

## Abstract

How eukaryotic cells sense and adjust the volume of their organelles, and specifically the mitochondria, remains unknown. To address this question, I assessed the function of mitophagy in modulating mitochondrial volume and employed fluorescence microscopy in the budding yeast *S. cerevisiae* to trace the physical size and morphology/topology of mitochondria over time. I used an established 3D reconstruction method to determine the volume of the mitochondrial networks, and to establish a connection between mitophagy capacity and the size of the mitochondrial network.

My findings reveal clear evidence that the mitophagy machinery functions to prune and reduce the mitochondrial network, and this is beyond its known role in quality control. Specifically, we find that under nitrogen starvation in the presence of glucose, cells will continuously undergo some level of mitochondrial biogenesis and initially expand their mitochondrial networks driven by non-selective macroautophagy. Mitochondria are then scaled back by receptor-mediated mitophagy. Mitophagy deficiency in the absence of the mitophagy receptor Atg32 or the adaptor Atg11, results in an expansion of the network with elevated total respiratory activity. However, these mitochondria are not intrinsically different than the mitochondria of WT cells based on metabolomic and proteomic analyses. Importantly, using a synthetically inducible mitophagy receptor, I could show that mitophagy is required and sufficient to reduce the network size of the mitochondria in nitrogen starving cells.

In summary, the data point towards a new layer of physiological function of the macroautophagy machinery by establishing a delicate balance between non-selective and selective autophagy in organelle homeostasis and volume control. If conserved, the process may facilitate a novel understanding of mitophagy in disease and ageing.

## **Zusammenfassung**

Wie eukaryotische Zellen das Volumen ihrer Organellen und insbesondere der Mitochondrien wahrnehmen und anpassen, ist unbekannt. Um diese Frage zu beantworten, untersuchte ich die Funktion der Mitophagie bei der Modulation des Mitochondrienvolumens und verwendete Fluoreszenzmikroskopie in der angehenden Hefe *S. cerevisiae*, um die physikalische Größe und Morphologie / Topologie der Mitochondrien über die Zeit zu verfolgen. Ich habe eine etablierte 3D-Rekonstruktionsmethode verwendet, um das Volumen der mitochondrialen Netzwerke zu bestimmen und einen Zusammenhang zwischen der Mitophagiekapazität und der Größe des mitochondrialen Netzwerks herzustellen.

Meine Ergebnisse zeigen eindeutige Beweise dafür, dass die Mitophagie-Maschinerie das mitochondriale Netzwerk beschneidet und reduziert, und dies geht über seine bekannte Rolle bei der Qualitätskontrolle hinaus. Insbesondere stellen wir fest, dass Zellen unter Stickstoffmangel in Gegenwart von Glukose kontinuierlich ein gewisses Maß an mitochondrialer Biogenese durchlaufen und zunächst ihre mitochondrialen Netzwerke erweitern, die durch nichtselektive Makroautophagie angetrieben werden. Mitochondrien werden dann durch Rezeptor-vermittelte Mitophagie zurückgefahren. Ein Mitophagie-Mangel in Abwesenheit des Mitophagie-Rezeptors Atg32 oder des Adapters Atg11 führt zu einer Erweiterung des Netzwerks mit erhöhter Gesamtatmungsaktivität. Diese Mitochondrien unterscheiden sich jedoch nicht wesentlich von den Mitochondrien von WT-Zellen, die auf metabolischen und proteomischen Analysen basieren. Wichtig ist, dass ich mit einem synthetisch induzierbaren Mitophagie-Rezeptor zeigen konnte, dass Mitophagie erforderlich und ausreichend ist, um die Netzwerkgröße der Mitochondrien in stickstoffarmen Zellen zu verringern.

Zusammenfassend deuten die Daten auf eine neue Schicht physiologischer Funktionen der Makroautophagie-Maschinerie hin, indem sie ein empfindliches Gleichgewicht zwischen nicht-selektiver und selektiver Autophagie bei der Organellenhomöostase und der Volumenkontrolle herstellen. Wenn er konserviert wird, kann der Prozess ein neuartiges Verständnis der Mitophagie bei Krankheit und Alterung erleichtern.