

Abstract

Cells are continuously challenged by environmental or internal stresses, which are balanced by homeostasis processes that adapt the cellular composition to occurring demands. Macroautophagy is a highly conserved homeostasis process characterized by rapid sequestration of cytosolic cargo in double-membrane autophagosomes. After fusion of the outer autophagosomal membrane with the vacuole, inner vesicle and engulfed material are degraded by resident hydrolases and transported to the cytosol for new applications. Defects in macroautophagy have been associated with various diseases in humans. Mechanisms regulating the generation of dynamic and highly curved autophagic membranes resulting in the formation of autophagosomes are mainly unknown.

In this thesis, I identified a new class of conserved enzymes, acyl-CoA synthetases (ACS), which localize and function on autophagic membranes. ACS link acyl-chains to CoA in an ATP-dependent thioesterification reaction, generating bioavailable, cellular acyl-CoA pools. Functional analyzes of yeast ACS Faa1 and human ACSL4 identified that local fatty acid activation on the autophagic membrane was required for autophagy. Faa1 associates with the autophagic membrane at early stages until degradation in the vacuole. Using time-lapse imaging, I found a function of Faa1 for efficient autophagic membrane expansion frequency, growth rate, and maximal size. Additionally, lipidomic analysis revealed that the composition of autophagic membranes with a high content of unsaturated and short acyl-chains was Faa1-dependent. This acyl-chain composition was consistent with dynamic and flexible membrane properties beneficial for rapid *de novo* formation of autophagosomes in yeast.

I propose that dynamic, local and direct acyl-CoA channeling at the autophagic membrane modulates the lipid composition and therefore the physicochemical properties of growing autophagic membranes. These defined membrane characteristics promote and are rate-limiting for the extent of autophagy in the cell. This is the first study providing strong evidence for an interface of lipid metabolism components, consisting of redundant ACS networks, and AP biogenesis. ACS locally promote autophagosome formation by modulating as well as generating autophagic membranes with specified compositions.

Zusammenfassung

Zellen werden fortwährend durch unterschiedliche Reize herausgefordert. Solche extra- und intrazelluläre Stresse werden durch Homöostase-Prozesse ausgeglichen und passen die zelluläre Zusammensetzung an die auftretenden Anforderungen an. Makroautophagie ist ein hochkonservierter zellulärer Homöostase-Prozess, der durch die schnelle Umschließung von cytosolischen Komponenten in einem sich bildenden Doppelmembran-Autophagosom charakterisiert ist. Nach der Fusion der äußeren Autophagosom-Membran mit der Vakuole wird das innere Vesikel mitsamt dem umschlossenen Material durch vakuoläre Hydrolasen abgebaut. Durch den Abbau gewonnene Bausteine können für biologische Prozesse oder Neusynthese von Makromolekülen in Zytosol verwendet werden.

Defekte in der Makroautophagie sind mit verschiedenen Krankheiten beim Menschen assoziiert. Die molekularen Mechanismen, die der dynamischen Bildung einer stark gekrümmten autophagosomalen Membran und schließlich eines gereiften Autophagosoms zugrunde liegen, sind weitgehend unbekannt. In dieser Arbeit habe ich konservierte Acyl-CoA-Synthetasen (ACS) identifiziert, die auf den autophagosomalen Membranen lokalisieren und wichtige Funktionen erfüllen. ACS verknüpfen Fettsäuren mit Coenzym-A in einer ATP-abhängigen Thioveresterungsreaktion und erzeugen bioverfügbares zelluläres Acyl-CoA. Eine funktionelle Analyse der ACS Faa1 aus Hefe und der humanen ACSL4 zeigte, dass eine effiziente Autophagosomenbildung von lokaler Fettsäureaktivierung auf der autophagosomalen Membran abhängt. Weiterhin wurde eine Lokalisierung von Faa1 an der autophagosomalen Membran beginnend in den frühen Stadien bis zum Abbau des Autophagosoms in der Vakuole nachgewiesen. Eine zeitabhängige Analyse zeigte, dass Faa1 für eine effiziente Expansionsfrequenz und Wachstumsrate sowie für die maximale Größe der autophagosomalen Membranen notwendig ist. Untersuchungen der autophagosomalen Phospholipide identifizierten eine Faa1-abhängige Membranzusammensetzung. Es wurde ein hoher Gehalt an ungesättigten und kurzen Fettsäureketten festgestellt, der generell mit dynamischen und flexiblen Membraneigenschaften in Verbindung gebracht werden kann, und somit wahrscheinlich eine schnelle und produktive Bildung von Autophagosomen fördert. Auf Grundlage der dargestellten Daten, schlage ich ein Model vor, in dem die lokale und direkte Aktivierung von Fettsäuren an der wachsenden autophagosomalen Membran die Lipidzusammensetzung und damit die physikalisch-chemischen

Eigenschaften der autophagosomalen Membran moduliert, um die Autophagosom-Biogenese zu fördern.

Dies ist eine erste Studie, die eine direkte Verbindung zwischen den Komponenten des Lipidstoffwechsels, bestehend aus redundanten ACS-Netzwerken, und der Autophagie darstellt, und somit neue Richtungen in der Autophagieforschung eröffnet.