11), 1758-1769. <https://doi.org/10.4161/auto.24633>
- Zhou, F., Wu, Z., Zhao, M., Murtazina, R., Cai, J., Zhang, A., Li, R., Sun, D., Li, W., Zhao, L., Li, Q., Zhu, J., Cong, X., Zhou, Y., Xie, Z., Gyurkovska, V., Li, L., Huang, X., Xue, Y., ... Segev, N. (2019). Rab5-dependent autophagosome closure by ESCRT. *The Journal of Cell Biology*, 218(6), 1908-1927. <https://doi.org/10.1083/jcb.201811173>