

ABSTRACT

Autophagy is a conserved degradative process activated in cells during starvation and other stresses. After initiation, small vesicles form and expand as cup-shaped membranes targeting portions of the cytoplasm or organelles for degradation in the vacuole/lysosome. Our current understanding proposes that, driven by *de novo* synthesis, millions of phospholipids are channeled by the membrane tether and phospholipid transfer protein Atg2 from the ER into the outer leaflet of the growing membrane and are then scrambled between leaflets by Atg9.

How cells ensure robust autophagosome biogenesis and autophagy in the presence of lipid or membrane stress has been unclear. In my work, I identified two small GTPases, Arl1 and Ypt6, and showed how they coordinate the dynamic recruitment, assembly, and interaction of Atg2 and Atg9, and confer critical robustness to phagophore expansion at ER contact sites in the presence of lipid stress.

Unpublished work from our group has shown that *ARL1* and *YPT6* are required for cell survival under moderate membrane stress. Interestingly, both, Arl1 and Ypt6 are susceptible to and lose their function in the presence of severe FA stress. Examining the effects on autophagy, I discovered that Arl1 and Ypt6 function specifically during phagophore expansion, because cells still formed functional autophagosomes in the absence of Arl1 and Ypt6, but with drastically reduced size significantly compromising autophagic capacity. Mechanistically, my data link this phagophore expansion defects to impaired recruitment and assembly of Atg2 and Atg9 at forming autophagosomes. I discovered that Ypt6 physically interacts with Atg2 via a Ypt6/Rab6 binding motif conserved from yeast to human. Mutating only two amino acids (*atg2*^{2LA}) within this motif impaired binding of Ypt6 and Atg2 and, in turn, reduced the interaction between Atg2 and Atg9 with severe consequences for phagophore expansion. Arl1 binds Atg2 downstream and in dependence of Ypt6. Strikingly, the integrity of the Ypt6/Rab6 binding motif was critically important to maintain phagophore expansion during moderate membrane stress.

Taken together, my data show the Arl1-Ypt6 module promotes phagophore expansion by coordinating the dynamic recruitment and interaction of Atg2 and Atg9 and confers critical robustness to autophagosome biogenesis in presence of membrane stress with broad implications of ageing and disease.

ZUSAMMENFASSUNG

Autophagie ist ein konservierter zellulärer Abbauprozess, der in der Abwesenheit von Nährstoffen und durch anderen Stressfaktoren aktiviert wird. Nach der Initiierung des Prozesses bilden sich anfänglich kleine Vesikel, die sich zu becherförmigen Membranen ausdehnen und Teile des Zytoplasmas oder von Organellen für den Abbau in der Vakuole/dem Lysosom einhüllen. Nach unserem derzeitigen Verständnis werden Millionen von de-novo synthetisierten Phospholipiden durch das Membranbinde- und Phospholipidtransfer-protein Atg2 von dem ER in die äußere Lipidschicht der wachsenden Phagophorenmembran transportiert und dann durch die Aktivität von Atg9 zwischen den beiden Lipidschichten der Membrane verteilt.

Wie Zellen eine robuste Autophagosomen-Biogenese und Autophagie in Gegenwart von Lipid- oder Membranstress sicherstellen, war bisher unklar. In meiner Arbeit habe ich zwei kleine GTPasen, Arl1 und Ypt6, identifiziert und gezeigt, wie sie die dynamische Rekrutierung, die Assemblierung und die Interaktion von Atg2 und Atg9 koordinieren und der Phagophorenexpansion an ER-Kontaktstellen in Gegenwart von Lipidstress kritische Robustheit verleihen.

Unveröffentlichte Arbeiten unserer Gruppe haben gezeigt, dass ARL1 und YPT6 für das Überleben der Zellen bei moderatem Membranstress erforderlich sind. Interessanterweise sind sowohl Arl1 als auch Ypt6 anfällig und verlieren ihre Funktion in Gegenwart von schwerem Fettsäure-Stress. Bei der Untersuchung der Auswirkungen auf die Autophagie entdeckte ich, dass Arl1 und Ypt6 speziell während der Phagophorenexpansion von Bedeutung sind, da die Zellen in Abwesenheit von Arl1 und Ypt6 immer noch funktionsfähige Autophagosomen bildeten, allerdings mit drastisch reduzierter Größe, was die autophagische Kapazität erheblich beeinträchtigte. Mechanistisch gesehen bringen meine Daten diesen Defekt bei der Phagophorenexpansion mit einer gestörten Rekrutierung und Assemblierung von Atg2 und Atg9 bei der Bildung von Autophagosomen in Verbindung. Ich entdeckte, dass Ypt6 mithilfe eines von der Hefe bis zum Menschen konservierten Ypt6/Rab6-Bindungsmotivs physisch mit Atg2 interagiert. Die Mutation von nur zwei Aminosäuren (atg22LA) innerhalb dieses Motivs beeinträchtigte die Bindung von Ypt6 und Atg2 und reduzierte als Folge die Interaktion zwischen Atg2 und Atg9, was schwerwiegende Folgen für die Ausdehnung der Phagophore hatte. Arl1 bindet Atg2 nachgelagert und nur in Abhängigkeit von Ypt6. Auffallend ist, dass die Integrität des Ypt6/Rab6-

Bindungsmotivs bei moderatem Membranstress für die Aufrechterhaltung der Phagophorenexpansion von entscheidender Bedeutung war.

Zusammengenommen zeigen meine Daten, dass das Arl1-Ypt6-Modul die Phagophorenexpansion fördert, indem es die dynamische Rekrutierung und Interaktion von Atg2 und Atg9 koordiniert und der Autophagosomen-Biogenese in Gegenwart von Membranstress kritische Robustheit verleiht, was weitreichende Auswirkungen auf Alterung und Krankheit hat.