

Abstract

FAN (Factor Associated with Neutral sphingomyelinase activity) is a WD-repeat protein acting as an adaptor protein of the TNF-receptor. FAN harbors multiple conserved domains through which it binds to a range of interaction partners, among them F-actin and thereby the cytoskeleton as well as the phospholipid PI4,5P (phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate), which targets FAN to the plasma membrane. Over the past years, FAN has been shown to convey several effects in the TNF-signaling pathway. In this work, we investigate a hitherto undescribed function of FAN in a different signaling context. We show that FAN interacts with a number of proteins that play key roles in autophagy. We identify the distinct domains within FAN that are necessary for these interactions. Specific point mutations which we bring into FAN prevent binding of FAN to LC3/GABARAP proteins, but still enable the interaction of FAN with other members of the autophagic pathway and the selective autophagy adaptor protein p62, proving that FAN independently interacts with different members of the autophagic signaling cascade. Autophagy has been recognized as a major cellular defense mechanism against bacteria. We identify FAN as an important mediator of antibacterial autophagy in *Shigella flexneri* infections. FAN co-localizes with LC3/GABARAP1 and p62 at vacuole-like structures surrounding intracellular *Shigella flexneri*. By using MEF cells constitutively expressing LC3-GFP, we demonstrate through livecell imaging that *Shigella flexneri* escapes autophagy in FAN^{-/-}MEFs. FAN deficiency results in reduced decoration of *Shigella flexneri* by the autophagic proteins LC3 and p62, and consequently enhanced intracellular proliferation. Finally, we show that an intact LC3-interacting domain in FAN is crucial for confining the bacterial proliferation. Our data reveal a previously unrecognized role of FAN in selective autophagy, which is indispensable for control of *Shigella flexneri*-infection.

Zusammenfassung

FAN (Factor Associated with Neutral sphingomyelinase activity) ist ein Protein aus der Familie der WD-repeat Proteine. Erstmals beschrieben als Adapter-Protein des TNF-Rezeptors, konnten in den vergangenen Jahrzehnten die unterschiedlichsten Interaktionspartner identifiziert werden. Über seine konservierten Domänen kann FAN sowohl an F-Aktin und damit das Zytoskelett, als auch an das Phospholipid PI4,5P (Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat) und dadurch an die Plasmamembran binden. Die Forschung der letzten Jahrzehnte hat gezeigt, dass FAN unterschiedliche Effekte im TNF-Signalweg vermittelt. In dieser Arbeit wird untersucht, welche Rolle FAN in einem anderen Signalweg spielt, in dem bisher keine Funktion von FAN beschrieben wurde. Wir zeigen, dass FAN mit verschiedenen Proteinen, die Funktionen im Signalweg der Autophagie haben, interagiert. Wir identifizieren die Domänen innerhalb von FAN, die für diese Interaktionen nötig sind und zeigen, dass spezifische Punktmutationen die Bindung von FAN an LC3/GABARAP Proteine unterbinden können, während die Interaktion mit Proteinen der Konjugationskaskade und dem selektiven Adaptorprotein p62 davon nicht beeinflusst wird. Somit beweisen wir, dass die Interaktion mit mehreren Bestandteilen der Autophagie-Signalkaskade unabhängig voneinander stattfinden kann. Autophagie wurde in den letzten Jahren als wichtiger Bestandteil der zellautonomen Immunität beschrieben, insbesondere auch gegen das enteropathogene Bakterium *Shigella flexneri*. Unsere mikroskopischen Analysen zeigen, dass FAN mit den wichtigen autophagischen

Proteinen LC3 und p62 um intrazelluläre Bakterien kolokalisiert. FANnegative Zellen weisen eine gestörte Rekrutierung dieser Proteine zu intrazellulären *Shigella flexneri*-Bakterien auf. Durch die Verwendung von MEF (murine embryonale Fibroblasten)-Zellen, die stabil eine fluoreszente Variante von LC3 exprimieren, kann gezeigt werden, wie *Shigella flexneri*-Bakterien in FANnegativen Zellen der Erkennung durch Autophagie entkommen. Durch Analyse des zeitlichen Verlaufes einer Infektion kann gezeigt werden, dass FAN-negative Zellen wenige Stunden nach der Infektion mit deutlich erhöhten Zahlen lebender Bakterien befallen sind. Ebenso zeigen unsere Daten, dass die spezifische Interaktion von FAN mit LC3/GABARAP-Proteinen für diesen Effekt entscheidend ist.

Unsere Daten zeigen somit eine völlig neue Funktion von FAN im Prozess der selektiven Autophagie und damit eine Schlüsselrolle für die Abwehr gegen Infektionen durch *Shigella flexneri*.