

ZUSAMMENFASSUNG

Lipidtröpfchen (LDs) sind konservierte Organellen, die an der intrazellulären Speicherung von neutralen Lipiden beteiligt sind. Neuere Studien legen nahe, dass LDs als direkte Lipidquellen für die Autophagie fungieren. Autophagie ist ein hoch konservierter kataboler Prozess und eine wichtige Stressantwort um die zellulären Homöostase aufrecht zu erhalten. Die Autophagie ist durch *de-novo* Bildung von Autophagosomen (APs) gekennzeichnet. Diese Doppelmembran-Vesikel nehmen Substrate auf und transportieren sie zum Abbau in die Vakuole / Lysosom. Der Ursprung und der Ausdehnungsmechanismus der autophagosomalen Membranen sind nur wenig erforscht. Daher ist es für das Gebiet besonders relevant, diese offenen Fragen zu untersuchen. Während dieser Arbeit konnte ich zeigen, dass LDs als Membranquelle für die Bildung von Autophagosomen zwar entbehrlich sind, aber zwei wichtige Funktionen für die Autophagie-Regulation besitzen. 1) Die Aufrechterhaltung der zellulären Phospholipid-Homöostase; 2) Das Puffern der *de-novo* Fettsäuresynthese. Mit biochemischen, zytologischen, genetischen und lipidomischen Ansätzen habe ich die funktionelle Rolle von LDs für die Autophagie in der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* untersucht. Durch die Analyse von Hefezellen, denen die Fähigkeit zur Bildung von LDs fehlt, fand ich heraus, dass LD-Mangel umfangreiche Veränderungen der Membran- und Lipidhomöostase, durch morphologische Veränderungen im ER, erhöhten ER-Stress und verringerte FA-Resistenz, verursacht. Dieses führt zu einer gestörten Autophagie und mindert die Überlebensfähigkeit der Zellen unter Nährstoffmangel. Wichtig ist, dass die metabolisch korrigierte Phospholipidzusammensetzung und die verbesserte FA-Resistenz in Abwesenheit von LDs die Autophagie und das Zellüberleben wiederherstellen, was die Entbehrlichkeit von LDs demonstriert. Um zu untersuchen, welche molekularen Mechanismen, unter der Abwesenheit von Lds, zur Autophagie führen, wurde eine synthetische genetische Array - Analyse in LD defizienten Zellen durchgeführt. Dabei wurde ein Cluster von konservierten Genen gefunden, die mit dem frühen sekretorischen Signalweg assoziiert werden. Von besonderem Interesse war die Identifizierung der kleinen Golgi-GTPase Arl1, die die AP-Bildung erleichtert. Die zytologische Analyse von LD-defizienten Zellen zeigte einen Defekt in der Arl1-Rekrutierung zum Golgi. Wichtig ist, dass eine verbesserte FA-Resistenz die Arl1-Rekrutierung an den Golgi rettete, was FA-Stress mit Veränderungen im frühen sekretorischen Pfad verbindet. Zusammenfassend liefert diese Arbeit neue Einblicke in die komplexe Wechselbeziehung zwischen LD-vermittelter Lipidhomöostase und Autophagie-Regulation, die möglicherweise

für ein besseres Verständnis der molekularen Mechanismen, die zu Lipid-Stress-assoziierten und metabolischen Erkrankungen führen, relevant ist.

SUMMARY

Lipid droplets (LDs) are conserved organelles dedicated to intracellular neutral lipid storage. Recent studies have suggested that LDs function as direct lipid sources for autophagy, a highly conserved catabolic process and stress response maintaining cellular homeostasis. Autophagy is characterized by *de novo* formation of autophagosomes (APs), double membrane vesicles that engulf and deliver cargo for degradation to the vacuole/lysosome. However, origin and expansion of autophagosomal membranes remains unclear. In this thesis, I have demonstrated that LDs are dispensable as membrane source for autophagosome formation, but instead fulfil two critical functions for autophagy regulation: maintaining cellular phospholipid homeostasis and buffering *de novo* fatty acid (FA) synthesis. Using biochemical, cytological, genetic, and lipidomic approaches, I dissected the functional role of LDs for autophagy in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Through the analysis of yeast cells lacking the ability to form LDs, I found that LD-deficiency causes severe alterations in membrane and lipid homeostasis, which manifest in morphological changes and chronic stress in the ER, and decreased FA resistance, together causing defective autophagy and compromised cell survival under nutrient stress. Importantly, metabolically corrected phospholipid composition and improved FA resistance in the absence of LDs cure autophagy defects and cell survival. In order to unravel the molecular mechanisms underlying autophagy impairment in the absence of LDs, a synthetic genetic array analysis in LD-deficient cells was performed and revealed a cluster of conserved genes functionally linked to the early secretory pathway and autophagy. Of note, the gene cluster centred on the small Arf-like GTPase Arl1 previously implicated in autophagy. Cytological analysis of LD-deficient cells revealed specific defects in the dynamic Arl1 localization to the Golgi, rescued by improved FA resistance connecting FA stress with alterations in the early secretory pathway. Together, this thesis provides novel insights into the complex interrelation between LD-mediated lipid homeostasis and autophagy regulation, likely relevant for understanding the molecular mechanisms underlying lipid stress-associated and metabolic diseases.