



JOHANNES GUTENBERG
UNIVERSITÄT MAINZ

Der Einfluss von Sphingomyelin auf die Autophagie in Abhängigkeit von ATG9A und RNA als Autophagiesubstrat

Dissertation

Zur Erlangung des Grades
Doktor der Naturwissenschaften

Am Fachbereich Biologie
Der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Pascale Henning-Domres, geb. Henning
geboren am 22.04.1991 in Rodewisch

Mainz, 2025

Nachnutzungslizenz

CC-BY-NC-SA-4.0

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Hans Zischler

1. Berichterstatter:

2. Berichterstatter:

Tag der mündlichen Prüfung: 10.03.2026

Die vorliegende Dissertation wurde am Institut für Pathobiochemie der Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität Mainz unter Anregung und Anleitung von Univ.-Prof. _____ und _____ angefertigt in Assoziation mit dem Sonderforschungsbereich 1177 „Molekulare und funktionale Charakterisierung der selektiven Autophagie“ gefördert durch den DFG, Projektnummer 259130777.

Teile der wesentlichen Aspekte dieser Arbeit wurden in den folgenden wissenschaftlichen Publikationen veröffentlicht:

- Schmitt et al. (2022) in EMBO Reports [EMBO Press]
- Schmitt et al. (2023) in Autophagy [Taylor&Francis Group]

Für meinen Mann,
mein Fels.

Für meine Kinder,
mein Licht.

Für mich.

In Gedenken an _____,
eine der stärksten Frauen, der ich je begegnet durfte.
Ohne dich wäre ich nicht hier und nicht die Frau, die ich heute bin.

In Erinnerung an all die Leben,
die viel zu früh enden mussten.

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich, die vorliegende Dissertation selbstständig verfasst und ausschließlich mit den angegebenen und ausgewiesenen Hilfsmitteln und Quellen angefertigt zu haben.

Mainz, 31.10.2025

Pascale Henning-Domres

„Überhaupt niemand gewinnt [...]. Ende. Es gibt Überlebende, keine Gewinner.“¹
Haymitch Abernathy

¹ Lawrence, 2013, 00:46:25-00:46:35

Zusammenfassung

Die Makroautophagie/Autophagie stellt einen der wichtigsten, adaptierbaren Degradationswege zur Aufrechterhaltung der Zellhomöostase dar. Abzubauenendes Material wird in ein doppelmembranöses Vesikel, das Autophagosom, eingeschlossen, welches mit den Lysosomen fusioniert, damit das im Autophagosom verpackte Substrat abgebaut und die Nährstoffe recycelt werden. Autophagosomen werden *de novo* über eine Vorläuferstruktur, die Phagophore, gebildet. Während des Wachstums wird abzubauenendes Substrat, wie beispielsweise verschiedene RNA-Typen, in die Phagophore eingeschlossen. Dabei ist die Bildung der Autophagosomen stark abhängig von der Lipidverfügbarkeit. Hauptversorger der Phagophore mit Lipiden ist das ER, von dem die Lipidtransferasen ATG2A und ATG2B Lipide direkt vom ER an die Phagophore transferieren. Lipidtröpfchen liefern Fettsäuren ins ER für die Synthese verschiedener Membranlipide und sind somit ein indirekter Lipidlieferant. Die Mobilisation der Fettsäuren ist abhängig von RAB18, welches in seiner aktiven Form die Fusion von Lipidtröpfchen und ER unterstützt. Auch andere Zellkompartimente versorgen die Phagophore mit Lipiden. Dazu zählen unter anderem das endosomale System, der Golgi-Apparat und vor allem ATG9A-positive Vesikel. Die ATG9A-positiven Vesikel nehmen dabei eine besondere Funktion ein, da sie nicht nur Lipide und Proteine liefern, sondern selbst als Keim der Phagophore dienen. Außerdem weist ATG9A eine Skramblase-Aktivität auf, die die gleichmäßige Verteilung der Lipide über die Lipiddoppelschicht gewährleistet.

Im Zuge dieser Arbeit wurde gezeigt, dass das Membranlipid Sphingomyelin, welches als Bestandteil der autophagosomalen Membran identifiziert wurde, die Autophagie positiv moduliert. Sowohl unter basalen als auch Autophagie-induzierenden Bedingungen steigerte Sphingomyelin die autophagische Aktivität weiter. Diese Modulation war abhängig vom ATG9A-positiven Vesikeltransfer. Der transiente Verlust von ATG9A sowie die Inhibierung des ATG9A-positiven Vesikeltransfer verhinderte eine Modulation der autophagischen Aktivität durch Sphingomyelin. Ferner moduliert Sphingomyelin die autophagische Aktivität positiv in *Knock-Out*-Modellen von ATG2A/B und RAB18, in denen die Lipidhomöostase der Zellen stark beeinträchtigt war und die beide durch eine negative autophagische Aktivität charakterisiert waren.

Zusätzlich wurde das Isolationsprotokoll für Autophagosomen optimiert und anschließend erstmals RNA aus Autophagosomen isoliert. Es konnte ribosomale RNA sowie die SRP-assoziierte RNA in Autophagosomen nachgewiesen werden, allerdings keine mRNA-Moleküle und keine nukleäre RNA.

Zusammenfassend wurde die Bedeutung von Sphingomyelin für die Synthese und Funktion der Autophagosomenmembran verdeutlicht und zudem mit der RNA eine weitere Cargo-Komponente aus Autophagosomen isoliert.

Summary

Macroautophagy/autophagy describes a highly adaptive degradative pathway important for eukaryotic cell homeostasis. During autophagy degradable substrates are engulfed in a double membranous vesicle, the autophagosome, that fuses with lysosomes for degradation and recycling of nutrients. Each autophagosome is synthesized *de novo* via its precursor, the phagophore. During its elongation, the phagophore engulfs different types of substrates, including nucleic acids like the RNA. Since every autophagosome is newly synthesized, the formation is highly dependent on the lipid availability. Main supplier of the phagophore with lipids is the ER, from which lipids are shuttled to the growing phagophore membrane by the lipid transferases ATG2A and ATG2B. Lipid droplets support the synthesis of membrane lipids by the mobilization of fatty acids. RAB18, a small RAB-GTPase, is very important as it works as a tether to support the fusion of Lipid Droplets with the ER and therefore the mobilization of fatty acids. Additionally, other cell compartments like the endosomal system, the Golgi and ATG9A positive vesicles are lipid sources. Especially ATG9A positive vesicles play a crucial role in the formation of the phagophore because they do not only supply lipids and proteins but serve also as a seed for the phagophore. Furthermore, ATG9A is a lipid scramblase and therefore important for the proper distribution of lipids across the membrane leaflets.

This work showed now that the membrane lipid sphingomyelin, that was identified as a component of the autophagosomal membrane, positively modulated autophagic activity. Under basal and under autophagy-inducing conditions sphingomyelin was capable to enhance autophagic activity further on. This modulation was dependent on ATG9A positive vesicle trafficking. The transient knock-down as well as the impairment of ATG9A positive vesicle trafficking abolished the positive effect of Sphingomyelin on autophagic activity. Furthermore, sphingomyelin enhanced autophagic activity in ATG2A/B KO-cells as well as in RAB18 KO-cells, which both showed a negative autophagic activity due to the disturbed cellular lipid homeostasis.

Next, the isolation protocol for autophagosomes was optimized and RNA was isolated out of autophagosomes for the first time. Ribosomal RNA and SRP associated RNA were detected within autophagosomes, but mRNA and nuclear RNA were excluded.

Taken together, the relevance of sphingomyelin in the biogenesis and functionality of autophagosomes was pointed out and additional RNA as a further autophagosomal cargo was isolated out of autophagosomes.

Inhaltsverzeichnis

ZUSAMMENFASSUNG

SUMMARY

INHALTSVERZEICHNIS	A
1 EINLEITUNG	1
1.1 Die Makroautophagie	1
1.2 Die <i>de novo</i> Synthese des Autophagosoms	3
1.2.1 Initiierung der Autophagie und Keimung der Phagophore	3
1.2.2 Elongation der Phagophorenmembran.....	5
1.2.3 Die Reifung der Autophagosomen und die Fusion zum Autolysosom	15
1.3 Cargosortierung zum Autophagosom	17
1.3.1 SQSTM1 Plattformen initiieren die Phagophorenbildung.....	18
1.3.2 Nukleinsäuren werden autophagisch abgebaut.....	18
1.4 Das Proteasom steht in engem Kontakt zur Autophagie.....	20
1.5 Vorrangegangene Studien und Zielsetzung der Arbeit.....	21
2 MATERIAL UND METHODEN	23
2.1 Methoden	23
2.1.1 Mikrobiologische Arbeiten	23
2.1.2 Zellbiologische Arbeiten	23
2.1.3 Biochemische Arbeiten	27
2.1.4 Molekularbiologische Arbeiten	39
2.1.5 RNA-Isolation aus autophagischen Vesikeln.....	40
2.1.6 Auswertung und Statistik.....	43
2.2 Materialien.....	45
2.2.1 Geräte.....	45
2.2.2 Chemikalien und Kits	46
2.2.3 Antikörper und Farbstoffe.....	49
2.2.4 Organismen	51
2.2.5 Oligonukleotide	52
2.2.6 EDV-Programmen und Online-Werkzeuge.....	53
3 ERGEBNISSE	55

3.1	Sphingomyelin ist Bestandteil der autophagosomalen Membran und beeinflusst die Autophagie in HeLa-Zellen.....	55
3.1.1	Sphingomyelin ist Bestandteil von autophagischen Vesikeln.....	56
3.1.2	Sphingomyelin ist ein positiver Modulator der Autophagie	62
3.1.3	Sphingomyelin induziert den autophagischen Flux über einen ATG9A-abhängigen Mechanismus.....	67
3.2	Der Verlust von ATG9A sowie ATG2A und ATG2B inhibiert die Autophagie bereits unter basalen Bedingungen	72
3.2.1	Der Verlust von ATG2A und ATG2B sowie der Verlust von ATG9A resultieren in einer veränderten autophagischen Aktivität.....	73
3.2.2	Der Verlust von ATG9A beeinflusst die lysosomale Funktion, der Verlust von ATG2A/B nicht.....	78
3.2.3	Die Regulation von ATG9A in ATG2A/B KO- und RAB18 KO-Zellen	81
3.3	Sphingomyelin moduliert die autophagische Aktivität auch in Autophagie-gestörten Modellen	85
3.4	Anpassungen des Isolationsprotokolles ermöglichen die Isolation distinkterer Autophagosomen-Populationen und auch anderer Organellen	89
3.4.1	Fluoreszenzgekoppelte Lipide sind ein zusätzlicher Marker für Autophagosomen	90
3.4.2	Der Verlust von ATG9A verhindert die Aufreinigung autophagischer Vesikel	91
3.4.3	Optimierungen der Isolation ermöglichen die Aufreinigung reiner Autophagosomen	93
3.4.4	Isolation von Lysosomen mittels Durchflusszytometrie.....	96
3.5	Isolation von RNA aus Autophagosomen	98
3.5.1	Zahlreiche Autophagiesubstrate sind RNA-bindende Proteine	98
3.5.2	RNA-Isolation aus Autophagosomen	102
4	DISKUSSION.....	105
4.1	Sphingomyelin ist unerlässlich für die Autophagie	105
4.1.1	Sphingomyelin moduliert die autophagische Aktivität in Abhängigkeit von ATG9A-positiven Vesikeln	108
4.1.2	In Modellen mit adaptierter ATG9A-Aktivität und gestörter Lipidhomöostase moduliert Sphingomyelin die Autophagie positiv	113
4.1.3	Ausblick	115
4.2	Anpassungen des Isolationsprotokolls.....	116
4.2.1	Die Isolation von Autophagosomen aus KO-Modellen.....	117

4.2.2	Die Isolation von Lysosomen ermöglicht ein besseres Verständnis der Fusion von Autophagosomen und Lysosomen	119
4.2.3	Isolation von autophagosomalen Membranen.....	121
4.3	RNA und RNA-bindende Proteine werden autophagosomal abgebaut.....	122
4.3.1	Das Lipidprofil von Autophagosomen im Kontext der Substrat- und der Fusionspezifität.....	126
5	REFERENZEN	128
5.1	Literaturverzeichnis	128
5.2	Weitere Referenzen	146
6	ANHANG	I
6.1	Abkürzungen	I
6.1.1	Abkürzungen für Bezeichnungen	I
6.1.2	Einheiten und Maße.....	IV
6.2	Abbildungsverzeichnis.....	VI
6.3	Tabellenverzeichnis.....	XV
6.4	Publikationen.....	XVI
6.5	Posterpräsentationen	XVI
6.6	Danksagung	XVII
6.7	Lebenslauf.....	XVIII

1 Einleitung

Die Autophagie ist ein Degradationsprozess in Eukaryoten, der für die Homöostase der Zelle von großer Bedeutung ist. Sie ist durch den hydrolytischen Abbau zahlreicher unterschiedlicher Substrate in einem sauren Verdauungsorganell charakterisiert – bei Wirbeltieren findet der Abbauprozess im Lysosom, bei Pflanzen und Pilzen in der Vakuole statt (Seglen & Bohley, 1992). Unter basalen Bedingungen findet die Autophagie zur Aufrechterhaltung der zellulären Homöostase statt und wird unter Stressbedingungen wie Nährstoffmangel noch verstärkt (Lum *et al*, 2005; Musiwaro *et al*, 2013). Insgesamt werden drei unterschiedliche autophagische Prozesse differenziert, die sich in der Art des Transportes des zu degradierenden Materials in das Lysosom unterscheiden (Aman *et al*, 2021).

Die Mikroautophagie (Abbildung 1A) beschreibt einen Pinozytose-ähnlichen Prozess, bei dem Substrate direkt von Lysosomen aufgenommen werden (De Duve & Wattiaux, 1966). Die Chaperon-vermittelte Autophagie (CMA) zeichnet sich durch den aktiven Transport eines Substrates über Transmembranproteine in das Lysosom aus (Abbildung 1C). Hierbei erkennt ein Chaperonkomplex ein abzubauenendes Proteinsubstrat über die exponierte Aminosäuresequenz KFERQ (Chiang *et al*, 1989) und interagiert anschließend mit LAMP2A (*lysosomal associated membrane protein 2A*). Dadurch wird das abzubauenende Protein zunächst entfaltet und dann ins Lysosom überführt (Bandyopadhyay *et al*, 2008; Cuervo & Wong, 2014). Auch Nukleinsäuren werden über ihre direkte Interaktion mit LAMP2C und SIDT2 (*systemic RNA-interference deficient-1 transmembrane family, member 2*) für ihre Degradation ins Lysosom transportiert (Aizawa *et al*, 2016; Fujiwara *et al*, 2013).

Die dritte Form der Autophagie ist die Makroautophagie, die wegen des großen Portfolios an potenziellen Substraten und der sensiblen Regulation unter Stressbedingungen die bedeutendste Variante darstellt (Abbildung 1B). Sie ist charakterisiert durch die Bildung eines doppelmembranösen Vesikels, des Autophagosoms, das einzelne Moleküle bis hin zu makromolekularen Substraten und Organellen in sich einschließt (Mizushima *et al*, 2001). Für den Abbau des eingeschlossenen Substrates fusionieren Autophagosomen mit den Verdauungsorganellen (Hollenstein & Kraft, 2020; Noda, 2024; Zhao & Zhang, 2019).

1.1 Die Makroautophagie

Die Makroautophagie, im Folgenden als Autophagie bezeichnet, ist ein eukaryontischer lysosomaler Abbauweg, im Zuge dessen abzubauenendes zelluläres Material in ein doppelmembranöses, *de novo* synthetisiertes Vesikel, das Autophagosom, eingeschlossen wird.

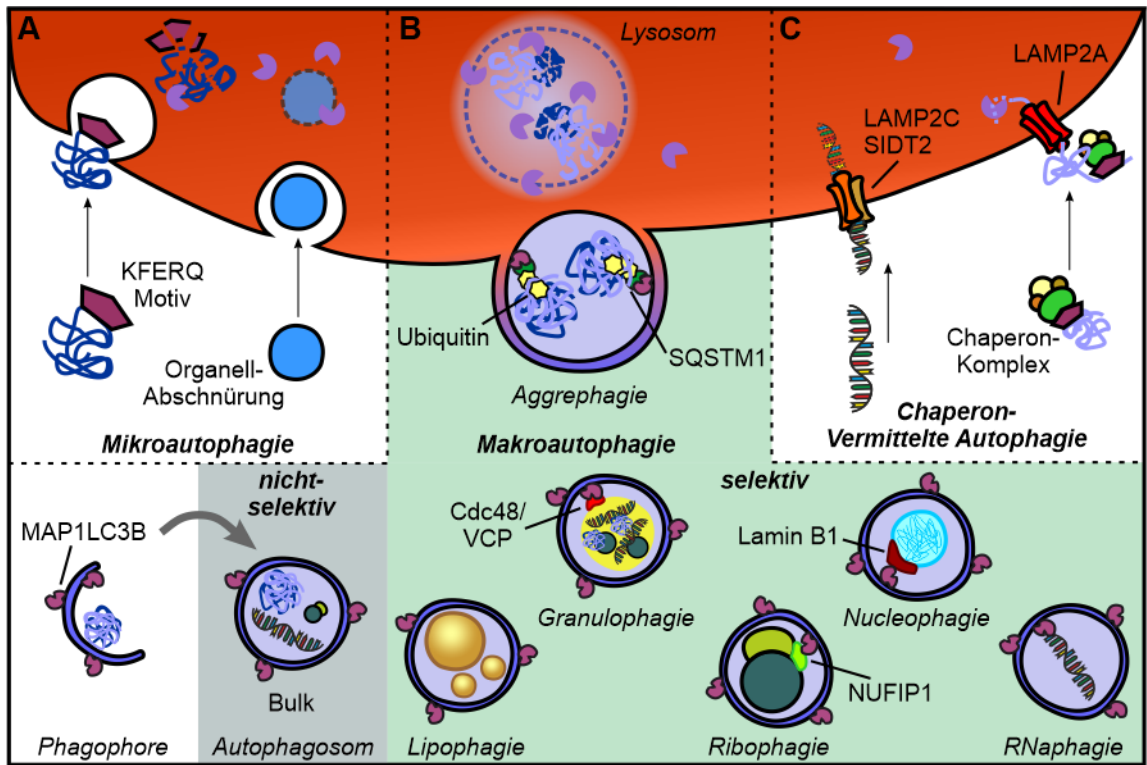


Abbildung 1 Übersicht autophagischer Prozesse Die Autophagie ist ein lysosomaler Abbauweg. (A) Bei der Mikroautophagie werden Substrate direkt in das Lysosom über einen Pinozytose-ähnlichen Mechanismus aufgenommen. Das Degradationsmotiv KFERQ kann dabei als Signal dienen, aber es werden auch Substrate Motiv-unabhängig aufgenommen. (B) Die Makroautophagie ist durch die *de novo* Synthese des doppelmembranösen Autophagosoms charakterisiert. Die Vorläuferstruktur ist die Phagophore, die während der Reifung zum Autophagosom um Substrate herum wächst und diese in sich einschließt. Die Makroautophagie kann unselektiv zytosolisches Material in das Autophagosom einschließen (Bulk-Autophagie genannt). Bei der selektiven Makroautophagie erkennen spezialisierte Autophagierezeptoren spezifische Substrate. Folgend aufgelistet sind Beispiele für prominente Rezeptoren: Cdc48/VCP interagiert mit Stressgranula, Lamin B1 mit Abschnürungen des Nukleus, NUFIP1 mit Ribosomen. MAP1LC3B kann direkt mit Nukleinsäuren interagieren. Die genauen Rezeptoren der Lipophagie sind noch unbekannt. SQSTM1 ist ein Autophagierezeptor, der unter anderem mit ubiquitinierten Substraten interagiert, beispielweise im Zuge der Aggrephagie. (C) Während der Chaperon-vermittelten Autophagie (CMA) erkennen Chaperone bestimmte exponierte Sequenzen wie das KFERQ-Motiv und führen die Substrate dem Lysosom in Zusammenarbeit mit Transportern zu. LAMP2A ist dabei der bevorzugte Transporter für Proteine, während LAMP2C und SIDT2 mit dem Nukleinsäuretransport in Verbindung gebracht wurden. KFERQ = Lysin-Phenylalanin-Glutaminsäure-Arginin-Glutamin; MAP1LC3B = *Microtubule-associated proteins 1A/1B light chain 3B*; SQSTM1 = *Sequestome 1/p62*; Cdc48 = *cell division cycle 48*; VCP = *valosin-containing protein*; NUFIP1 = *Nuclear fragile X mental retardation-interacting protein 1*; LAMP = *Lysosomal associated membrane protein*; SIDT2 = *systemic RNA-interference deficient-1 transmembrane family, member 2*.

Das Autophagosom bildet sich über die Phagophore am endoplasmatischen Retikulum (ER) und wird von verschiedenen Organellen und Kompartimenten mit Lipiden für den Aufbau der Membran versorgt. Die Phagophore wächst und schließt sich schließlich zum reifen

Autophagosom (Gomez-Sanchez *et al*, 2021). Während des Wachstums werden ATG8-Proteine (*autophagy related genes 8*) über Lipidierung in der Membran verankert (Kabeya *et al*, 2000).

Wenn Cargo mehr oder weniger zufällig im Autophagosom eingeschlossen wird, wird dies als nicht-selektive oder Bulk-Autophagie beschrieben. Werden Substrate spezifisch über die Interaktion von Rezeptoren mit ATG8-Proteinen oder über die direkte Bindung an ATG8-Proteine in das Autophagosom überführt, wird dies als selektive Autophagie bezeichnet (Abbildung 1B). Dabei sind verschiedene Autophagierezeptoren auf unterschiedliche Substrate spezialisiert. Je nach Substrat unterscheidet man verschiedene Typen der selektiven Autophagie. Bei der Nukleophagie werden Teile des Nukleus eingeschlossen, bei der Lipophagie Lipidtröpfchen, bei der Ribophagie Ribosomen usw. (Aman *et al.*, 2021).

Schließlich wird das Autophagosom zum Lysosom transportiert und fusioniert mit diesem. Das eingeschlossene Material wird von lysosomalen sauren Hydrolasen in seine Grundbausteine gespalten, die dann über verschiedene Transporter zurück ins Zytosol transferiert und somit recycelt werden (Rudnik & Damme, 2021; Trivedi *et al*, 2020)

1.2 Die *de novo* Synthese des Autophagosoms

Autophagie ist ein dynamischer Prozess, der unter basalen Bedingungen kontinuierlich stattfindet (Musiwaro *et al.*, 2013) und unter Hunger- und Stressbedingungen stark induziert wird (Noda, 2017). Daher ist die Synthese von Autophagosomen, die *de novo* synthetisiert werden, streng reguliert. An ihrer hierarchisch orchestrierten Biogenese sind diverser Proteine, Proteinkomplexe sowie Organellen gleichermaßen beteiligt (Noda, 2024) (Abbildung 2A).

1.2.1 Initiierung der Autophagie und Keimung der Phagophore

In der Initiationsphase (Abbildung 2A Initiierung) werden am ER Vorläuferstrukturen gebildet, aus denen das Autophagosom heranreift. Der ULK-Komplex (*UNC51-like kinase*), dessen Aktivität über den Nährstoffgehalt der Zelle reguliert wird, rekrutiert den PI3K-Komplex (*phosphatidylinositol 3-kinase*) (Houghton *et al*, 2022; Noda, 2017). Der PI3K-Komplex phosphoryliert das Membranlipid Phosphatidylinositol (PI) und bildet so Phosphatidylinositol-3-Phosphat-haltige (PI3P) Mikrodomänen. Dadurch formt sich das Omegasom, eine keilförmige Membrandomäne, aus der die Isolationsmembran (IM) gebildet wird (Nishimura *et al*, 2017).

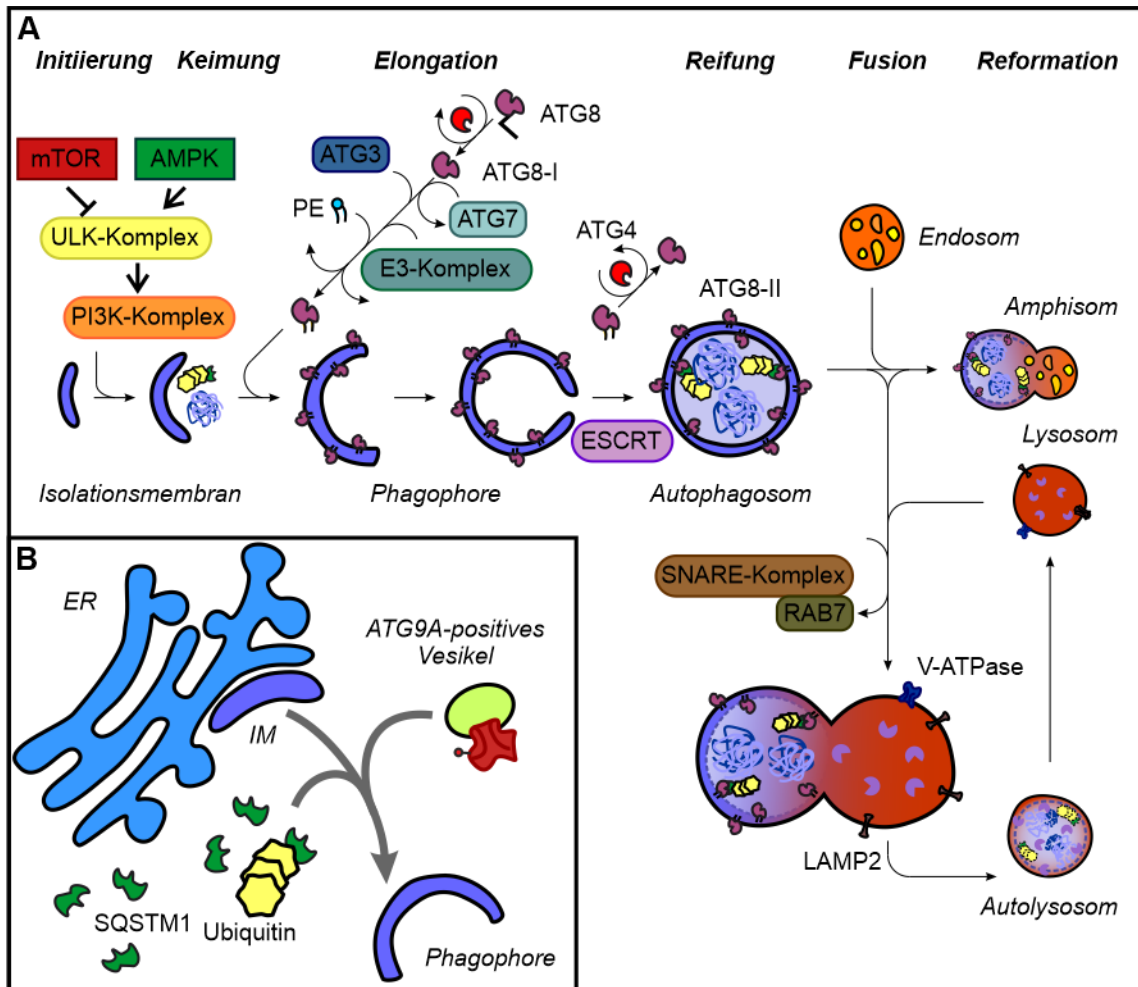


Abbildung 2 Biogenese von Autophagosomen (A) Schematische Darstellung der Biogenese eines Autophagosoms. Während der Initiierung regulieren mTOR und AMPK den ULK-Komplex, der über die Aktivierung des PI3K-Komplexes die Bildung einer Isolationsmembran initiiert. ATG8-Proteine werden von den ATG4-Proteasen zu ATG8-I hydrolysiert. Nach der IM-Keimung wird ATG8-I über ATG7, ATG3 und den E3-Komplex an das Phospholipid PE konjugiert und als ATG8-II in die Phagophorenmembran integriert. Die Membran wächst und wird während der Reifung zum Autophagosom vom ESCRT-Komplex geschlossen. ATG8-II wird von ATG4-Proteasen teilweise von der Außenseite des Autophagosoms dekonjugiert und das reife Autophagosom fusioniert entweder mit Endosomen zu Amphisomen oder direkt mit Lysosomen zu Autolysosomen. An der Fusion sind ATG8-Proteine, LAMP2, der SNARE-Komplex und RAB7 beteiligt. Die V-ATPase kriert das für die Fusion notwendige saure Milieu der Lysosomen. Saure Hydrolasen verdauen den Cargo zu einzelnen Nährstoffgrundbausteinen, die ins Zytosol transportiert werden. Das Autolysosom reformiert sich zu einem Lysosom und steht für weitere Fusionen bereit. (B) Die IM bildet sich am ER, aber auch SQSTM1/Ubiquitin-Tropfen und ATG9A-positive Vesikel können als Startpunkt der Phagophorenbildung dienen. mTOR = *mammalian target of rapamycin*; AMPK = *AMP-activated kinase*; ULK = *UNC51-like kinase*; PI3K = *phosphatidylinositol 3-kinase*; ATG = *autophagy related gene*; PE = Phosphatidylethanolamin; ESCRT = *endosomal sorting complex required for transport*; SNARE = *soluble N-ethylmaleimide-sensitive-factor attachment receptor*; RAB = *Ras-related in brain*; V-ATPase = *vacuolar-type adenosine 5'-triphosphatase*; ER = endoplasmatisches Retikulum; IM = Isolationsmembran.

Nicht nur der ULK-Komplex am ER, wie in Abbildung 2B dargestellt, fungiert als Startpunkt der Autophagie. In verschiedenen Studien wurde gezeigt, dass auch andere zelluläre Strukturen wie ATG9A-positive Vesikel (auf die später genauer eingegangen wird) sowie Substrat selbst als Plattform für die Ausbildung der IM dienen (Kageyama *et al*, 2021; Olivas *et al*, 2023).

Die IM wird anfangs vom ER über ATG2- und WIPI-Proteine (*WD-40 repeat containing protein that interacts with PI*) mit Lipiden versorgt (Polson *et al*, 2010; Valverde *et al*, 2019), die wiederum mit den PI3P-reichen Mikrodomänen interagieren, die vom PI3K-Komplex gebildet werden (Osawa *et al*, 2020). Vor allem ATG2 ist wichtig für die Keimung, bis sich die IM aus dem Omegasom löst (Axe *et al*, 2008; Velikkakath *et al*, 2012) (Abbildung 2A Keimung).

1.2.2 Elongation der Phagophorenmembran

Während der Elongation reift die IM zur Phagophore und schließt sich schlussendlich zum reifen Autophagosom (Nishimura & Tooze, 2020). Die Phagophore wird dafür mit Lipiden aus verschiedenen Membranquellen versorgt. Vom ER werden Lipide über ATG2A und ATG2B direkt an die Phagophore transferiert (Valverde *et al.*, 2019) (Abbildung 3). Zusätzlich werden von anderen Organellen einzelne Lipide direkt und indirekt zur Verfügung gestellt. Vesikel fusionieren teilweise oder ganz mit der Phagophore für die Bereitstellung von Lipiden (Ge *et al*, 2013; Hailey *et al*, 2010; Karanasios *et al*, 2016; Rambold *et al*, 2015; Ravikumar *et al*, 2010). Besonders hervorzuheben ist hier der enge Austausch mit ATG9A-positiven Vesikeln (Orsi *et al*, 2012). Ferner wurde eine enge Verbindung der Autophagosomen-Biogenese zu Lipidtröpfchen gezeigt (Bekbulat *et al*, 2020; Dupont *et al*, 2014). Die Phagophore wächst auch in engem Kontakt zu anderen Organellen wie Mitochondrien und dem Recycling-Endosom, um in ihre vesikuläre Form gebracht zu werden und um Lipide auszutauschen (Drizyte-Miller *et al*, 2020; Klecker *et al*, 2017; Longatti *et al*, 2012; Pfisterer *et al*, 2014; Tang *et al*, 2019).

Während der Elongation der Phagophore werden ATG8-Proteine, allen voran MAP1LC3B (*Microtubule-associated proteins 1A/1B light chain 3B*), über Lipidierung an die Membran gebunden (Shpilka *et al*, 2011).

1.2.2.1 ATG8-Proteine unterstützen den Elongationsprozess

Für die Elongation der Phagophore spielt nicht nur die Versorgung der wachsenden Membran mit Lipiden eine bedeutende Rolle, auch die Integration von ATG8-Proteinen und die Interaktion mit dem Konjugationskomplex der ATG8-Proteinen ist ein wichtiger Faktor (Martens & Fracchiolla, 2020) (Abbildung 2A Elongation). Die ATG8-Proteine sind kleine Ubiquitin-ähnliche Proteine, die hochkonserviert von Hefen bis zu höheren eukaryotischen

Organismen auftreten (Noda *et al*, 2009). Sie können über hydrophobe Sequenzen effektiv an Autophagierezeptoren oder direkt an zu degradierendes Substrat binden (Shpilka *et al.*, 2011).

Die ATG8-Proteine werden von der Familie der ATG4-Proteasen prozessiert, damit sie aktiviert und an Phosphatidylethanolamin (PE) konjugiert werden können (Hirata *et al*, 2017). Alle ATG8-Proteine liegen erst in ihrer Proform vor und werden von ATG4-Proteasen zu ATG8-I prozessiert. Durch eine der Ubiquitinierung ähnliche Konjugationsreaktion wird ATG8-I über den N-Terminus an die Kopfgruppe von Lipiden, meist PE, konjugiert, so dass lipidiertes ATG8-II in die Phagophorenmembran eingebaut wird. ATG8-II-Proteine liegen damit an der Außen- und Innenseite der Doppelmembran von reifen Autophagosomen vor (Martens & Fracchiolla, 2020; Yu *et al*, 2012) (Abbildung 2 Elongation).

Der ATG8-lipidisierende Komplex interagiert mit WIPI auf den PI3P-Mikrodomänen und unterstützt die Krümmung der Membran. Zum einen reguliert sowohl der ATG8-lipidisierende Komplex die Krümmung der Phagophorenmembran, zum anderen beeinflussen die ATG8-Proteine selbst durch die Konjugation an PE die Membrankrümmung (Jensen *et al*, 2022; Knorr *et al*, 2014; Ye *et al*, 2021).

Es wurden sechs humane ATG8-Proteine beschrieben, die jedes für sich spezifische Funktionen während der Biogenese der Autophagosomen haben (Jacquet *et al*, 2021) (siehe Tabelle 1).

Tabelle 1 Familie der humanen ATG8-Proteine

Familie	Proteine	Funktion	Referenz
GABARAP		ATG2-Interaktion, Reifung, Fusion, Mitophagie	(Bozic <i>et al</i> , 2020; Ebner <i>et al</i> , 2018; Nguyen <i>et al</i> , 2016)
	GABARAP	ULK-Rekrutierung	(Alemu <i>et al</i> , 2012; Okazaki <i>et al</i> , 2000)
	GABARAPL1	mTOR und ULK-Regulierung, Fusion, Lysosomenaktivität	(Nguyen <i>et al.</i> , 2016; Poillet-Perez <i>et al</i> , 2017)
GATE16	GABARAPL2	ULK-Rekrutierung, Reifung	(Alemu <i>et al.</i> , 2012; Weidberg <i>et al</i> , 2010)
MAP1LC3		Membrankrümmung	(Knorr <i>et al.</i> , 2014)
	MAP1LC3A	Mitophagie	(Bhujabal <i>et al</i> , 2017)
	MAP1LC3B	Cargo-Rekrutierung, Elongation, Transport	(Hwang <i>et al</i> , 2022; Kimura <i>et al</i> , 2008; Shvets <i>et al</i> , 2011; Weidberg <i>et al.</i> , 2010)
	MAP1LC3C	Mitophagie, Xenophagie	(Le Guerroue <i>et al</i> , 2017; von Muhlinen <i>et al</i> , 2012)

Drei dieser ATG8-Proteine werden in der Familie der GABARAP-Proteine zusammengefasst: GABARAP (*γ-aminobutyric acid type A receptor-associated protein*), GABARAPL1 und GABARAPL2 (*γ-aminobutyric acid type A receptor-associated protein like 1/2*). GABARAPL2 ist auch als GATE-16 (*Golgi-associated ATPase enhancer of 16 kDa*) bekannt und steht etwas außerhalb der Familie der GABARAPs. Die GABARAPs sind unerlässlich

sowohl für die Initiierung als auch für die Reifung der Autophagosomen (Nguyen *et al.*, 2016; Okazaki *et al.*, 2000; Weidberg *et al.*, 2010). GABARAP interagiert während der Initiierung direkt mit dem ULK- und PI3K-Komplex (Alemu *et al.*, 2012), GABARAPL2 ist entscheidend für die Reifung des Autophagosoms (Weidberg *et al.*, 2010) und GABARAPL1 vermittelt die Fusion mit dem Lysosom (Nguyen *et al.*, 2016).

Die anderen drei ATG8-Proteine werden in der Familie der MAP1LC3s zusammengefasst, aufgeteilt nach MAP1LC3A, MAP1LC3B und MAP1LC3C. Diese ATG8-Proteine sind wichtig für die Membrankrümmung und Elongation der Phagophore (Knorr *et al.*, 2014; Weidberg *et al.*, 2010). MAP1LC3A und -LC3C spielen in der selektiven Autophagie eine größere Rolle (Bhujabal *et al.*, 2017; Le Guerroue *et al.*, 2017), ihre genauere Funktion bleibt allerdings unbekannt. MAP1LC3B interagiert ubiquitär mit Autophagierezeptoren wie SQSTM1 (*Sequestome1/p62*) über exponierte LIR-Motive (*LC3-interacting regions*) (Hwang *et al.*, 2022; Pankiv *et al.*, 2007; Shvets *et al.*, 2011). Während der Elongationsphase werden Cargo-Rezeptoren und Substrate über die Interaktion mit der LIR-Domäne an der Phagophoremembran fixiert und können so von der Phagophore eingeschlossen werden (Aman *et al.*, 2021; Birgisdottir *et al.*, 2013). Da MAP1LC3B von allgemeiner Bedeutung für die Autophagie und ein kritischer Faktor für den Transport des Autophagosoms zum Lysosom ist, wird es als Markerprotein für Autophagosomen und zur Bestimmung der autophagischen Aktivität genutzt (Kimura *et al.*, 2008).

1.2.2.2 ATG2A und ATG2B sind Lipidtransferasen am ER

Das ER ist hauptverantwortlich für die Bereitstellung von Phospholipiden zur Synthese von Autophagosomen (Abbildung 3). Die ATG2-Proteine sind hierbei die wichtigsten Transferasen und liegen im humanen Organismus als ATG2A und ATG2B vor (Capitano *et al.*, 2023; McEwan & Ryan, 2022). Während der Initiierung dienen die WIPI-Proteine und die vom PI3K-Komplex gebildeten PI3P-Mikrodomänen am ER als Anker für die ATG2-Proteine und im Verlauf der Reifung des Autophagosoms führt GABARAP die ATG2-Proteine an die Phagophoremembran (Bozic *et al.*, 2020; Chowdhury *et al.*, 2018; Osawa *et al.*, 2020).

ATG2-Proteine fungieren allerdings nicht nur als Transferasen von Lipiden, sondern interagieren auch mit anderen Proteinen und Organellen, um weitere Lipidquellen zum ER zu rekrutieren. Neben Mitochondrien sind auch Lipidtröpfchen als Interaktionspartner von ATG2-Proteinen beschrieben. Ob ATG2-Proteine diese Organellen für Interaktionen verankern oder auch hier eine Transferaseaktivität aufweisen, ist noch unklar (Korfhage *et al.*, 2023; Velikkakath *et al.*, 2012). Da auf der Oberfläche der Lipidtröpfchen Enzyme für die Synthese von Phospholipiden, vorrangig für Phosphatidylcholin (PC) und Phosphatidat (PA), nachgewiesen wurden und Mitochondrien Phosphatidylglycerol (PG) liefern, könnten

die ATG2-Proteine durchaus als Transferase an diesen Organellen aktiv sein (Krahmer *et al.*, 2011; Larsson *et al.*, 2012).

Es wurde außerdem gezeigt, dass Lipidtröpfchen zusammen mit dem ER und vorwiegend dem ERES (*endoplasmic reticulum exit site*), den Mitochondrien und anderen Vesikeln eine formgebende Rolle bei der Biogenese der Phagophorenmembran spielen. Dabei nimmt ATG2A eine Lipid- und Organell-rekrutierende Funktion ein (Bieber *et al.*, 2022; Capitanio *et al.*, 2023).

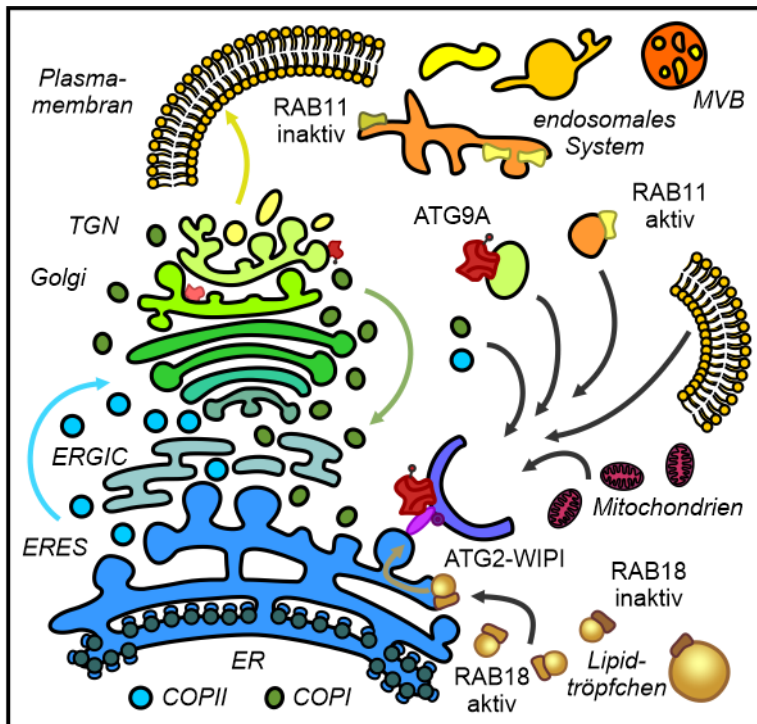


Abbildung 3 Die Membran wachsender Autophagosomen wird von diversen Kompartimenten mit Lipiden versorgt Die Phagophore wird direkt vom ER mit Lipiden versorgt, die vom ATG2-WIPI-Komplex transferiert werden. Am ERES generierte COPI-Vesikel und vom Golgi-Apparat sezernierte COPII-Vesikel liefern ebenfalls Lipide für das Wachstum der Phagophore. ERGIC und ERES stehen in engem Kontakt zur Phagophore und beeinflussen deren Formgebung. ATG9A-positive Vesikel werden am TGN gebildet und transferieren ebenfalls Membranbestandteile. Vermittelt durch RAB11 knospen endosomale Vesikel vom Recyclingendosom ab und liefern Lipide an die Phagophore. Es wurden auch Verbindungen zur Plasmamembran und den Mitochondrien beschrieben. Lipidtröpfchen werden durch die Aktivierung von RAB18 mobilisiert, die die Lipidversorgung der Phagophore indirekt unterstützen. MVB = *multivesicular bodies*; TGN = *trans-Golgi Netzwerk*; ERGIC = *ER Golgi intermediate compartment*; ERES = *ER exit site*; COP = *coat protein*; WIPI = *WD-40 repeat containing protein that interacts with PI*.

ATG2-Proteine bilden einen langen hydrophoben Schacht, durch den Lipide hindurch geleitet werden. Funktionell ist der genaue Mechanismus des Lipidtransfers unklar: die ATG2-Proteine können entweder einen konstanten Lipidfluss vom ER zur Phagophore etablieren ähnlich einem Tunnel. Sie können alternativ mit WIPI als Drehpunkt zur Aufnahme von

Membranlipiden zum ER hin und zur Abgabe der Lipide zurück zur Phagophore wippen (Maeda *et al.*, 2019).

Bekannt ist, dass ATG2-Proteine eine höhere Bindungsaffinität zu PE als zu anderen Phospholipiden aufweisen (Osawa *et al.*, 2019). Durch eine Deletion von *Atg2* in *D. melanogaster*, in denen es nur ein ATG2-Protein gibt, wird das Lipidprofil von autophagischen Strukturen drastisch verändert (Laczko-Dobos *et al.*, 2021). Nicht nur die Verteilung der Phospholipide in der Membran wird auf Kosten von PE zu PI, Phosphatidylserin (PS) und PA verschoben, auch das Verhältnis der Fettsäurereste verschiebt sich von gesättigt zu ungesättigt. Die aus den *Atg2 Knock Out*-Zellen (KO) gewonnenen Strukturen, die analysiert wurden, sind vorrangig ungeschlossene Phagophoren, deren Reifung zum Autophagosom nicht abgeschlossen werden kann (Laczko-Dobos *et al.*, 2021).

Der Verlust von ATG2A und ATG2B führt in humanen Zellen ebenfalls zu einer Akkumulation von Phagophoren und zu einer verminderten Bildung von reifen Autophagosomen. Dementsprechend ist der autophagische Flux verringert, also die Menge der neu gebildeten und wieder abgebauten Autophagosomen pro Zeit (Korfhage *et al.*, 2023; Maeda *et al.*, 2019; Valverde *et al.*, 2019). Interessanterweise reichern sich zudem Lipidtröpfchen bei einem Verlust von ATG2A/B an (Velikkakath *et al.*, 2012).

ATG2-Proteine sind maßgeblich für die Homöostase des Lipidprofils der Autophagosomenmembran verantwortlich und scheinen zusätzlich am Selektionsprozess, welche Lipide in die Membran integriert werden, beteiligt zu sein. Störungen der Lipidhomöostase durch den Verlust von ATG2-Proteinen führen während der Biogenese des Autophagosoms zu einer schwerwiegenden Beeinträchtigung der Autophagie.

1.2.2.3 ATG9A-positive Vesikel transferieren Lipide zur Phagophore

Die ATG9-Proteine sind die erste Familie integraler Membranproteine, die mit der Autophagie assoziiert sind (Matoba *et al.*, 2020). Im Säuger wird zwischen ATG9A und ATG9B unterschieden und beide Proteine interagieren mit anderen Autophagie-assoziierten Proteinen. Während ATG9B nur in wenigen Geweben exprimiert wird, ist ATG9A ubiquitär exprimiert und dementsprechend das besser studierte Protein (Chiduzza *et al.*, 2024; Yamada *et al.*, 2005).

ATG9A ist unter basalen Bedingungen vorwiegend am Golgi-Apparat und im endosomalen System lokalisiert (Longatti *et al.*, 2012; Orsi *et al.*, 2012; Young *et al.*, 2006). Es gibt eine Population aus ATG9A-positiven Vesikeln sowie ein tubuläres ATG9A-Kompartiment, die beide mit dem endosomalen System, dem Golgi-Apparat, dem ER und der Phagophore in Kontakt stehen und unter Autophagie-induzierenden Bedingungen vergrößert werden (Imai *et al.*, 2016; Kakuta *et al.*, 2017; Mari *et al.*, 2010; Orsi *et al.*, 2012; Young *et al.*, 2006). Die

SRC-Kinase (*Proto-oncogene sarcoma tyrosine-protein kinase*) phosphoryliert ATG9A unter basalen Bedingungen an Tyrosin-8 (Y8) und unterstützt so die Bildung der ATG9A-positiven Vesikel am trans-Golgi Netzwerk (TGN). Unter Autophagie-induzierenden Bedingungen phosphoryliert der ULK-Komplex ATG9A zusätzlich an Serin-14 (S14), so dass die Bildung ATG9A-positiver Vesikel noch weiter begünstigt wird. Beide Phosphorylierungen sind für die Rekrutierung von ATG9A an die Phagophore von Bedeutung (Papinski *et al.*, 2014; Zhou *et al.*, 2017).

ATG9A-positive Vesikel sind schon in der Initiierungsphase der Autophagosomensynthese äußerst wichtig, da sie als Plattform zur Bildung der IM beschrieben sind (Karanasios *et al.*, 2016; Olivas *et al.*, 2023). Damit liefern sie eine vesikuläre Grundstruktur, auf die die Phagophore aufgebaut werden kann, und bringen weitere Proteine wie PI-Kinasen an die wachsende Phagophore (Judith *et al.*, 2019). Die Modifikation der PIs am Inositolring ist wiederum wichtig für die Reifung der Phagophore (Posor *et al.*, 2022).

ATG9A garantiert über seine Funktion als Skramblase eine gleichmäßige funktionelle Verteilung von Lipiden in der Phagophorenmembran, so dass die gekrümmte, vesikuläre Struktur der Phagophore etabliert wird (Maeda *et al.*, 2020). Dabei unterstützt es die Krümmung der Membran auch dadurch, dass es selbst eine Krümmung provoziert (Guardia *et al.*, 2020; Judith *et al.*, 2019).

Alle ATG9-Proteine bilden Homotrimere, die eine gemeinsame zentrale Pore bilden, sowie je eine laterale und eine vertikale Pore pro Molekül aufweisen. Über diese Poren können Lipide von einer Seite der Lipiddoppelschicht auf die andere wechseln. Das Trimer liegt gemessen an der vertikalen Pore in einer geöffneten und geschlossenen Konformation vor, wobei die Anordnung der vertikalen Pore den Transportweg der Lipide bestimmt (Chiduzza *et al.*, 2024; Guardia *et al.*, 2020; Matoba *et al.*, 2020). ATG9A hat eine konservierte Interaktionsstelle für ATG2A, die ermöglicht, dass ATG2A entweder an die laterale (Matoba *et al.*, 2020) oder an die vertikale Pore von ATG9A bindet (Wang *et al.*, 2025). Von ATG2A transferierte Lipide können so direkt von der einen Seite der Lipiddoppelschicht durch ATG9A hindurch auf die andere Seite wechseln (Noda, 2021). Die beiden Proteine interagieren entweder, wenn sie gemeinsam auf einer Membran lokalisieren, oder auch, wenn sie auf unterschiedlichen Membranen vorliegen (Wang *et al.*, 2025). Ob es einen Zusammenhang gibt, an welche ATG9A-Pore ATG2A bindet, wenn beide Proteine auf einer oder zwei verschiedenen Membranen lokalisiert sind, ist bislang unklar.

Zusätzlich liefern ATG9A-positive Vesikel während der Elongation der Phagophore weitere Lipide und Proteine. Die Vesikel transferieren die benötigten Moleküle nach einem *kiss and run*-Mechanismus, bei dem sie sich der Phagophore annähern, ohne komplett mit ihr zu verschmelzen (Judith *et al.*, 2019; Orsi *et al.*, 2012).

Der Verlust von ATG9A zieht je nach Zellmodell unterschiedliche Konsequenzen für die Autophagie nach sich. Einerseits sind die Proteinspiegel der lipidierten Variante von MAP1LC3B kaum messbar, andererseits ist der autophagisch Flux stark verringert und lässt sich nicht induzieren (Imai *et al.*, 2016; Olivas *et al.*, 2023; van Vliet *et al.*, 2022). In jedem Fall führt der Verlust von ATG9A zu stärkeren Einschränkungen in der Biogenese der Autophagosomen als der Verlust von ATG2A/B (Kishi-Itakura *et al.*, 2014). Zusätzlich sind Akkumulationen diverser Autophagie-assoziiierter Proteine bei einem Verlust von ATG9A messbar, die auf die gestörte Initiierung der Autophagosomenbiogenese zurückzuführen sind (Broadbent *et al.*, 2023; Guardia *et al.*, 2020; Kishi-Itakura *et al.*, 2014; Runwal *et al.*, 2019).

1.2.2.4 Lipidtröpfchen liefern Fettsäuren für die Lipidsynthese an ER und Mitochondrien in Abhängigkeit von RAB18

Lipidtröpfchen sind Organellen zur Speicherung neutraler Lipide in der Zelle. Sie lassen sich in jedem Zelltyp nachweisen, wobei die Gesamtgröße, die sie erreichen können, variiert. Ihr Kern besteht vorwiegend aus Triacylglycerol (TAG) und Sterolestern, umgeben von einer Monophospholipidschicht (Bartz *et al.*, 2007; Murphy, 2001; Tauchi-Sato *et al.*, 2002). Sie sind beteiligt an der Energiebilanz und Lipidhomöostase der Zelle und beeinflussen autophagische Prozesse (Bekbulat *et al.*, 2020; Jarc & Petan, 2019; Olzmann & Carvalho, 2019; Schepers & Behl, 2021).

Lipidtröpfchen liefern nur geringfügig Phospholipide ihrer eigenen Membran für die Biogenese der Phagophorenmembran. Stattdessen sublimieren sie dem ER Fettsäuren für die Synthese neuer Phospholipide. Zur Gewinnung der in den TAGs gespeicherten Fettsäuren stehen verschiedene Wege zur Verfügung (Corbo & Chung, 2024). TAGs können beispielsweise direkt von den Lipidtröpfchen in die ER-Membran transferiert werden (Olzmann & Carvalho, 2019). Die Lipophagie andererseits beschreibt den Einschluss eines Lipidtröpfchens in ein Autophagosom, um die Bestandteile des Lipidtröpfchens im Lysosom durch Verdauung verfügbar zu machen. Das Lysosom kann auch direkt mit dem Lipidtröpfchen interagieren, wobei der genaue Mechanismus noch unklar ist (Corbo & Chung, 2024). Ob die Synthese neuer Phospholipide aus den bereitgestellten Fettsäuren direkt der Versorgung der Phagophorenmembran oder vorrangig der Homöostase der ER-Membran gilt, bleibt unklar (Bekbulat *et al.*, 2020; Schutter *et al.*, 2020).

RAB18 spielt eine entscheidende Rolle bei der Mobilisation von Fettsäuren aus Lipidtröpfchen. RAB18 gehört zur Gruppe der RAB-GTPasen (*Ras-related in brain*), die unerlässlich für die Bildung, den Transport und die Fusion von Vesikeln sind (Homma *et al.*, 2021). Ihre Aktivität ist abhängig von der Bindung an und der Hydrolyse von GTP (Guanosintriphosphat). In der aktivierten Form wird RAB18 an Lipidtröpfchen rekrutiert und fungiert dort mit anderen Proteinen als *Tethering*-Faktor, der die Interaktion zwischen Lipidtröpfchen und

dem ER gewährleistet und so den Transfer von Fettsäuren in das ER einleitet (Martin *et al.*, 2005; Xu *et al.*, 2018a).

Der Verlust von RAB18 bedingt eine verringerte Anzahl an Lipidtröpfchen mit einem erhöhten Durchmesser, deren Transport zum ER sowie Abbau gestört ist. Dies beeinträchtigt die zelluläre Lipidhomöostase und limitiert den ER-vermittelten Transfer von Lipiden für die Synthese der Autophagosomenmembran. Spannenderweise bewirken diese Veränderungen eine erhöhte SRC-Kinase-vermittelte Phosphorylierung von ATG9A im RAB18 KO und damit einen verstärkten Transfer von ATG9A-positiven Vesikeln zum ER und der Phagophore. Auch die ATG2B-Proteinspiegel sind nach dem Verlust von RAB18 erhöht (Bekbulat *et al.*, 2020; Feldmann *et al.*, 2017; Martin *et al.*, 2005).

1.2.2.5 Lipidklassen und Fettsäurereste bestimmen die Charakteristiken einer Membran

Eine biologische Membran besteht vorwiegend aus assoziierten Proteinen und Lipiden. Funktionell relevant sind die Wechselwirkungen zwischen Lipiden und Proteinen beispielsweise, wenn Mikrodomänen in Membranen gebildet werden, wie in Kapitel 1.2.1 beschrieben. Die Lipide, die den Großteil der Membran ausmachen, setzen sich aus Phospholipiden, Glykolipiden und Sterolen zusammen. Auch einfache Lipide wie Diacylglycerole (DAG) und Fettsäuren selbst können in die Membranen kooperieren. Die Phospholipide werden weiter zwischen Glycerophospholipiden und Sphingolipiden unterschieden. (Axe *et al.*, 2008; de la Ballina *et al.*, 2020; Osawa *et al.*, 2020; Puri *et al.*, 2018).

Die amphiphilen Membranlipide bestehen aus zwei Komponenten – der hydrophilen Kopfgruppe und den hydrophoben Fettsäureresten. Beide Komponenten beeinflussen die Membraneigenschaften (Listenberg *et al.*, 2003; Osawa *et al.*, 2024).

Die Kopfgruppen der Lipide können mit ihrer Ladung und Größe die Bindungsfähigkeit von Proteinen an die Membran beeinflussen und interagieren mit spezifischen Membran-bindenden und transmembranen Proteinen (Puri *et al.*, 2018). ATG8-Proteine interagieren bspw. direkt mit Ceramid, Sphingomyelin (SM) und Cardiolipin, wenn diese in Membranen beschädigter Kompartimente exponiert vorliegen (Harayama & Riezman, 2018; Kaur *et al.*, 2023; Varela *et al.*, 2023).

Die an die Kopfgruppe gebundenen Fettsäuren bestimmen die biophysikalischen Eigenschaften der Membran, wie beispielsweise die Fluidität, Ordnung, Dicke und Krümmung (de la Ballina *et al.*, 2020; Renne & Ernst, 2023). Gesättigte Fettsäuren können aufgrund der Van-der-Waals-Kräfte über die gestreckte Kohlenwasserstoffkette eine eher viskose Membran bilden. Je länger die gesättigte Fettsäure, desto höher die Viskosität und Dicke der Membran. Dies wird in Mikrodomänen genutzt, in denen Sterole akkumulieren, um Protein-Effektor-Interaktionen zu stabilisieren (Harayama & Riezman, 2018; Kunduri *et al.*, 2022). In

flexiblen, fluiden Membranen sind vorwiegend ungesättigte Fettsäuren eingebaut, die aufgrund ihrer Krümmung eine starke Ausbildung der Van-der-Waals-Kräfte verhindern. Je länger und komplexer der Aufbau der ungesättigten Fettsäuren, desto unorganisierter ist die Membran und dementsprechend fluid. Auch hier interagieren Sterole, allerdings um die Membran zu stabilisieren (Kunduri *et al.*, 2022).

Membranen müssen je nach Lokalisation unterschiedlichste Anforderungen erfüllen – während am ER eine dünnere, flexiblere Membran benötigt wird, die die Bildung von Vesikeln und die Mobilität von Membrankomponenten gewährleistet, muss die Plasmamembran dicker und starrer sein, um eine robuste Abgrenzung zur Umgebung zu gewährleisten (Jacquemyn *et al.*, 2017; Renne & Ernst, 2023). Hierfür bestimmen die Kopfgruppen zusammen mit ihren assoziierten Fettsäuren über ihre ganzheitliche Struktur die Form der Membran. Zylindrische Phospholipide wie PC, SM und PS bilden gerade Membranen. Eine positive Krümmung, die an der inneren Membranseite bei der Vesikelbildung nötig und durch einen flächigeren Fettsäurerest gekennzeichnet ist, wird von konischen Lipiden wie Ceramid, DAG, PA und PE vermittelt. Invertiert-konische Lipide wie PI, Lyso-Lipide und Ganglioside bilden eine negative Krümmung wie an der äußeren Membranseite von Vesikeln aus (Binotti *et al.*, 2021; Ghadami & Dellinger, 2023; Harayama & Riezman, 2018).

Für die Ausbildung der Membrankrümmung ist wichtig, dass Lipide von einer Membranseite auf die andere wechseln, wobei die transversale Bewegung von Skramblasen und Flippasen unterstützt wird (Pomorski *et al.*, 2001). Wie wichtig dieser Mechanismus ist, zeigt sich bei der Abschnürung oder der Schließung von Vesikeln. Die Krümmung der Membran muss invertiert werden, damit sich die Membranenden verbinden können. Dabei unterstützt beispielsweise der ESCRT-Komplex (*endosomal sorting complex required for transport*) die Invertierung der Lipidausrichtung (McMahon & Gallop, 2005; Ohsaki *et al.*, 2014). Für die Krümmung der Membran ist also die Form des Lipids, die Fettsäurekomposition sowie die Eigenschaften der Kopfgruppe maßgebend.

Synthetisiert werden die meisten Glycerophospholipide am ER (van Meer *et al.*, 2008) (Abbildung 4A). Wie in Abbildung 4B dargestellt ist, wird Glycerin als Grundgerüst für die Glycerophospholipide genutzt. In *sn*-1 Position und *sn*-2 Position sind Fettsäuren konjugiert, in *sn*-3 Position ist eine Phosphatgruppe mit Kopfgruppensubstituent assoziiert (Harayama & Riezman, 2018).

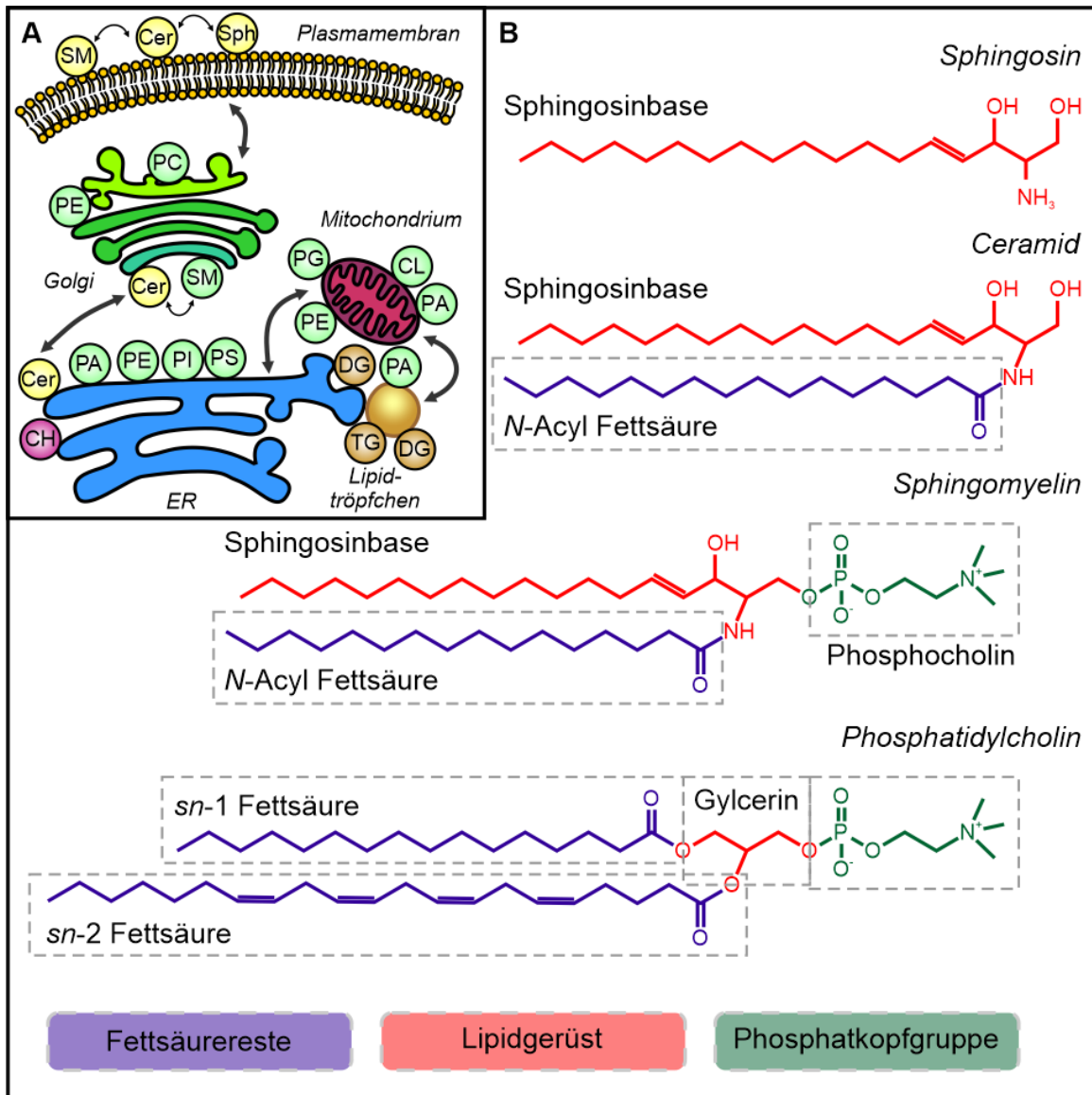


Abbildung 4 Übersicht über die Syntheseorte von Phospholipiden sowie die Struktur ausgewählter Phospholipide (A) Übersicht über die Syntheseorte der Phospholipide. Lipidtröpfchen liefern Fettsäuren sowie Di- und Triacylglycerole und Acetyl-Coenzym A, die über verschiedenste Synthesewege am ER zu PA, PE, PI, PS, Cholesterin und Ceramid verarbeitet werden. Mitochondrien synthetisieren Cardiolipin, PA, PG und PE, wobei nur die Glycerophospholipide ans ER transferiert werden. Vom ER werden Ceramide zum Golgi-Apparat geleitet, in dessen Membran unter anderem SM produziert wird. Ceramid und SM werden an die Plasmamembran transportiert. Dort stehen sie in stetiger Balance mit Sphingosin als Signalmoleküle. (B) Strukturformeln der einfachen Sphingolipide Sphingosin und Ceramid sowie des komplexen Sphingolipides Sphingomyelin, und Strukturformel von Phosphatidylcholin. In Rot dargestellt ist das Lipidgerüst der Phospholipide, in Violett die Fettsäurereste und in Grün die Phosphatkopfgruppe. Alle Sphingolipide bauen auf einer Sphingosinbase als Grundgerüst auf. Ceramid wird über die Konjugation einer Fettsäure an das Stickstoffatom gebildet. Sphingomyelin wird durch die Konjugation von Phosphocholin an die erste Hydroxygruppe der Sphingosinbase gebildet. Glycerophospholipide wie PC bauen auf Glycerin auf, an dessen erstes Kohlenstoffatom die Kopfgruppe und an dessen zweites und drittes die beiden Fettsäuren konjugiert sind. Die Kopfgruppe besteht aus einem Phosphat und einem Konjugat, wie hier Cholin. Cer = Ceramid; Sph = Sphingosin; CL = Cardiolipin; CH = Cholesterin; DG = Diacylglycerol; TG = Triacylglycerol.

PA ist eine mögliche Ursprungsform der Glycerophospholipide ohne Kopfgruppensubstituent – PC, PE, PG und PI werden unter anderem durch die Konjugation der entsprechenden Substituenten aus PA generiert. Durch Lipasen können die meisten Glycerophospholipide ineinander überführt oder in ihre Lyso-Form gebracht werden, in der nur ein Fettsäurerest an Glycerin assoziiert ist (Binotti *et al.*, 2021; Ghadami & Dellinger, 2023; Yamashita *et al.*, 2014). PI stellt eine Sonderheit dar, da es je nach Phosphorylierung am Inositolring der Kopfgruppe in verschiedene Signalwege involviert ist. Die Konvertierung der PIP-Spezies ineinander spielt beispielsweise eine entscheidende Rolle bei der Reifung des endosomalen Systems oder bei der Synthese und Reifung von Autophagosomen (Lolicato *et al.*, 2024; Posor *et al.*, 2022).

Im Gegensatz zu den Glycerophospholipiden werden die komplexen Sphingolipide vorrangig im Golgi-Apparat synthetisiert (Abbildung 4A). Sie unterscheiden sich durch ihr Sphingosinbasen-Skelett von den Glycerophospholipiden. Die Vorstufe aller komplexen Sphingolipide ist Ceramid, bei dem eine Fettsäure an eine Sphingosinbase, meist Sphingosin, konjugiert ist (Abbildung 4B). Ceramid wird anschließend vom ER zum Golgi-Apparat transportiert (Abbildung 4A). In Folge weiterer Modifikationen im Golgi-Apparat werden verschiedene Kopfgruppen für die Synthese unterschiedlicher Sphingolipide mit Ceramid assoziiert (Allwright *et al.*, 2024; Companioni *et al.*, 2021; Pan *et al.*, 2023). Dort wird beispielsweise SM mithilfe von PC synthetisiert, wobei ein gewisser Teil von SM auch an der Plasmamembran generiert wird (Taniguchi & Okazaki, 2021; van Meer *et al.*, 2008).

Während Glycerophospholipide tendenziell mit einfach und mehrfach ungesättigten Fettsäuren assoziiert sind, sind die Sphingolipide häufig mit gesättigten, längeren Fettsäuren verbunden (Hartmann *et al.*, 2012; Yamashita *et al.*, 2014). Dies unterstützt die Funktion der Sphingolipide, zusammen mit Sterolen Mikrodomänen zu bilden, die als Reaktionsplattform an den Membranen dienen (McCluskey *et al.*, 2022).

Störungen im Lipidmetabolismus führen zu Fehlfunktionen in unterschiedlichen Stadien der Autophagie. Wird beispielsweise die PC-Synthese unterbrochen, kommt es ähnlich wie im ATG2 KO zu einer Akkumulation von Phagophoren (Polyansky *et al.*, 2022). Der gestörte Abbau von SM in Lysosomen führt zu dessen Akkumulation und einer schwerwiegenden Störung der lysosomalen Funktion – auch als Niemann-Pick-Krankheit Typ A bekannt (Gabande-Rodriguez *et al.*, 2014). Eine Überladung des zellulären Systems mit SM führt wiederum zu einer Stressreaktion im ATG9A-positiven Vesikelpool, der die Autophagie beeinträchtigt (Corcelle-Termeau *et al.*, 2016).

1.2.3 Die Reifung der Autophagosomen und die Fusion zum Autolysosom

Der Reifeprozess des Autophagosoms beschreibt die Schließung der Phagophore zum Autophagosom (Abbildung 2A Reifung). Der ESCRT-Komplex initiiert die Verschmelzung

der Membranen (Takahashi *et al*, 2019). Im Zuge dessen werden die PI3P-Domänen abgebaut und die ATG-Proteine dissoziieren vom reifen Autophagosom (Cebollero *et al*, 2012). Auch ATG8-Proteine an der Außenseite der Autophagosomenmembran werden zu einem Großteil recycelt. Die Dekonjugationsreaktion der ATG8-Proteine läuft langsamer ab als die Konjugation an PE, daher können verbliebene ATG8-Proteine die nachfolgende Fusion mit Endosomen und Lysosomen problemlos vermitteln (Maruyama & Noda, 2017). Die Dekonjugation von ATG8 unterstützt zusätzlich die Dissoziation anderer ATG-Proteine von der Phagophore und dem reifen Autophagosom (Nair *et al*, 2012; Yu *et al.*, 2012).

Die Verschmelzung der Autophagosomen mit Endosomen wird als Bestandteil des Reifungsprozesses betrachtet (Zhao & Zhang, 2019). Bei der Verschmelzung der beiden Vesikel entstehen sogenannte Amphisomen, die auch eingeschlossene Vesikel von den MVB (*multivesicular bodies*) enthalten können (Liou *et al*, 1997; Tooze *et al*, 1990).

Die Reifung des Amphisoms zum Lysosom oder die direkte Fusion von Amphisomen und Autophagosomen mit den Lysosomen beschreibt den letzten Schritt im Lebenszyklus eines Autophagosoms (Abbildung 2A Fusion). Am Ende der Autophagosomensynthese lagern sich SNARE-Proteine (*soluble N-ethylmaleimide-sensitive-factor attachment receptor*) an die Außenseite der Vesikelmembran, die mit zytosolischen und lysosomalen SNAREs interagieren (Itakura *et al*, 2012). Der SNARE-Komplex zusammen mit anderen Proteinen wie RAB7 und LAMP2 bewirkt die Fusion der beiden Vesikelmembranen (Baker & Hughson, 2016; Urwin *et al*, 2010). Nach der Fusion dissoziieren die SNARE-Bestandteile. Durch die Bildung des Autolysosoms werden die innere Autophagosomenmembran sowie der Cargo für saure Hydrolasen zugänglich (Tsuboyama *et al*, 2016). Makromoleküle wie Proteine werden vornehmlich von Cathepsinen und (Desoxy-)Ribonukleinsäuren (DNA/RNA) von sauren DNasen und RNasen abgebaut (Campomenosi *et al*, 2006; Lubke *et al*, 2009; Zhuang *et al*, 2024). Integrale Transporter der Lysosomenmembran transportieren die Grundbausteine ins Zytosol zurück (Baldwin *et al*, 2005; Rudnik & Damme, 2021; Scharenberg *et al*, 2023). Das saure Milieu im Lysosom und Autolysosom, das für die Hydrolyse benötigt wird, wird vorwiegend von der V-ATPase (*vacuolar-type adenosine 5'-triphosphatase*) aufrechterhalten, die Protonen ins lysosomale Lumen pumpt (Ishida *et al*, 2013). Im Anschluss können sich Autolysosomen zu Lysosomen reformieren und stehen somit erneut für Fusionen zur Verfügung (Yu *et al*, 2010).

Die Biogenese der Autophagosomen ist einzigartig, da sie zu den wenigen Organellen gehören, die komplett neu synthetisiert werden (Melia *et al*, 2020). Endosomen und Lysosomen durchlaufen eine Art Recyclingprozess, so dass kein Vesikel als neu synthetisiert beschrieben werden kann. Auch die aus der Plasmamembran, dem ER oder dem Golgi-Apparat generierten Vesikel zeichnen sich dadurch aus, dass die bereits vorhandenen

Membranstrukturen zur Vesikelgenerierung genutzt werden und durch die Synthese von neuen Membranbestandteilen ausgebessert werden (Vagne *et al*, 2020). Für die Membran der Autophagosomen werden durchaus auch bereits vorhandene Membranstrukturen genutzt. Kleine Vesikel, Membranfragmente und einzelne Lipide werden allerdings zusammen in eine völlig neue Struktur integriert. Es findet kein klassischer Austausch von Membranen und Proteinen in einem retro- und anterograden Transportsystem statt. Nichtsdestotrotz wird ein Organell mit einer Doppelmembran aufgebaut. Die einzigen weiteren Strukturen mit einer Doppelmembran in der eukaryotischen Zelle sind die Mitochondrien, deren Reifung aber auf bereits vorhandenen Mitochondrien aufbaut (Memme & Hood, 2020). Dies macht die Synthese der Autophagosomen einmalig.

1.3 Cargosortierung zum Autophagosom

Der Einschluss von abzubauenem Material ins Autophagosom kann sehr spezifisch erfolgen. Substrate werden über die Interaktion von Autophagierezeptoren mit den ATG8-Proteinen an der Phagophorenmembran während der Elongation fixiert. Dabei sind verschiedene Autophagierezeptoren, wie in Abbildung 1B dargestellt ist, auf unterschiedliche Substrate spezialisiert. SQSTM1 beispielsweise interagiert u.a. mit Ubiquitin und ist so für den Einschluss von Proteinaggregaten im Zuge der Aggrephagie verantwortlich. Während der Nukleophagie werden vermittelt durch Lamin B1 Kernabschnürungen im Autophagosom eingeschlossen. NUFIP1 (*Nuclear fragile X mental retardation-interacting protein 1*) wurde als Autophagierezeptor der Ribophagie und damit der Ribosomendegradation beschrieben und VCP (*valosin-containing protein*) erkennt zu degradierende Stressgranula bei der Granulophagie. Neben den genannten Beispielen gibt es noch zahlreiche weitere Typen der selektiven Autophagie, wobei nicht immer die spezifischen Autophagierezeptoren bekannt sind (Aman *et al.*, 2021).

Die Initiierung der Autophagie kann nicht nur durch die Aktivierung des ULK-Komplexes am ER erfolgen, sondern auch, wenn Substrate mit Autophagierezeptoren markiert werden und so die Autophagiemaschinerie zur Bildung der Phagophore zum Substrat rekrutieren (Mancias & Kimmelman, 2016; Turco *et al*, 2020). FIP200 (*Focal Adhesion Kinase Family-Interacting Protein of 200 kDa*) und Huntingtin sind Initiatoren der selektiven Autophagie (Mancias & Kimmelman, 2016; Zientara-Rytter & Subramani, 2020). Über konservierte Domänen können beide Proteine mit Autophagierezeptoren interagieren und so die Biogenese des Autophagosoms direkt am Substrat einleiten. Diese Interaktion wurde bereits für FIP200 und SQSTM1 im Zuge der selektiven Autophagie von Ubiquitin-Kondensaten gezeigt (Schlutermaun *et al*, 2021; Turco *et al*, 2019). FIP200 selbst ist Bestandteil des ULK-Komplexes und leitet damit die Phagophorenbildung ein (Hara *et al*, 2008).

1.3.1 SQSTM1 Plattformen initiieren die Phagophorenbildung

SQSTM1 bindet u.a. an Ubiquitin und damit an ubiquitinierte Proteine. Durch die gleichzeitige Interaktion mit ATG8-Proteinen werden Substrate dem Autophagosom zugeführt (Cohen-Kaplan *et al*, 2016; Kumar *et al*, 2022). Im Zytosol bildet SQSTM1 mit abzubauenem Substrat SQSTM1-Tropfen. Diese entstehen über Phasenseparation, wenn sich modulare Domänen zusammenlagern und Molekülinteraktionen von elektrostatischen Wechselwirkungen, Wasserstoffbrückenbindungen und Van-der-Waals-Kräften stabilisiert werden (Huang *et al*, 2025). Diese Gel-artigen Strukturen werden beispielsweise von FIP200 und MAP1LC3B erkannt und initiieren die Phagophorenbildung (Kageyama *et al.*, 2021; Turco *et al.*, 2019) (Abbildung 2B). Werden die Gele von FIP200 erkannt, werden der restliche ULK- sowie der PIK-Komplex rekrutiert (Turco *et al*, 2021). MAP1LC3B kann schon in seiner unkonjugierten Form mit den SQSTM1-Gele interagieren und sich an dessen Peripherie anlagern, um so die Rekrutierung der Autophagiemaschinerie zu unterstützen. Kommt es aufgrund einer gestörten Proteinhomöostase zu einer Anreicherung der SQSTM1-Gele, wird MAP1LC3B in die Gele integriert, ohne vollständig an PE konjugiert werden zu können (Agudo-Canalejo *et al*, 2021; Huang *et al.*, 2025; Zaffagnini *et al*, 2018).

SQSTM1 interagiert dabei nicht nur mit Ubiquitin, sondern bildet weiterhin Polymere aus. Dadurch kann Cargo im SQSTM1-Tropfen konzentriert und gehalten werden, beispielsweise pathogene Proteinaggregate oder nicht funktionsfähige Proteasomen (Bjorkoy *et al*, 2005; Sun *et al*, 2018; Zatloukal *et al*, 2002). Dies ist unter anderem von Bedeutung im Lebenszyklus von Transkriptionsfaktoren (Danieli *et al*, 2023; Sanchez-Martin *et al*, 2020). Die Phasenseparation zu einem Gel akkumuliert die Substrate, so dass sie entweder vollständig oder durch Fissionen ins Autophagosom sezerniert werden können. Autophagisch können die Zusammenlagerungen nicht mehr abgebaut werden, wenn sich aus dem Gel Fibrillen bilden (Agudo-Canalejo *et al.*, 2021; Huang *et al.*, 2025).

Die vermehrte Bildung von Poly-SQSTM1 wurde bereits mit dem Alterungsprozess in Verbindung gebracht, wenn die Autophagie zugunsten des UPS (Ubiquitin-Proteasom-System) reguliert wird (Gamerding *et al*, 2009).

1.3.2 Nucleinsäuren werden autophagisch abgebaut

Die RNA wird längst nicht mehr nur als Bindeglied zwischen DNA und Proteinen, die lediglich Gene in Polypeptide umschreibt, angesehen. Neben der ribosomalen RNA (rRNA), *messenger* (mRNA) und *transfer* RNA (tRNA) wurden weitere RNA-Typen in der Zelle identifiziert, die keine klassische translationale Funktion aufweisen (Chandrasekaran *et al*, 2019). Sogenannte snRNA und snoRNA (*small nuclear* und *small nucleolar* RNA) sind beispielsweise vor allem im Nucleus und Nucleolus lokalisiert, in dem sie eine regulatorische Funktion auf die Transkriptionsprozesse von Genen, mRNA und RNA-bindende Proteine

(RBPs) ausüben (Trendel *et al.*, 2019). Eine lncRNA (*long non-coding RNA*) ist eine lange RNA, die nicht translatiert wird und verschiedene regulatorische Funktionen ausübt. Oft interagiert sie, teilweise zeitgleich, mit verschiedenen Interaktionspartnern sowohl im Zellkern als auch im Zytosol (Statello *et al.*, 2021). Ein Sonderfall einer lncRNA ist die TER, die RNA der Telomerase. Sie ist im Nukleus lokalisiert, wo sie im Komplex mit der Telomerase für die Instandhaltung der Telomere der Chromosomen zuständig ist (Calado & Young, 2009; Mason *et al.*, 2011). Ebenfalls regulativ wirken miRNA (*micro RNA*) und circRNA (*circular RNA*) im Nukleus und im Zytosol. Die Funktion der verschiedenen RNA-Typen ist also noch vielfältiger als die Gruppen, die inzwischen für sie definiert wurden (Bogurcu-Seidel *et al.*, 2023).

Neben Proteinen und Organellen gehören Nukleinsäuren ebenfalls zum Portfolio der Autophagiesubstrate (Saha *et al.*, 1979; Zhuang *et al.*, 2024). Die DNA unterliegt dabei einem anderen Homöostasemechanismus als die RNA (Neurohr *et al.*, 2019) und erreicht eher als Satellit während der Nukleo- und Mitophagie das Lysosom. Nur unter Stressbedingungen und während des Auftretens vermehrter DNA-Schäden, wird die DNA gezielt lysosomal degradiert (Juretschke & Beli, 2021). Im Gegensatz dazu kann die RNA auf verschiedenste Arten vom Lysosom internalisiert und abgebaut werden (Houghton *et al.*, 2022; Juretschke & Beli, 2021).

RNA kann gebunden an RBPs in Autophagosomen eingeschlossen werden. Die Interaktion zwischen RNA und RBP ist meist so stark, dass nur der Einschluss in ein Autophagosom einen Abbau im Lysosom ermöglicht. Dies trifft zum Beispiel auf Ribosomen zu. Eine ribosomale Untereinheit besteht aus rRNA, die an ribosomale Proteine gebunden ist. Im Zuge der Translation interagieren die Ribosomen mit mRNA sowie tRNA-Molekülen, um die Ausbildung von Peptidbindungen zu katalysieren. Kommt es zu Störungen in der Translation und einem Arrest, können theoretisch alle drei RNA-Spezies über die Ribophagie ins Autophagosom geleitet und autophagisch abgebaut werden (Chandrasekaran *et al.*, 2019; Kolapalli *et al.*, 2025). Der Abbau von Ribosomen kann unselektiv vonstattengehen, ein *bystander* Ereignis sein oder, wie in Abbildung 1B dargestellt, selektiv durch den Ribophagie-Rezeptor NUFIP1 vermittelt werden (Nakatogawa, 2018). Nicht nur das Ribosom selbst, auch das *small recognition particle* (SRP), das für die Translokation von Ribosomen während der Translation an das ER verantwortlich ist, enthält eine nicht-codierende RNA, die 7SL RNA (Calo & Eichler, 2011; Nyathi *et al.*, 2013; Wild *et al.*, 2002). SRP wird sowohl im Zusammenspiel mit Ribosomen als auch im Zuge der ER-Phagie ein autophagisches Substrat. Schlussendlich wird RNA auch über Stressgranula, die als RNA-Speicher beschrieben wurden, in das Autophagosom gelangen (Borbolis & Syntichaki, 2015; Buchan *et al.*, 2013).

Doch neben der indirekten Überführung durch die Bindung an RBPs wird RNA auch sehr spezifisch und direkt der Autophagie zugeführt. MAP1LC3B bindet an die Sequenz AAUAAA der RNA und fungiert so selbst als selektiver Autophagierezeptor (Hwang *et al.*, 2022). Diese Interaktion wurde bisher nur für eine kleine Zahl von mRNA-Molekülen beschrieben (Zhou *et al.*, 1997).

Neben der Makroautophagie werden Nukleinsäuren auch in einem CMA-verwandten Mechanismus direkt ins Lysosom transferiert (Fujiwara *et al.*, 2013). SIDT2 transportiert abhängig von ATP (Adenosintriphosphat), aber unabhängig vom pH, RNA in die Lysosomen und hält so eine basale RNA-Degradation unabhängig von der zytosolischen RNA-Verwertung aufrecht (Aizawa *et al.*, 2016; Contu *et al.*, 2023). Auch LAMP2C interagiert über ein Argininreiches Aminosäuremotiv mit einer Poly-Guanin Sequenz auf der RNA und DNA, um diese ins Lysosom zu transportieren (Fujiwara *et al.*, 2015; Hase *et al.*, 2015). Kommt es zu einer viralen Infektion und einem Anstieg an der Verfügbarkeit doppelsträngiger RNA, werden sowohl SIDT2 als auch LAMP2C positiv in ihrer Expression reguliert, um die RNaphagie zu fördern (Fujiwara *et al.*, 2024).

1.4 Das Proteasom steht in engem Kontakt zur Autophagie

Neben der Autophagie ist das UPS mitentscheidend für den effizienten Abbau von Proteinen und die Aufrechterhaltung der zellulären Homöostase. Insgesamt sind über 30 Proteine im Proteasom zusammengelagert. Es besteht aus der katalytischen 20S Einheit, die Proteine degradiert, und der regulatorischen 19S Einheit, die wie eine Kappe ober- und unterhalb der katalytischen Einheit gebunden ist (Rousseau & Bertolotti, 2018). Das 19S-Proteasom erkennt abzubauen Proteine und führt sie unter ATP-Hydrolyse der katalytischen Einheit zu. Das 20S-Proteasom spaltet mit unterschiedlichen proteolytischen Zentren Proteine in kurze Peptidfragmente. Die Untereinheiten sind in heptameren Heterokomplexen ringförmig angeordnet, wobei vier Ringe aufeinander liegen. Dadurch entsteht eine Pore, durch die das abzubauen Protein geleitet und dabei hydrolytisch gespalten wird (Thibaudeau & Smith, 2019).

Das wichtigste Signal zum proteasomalen Abbau von Proteinen ist die Ubiquitinierung, also das Anfügen von einer Markierung aus (Poly-)Ubiquitin. Ubiquitin ist ein kurzes, hochkonserviertes Protein und wird über seinen C-Terminus an die Aminogruppen von Lysin, Serinen oder Threoninen innerhalb des abzubauen Proteins angefügt (Gonzalez-Santamarta *et al.*, 2022). Unter ATP-Hydrolyse wird Ubiquitin an eine E1-Ligase gebunden und wird dann auf einen E2-Komplex übertragen. Der E3-Komplex bindet an Ubiquitin-E2 und überträgt Ubiquitin auf das Substrat. Diese Reaktionskaskade entspricht funktionell der Konjugation von Phospholipiden an ATG8-Proteine (siehe Kapitel 1.2.2.1) (Damgaard, 2021; Marshall & Vierstra, 2019; Raffeiner *et al.*, 2023).

Ubiquitin weist insgesamt sieben Lysine auf, die als Reaktionspunkt für die Konjugation weiterer Ubiquitine dienen, um so Polyubiquitin zu generieren. Dabei werden entweder ein oder mehrere Ubiquitine auf ein bereits vorhandenes Ubiquitin übertragen. Wird lediglich ein Ubiquitin auf ein Protein übertragen, wird dies Monoubiquitinierung genannt. Es können auch Ubiquitine auf bereits vorhandene Ubiquitine übertragen werden, entweder als Kette (homotypisch), als verzweigte Struktur oder auch modifiziert über beispielsweise Phosphorylierungen (heterotypische Polyubiquitinierung), wobei jedes Lysin im Ubiquitin als Anker genutzt werden kann. Je nach Lysin, das für die Verkettung genutzt wurde, entsteht ein Ubiquitin-Signal für verschiedenste Prozesse. Monoubiquitinierte Proteine werden vor allem der proteasomalen Degradation zugeführt. Substrate mit einer K-63 Polyubiquitinkette, in der die Ubiquitine über Lysin an Stelle 63 vernetzt sind, werden vorwiegend autophagisch degradiert. Kinasen können mit verzweigten K-63 Ubiquitinketten markiert werden, um Modifikationen zu initiieren. Schließlich können Deubiquitinasen Ubiquitine abspalten und die Signalgebung erneut modifizieren. Der Ubiquitin-Code beschreibt dementsprechend einen komplexen Modifikationsvorgang von Substraten in der Zelle, der weit über Degradationssignale hinausgeht (Damgaard, 2021; Dikic & Schulman, 2023; Heride *et al.*, 2014; Kwon & Ciechanover, 2017; Raffeiner *et al.*, 2023; Yau & Rape, 2016).

Doch nicht nur Ubiquitin als Signalgeber verbindet Autophagie und UPS. Unter Stressbedingungen werden beide Prozesse aktiviert (Zhao *et al.*, 2015). Das UPS reguliert die Autophagie, in dem es nach übermäßiger Aktivität den ULK- und PI3K-Komplex abbaut und so langfristig die Initiierung der Autophagie inhibiert (Chen *et al.*, 2019). Ferner kann das Proteasom die Autophagie bis zu einem gewissen Punkt supplementieren, wenn diese pharmakologisch oder genetisch inhibiert ist (Wang *et al.*, 2013).

Auf der anderen Seite kann das UPS autophagisch abgebaut werden, wenn es überladen ist. Dieser Prozess wird Proteaphagie genannt. Ist das Proteasom nicht funktionsfähig, beispielsweise durch eine Akkumulation von SQSTM1, wird die Autophagie ausgleichend erhöht (Korolchuk *et al.*, 2009). BAG-Proteine (*Bcl-2-associated athanogene*) regulieren ebenfalls die Balance zwischen UPS und Autophagie. Unter basalen Bedingungen wird BAG1 stärker exprimiert und unterstützt die Funktion des UPS. Im Alter oder unter Stressbedingungen wird die Expression von BAG3 gegenüber BAG1 erhöht, wodurch die autophagische Degradation von ubiquitinierten Substraten gefördert wird (Gamerding *et al.*, 2011; Gamerding *et al.*, 2009). Beide Systeme stehen also in ständigem Austausch miteinander (Li *et al.*, 2022).

1.5 Vorrangegangene Studien und Zielsetzung der Arbeit

In früheren Arbeiten der Arbeitsgruppe Behl wurden während eines RNAi-Screens (*RNA interference*) im Modellorganismus *C. elegans* neue Modulatoren der Proteinhomöostase

identifiziert (Spang *et al*, 2014). Unter anderem wurde RAB18 als positiver Effektor der Autophagie identifiziert (Feldmann *et al.*, 2017).

Interessanterweise zeigte der stabile Verlust von RAB18 durch einen *CRISPR/Cas9*-vermittelten KO (*Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats; CRISPR associated protein 9*) des Gens unter basalen Bedingungen keinen veränderten autophagischen Flux, obwohl die Lipidhomöostase der Zelle gestört war. Allerdings war die Induktion der Autophagie gestört. Diese Aufrechterhaltung der basalen Autophagieaktivität wurde durch Adaptionen des autophagischen Netzwerkes ermöglicht. Zum einen wurden erhöhte ATG2B-Proteinlevel in den RAB18 KO Zellen nachgewiesen, zum anderen konnte eine erhöhte Aktivität von ATG9A durch die Phosphorylierung an Y8 und S14 gezeigt werden. Zusammengenommen deutet dies auf einen gesteigerten, alternativen Lipidversorgungsweg hin, der durch den Verlust von RAB18 etabliert wird (Bekbulat *et al.*, 2020).

Eine gestörte Lipidhomöostase durch eine stark verringerte Verfügbarkeit von Fettsäuren modulierte also die Autophagie negativ und provozierte Adaptionen zu alternativen Lipidquellen. Offen blieb die Frage, ob bei einer vermehrten Lipidzufuhr aus anderen Quellen das Lipidprofil der Autophagosomen erhalten blieb. Daher liegt der Fokus dieser Arbeit auf den Autophagosomen selbst. Es wurde ein Protokoll etabliert, mit dessen Hilfe autophagische Vesikel angereichert werden können. Das Phospholipidom der isolierten autophagischen Vesikel wurde in einem *targeted approach* bestimmt – es wurde also nach spezifischen Phospholipiden gesucht. Außerdem wurde das Cargoprofil der autophagischen Vesikel bestimmt (Schmitt *et al*, 2022).

2 Material und Methoden

2.1 Methoden

Alle Arbeiten wurden in einem Labor der Sicherheitsstufe 1 durchgeführt. Sofern nicht anders hervorgehoben, wurden alle Arbeiten bei Raumtemperatur (RT) durchgeführt. Die im Folgenden beschriebenen Methoden umfassen alle Arbeitsschritte sowie die Zusammensetzung sämtlicher Medien und Lösungen oder die Bezeichnung kommerziell erworbener Reagenzien inklusive Distributor bzw. Hersteller. Wenn nicht anders beschrieben, handelt es sich bei der Erwähnung von H₂O um vollentsalztes Wasser.

Die ausgeführten Versuche wurden mehrmals wiederholt, um die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse zu gewährleisten. Die Anzahl der Wiederholungen wurde entsprechend gekennzeichnet. Bei Messungen im Multi-Well-Format wurden mindestens zwei technische Replikate pro Ansatz gemessen.

Alle genetisch veränderten Organismen (GVOs) wurden nach Gentechnik-Sicherheitsverordnung (GenTSV) ordnungsgemäß dokumentiert. GMOs wurden nach Verwendung sachgemäß vernichtet oder für eine Langzeitlagerung vorbereitet. Wenn möglich, wurden stabil genetisch veränderte Organismen in zwei Klonen charakterisiert, um etwaige klonale Effekte erkennen zu können.

2.1.1 Mikrobiologische Arbeiten

Es wurde mit ultrakompetenten *E. coli* vom Stamm DH5 α (New England BioLabs) gearbeitet. Die Kultivierung und Transformation wurde den Herstellerangaben folgend vorgenommen. Die mikrobiologischen Arbeiten wurden von technischen Assistierenden durchgeführt.

2.1.2 Zellbiologische Arbeiten

Alle zellbiologischen Arbeiten wurden steril mit HeLa-Zellen durchgeführt, die im Vorfeld auf ihre Authentizität geprüft und wie bereits beschrieben kultiviert wurden (Bekbulat *et al.*, 2020).

Zur Inkulturnahme wurden die Zellen durch Schwenken im 37 °C warmen Wasserbad aufgetaut und in warmes Kulturmedium (siehe Tabelle 2) überführt. Die Zellen wurden bei 306 g für 4 min zentrifugiert und der DMSO-haltige (Dimethylsulfoxid, Carl Roth) Überstand abgenommen. Das Zellpellet wurde in warmem Kulturmedium resuspendiert und auf eine 60 cm² Petrischale mit insgesamt 10 ml Kulturmedium ausplattiert.

Zur Kultivierung wurden die Zellen bei einer Konfluenz von etwa 70 bis 90 % passagiert. Hierfür wurden die Zellen mit PBS (*Phosphate Buffered Saline*, Sigma-Aldrich) gewaschen und mit 1x Trypsin (Invitrogen) verdünnt in PBS für maximal 5 min bei 37 °C inkubiert. Nachdem sich die Zellen gelöst hatten, wurden sie in Kulturmedium resuspendiert, um die

Trypsinreaktion abzustoppen, und bei 306 g für 4 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen in frischem Kulturmedium resuspendiert. Je nach Wachstum wurden die Zellen zwischen 1:10 und 1:40 auf neue 60 cm² Petrischalen mit 10 ml frischem Medium ausgesät.

Zur Kryokonservierung wurden Zellen bei einer Konfluenz von 80 bis 90 % trypsinisiert. Die Zellen wurden bei 306 g für 4 min zentrifugiert und der Überstand verworfen. Anschließend wurde das Zellpellet in Kulturmedium mit 10 % DMSO resuspendiert und in ein Kryokonservierungsröhrchen überführt. Dieses wurde langsam in einer mit Isopropanol (Carl Roth) versehenen Einfrierbox bei -80 °C eingefroren, wobei das DMSO die Bildung von Eiskristallen und somit die Zerstörung der Zellen verhindern soll. Nach mind. 24 h wurden die Zellen in eine Kryokonservierungsbox zur langfristigen Lagerung in flüssigen Stickstoff überführt.

Um eine definierte Zellzahl auf entsprechende Kultivierungsgefäße auszusäen, wurde die Zellzahl pro ml bestimmt. Hierfür wurden die Zellen wie beschrieben trypsinisiert und ein Teil der Zellen wurde mit Trypanblau im Verhältnis 1:1 (Sigma-Aldrich) vermenget. Der Farbstoff ist nicht membrangängig und kann nur Zellen färben, deren Zellmembran nicht intakt ist. In einer Neubauer-Zählkammer wurden alle ungefärbten, lebenden Zellen in den vier Großquadranten gezählt und die Zellzahl wie folgt bestimmt:

$$\text{Lebendzellzahl pro ml} = \frac{\text{gezählte Zellzahl} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times \text{Kammerfaktor } 10^4}{\text{Anzahl der ausgezählten Quadrate}}$$

Das der gewünschten Zellzahl entsprechende Volumen wurde aus der Zellsuspension entnommen und die Zellen wurden wie bereits beschrieben zentrifugiert. Die Zellen wurden im benötigten Volumen in Kulturmedium resuspendiert und ausgebracht.

Tabelle 2 Kulturmedium

Komponente	Konzentration/Anteil
Phenolrothaltiges Dulbecco`s Modified Eagle Medium (DMEM)	
Aktives fötales Kälberserum (FCS)	10 % [V/V]
Antibiotika/Antimykotika (100 x)	1 % [V/V]
Natriumpyruvat (100 mM)	1 mM

2.1.2.1 Transfektionen von Zellen

Die Einbringung genetischen Materials erfolgte wie bereits beschrieben über Elektroporation (Spang *et al.*, 2014). Eine definierte Zellzahl wurde in 400 µl Elektroporationspuffer (siehe Tabelle 3) pro Transfektionsansatz resuspendiert. Es wurden je nach Konstrukt zwischen 5 und 15 µg Plasmid (für die Liste der verwendeten Plasmide siehe Tabelle 43) eingesetzt. Für HeLa-Zellen wurde das Programm U24 des Nucleofactor™ 2b (Lonza) genutzt. Nach der Elektroporation erholten sich die Zellen für 5 bis 10 min bei 37 °C im Inkubator, damit sich die Zellmembran nach dem elektrischen Impuls wieder reorganisieren und die

Zellen nach dem akuten Stress akklimatisieren konnten. Anschließend wurde die Zellsuspension in die benötigte Menge Kulturmedium überführt und dieses auf die Kulturgefäße nach Versuchsansatz verteilt. Nach 24 h wurde das Medium erneuert, um Reste des Elektroporationspuffer sowie abgestorbene Zellen zu entfernen. Nach weiteren 24 h wurden die Zellen entsprechend des Versuchsansatzes weiterverarbeitet.

Tabelle 3 Elektroporationspuffer in PBS

Komponente	Konzentration/Anteil	pH 7,8
KCl	135 mM	
CaCl ₂	200 µM	
MgCl ₂	2 mM	
EGTA	2 mM	
HEPES	10 mM	
FCS	25 % [V/V]	

2.1.2.2 Generierung von stabilen *Knockout* Zellen

Die verwendeten *CRISPR/Cas9*-Konstrukte wurden von (Institut für Biochemie II, Universitätsklinikum der Goethe-Universität Frankfurt a.M.) zur Verfügung gestellt. HeLa WT-Zellen (Wildtyp) wurden per Elektroporation transfiziert und in Kulturmedium mit Selektionsmarker kultiviert. Die überlebenden Zellen wurden in einer 96-Napfschale vereinzelt und weiterkultiviert. Die Gendeletion in potenziellen Klonen wurde proteinbiochemisch und molekularbiologisch verifiziert. Die Generierung der KO-Linien erfolgte institutsintern im Vorfeld dieser Arbeit.

2.1.2.3 Behandlung von Zellen

Für Behandlungen wurden HeLa Zellen in einer Durchschnittsdichte von 7000 Zellen/cm² ausgebracht. Hierfür wurde die definierte Zellmenge in einem dem Versuch entsprechenden Volumen resuspendiert und ausplattiert.

2.1.2.3.1 Bafilomycin A₁-Behandlung für die Bestimmung des autophagischen Fluxes

Für die Untersuchung des autophagischen Fluxes wurden die Zellen 2 h mit 2 µM Bafilomycin A₁ (Toronto Research Chemicals) oder DMSO kultiviert. Bafilomycin A₁ ist ein Antibiotikum, das die Funktion der V-ATPase der Lysosomen blockiert und so den Abbau von Proteinen in Autolysosomen inhibiert. So akkumulieren Autophagosomen mit ihrem Cargo in den Zellen (Yuan *et al*, 2015). Der autophagische Flux wurde zum einen unter basalen Bedingungen in Kulturmedium, zum anderen in EBSS (*Earle's Balanced Salts*, Sigma-Aldrich) untersucht. EBSS ist eine salzhaltige Pufferlösung, die keine Nährstoffe enthält und somit die Zellen in einen Hungerzustand versetzt. Das Hungern ist eine etablierte Methode,

die Autophagie zu initiieren (Klionsky *et al.*, 2021). Störungen der autophagischen Maschinerie zeigen sich unter Umständen erst unter Hungerbedingungen (Bekbulat *et al.*, 2020).

2.1.2.3.2 Behandlung mit Phospholipiden

Um den Einfluss von Sphingomyelin auf den autophagischen Flux zu untersuchen, wurden die Zellen mit *BODIPY*[™] FL C5-Sphingomyelin (BP-SM, Invitrogen) in Kulturmedium mit delipidisiertem Serum (Bio&Sell) oder EBSS inkubiert. Hierfür wurden die Zellen mit 250 nM Sphingomyelin oder einem äquivalenten Volumen an DMSO für 2 h und anschließend mit 2 µM Bafilomycin A₁ für weitere 2 h inkubiert.

Um den Einfluss von Phosphatidylcholin und Phosphatidylethanolamin auf den autophagischen Flux zu untersuchen, wurden die Zellen mit je 500 nM 18:1-12:0 NBD-Phosphatidylethanolamin (NBD-PE, Avanti Polar Lipids) oder 16:0-18:1 PC (Avanti Polar Lipids) bzw. einem entsprechenden Volumen an Chloroform (Carl Roth) und Methanol (VWR International) im Verhältnis 1:1 für 2 h inkubiert. Hierfür wurde sowohl der Einfluss unter EBSS als auch in Kulturmedium mit delipidisiertem Serum betrachtet. Anschließend wurden die Zellen für weitere 2 h mit 2 µM Bafilomycin A₁ inkubiert.

2.1.2.3.3 Inhibierung der Phosphorylierung von ATG9A

PP2 (Calbiochem) ist eine SRC-Kinase-Inhibitor und verhindert die Phosphorylierung von ATG9A an der Stelle Y8. Die Phosphorylierung ist wichtig für die Aktivierung von ATG9A und die Bildung ATG9A-positiver Vesikel (Webber & Tooze, 2010; Zhou *et al.*, 2017). Die Zellen wurden insgesamt 12 h mit 5 µM PP2 behandelt. Nach 8 h wurde zusätzlich mit 250 nM BP-SM in Kulturmedium mit delipidisiertem Serum für 2 h, darauffolgend noch weitere 2 h mit 2 µM Bafilomycin A₁ behandelt.

2.1.2.3.4 Zelllyse

Um die Zelllysate für Proteinanalysen vorzubereiten, wurden die Zellen auf Eis mit kaltem PBS gewaschen und anschließend in 50 bis 100 µl 1x Lysispuffer mit 1x Proteaseinhibitor (siehe Tabelle 4) abgeschabt. Proteaseinhibitor verhindert den Abbau von Proteinen im Gesamtzelllysate während der Prozessierung der Proben (Klionsky *et al.*, 2021). Hierfür wurden die Zellen mit einem Zellschaber von den Petrischalen abgelöst und in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß überführt. Die Lysate wurden bei einer Amplitude von 80 % für dreimal 3 sec sonifiziert und die Proteine bei 60 °C für 5 min oder 95 °C für 10 min denaturiert. Die Lysate wurden bei -80 °C gelagert.

Tabelle 4 3x SDS-Lysispuffer in MilliQ-Wasser

Komponente	Konzentration/Anteil	pH 6,8
Tris-HCl	187,5 mM	
EDTA	3 mM	
SDS	6 % [m/V]	
Saccharose	30 % [m/V]	

2.1.2.3.5 Färbung von Zellen

Für die Färbung der Zellen mit Sphingomyelin, 18:1-12:0 NBD-PE oder 18:1-06:0 NBD-Phosphatidylcholin (NBD-PC, Avanti Polar Lipids), wurden diese mit 250 nM bis 2 μ M des gefärbten Lipids in EBSS für 30 min bis 2 h kultiviert. Für Kollokalisationsstudien mit Autophagosomenmarkern wurden die Zellen 2 h mit 500 nM des jeweiligen Lipids behandelt, gefolgt von 2 h Inkubation mit 2 μ M Bafilomycin A₁.

Um die Zellen für Färbungen vorzubereiten, wurden sie mit PBS gewaschen und anschließend mit 4 °C kaltem 4 %-igem PFA (Paraformaldehyd, Carl Roth) für 20 min inkubiert. Danach wurden die Zellen dreimal mit PBS gewaschen und ggf. in PBS bei 4 °C gelagert.

2.1.2.3.6 Vorbereitung der Isolation autophagischer Vesikel

Zur Isolation von autophagischen Vesikeln wurden Zellen mit einer Konfluenz von ca. 80 % für 2 h mit 1 μ M Bafilomycin A₁ behandelt. Anschließend wurden die Zellen wie in Kapitel 2.1.2 beschrieben trypsinisiert. Gegebenenfalls wurden geringe Mengen für Protein- oder RNA-Isolationen des Gesamtlysates bereits separiert. Die Isolation von lysosomalen Vesikeln lehnte sich an die Isolation autophagischer Vesikel an. Bei einer Konfluenz von ca. 80 % wurden Zellen ohne etwaige Behandlung trypsinisiert. Für beide Isolationen wurden die Zellen nach Zentrifugation in PBS gewaschen und dabei in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß überführt. Die Zellen wurden bei 306 g und 4 °C für 6 min pelletiert und der Überstand verworfen. Das Zellpellet wurde trocken bei -80 °C gelagert.

2.1.3 Biochemische Arbeiten

2.1.3.1 Immunoblotting

2.1.3.1.1 BCA-Assay

Per Biuret-Bicinchoninsäure-Reaktion (BCA, Thermo Fisher Scientific) wurde der Proteingehalt der Zelllysate bestimmt. Hierfür wurde eine BSA-Konzentrationsreihe von 0 bis 20 μ g/ml angesetzt und die Zelllysate wurden 1:200 in der BCA-Lösung verdünnt. Die Proben wurden bei 60 °C für 15 min (bei Proben mit hoher Proteinkonzentration) oder bei 37 °C für 30 min (bei Proben mit niedriger Proteinkonzentration) inkubiert. Biuret reagiert mit den Peptidbindungen der Proteine und dabei werden zweiwertige zu einwertigen Kupferionen

reduziert. Diese wiederum bilden einen Chelatkomplex mit Bicinchoninsäure, der einen Farbumschlag der Lösung von blau zu violett bewirkt (Olson & Markwell, 2007). Die Absorption der Proben wurde bei 562 nm photometrisch am Varioskan Lux mit dem Programm SkanIt RE 6.0.2 (Thermo Fisher Scientific) gemessen. Mithilfe des Programms wurde der Blankwert ermittelt und von den Probenabsorptionen abgezogen. Es wurde eine lineare Regression durchgeführt, wobei der R-Wert nicht niedriger als 0,95 sein sollte und es wurden anhand der Mittelwerte mithilfe der BSA-Standardreihe die Proteinkonzentrationen in den Proben kalkuliert.

2.1.3.1.2 SDS-PAGE

Für biochemische Analysen wurden gleiche Mengen Proteine ihrer Größe nach über eine SDS-PAGE (Natriumlaurylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese, englisch *sodiumdodecylsulfat polyacrylamide gel electrophoresis*) aufgetrennt. Hierfür wurden Proteine mit 4x Ladepuffer vermengt und bei 95 °C für 2 min bzw. bei 60 °C für 10 min denaturiert, so dass SDS an die Proteine binden und diese mit einer negativen Ladung umgeben kann.

Tabelle 5 4x Ladepuffer in MilliQ-H₂O

Komponente	Konzentration/Anteil	pH 7,3
Tris	100 mM	
SDS	4 % [m/V]	
Glycerol	24 % [V/V]	
Bromphenolblau		
β-Mercaptoethanol	4 % [V/V]	

Die Proteine wurden auf BisTris-Gelen in einem elektrischen Feld aufgetrennt. Je nach Versuchsansatz wurden 4-12 % NuPAGE BisTris-Gele (Invitrogen) oder selbst gegossene Gele mit einer Sammel- und einer Trenngelphase (siehe Tabelle 6 und Tabelle 7) verwendet. Als Größenstandard wurden 2 bis 5 µl entweder *PageRuler™ Prestained Protein Ladder* oder *PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder* (Thermo Fisher Scientific) mitaufgetragen. Die Proben wurden zur Synchronisation in der Sammelgelphase bei 70 V und später in der Trenngelphase zur Separation bei 120 bis 140 V in 1x MES- bzw. 1x MOPS-Puffer (Invitrogen) aufgetrennt. Den Herstellerangaben folgend war MES-Puffer geeigneter für die Auftrennung niedrig-molekularer, MOPS-Puffer für die Auftrennung hoch-molekularer Proteine.

Tabelle 6 BisTris-Puffer für Gelelektrophorese

Komponente	Konzentration/Anteil	pH 6,6
BisTris	1,25 M	

Tabelle 7 Zusammensetzung der BisTris-Gele

	H ₂ O [ml]	BisTris 1,25 M [ml]	10 % Acrylamid/Bisac- rylamid (40 %) [ml]	APS (10 %) [µl]	TEMED [µl]
4 %	3,2	1,5	0,55	42	21
8 %	5,4	3	2	74	20
10 %	4,9	3	2,6	74	20
12 %	4,4	3	3,1	74	20

2.1.3.1.3 *Semi-dry* Western Blot

Für den *semi dry*-Blot wurden zwei Filterstapel und eine Nitrozellulosemembran in 1x *TransTurbo*-Blotpuffer (BioRad) geschwenkt und ein Filterstapel mit der Membran oben auf in die Blotkammer überführt. Das Polyacrylamidgel wurde luftblasen-frei auf der Membran platziert und der zweite Filterstapel aufgelegt. Die Kammer wurde verschlossen und in den *TransTurbo* (BioRad) eingelegt. Unter dem Reiter „List“ wurde das Programm „1,5 mm Gel“ ausgewählt und die Proteine wurden auf die Membran bei 12 V und innerhalb von 15 min übertragen.

Die Membran wurde für etwa 60 min in 5 % Magermilch in TBS/T (1x TBS mit 0,05 % Tween® 20 (Carl Roth), siehe Tabelle 8) inkubiert. Die Magermilch blockierte freie Bindestellen auf der Membran. Die Membran wurde mehrmals gewaschen und über Nacht mit einem primären Antikörper bei 4 °C unter Schwenken inkubiert. Primäre Antikörper für den Western Blot wurden standardmäßig 1:500 bis 1:1000 in 1x TBS/T mit 100 µl Natriumazit angesetzt zur mehrmaligen Nutzung (siehe Tabelle 36). Am Folgetag wurde der primäre Antikörper abgenommen und die Membran erneut mehrmals gewaschen. Anschließend wurde sie mit 1:10000 in 1x TBS/T verdünntem sekundärem Antikörper (siehe Tabelle 37), gekoppelt an Radieschen-Peroxidase (HRP), für 1 bis 2 h unter Schwenken inkubiert. Die Membran wurde mehrmals gewaschen und mit Entwicklerlösung konnten Proteine am Amersham Imager 600 (GE Healthcare Life Science) detektiert werden. Für Membranen mit Proteinmengen von 10 µg und mehr wurde eine selbstangesezte Entwicklerlösung im Verhältnis 1:100:1000 angesetzt (siehe Tabelle 9 bis Tabelle 11). Für Proteinmengen unter 5 µg wurde Immobilon Western chemilumineszierendes HRP-Substrat (Sigma-Aldrich) verwendet. Nach der Entwicklung wurden die Membranen erneut gewaschen, ehe ggf. ein weiterer primärer Antikörper für eine Inkubation über Nacht auf die Membranen gegeben wurde.

Tabelle 8 10x TBS

Komponente	Konzentration
NaCl	1,37 M
KCl	27 mM
Tris	28 mM
Tris-HCl	220 mM

Tabelle 9 Entwicklerlösung A

Komponente	Konzentration	pH 8,6
Tris-HCl	0,1 M	
Luminol	0,025 % [m/V]	

Tabelle 10 Entwicklerlösung B

Komponente	Anteil	in
p-Kumarinsäure	0,11 % [m/V]	DMSO

Tabelle 11 Entwicklerlösung C

Komponente	Anteil
Wasserstoffperoxid	30 % [V/V]

2.1.3.2 Isolation von Vesikeln

2.1.3.2.1 Färbung autophagischer Vesikel

Das Isolationsprotokoll wurde durchgeführt und adaptiert nach früheren Publikationen (Korschgen *et al*, 2023; Schmitt *et al.*, 2022). Um autophagische Vesikel zu isolieren, wurde das vorbereitete Zellpellet in 1000 µl PBS mit 1x Proteaseinhibitor (*cOmplete, EDTA-free protease inhibitor cocktail*, Sigma-Aldrich) resuspendiert und mild bei einer Amplitude von 60 % für dreimal 2 sec sonifiziert. Die Zellsuspension wurde bei 3000 g und 4 °C für 10 min zentrifugiert und der Überstand in ein neues 1,5 ml Eppendorfgefäß überführt. Die Suspension wurde bei 20000 g und 4 °C für 60 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet erst mit 700 µl PBS überspült, welches dann sofort wieder verworfen wurde. Anschließend wurde das Pellet in 1 ml frischem PBS vorsichtig resuspendiert.

Entweder wurde die Suspension mit anti-allGABARAPs Antikörper (Abcam) gekoppelt an PE (Phycoerythrin) oder APC (Allophycocyanin) für 45 min unter Rotation bei 4 °C inkubiert.

Oder die Zellsuspension wurde für 30 min mit anti-LC3B Antikörper (Nanotools) für 30 min bei 4 °C unter Rotation und anschließend direkt mit der doppelten Menge anti-Maus Cy5 gekoppeltem Antikörper (Jackson Immuno Research) für 60 min bei 4 °C unter Rotation inkubiert. Die Suspension wurde erneut bei 20000 g und 4 °C für 60 min zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt, das Pellet mit PBS überspült und anschließend resuspendiert.

Nun wurde die Suspension mit anti-allGABARAPs Antikörper gekoppelt an PE für 30 min und bei 4 °C unter Rotation inkubiert.

Nach Antikörperinkubation wurde die Probe erneut bei 20000 g und 4 °C für 60 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet erst überspült und dann vorsichtig in 1 ml PBS resuspendiert.

2.1.3.2.2 Färbung lysosomaler Vesikel

Das Isolationsprotokoll für lysosomale Vesikel adaptierte und kombinierte Aufreinigungen aus vorangegangenen Publikationen (Sanchez-Martin *et al*, 2023; Schmitt *et al.*, 2022). Die Zellen wurden in 1 ml PBS resuspendiert und bei 60 % Amplitude dreimal 2 sec sonifiziert. Es wurden 25 µl Gesamtlisat entnommen und in einem neuen 1,5 ml Eppendorfgefäß mit 50 µl 3x Lysispuffer vermengt. Die Zellsuspension wurde bei 2000 g und 4 °C für 10 min zentrifugiert und der Überstand in ein neues 1,5 ml Eppendorfgefäß überführt. Das Pellet wurde verworfen. Der Überstand wurde bei 20000 g und 4 °C für 30 min zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet in 1000 µl PBS resuspendiert. Die Suspension wurde entweder mit 3 µg anti-Lamp1/CD107a (*cluster of differentiation*) [Alexa Fluor®647] Antikörper (Abcam) oder mit 3 µg anti-Lamp2/CD107b [Alexa Fluor®488] Antikörper (Abcam) für 45 min unter Schwenken bei 4 °C inkubiert. In den letzten 10 bis 15 min wurde LysoTracker RedDND-99 in einer finalen Konzentration von 1 µM hinzugegeben. Die Suspension wurde bei 20000 g und 4 °C für 30 min pelletiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 1 ml PBS resuspendiert.

2.1.3.2.3 Durchflusszytometrie

Alle durchflusszytometrischen Arbeiten wurden am Institut für Molekulare Biologie Mainz durchgeführt. Die Sortierung von Vesikeln wurde in der *Flow Cytometry Core Facility* von durchgeführt. Die Sortierungen wurden mit einem BD FACSAria III SORP ausgestattet mit einem 1.0 FCS Neutraldichtefilter mit dem Programm BD FACSDiva v9.0.1 (Becton Dickinson GmbH) oder mit einem Bigfoot™ *Spectral Cell Sorter* mit dem Programm Sasquatch Software SQS 1.19.4 (Invitrogen) sortiert und in 15 ml Röhrchen aufgefangen. Es wurden 70 µm Düsen verwendet bei einem Druck von 60 bis 70 psi. Für die Analyse wurden sowohl der Novocyte Quanteon mit dem Programm NovoExpress v.1.6.2 (Agilent) sowie der BD LSRFortessa SORP mit dem Programm BD FACSDiva v9.7 (Becton Dickinson GmbH) genutzt.

Die Nutzung des Bigfoots, des ARIA und des Fortessa sind dank DFG-Förderung (210144599, 210253511 und 511658729) möglich.

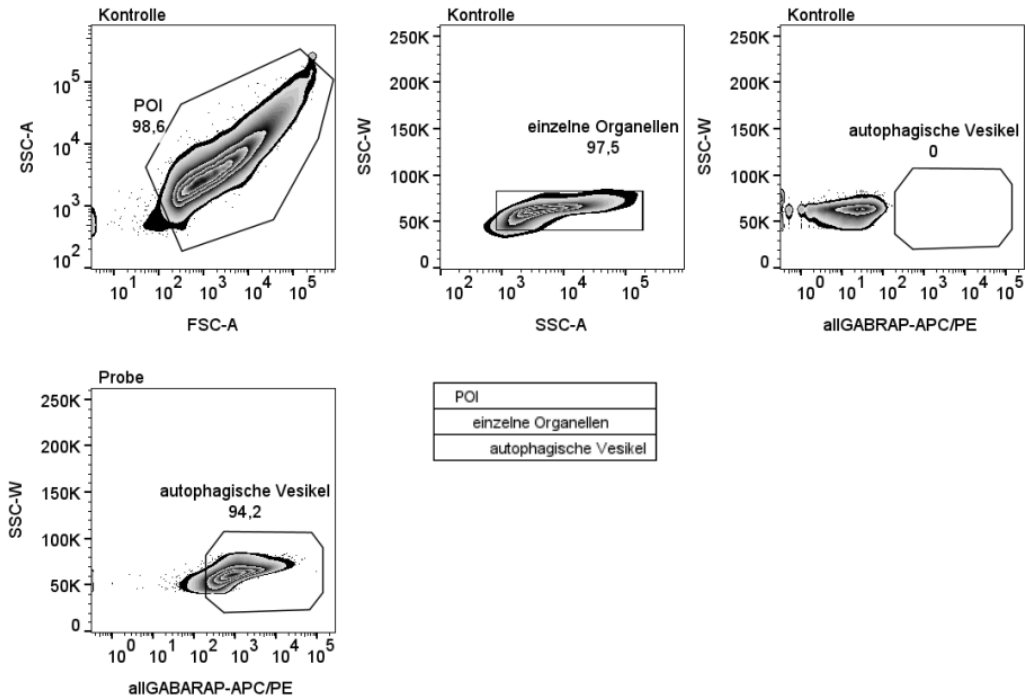


Abbildung 5 Gating-Strategie zur Isolation von autophagischen Vesikeln Zuerst wurde per *Sideward Scatter* (SSC) und *Forward Scatter* (FSC) die *Population of Interest* (POI) festgelegt und über ein weiteres Gate wurden Dubletten diskriminiert. Anschließend wurde anhand der Kontrollen ein Fenster mithilfe der Fluoreszenzintensität für die Population autophagischer Vesikel festgelegt.

Zur Bestimmung der *Population of Interest* (POI) wurden *Forward Scatter* (FSC) für die Größe und *Sideward Scatter* (SSC) für die Granularität verwendet. Aus dieser Population wurden Dubletten und Konglomerate mithilfe zweier SSC (Area/Width) diskriminiert (Cossarizza *et al*, 2019). Mithilfe der Kontrollen wurden schließlich anhand der Fluoreszenzintensitäten die Gates für die gefärbten Vesikel gelegt.

Für jede Färbung wurde die in Abbildung 5 dargestellte Gating-Vorlage individuell angepasst. Diese wurde initial für eine Färbung mit direkt-gekoppeltem primären Antikörpern erstellt und enthält Kontrollen für Autofluoreszenzen über eine ungefärbte Kontrolle. Bei Mehrfachfärbungen wurden Einzelfärbungen und eventuell Proben nur mit sekundärem Antikörper inkubiert als Kontrollen inkludiert (Abbildung 6 und Abbildung 7). Für Färbungen mit Farbstoffen (Abbildung 8) diente ebenfalls eine ungefärbte Probe als Kontrolle. Alle verwendeten Antikörper sind in Tabelle 34 und Tabelle 35 gelistet. Für die Fluorophore NBD und AF488 wurde der Laser 488 nm (BP 530/30) verwendet, für die Fluorophore Cy3, LysoTracker RedDND99 und PE der Laser 561 nm (586/15) und für die Fluorophore APC und Cy5 wurde ein Laser 640 nm (BP 670/30) genutzt. Die Durchflussgeschwindigkeit wurde bei etwa 15000 Events/Sekunde gehalten.

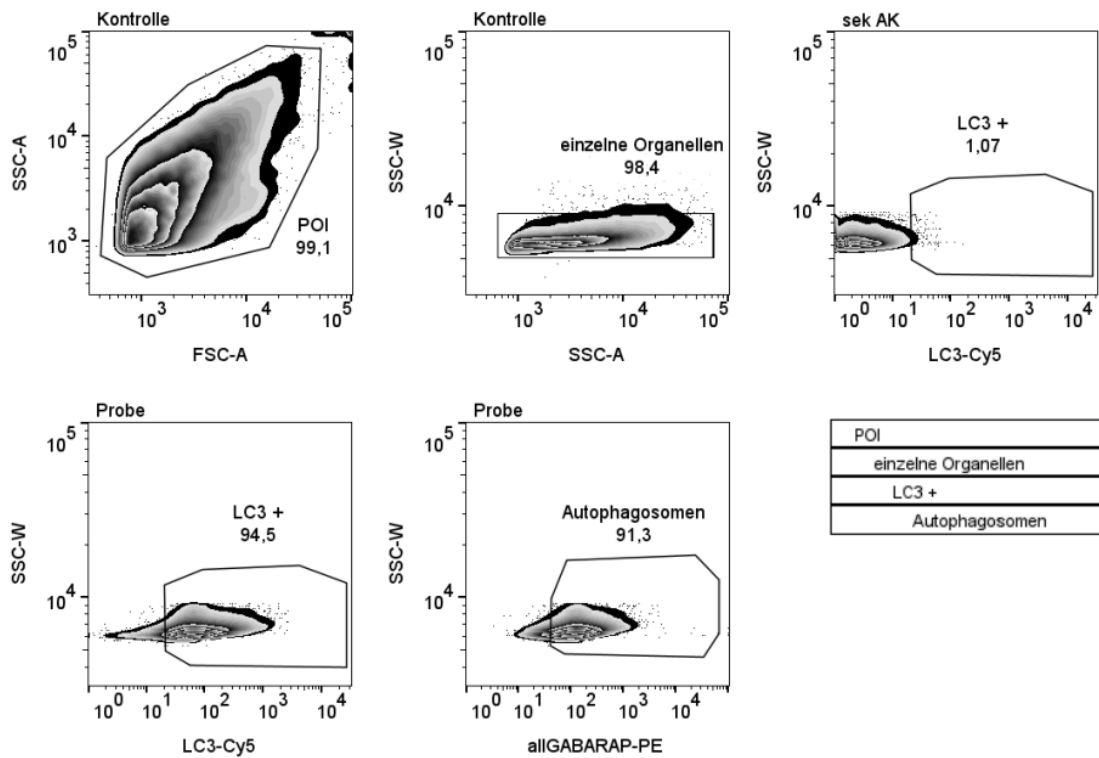


Abbildung 6 Gating-Strategie zur Isolation von autophagischen Vesikeln nach Markierung mit zwei unterschiedlichen Antikörpern Zuerst wurde per SSC und FSC die POI festgelegt und über ein weiteres Gate wurden Dubletten diskriminiert. Anschließend wurde anhand der sekundär Antikörper-Kontrolle ein Fenster mit Hilfe der Fluoreszenzintensität für die Population MAP1LC3B positiver Vesikel festgelegt. Hieraus ergab sich anhand der allGABARAPs-Färbung eine Population aus Autophagosomen.

Die isolierten Vesikel konnten für maximal 48 h bei 4 °C gelagert werden. Für molekularbiologische Analysen wurden die autophagischen Vesikel erneut zentrifugiert, in 40 µl PBS resuspendiert und die Probe für die RNA-Isolation vorbereitet (siehe Kapitel 2.1.5). Zur proteinbiochemischen Analyse mussten die Proteine aus den Isolaten präzipitiert werden (siehe Kapitel 2.1.3.1). Die isolierten Lysosomen wurden für Proteinanalysen erneut bei 20000 g und 4 °C für 20 min zentrifugiert und das Pellet direkt in Ladepuffer aufgenommen (siehe Kapitel 2.1.3.1.2).

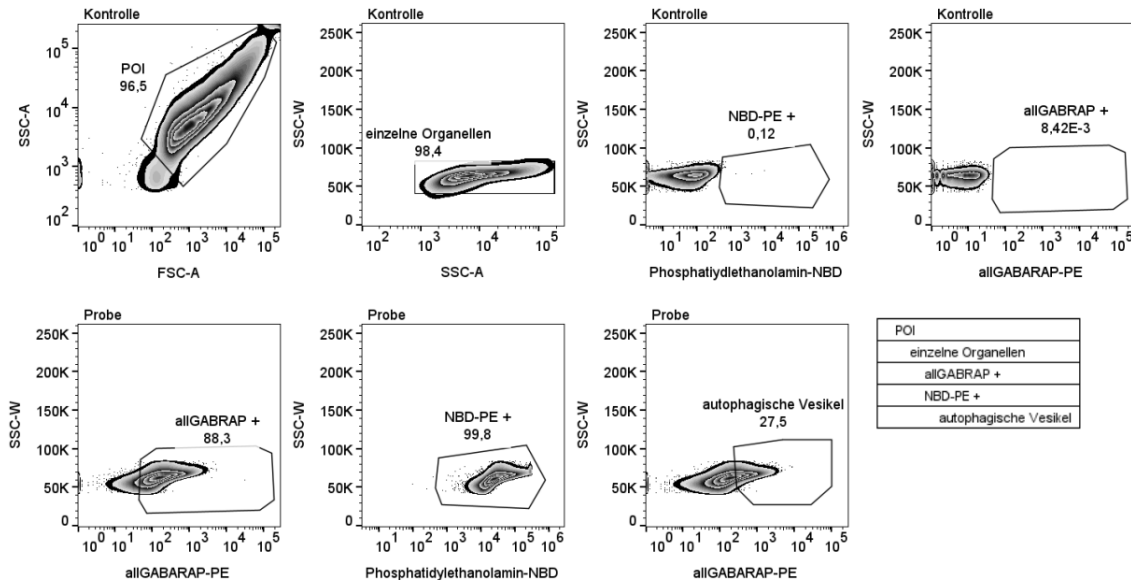


Abbildung 7 Gating-Strategie für autophagische Vesikel gefärbt mit fluoreszierendem Lipid Zuerst wurde mit SSC und FSC die POI festgelegt und über ein weiteres Gate wurden Dubletten diskriminiert. Anschließend wurde anhand der Kontrollen mithilfe der Fluoreszenzintensität ein Fenster für die Population autophagischer Vesikel festgelegt. Die Gates für NBD und PE wurden unabhängig voneinander festgelegt, während die Isolation der autophagischen Vesikel über das PE-definierte Gate in Abhängigkeit vom NBD-Gate durchgeführt wurde.

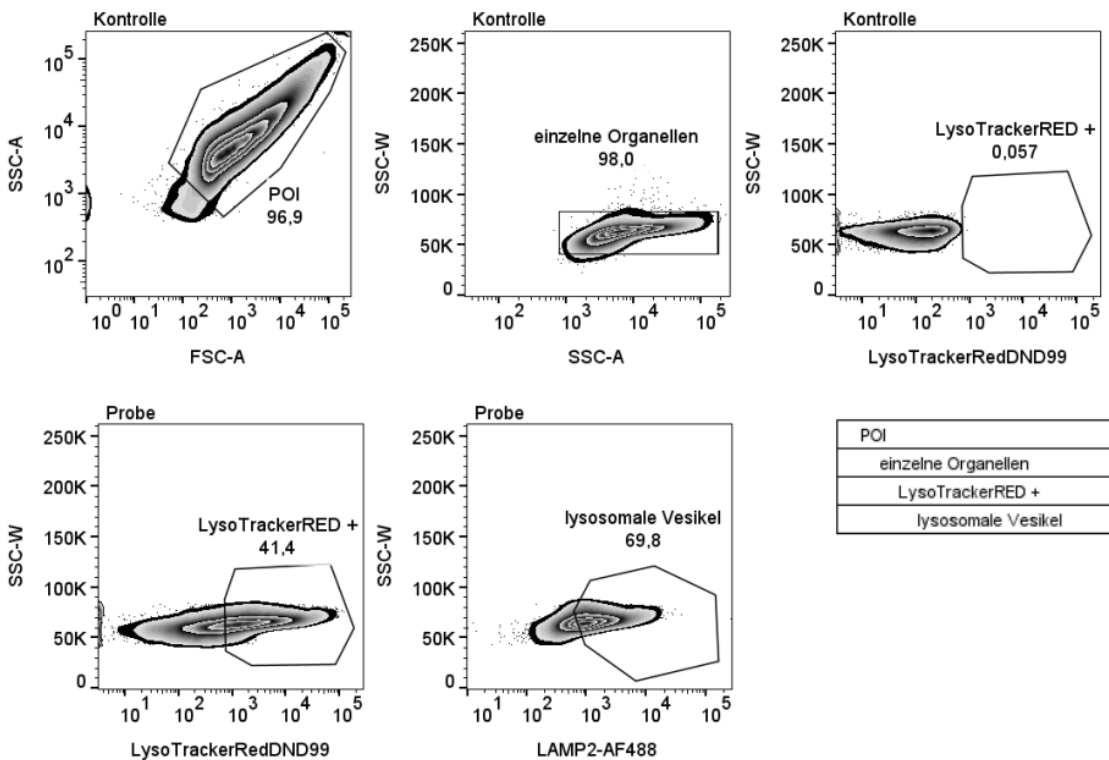


Abbildung 8 Gating-Strategie für lysosomale Vesikel Zuerst wurde mit SSC und FSC die POI festgelegt und über ein weiteres Gate wurden Dubletten diskriminiert. Anschließend wurde anhand der Kontrollen ein Fenster für die Population azidifizierter Vesikel anhand der LysoTracker RedDND-99-Färbung festgelegt. Die Population lysosomaler Vesikel wurde hiervon abhängig anhand von LAMP2 oder LAMP1 bestimmt.

2.1.3.2.4 Lipidom-Analysen

Die autophagischen Vesikel zur Analyse des Phospholipidoms wurden von isoliert und aufbereitet. Alle technischen Analysen zu den Phospholipiden wurden im Labor von am Institut für Physiologische Chemie der Universitätsmedizin Mainz durchgeführt. Die Auswertungen wurden von und erstellt und sind dezidiert publiziert (Schmitt *et al.*, 2022). Für diese Arbeit wurden die publizierten Daten erneut aufbereitet und tiefer gehend analysiert.

2.1.3.2.5 Proteinpräzipitation

Die Proteine aus isolierten autophagischen Vesikeln wurden präzipitiert, um sie per Western Blot (siehe Kapitel 2.1.3.3) zu untersuchen. Hierfür wurden zwei Präzipitationsprotokolle verwendet.

Für die eine Präzipitation (Schmitt *et al.*, 2022) wurde ein Chloroform-Methanol-Gemisch genutzt bestehend aus zwei Einheiten Methanol (Carl Roth) und einer Einheit Chloroform. Die 3,6x Menge dieses Gemisches wurde mit den Isolaten durch Invertieren vermengt. Anschließend wurde die 0,5x Menge Wasser gemessen am Volumen des Isolates durch Invertieren hinzugefügt und somit die Phasenbildung initiiert. In der Chloroformphase sammelten sich die Lipide, in der Methanolphase die Nukleinsäuren und zwischen den Phasen waren gefällte Proteine als weiße Flocken zu sehen. Das Gemisch wurde bei 7000 g und 4 °C für 45 min zentrifugiert, um eine differenzierte Phasentrennung zu beschleunigen. Die Methanol-Wasser-Phase wurde so weit wie möglich abgenommen, ohne die präzipitierten Proteine aufzunehmen. Die Chloroformphase wurde mit einem äquivalenten Volumen reinem Methanol aufgefüllt und invertiert. Durch die erneute Zentrifugation bei 7000 g und 4 °C für 45 min wurden die gefällten Proteine pelletiert. Das Methanol-Chloroform-Gemisch wurde abgenommen und verworfen, die Proteinflocken in Methanol aufgenommen und in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß überführt. Die Proteine wurden erneut bei 18000 g für 45 min pelletiert, das Methanol wurde vorsichtig abgenommen und evaporierte aus den Präzipitaten.

Das zweite Präzipitationsprotokoll basierte ebenfalls auf einer Chloroform-Methanol-Fällung (Wessel & Flugge, 1984). Die Isolate wurden mit der 4x Menge Methanol durch Invertieren vermengt und bei 7000 g für 1 min zentrifugiert. Anschließend wurde das Gemisch mit der 2x Menge Chloroform des ursprünglichen Isolat-Volumens vermengt und erneut bei 7000 g für 1 min zentrifugiert. Nun wurde Wasser entsprechend der 3x Menge des Isolat-Volumens hinzugegeben und die Präzipitation durch ausgiebiges Invertieren beschleunigt. Die Proben wurden bei 7000 g für 10 min zentrifugiert, die obere wässrige Phase wurde weitgehend entfernt, ohne die Interphase zu berühren. Mit der 3x Menge Methanol bezogen auf das Isolat-Volumen wurde die Lösung aufgefüllt, gevortext und bei 7000 g für 5 min

zentrifugiert. Der komplette Überstand wurde vorsichtig entfernt und das Präzipitat in 1 ml Methanol in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß überführt. Die Probe wurde bei 10000 g für 5 min zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Methanol evaporierte aus den Proben.

Die trockenen Proteine konnten bei -80 °C gelagert werden. Zur Aufbereitung der Proben für den Western Blot wurden die Präzipitate entweder in Urea-Puffer (siehe Tabelle 12) resuspendiert und sonifiziert, oder sie wurden unter einem Abzug erneut bei 60 °C für 10 min getrocknet und anschließend in 2x DTT-Ladepuffer (siehe Tabelle 13) resuspendiert. Schlussendlich wurden die Präzipitate für 10 min bei 95 % denaturiert.

Tabelle 12 Urea-Puffer

Komponenten	Konzentration/Anteil	pH 8,5
Tris	30 mM	
Urea	8 M	
CHAPS	4 % [m/V]	

Tabelle 13 2x DTT-Ladepuffer in MilliQ-H₂O

Komponenten	Konzentration/Anteil	pH 6,8
Tris-HCl	100 mM	
DTT	200 mM	
SDS	4 % [m/V]	
Glycerol	20 % [V/V]	
Bromphenolblau		

2.1.3.3 Proteom-Analysen

Die autophagischen Vesikel zur Analyse des Proteoms wurden von isoliert und aufbereitet. Alle technischen Analysen zum Proteom wurden im Labor von am Institut für Biochemie II der Universitätsmedizin der Goetheuniversität Frankfurt a.M. durchgeführt. Die Auswertungen wurden von , und erstellt und sind dezidiert publiziert (Schmitt *et al.*, 2022). Für diese Arbeit wurden die publizierten Daten erneut aufbereitet und tiefer gehend analysiert.

2.1.3.4 Mikroskopie

Für die Immunfluoreszenzfärbungen wurden die Zellen zwischen allen Arbeitsschritten drei bis viermal mit PBS gewaschen. Alle für die Färbung genutzten Antikörper wurden in Tabelle 38 und Tabelle 39 gelistet und 1:200 verdünnt genutzt. Die Färbungen wurden wie bereits publiziert durchgeführt (Spang *et al.*, 2014). Kurz, die Zellen wurden mit 90 %, -20 °C kaltem Methanol für 8 min oder mit 0,05 % Triton X-100 für 15 min permeabilisiert. Unspezifische Bindestellen in den Zellen wurden anschließend in 3 % BSA für 1 h blockiert. Der

primäre Antikörper wurde in 1 % BSA appliziert, der sekundäre Antikörper in PBS. Anschließend wurden die Zellkerne mit Dapi (4,6-Diamidino-2-Phenylindol-dihydrochlorid-hydrat, Calbiochem) 1:1000 verdünnt in PBS für 5 min angefärbt. Die Objektträger wurden bei -20 °C bzw. 4 °C gelagert. Anschließend wurden die Zellen mit Eindeckmedium auf Objektträger gebracht. Es wurde sowohl selbstangesetztes Eindeckmedium (siehe Tabelle 14) als auch Fluoromount-G (Thermo Fisher Scientific) verwendet.

Wurden Zellen nicht mit Antikörpern gefärbt und eine Permeabilisierung war nicht nötig, wurden die Zellen nach Fixierung für 20 bis 30 min mit Dapi 1:1000 verdünnt in PBS inkubiert, viermal gewaschen und in Eindeckmedium eingebettet.

Die Färbungen wurden am *Laser-Scanning* Mikroskop LSM710 und der Software ZEN (Zeiss) visualisiert und aufgenommen. Es wurden die 405 nm UV Laser Diode, der 488 nm Argon Laser sowie die 543 und 633 nm Helium-Neon Laser genutzt. Die Aufnahmen wurden mit einem *Objective EC Plan-Neofluar 40x/1,30 Oil M27* oder einem *Objective EC Plan-Neofluar 100x/1,30 Oil M27* unter Verwendung des Immersionsöl Immersol 518 F (Zeiss) angefertigt. Die aufgenommenen Bilder wurden mit Fiji oder GIMP bearbeitet.

Tabelle 14 Eindeckmedium in PBS

Komponente	Konzentration/Anteil
p-Phenylendiamin	1 mg/ml
Glycerol	70 % [V/V]

2.1.3.5 Aggregationsassay

Die vorbereiteten Zellpellets wurden in 1x PBS mit 1x Proteaseinhibitor resuspendiert, wobei sich das Volumen an der Größe des Pellets orientierte. Die Suspensionen wurden mit einer Amplitude von 60 % viermal für je 10 sec sonifiziert. Von der Suspension wurde ein Anteil als Kontrolle für den Immunoblot abgenommen. Die Suspensionen wurden bei 15500 g und 4 °C für 15 min zentrifugiert. Der Überstand wurde als lösliche Fraktion eingesammelt und das Pellet wurde in PBS gewaschen und erneut wie vorrangegangen zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 4x SDS-Lysispuffer resuspendiert. Die Pelletfraktion wurde bei 60 % Amplitude viermal für je 10 sec sonifiziert. Alle Proben wurden bei 95 °C für 5 min denaturiert. Der Assay wurde aus früheren Studien adaptiert (Witan *et al*, 2008) und gibt Aufschluss über mögliches Aggregationsverhalten von Proteinen.

2.1.3.6 Nachweis der Cathepsinaktivität

Die Zellpellets wurden auf Eis aufgetaut und in PBS und zytosolischem Lysispuffer im Verhältnis 1:3 resuspendiert. Die Suspensionen wurden bei 16000 g und 4 °C für 30 min zent-

rifugiert. Die Überstände wurden verworfen und die Pellets in PBS gewaschen. Danach wurden sie in PBS und lysosomalem Lysispuffer im Verhältnis 1:2 aufgenommen. Die Suspensionen wurden in zwei aufeinanderfolgenden Intervallen für 10 sec bei 60 % Amplitude sonifiziert. Die Proben wurden erneut bei 16000 g und 4 °C für 30 min zentrifugiert und es wurde mit den Cathepsin-angereicherten Überständen weitergearbeitet. Die Proteinkonzentrationen wurden mittels BCA-Assay ermittelt und pro Reaktion wurden 5 µg Protein eingesetzt. Die Proteinmengen wurden in Reaktionspuffer bei 37 °C für 15 min inkubiert. Für die Aktivitätsbestimmung von Cathepsin D wurde das Substrat OmniCathepsin (Enzo Life Sciences) in einer Konzentration von 40 µM mit dem Inhibitor Leupeptin (Calbiochem) mit einer Konzentration von 10 mM als Negativkontrolle verwendet. Die Aktivität der Cathepsine D und E wurde mit 20 µM Cathepsin D&E Substrat (Enzo Life Sciences) bestimmt, wobei Pepstatin A (Sigma-Aldrich) mit einer Konzentration von 0,5 M als Negativkontrolle diente. Die Substrate wurden den Proben hinzugefügt und die Fluoreszenz der gespaltenen Substrate über 180 min alle 30 sec bei 37 °C gemessen. Die Emission des OmniCathepsin-Substrates lag bei 380 nm und die Extinktion wurde bei 460 nm gemessen. Das Cathepsin D&E-Substrat wurde bei 340 nm angeregt und die Extinktion wurde bei 420 nm gemessen. Der Assay wurde aus früheren Studien adaptiert (Chakraborty *et al*, 2019; Hiebel *et al*, 2014).

Tabelle 15 zytosolischer Lysispuffer

Komponente	Konzentration/Anteil	pH 7,8
TrisHCl	20 mM	
EDTA	1 mM	
EGTA	1 mM	
Glycerol	1 % [V/V]	
DTT	2 mM	

Tabelle 16 lysosomaler Lysispuffer

Komponente	Bestandteil	pH 5
Natriumacetat	200 mM	
NaCl	50 mM	
Triton X-100	0,1 % [V/V]	

Tabelle 17 Reaktionspuffer

Komponente	Bestandteil	pH 5,5
Natriumacetat	100 mM	
NaCl	120 mM	
EDTA	1 mM	

2.1.3.7 Nachweis der Proteasomaktivität

Die Pellets wurden auf Eis aufgetaut, in Proteasomlysispuffer resuspendiert und in zwei aufeinanderfolgenden Intervallen 10 sec und mit 60 % Amplitude sonifiziert. Die Suspensionen wurden bei 15000 g und 4 °C für 15 min zentrifugiert und es wurde mit den Proteasomangereicherten Überständen weitergearbeitet. Die Proteinkonzentrationen wurden kalkuliert und pro Messung wurden 60 µg Protein eingesetzt. Die Proben wurden 10 min in Proteasomlysispuffer (siehe Tabelle 18) inkubiert. Als Negativkontrolle wurden Proben zusätzlich mit 100 µM MG132 (Enzo Life Sciences) inkubiert. Es wurde Assaypuffer (siehe Tabelle 19) zu den Proben hinzugegeben, der 100 µM des Substrates Suc-LLVY-AMC (Enzo Life Sciences) enthielt, und die Fluoreszenz des Abbauproduktes wurde 90 min bei 37 °C alle 60 sec gemessen. Die Emission lag bei 350 nm, die Extinktion wurde bei 440 nm gemessen. Der Assay wurde aus vorangegangenen Studien angepasst (Gamerdinger *et al.*, 2009).

Tabelle 18 Proteasomlysispuffer

Komponente	Konzentration/Anteil	pH 7,2
TrisHCl	40 mM	
NaCl	50 mM	
DTT	2 mM	
ATP	2 mM	
MgCl ₂	5 mM	
Glycerin	10 % [V/V]	

Tabelle 19 Assaypuffer

Komponente	Konzentration/Anteil	pH 7,5
TrisHCl	20 mM	
NaCl	50 mM	
DTT	2 mM	
Suc-LLVY-AMC	100 µM	

2.1.4 Molekularbiologische Arbeiten

2.1.4.1 Plasmidpräparation

Für die Isolation der verwendeten Plasmide (siehe Tabelle 43) wurden die Bakterienpellets aus der Expansionskultur genutzt. Es wurde den Herstellerangaben des *NucleoBond® Xtra Midi EF Kit* (Machery-Nagel) gefolgt. Das Plasmidpellet wurde in DEPC-behandeltem Wasser (Invitrogen) resuspendiert und die Konzentration der DNA mithilfe des NanoDrop 1000 (PeqLab) bei einer Wellenlänge von 260 nm bestimmt (Gallagher & Desjardins, 2008). Die gelösten Plasmide wurden bei -20 °C gelagert. Die Plasmidpräparationen wurden von technischen Assistierenden durchgeführt.

2.1.5 RNA-Isolation aus autophagischen Vesikeln

Die Vesikel wurden wie in Kapitel 2.1.3.2 beschrieben in Proben mit maximal 5 Millionen Vesikel vorbereitet und erneut bei 20000 g und 4 °C für 1 h pelletiert und mit NEBuffer 3 (New England BioLabs) versetzt und mit RNase I_r (New England BioLabs) den Herstellerangaben folgend für 30 min bei 37 °C inkubiert (siehe Tabelle 20). Die RNase wurde mit RNasin (Promega) inaktiviert. Anschließend wurden sowohl die Suspension der autophagischen Vesikel als auch die Gesamtzellen als Kontrolle mit 400 µl TriReagent/Trizol (Sigma-Aldrich) zur Extraktion der RNA vermengt (Roth *et al*, 2018). Zum Aufbrechen der Strukturen wurde das 1,5 ml *safe lock* Eppendorfgefäß 20x schnell über eine Gitterplatte gezogen. Die Proben wurden viermal 20 sec gevortext mit einer Zwischeninkubation von 40 sec auf Eis. Das Gemisch wurde mit 100 µl Chloroform durch Invertieren vermengt und anschließend kurz gevortext. Nach einer Inkubation von 3 min wurden die Proben bei 16000 g und 4 °C für 15 min zentrifugiert. Die untere organische Phase wurde verworfen, die obere wässrige Phase wurde in ein frisches Eppendorfgefäß überführt. Dabei wurde darauf geachtet, dass die DNA-reiche Interphase nicht überführt wurde. Die RNA wurde mit 100 µl Isopropanol präzipitiert und nach 10 min Inkubation für 10 min bei 16000 g und 4 °C zentrifugiert. Das Isopropanol wurde aspiriert und das RNA-Pellet wurde mit 75 %-igem Ethanol (Carl Roth) in DEPC-H₂O gewaschen. Das Pellet wurde bei 3500 g und 4 °C für 5 min zentrifugiert, das Ethanol verworfen und das Pellet wurde an der Luft getrocknet.

Die RNA wurde anschließend in 15 µl (RNA der autophagischen Vesikel aus 10 Millionen Autophagosomen) bzw. 20 µl (RNA der Zellen) DEPC-H₂O resuspendiert und die Konzentration am Spektralphotometer Nanodrop 1000 (Thermo Fisher Scientific) bestimmt.

Tabelle 20 Reaktionsansatz RNase-Verdau

Komponente	Volumen/Einheit
Probe	40 µl
RNase I _r	1000 U
10x NEBuffer 3	4,4 µl

Um eventuelle Kontaminationen mit DNA zu entfernen, wurden 5 µg RNA mit 20 U DNase I (Agilent) vermengt und bei 37 °C für 30 min inkubiert. Der DNase-Verdau wurde mit 2 µl 50 mM EDTA (Agilent) gestoppt und die DNase I bei 65 °C für 15 min hitzeinaktiviert (siehe Tabelle 21). Die RNA-Konzentration wurde erneut am NanoDrop bestimmt.

Tabelle 21 Reaktionsansatz DNase-Verdau

Komponente	Volumen/Einheit
RNA	5 µg
DNase I	20 U
10x Reaktionspuffer	2 µl
DEPC-H ₂ O	Ad 18 µl
50 mM EDTA	2 µl

2.1.5.1 Reverse Transkription und Polymerasekettenreaktion

Primer für die reverse Transkription (RT) sowie für die Polymerasekettenreaktion (PCR) wurden mit dem Onlinetool primer3web (Version 4.1.0) generiert (Koressaar *et al*, 2018; Koressaar & Remm, 2007; Untergasser *et al*, 2012). Für RT-Primer wurden Sequenzen am 3'-Ende gesucht mit einer optimalen Schmelztemperatur bei 50 °C. Die Primer für die PCR wurden sowohl am 3'- als auch am 5'-Ende des Transkriptionsproduktes der RT gesucht mit einer optimalen Schmelztemperatur von ca. 60 °C und mit einem optimalen GC-Gehalt von ca. 60 %. Die Sequenzen der Transkriptionsprodukte wurden größer als 100 Basenpaare (bp) generiert. Die Spezifität der Primer wurde mit dem Onlinetool BLAST (Altschul *et al*, 1990) überprüft. Für die Detektion spezieller RNA-Spezies wurde die RNA in der RT nicht wie laut Herstellerangabe mit Oligo dT-Primern, sondern mit spezifischen Primern eingesetzt. Die verwendeten Primer sind in Tabelle 42 und Tabelle 44 gelistet.

Für die Reverse Transkription wurde das Omiscript® Reverse Transcription Kit (Qiagen) nach Herstellerangaben verwendet (siehe Tabelle 22). Pro Ansatz einer RT wurden 250 ng bis 1 µg RNA eingesetzt. Die RNA wurde initial bei 70 °C für 5 min denaturiert und sofort auf Eis platziert. Der RT-Reaktionsmix wurde hinzugegeben und die Reaktion lief für 60 min bei 37 °C ab. Pro Reaktionsansatz wurde eine Probe ohne Transkriptase angesetzt, um die Proben auf eventuelle DNA-Kontaminationen kontrollieren zu können.

Pro PCR-Reaktion (siehe Tabelle 23) wurden 2 µl der in der RT generierten komplementären DNA (cDNA) eingesetzt. Für die PCR wurde die Polymerase Phusion (New England Biolabs) benutzt. Die PCR-Reaktion wurde initial bei 98 °C für 2 min gestartet, damit die cDNA und Primer denaturiert und linearisiert in der Reaktion vorliegen. Bei 57 °C wurde die Anlagerung der Primer an die cDNA in 30 sec katalysiert und bei 72 °C elongierte die Phusion cDNA für 25 sec. Anschließend wurden die cDNA-Primer-Komplexe erneut bei 98 °C für 10 sec denaturiert. Dieser Rhythmus wurde für insgesamt 35 Zyklen wiederholt, bis schließlich eine finale Elongation für 5 min stattfand (siehe Tabelle 24).

Tabelle 22 Reaktionsansatz reverse Transkription

Komponente	Volumen/Einheit
10x Reaktionspuffer	5 µg
dNTP Mix (5 mM pro dNTP)	2 µl
Oligo dT Primer (10 µM) ODER 1:10 spezifische Primer	2 µl
RNAsin	1 µl
Omniscript Reverse Transcriptase	1 µl
RNA-Probe	In 12 µl
Gesamtvolumen	20 µl

Tabelle 23 Reaktionsansatz Polymerasekettenreaktion

Komponente	Volumen/Einheit
RT-cDNA	2 µl
5x HF-Reaktionspuffer	5 µl
dNTP-Mix (10 µM)	0,5 µl
1:10 forward Primer	0,5 µl
1:10 reverse Primer	0,5 µl
Phusion	0,5 µl
H ₂ O	16 µl
Gesamtvolumen	25 µl

Tabelle 24 PCR-Programm für den Nachweis spezifischer RNAs in autophagischen Vesikeln

PCR-Zyklen	Temperatur	Zeit	Zyklen
Initiale Denaturierung	98 °C	35 sec	1
Denaturierung	98 °C	10 sec	} 34
Anlagerung der Primer	57 °C	30 sec	
Elongation	72 °C	25 sec	
Finale Elongation	72 °C	5 min	1
Kühlung	4 °C	∞	

2.1.5.2 Agarosegellauf

Um die korrekte Fragmentgröße der PCR-Produkte zu überprüfen, wurden diese mit 6x *Gel loading Dye* (New England Biolabs) vermengt und direkt auf ein 2 % Agarosegel aufgetragen. Das Agarosegel wurde in 1x TAE-Puffer (siehe Tabelle 25) angesetzt, wobei der Puffer in einer Mikrowelle erhitzt wurde, um die Agarose darin aufzulösen. Nach dem diese vollständig aufgelöst war, kühlte die Agarosemischung ab. Es wurden auf 50 ml Agarosegelansatz 1 Tropfen Ethidiumbromid (AppliChem) gegeben und die Agarosemischung wurde in noch komplett flüssigem Zustand in eine vorbereitete *PerfectBlue™ System Mini* (PeqLab) Gelkammer gegossen und härtete aus. Pro Probenansatz wurden maximal 3 µl MassRuler DNA-Leiter (Thermo Fisher Scientific) sowie 15 µl PCR-Produkt mit Ladepuffer auf das Agarosegel aufgeladen und die cDNA-Fragmente wurden bei 60 bis 80 mA zwischen 30 und 45 min aufgetrennt.

Die PCR-Produkte wurden mithilfe eines Gel iX20 Imager (Intas Science Imaging) unter UV-Licht visualisiert und mithilfe der INTAS *Capture Software* dokumentiert.

Tabelle 25 50x TAE-Puffer

Komponente	Konzentration
Tris	2 M
Natriumacetat	1 M
EDTA	50 mM

2.1.6 Auswertung und Statistik

Die Proteomic-Daten aus der vorangegangenen Publikation „Lipid and protein content profiling of isolated native autophagic vesicles“ (Schmitt *et al.*, 2022) wurden im Zuge dieser Arbeit tiefergehend analysiert. Hierfür wurden die online verfügbaren Werkzeuge UniProt (UniProt, 2025), RBB2GO (Caudron-Herger *et al.*, 2021) und QuickGO (Thakur *et al.*, 2025) genutzt.

Die auf den Membranen mittels Western Blot detektierten Proteine wurden mit Image Studio Lite densitometrisch quantifiziert. Die ermittelten Werte wurden auf Tubulin normiert. Die Bildung der Autophagosomen und somit die autophagische Aktivität lässt sich im Zellmodell messen, wenn die Ansäuerung der Lysosomen verhindert und somit die Fusion von Autophagosomen und Lysosomen verhindert wird – so lässt sich der autophagische Flux, also die Menge der neugebildeten Autophagosomen pro Zeiteinheit, messen. Zur Bestimmung des autophagischen Fluxes wurden die normierten Werte aller MAP1LC3BII-Proteinspiegel kalkuliert. Anschließend wurde die Differenz aus den Werten der zusammengehörigen Proben mit und ohne Bafilomycin A₁-Behandlung gebildet (Klionsky *et al.*, 2021). Die Differenzen wurden in Relation zu einer Kontrolle gesetzt und die Veränderungen des Fluxes bestimmt.

Die Kolokalisation von Proteinen und Lipiden wurde in ImageJ/Fiji (Schindelin *et al.*, 2012) mittels des Pearson Koeffizienten mit dem Werkzeug Coloc2 bestimmt. Immunfluoreszenzfärbungen wurden hier vorbearbeitet und mithilfe von GIMP bzw. CorelDraw weiterbearbeitet.

Schematische Darstellungen wurden mit CorelDraw angefertigt. Die in Abbildung 1 bis Abbildung 4, Abbildung 15, sowie Abbildung 36 bis Abbildung 38 dargestellten Schemata wurden angefertigt mit Teilen Institutseigener Vorlagen, die von Micheal Plenikowski (Institut für Physiologische Chemie, Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität Mainz) erstellt wurden.

Durchflusszytometrische Daten wurden mithilfe von FloJow aufbereitet.

Die enzymatischen Aktivitäten wurden mithilfe von Microsoft Excel und Prism bestimmt. Hierfür wurde mithilfe der Funktion „*Nonlinear Regression*“ das Modell „Michaelis-Menten“

gewählt, um die maximale Umsatzgeschwindigkeit (v_{\max}) der Proben zu bestimmen. Diese Werte wurden relativiert und gegeneinander verglichen.

Statistische Auswertungen wurden mit Microsoft Excel vorbereitet und mit Prism durchgeführt. Es wurden sowohl *one-way* ANOVA als auch t-test für je gleiche und ungleiche Verteilungen genutzt. Als Posthoc-Test wurden Tuckey oder Bonferroni gewählt. Für die Analyse der Lipidomdaten wurde die *two-way* ANOVA mit dem Sidak's Posthoc-Test verwendet. Die aus allen Posthoc-Tests errechneten P-Werte kleiner 0,1 wurden als signifikant (*), kleiner 0,05 als sehr signifikant (**) und kleiner 0,01 als äußerst signifikant (***) definiert.

2.2 Materialien

Verbrauchsmaterialien sowie allgemeine Laborhilfsmittel wie Pipettierhilfen werden nicht aufgeführt.

2.2.1 Geräte

Tabelle 26 Allgemeine Gerätschaften

Bezeichnung	Hersteller (Sitz)
Feinwaage Quintix124-1S	Sartorius Lab Instruments (Göttingen, DEU)
FKS 3600 (Kühlschrank 4 °C)	Liebherr (Kirchdorf a. d. Iller, DEU)
FKS5010 (Kühlschrank 4 °C)	Liebherr (Kirchdorf a. d. Iller, DEU)
Hera Freeze HFU B Series	Thermo Fisher Scientific (Dreieich, DEU)
Leica AF7000 Weitfeldmikroskop	Leica Microsystems (Wetzlar, DEU)
LSM710 laser scanning Mikroskop	Carl Zeiss AG (Jena, DEU)
Micro 200R	Hettich (Tuttlingen, DEU)
Micro Star 17	VWR International (Radnor, USA)
Mixer Mini Vortex	VWR International (Radnor, USA)
Optima-Max	Beckman Coulter (Brea, USA)
pH-Meter CG 820	Schott AG (Mainz, DEU)
Thermo-Magnetrührer IKAMAG® RCT	Janke&Kunkel GmbH (Staufen, DEU)
Thermomixer compact	Eppendorf SE (Hamburg, DEU)
Ultrasonic processor UP50H	Hielscher Ultrasound Technology (Teltow, DEU)
Universal 32 R	Hettich (Tuttlingen, DEU)
Vakuumpumpe	KNF (Schenkton, CHE)
Waage BL6100	Sartorius Lab Instruments (Göttingen, DEU)
Premium NoFrost	Liebherr (Kirchdorf a.d. Iller, DEU)
Varioklav® Dampfsterilisator	HP Medizintechnik (Oberschleißheim, DEU)

Tabelle 27 Gerätschaften Molekularbiologie

Bezeichnung	Hersteller (Sitz)
Agagel-Mini Biometra	Biometra (Göttingen, DEU)
Gel iX20 Imager	Intas Science Imaging Instruments (Göttingen, DEU)
PCR DNA Thermocycler	Biometra (Göttingen, DEU)
PerfectBlue™ Gel system Mini	PeqLab Biotechnologie (Erlangen, DEU)
Spektralphotometer Nanodrop 1000	Thermo Fisher Scientific (Dreieich, DEU)

Tabelle 28 Gerätschaften Proteinbiochemie

Bezeichnung	Hersteller (Sitz)
Amersham Imager 600	GE HealthCare (Frankfurt, DEU)
Mini-PROTEAN® III Western Blotting	BioRad (München, DEU)
PowerPac 300	BioRad (München, DEU)
PowerPac™ Basic	BioRad (München, DEU)
Power Supply Powerpac 300	BioRad (München, DEU)
Trans-Blot®Turbo™ Transfer System	BioRad (München, DEU)
Varioskan Lux	Thermo Fisher Scientific (Dreieich, DEU)
Xcell SureLock™ NuPage	Thermo Fisher Scientific (Dreieich, DEU)

Tabelle 29 Gerätschaften Zellkultur

Bezeichnung	Hersteller (Sitz)
HERASAFE 2030i	Thermo Fisher Scientific (Dreieich, DEU)
Inkubator	Binder (Tuttlingen, DEU)
Integra VACUSAFE 158 3XX	INTEGRA Biosciences (Biebertal, DEU)
Multifuge 3 S-R	Heraeus (Hanau, DEU)
Nukleofactor™ 2b	Lonza (Basel, CHE)
Stereomikroskop CKX31	Olympus (Tokyo, JPN)
Wasserbad WBT 22	medingLab (Freital, DEU)

2.2.2 Chemikalien und Kits

Tabelle 30 Chemikalien

Bezeichnung	Bestell-Nr.	Hersteller (Sitz)
1,4-Dithiotreit (DTT)	10708984001	Roche (Basel, CHE)
16:0-18:1 PC	850457P	Avanti Polar Lipids (Alabaster, USA)
2'-Desoxyadenosin-5'-triphosphat (dATP)	20-1011	VWR International (Radnor, USA)
2'-Desoxycytidin-5'-triphosphat (dCTP)	20-1021	VWR International (Radnor, USA)
2'-Desoxyguanosin-5'-triphosphat (dGTP)	20-1031	VWR International (Radnor, USA)
2'-Desoxythymidin-5'-triphosphat (dTTP)	20-1041	VWR International (Radnor, USA)
3-[(3-Cholamidopropyl)-dimethylammonio]-1-propansulfonat (CHAPS)	1479	Carl Roth (Karlsruhe, DEU)
5x Phusion® HF Reaction Buffer	B0518S	New England BioLabs (Frankfurt a.M., DEU)
AB/AM	A5955	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Ammoniumpersulfat (APS)	A3678	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
ATP	A2383	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Bacto Agar	214030	BD Biosciences (Franklin Lakes, USA)
Bacto-Trypton	211705	BD Biosciences (Franklin Lakes, USA)
Bafilomycin A ₁	B110000	Toronto Reserach Chemicals (North York, CAN)

Der Einfluss von Sphingomyelin auf die Autophagie in Abhängigkeit von ATG9A und RNA
als Autophagiesubstrat

Biozym LE Agarose	840004	Biozym Scientific (Hess. Oldendorf, DEU)
Bis-Tris	9140.3	Carl Roth (Karlsruhe, DEU)
Bovines Serum Albumin (BSA)	A3311	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Bromphenolblau	B6131	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Calciumchlorid	C7902	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Cathepsin D & E Substrat (fluorogenic)	BML-P145-0001	Enzo Life Sciences (Farmingdale, USA)
Chloroform	4432.1	Carl Roth (Karlsruhe, DEU)
cOmplete, EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail	5056489001	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
DEPC-Treated Water	AM9916	Invitrogen (Waltham, USA)
Dimethylsulfoxid (DMSO)	A994.1	Carl Roth (Karlsruhe, DEU)
Dulbecco's Modified Eagle Medium	41965-039	Invitrogen (Waltham, USA)
Earle's Balanced Salts	E28888	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Ethanol p.a.	9065.2	Carl Roth (Karlsruhe, DEU)
Ethanol vergällt ≥99.5%	85033360	VWR International (Radnor, USA)
Ethidiumbromid	A2273	AppliChem (Darmstadt, DEU)
Ethylendiamin-tetraessigsäure (EDTA)	8043.2	Carl Roth (Karlsruhe, DEU)
Ethylenglykol-bis-(2-aminoethyl)-tetraessigsäure, 1,2-Bis-(2-aminoethoxyethan)-N,N,N',N'-tetraessigsäure (EGTA)	3054	Carl Roth (Karlsruhe, DEU)
FBS delipidisiert	FCS.LFS.0500	Bio&Sell (Feucht, DEU)
Fetal Calv Serum	F7524	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Fluoromount-G	00-4958-02	Thermo Fisher Scientific (Dreieich, DEU)
Glucose	6780.1	Carl Roth (Karlsruhe, DEU)
Glycerol	G9012-1L	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Hefeextrakt	Y1625	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Immersol 518 F fluoreszenzfrei	444962-0000-000	Zeiss (Jena, DEU)
Isopropanol	6752.4	Carl Roth (Karlsruhe, DEU)
Kaliumchlorid (KCl)	6781.1	Carl Roth (Karlsruhe, DEU)
Leupeptin	108975	Calbiochem (San Diego, USA)
Luminol	123072	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Magnesiumchlorid (MgCl ₂)	M8266	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Magnesiumsulfat (MgSO ₄)	230391	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Methanol ≥98.5%, TECHNICAL	20903368	VWR International (Radnor, USA)
Methanol ≥99 %, zur Synthese	8388.1	Carl Roth (Karlsruhe, DEU)
MG132	BML-PL102	Enzo Life Sciences (Farmingdale, USA)
N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED)	161-0801	BioRad (München, DEU)
N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure (HEPES)	7365-45-9	Carl Roth (Karlsruhe, DEU)

Natrium-Acetat x 3 H ₂ O	3856.1	Carl Roth (Karlsruhe, DEU)
Natriumazid (NaN ₃)	K305.2	Carl Roth (Karlsruhe, DEU)
Natriumchlorid (NaCl)	3957.2	Carl Roth (Karlsruhe, DEU)
Natriumlaurylsulfat (SDS)	161-0302	BioRad (München, DEU)
Natrium-Pyruvat (100x)	1136039	Invitrogen (Waltham, USA)
NEBuffer 3	B7003S	New England BioLabs (Frankfurt a.M., DEU)
Nonfat dried milk powder	A0830,5000	AppliChem (Darmstadt, DEU)
NuPAGE MES SDS Running Buffer 20x	NP000202	Invitrogen (Waltham, USA)
NuPage MOPS SDS running buffer (20x)	NP0001	Invitrogen (Waltham, USA)
OmniCathepsin™ Fluorogenic Substrate	BML-P139	Enzo Life Sciences (Farmingdale, USA)
OmniPur®Acrylamide:Bis Solution 29:1 40 % Solution	1710-1L	Calbiochem (San Diego, USA)
PBS 1x steril	D8537-500	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Pepstatin A	P5318	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
PP2	529573	Calbiochem (San Diego, USA)
RNasin® Plus RNase Inhibitor	N2615	Promega (Madison, USA)
Roti Histofix, 4%	P087.3	Carl Roth (Karlsruhe, DEU)
Saccharose	4661.2	Carl Roth (Karlsruhe, DEU)
Salzsäure rauchend 37%	X942	Carl Roth (Karlsruhe, DEU)
Suc-LLVY-AMC	BML-P802	Enzo Life Sciences (Farmingdale, USA)
TriReagent/Trizol	T9424	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Tris	4855.2	Carl Roth (Karlsruhe, DEU)
TrisHCl	9090.4	Carl Roth (Karlsruhe, DEU)
Triton X-100	T8787	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Trypanblau	T-8154	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Tween® 20	9127.1	Carl Roth (Karlsruhe, DEU)
Urea	3941.2	Carl Roth (Karlsruhe, DEU)
Wasserstoffperoxid (H ₂ O ₂)	H1009	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
β-Mercaptoethanol	4227.3	Carl Roth (Karlsruhe, DEU)
p-Kumarinsäure	C9008	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
p-Phenylendiamin	P6001	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)

Tabelle 31 Kits und Größenstandards

Bezeichnung	Bestell-Nr.	Hersteller (Sitz)
Gel Loading Dye Purple, 6x	B7024S	New England BioLabs (Frankfurt a.M., DEU)
Immobilon Western chemilumineszentes HRP-Substrat	WBKLS0500	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
MassRuler DNA-Leiter-Gemisch	SM0403	Thermo Fisher Scientific (Dreieich, DEU)
NucleoBond® Xtra Midi EF	740420	Marcherey-Nagel (Düren, DEU)
Ominscript® Reverse Transcription Kit	205113	Qiagen (Hilden, DEU)
PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder	26620	Thermo Fisher Scientific (Dreieich, DEU)
Pierce™ BCA Protein Assay	23225	Thermo Fisher Scientific (Dreieich, DEU)
PageRuler™ Prestained Protein Ladder	26617	Thermo Fisher Scientific (Dreieich, DEU)
Trans-Blot Turbo RTA Mini Nitrocellulose Transfer Kit	170-4270	BioRad (München, DEU)

Tabelle 32 Enzyme

Bezeichnung	Bestell-Nr.	Hersteller (Sitz)
DNase I	600032	Agilent (Santa Clara, USA)
Phusion HF DNA Polymerase	M0530L	New England BioLabs (Frankfurt a.M., DEU)
RNase I _r	M0243S	New England BioLabs (Frankfurt a.M., DEU)
Trypsin	15400-054	Invitrogen (Waltham, USA)

2.2.3 Antikörper und Farbstoffe

Tabelle 33 Farbstoffe

Farbstoff	Bestell-Nr.	Hersteller (Sitz)
BODIPY™ FL C5-Sphingomyelin (N-(4,4-Difluoro-5,7-Dimethyl-4-Bora-3a,4a-Diazas-Indacen-3-Pentanoyl)Sphingosylphosphocholin)	11510306	Invitrogen (Waltham, USA)
LysoTracker RedDND-99	L-7528	Molecular Probes (Eugene, USA)
18:1-06:0 NBD PC	810132P	Avanti Polar Lipids (Alabaster, USA)
18:1-12:0 NBD PE	810156C	Avanti Polar Lipids (Alabaster, USA)
4,6-Diamidino-2-Phenylindol-dihydrochlorid-hydrat (DAPI)	382061	Calbiochem (San Diego, USA)

Tabelle 34 primäre Antikörper für Durchflusszytometrie

Antikörper	Spezies	Bestell-Nr.	Hersteller (Sitz)
GABARAP+GABARAPI1+GABARAPL2 (APC)	Maus	ab223949	Abcam (Cambridge, GRB)
GABARAP+GABARAPI1+GABARAPL2 (PE)	Maus	ab223948	Abcam (Cambridge, GRB)
LAMP-2/CD107b [Alexa Fluor® 488]	Kaninchen	NBP2-22217AF488	Novus Biologicals (Littleton, USA)
MAP1LC3B	Kaninchen	NB100-2220	Novus Biologicals (Littleton, USA)
MAP1LC3B	Maus	0260-100	Nanotools (München, DEU)
MAP1LC3B Antibody [Alexa Fluor®647]	Kaninchen	NB100-2220AF647	Novus Biologicals (Littleton, USA)

Tabelle 35 sekundäre Antikörper für Durchflusszytometrie

Antikörper	Konjugat	Bestell-Nr.	Hersteller (Sitz)
anti-Hase	Cy3	715-165-151	Jackson ImmunoResearch (Cambridge, GRB)
anti-Hase	Cy5	711-175-152	
anti-Maus	AF488	711-485-152	
anti-Maus	Cy5	711-175-150	

Tabelle 36 primäre Antikörper für Immunoblotting

Antikörper	Spezies	Bestell-Nr.	Hersteller (Sitz)
ATG2A	Kaninchen	MBLPD041	Biozol Diagnostica (Eching, DEU)
ATG2B	Kaninchen	25155-1-AP	Proteintech (Rosemont, USA)
ATG9A (C-term)	Kaninchen	ab108338	Abcam (Cambridge, GRB)
Cathepsin D	Kaninchen	ab75852	Abcam (Cambridge, GRB)
GAPDH	Kaninchen	MCA P 77	Bio-Rad AbD Serotec (Neuried, DEU)
LAMP2	Maus	25631	Abcam (Cambridge, GRB)
M6PR	Maus	ab8093	Abcam (Cambridge, GRB)
MAP1LC3B	Kaninchen	NB100-2220	Novus Biologicals (Littleton, USA)
MAP1LC3BI+II	Kaninchen	L7543	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
RAB11	Kaninchen	5589	Cell Signaling Technologies (Danvers, USA)
RAB18	Maus	60057-1-Ig	Proteintech (Rosemont, USA)
SOD1	Kaninchen	ab51254	Abcam (Cambridge, GRB)
SQSTM1	Meerschweinchen	GP62-C	Progen Biotechnik (Heidelberg, DEU)
SRP9	Kaninchen	5174	Cell Signaling Technologies (Danvers, USA)
Telomerase	Kaninchen	ab32020	Abcam (Cambridge, GRB)
Tubulin	Ratte	ab131239	Abcam (Cambridge, GRB)
Ubiquitin	Maus	3936	Cell Signaling Technologies (Danvers, USA)

Tabelle 37 sekundäre Antikörper für Immunoblotting

Antikörper	Konjugat	Bestell-Nr.	Hersteller (Sitz)
anti-Hase	HRP	711-035-152	Jackson ImmunoResearch (Cambridge, GRB)
anti-Maus	HRP	715-035-151	
anti-Meerschweinchen	HRP	706-035-148	
anti-Ratte	HRP	112-035-003	

Tabelle 38 primäre Antikörper für Immunofluoreszenzfärbungen

Antikörper	Spezies	Bestell-Nr.	Hersteller (Sitz)
GM130	Maus	610823	BD Biosciences (Franklin Lakes, USA)
LAMP2	Maus	25631	Abcam (Cambridge, GRB)
MAP1LC3B	Maus	0260-100	Nanotools (München, DEU)
MAP1LC3B	Kaninchen	NB100-2220	Novus Biologicals (Littleton, USA)
RAB11	Kaninchen	5589	Cell Signaling Technologies (Danvers, USA)
SQSTM1	Meerschweinchen	GP62-C	Progen Biotechnik (Heidelberg, DEU)
TGN46	Schaf	AHP500	BioRad (München, DEU)
Vimentin	Maus	sc-5565	Santa Cruz Biotechnology (Dallas, USA)

Tabelle 39 sekundäre Antikörper für Immunofluoreszenzfärbungen

Antikörper	Konjugat	Bestell-Nr.	Hersteller (Sitz)
anti-Hase	AF488	711-485-152	Jackson ImmunoResearch (Cambridge, GRB)
anti-Hase	Cy2	711-225-152	
anti-Hase	Cy3	715-165-151	
anti-Hase	Cy5	711-175-152	
anti-Maus	AF488	35502	Invitrogen (Waltham, USA)
anti-Maus	Cy2	715-225-151	Jackson ImmunoResearch (Cambridge, GRB)
anti-Maus	Cy3	715-165-151	
anti-Maus	Cy5	711-175-150	
anti-Meerschweinchen	AF488	706-486-148	
anti-Meerschweinchen	Cy2	706-175-148	
anti-Meerschweinchen	Cy3	706-165-148	
anti-Meerschweinchen	Cy5	706-175-148	
anti-Schaf	Cy3	713-165-147	

2.2.4 Organismen

Alle zellbiologischen Arbeiten wurden in HeLa-Zellen durchgeführt. Diese Zellen sind adherente Epithelzellen aus einem Zervixkarzinom, dessen Gewebeprobe 1951 der Patientin Henrietta Lacks entnommen wurde (Scherer *et al*, 1953). Die Zellen wurden von

von der MRC Human Genetics Unit, Institute of Genetics and Molecular Medicine, University of Edinburgh zur Verfügung gestellt.

Tabelle 40 Bakterienstämme

Stamm	Genotyp	Quelle
Escherichia coli DH5 α	fhuA2 Δ (argF-lacZ)U169 phoA glnV44 Φ 80 Δ (lacZ)M15 gyrA96 recA1 relA1 endA1 thi-1 hsdR17	New England BioLabs (Frankfurt a.M., DEU)

Tabelle 41 humane Zelllinien

Bezeichnung	Genotyp/Stamm	Quelle
HeLa WT	WT	MRC Human Genetics Unit, Institute of Genetics and Molecular Medicine, University of Edinburgh (GBR)
HeLa ATG2A/B KO Klon 1H11	Deletion von ATG2A und ATG2B	Institut für Pathobiochemie, Universitätsmedizin der JGU Mainz (DEU)
HeLa ATG9A KO Klon 3E	Deletion von ATG9A	Institut für Pathobiochemie, Universitätsmedizin der JGU Mainz (DEU)
HeLa RAB18 KO Klon IV	Deletion von RAB18	Institut für Pathobiochemie, Universitätsmedizin der JGU Mainz (DEU)

2.2.5 Oligonukleotide

Alle siRNAs (*small interfering RNA*) wurden bei Merck (Darmstadt, DEU) erworben. Das Plasmid mCherryATG9A wurde von Prof. Ivan Đikić vom Institut für Biochemie II der Goethe Universität Frankfurt a.M. zur Verfügung gestellt. Alle Plasmidkarten sind am Institut für Pathobiochemie hinterlegt. Die verwendeten Primer wurden von Eurofins Genomics bezogen (Ebersberg, DEU). Die Oligo(dT)₁₅ Primer wurden von Promega (Walldorf, DEU) erworben.

Tabelle 42 PCR-Primer

Bezeichnung		Sequence (5'->3')
18 rRNA	for	AAGACGGACCAGAGCGAAAG
	rev	TCCACCAACTAAGAACGGCC
28S rRNA	for	CAGGTGCAGATCTTGGTGGT
	rev	ATTTTCAAGGGCCAGCGAGA
7SL	for	TCGCTTGAGTCCAGGAGTTC
	rev	TTTGACCTGCTCCGTTTCCG
ATG16L1	for	ATGCGCGGATTGTCTCAGG
	rev	GTCCACTCATTACACATTGCTCT
MAP1LC3B	for	CTGTTGGTGAACGGACACAG
	rev	CTGGGAGGCATAGACCATGT
RPL19	for	GAAATCGCCAATGCCAACTC
	rev	TTCCTTGGTCTTAGACCTGCG
SQSTM1	for	GTGGTAGGAACCCGCTACAA
	rev	GAGAAGCCCTCAGACAGGTG
TER	for	CGCCTTCCACCGTTCATTCT
	rev	GACTCGCTCCGTTCTCTTC

Tabelle 43 Plasmide

Bezeichnung	Quelle
pCMV-HA-N	Clontech (Saint-Germain-en-Laye, FRA)
mCherry-ATG9A	Institut für Biochemie II, Goethe Universität FRA (DEU)

Tabelle 44 RT-Primer

Bezeichnung	Sequence (5'->3')
18S rRNA	TTCCTCTAGATAGTCAAGTT
28S rRNA	TCCTCAGCCAAGCACATACA
7SL	ATCCCACTACTGATCAGCA
TER	GAGCCGAGTCCTGGGTGCAC

Tabelle 45 siRNA-Sequenzen

siRNA		Sequence (5'->3')
non sense	<i>sense</i>	GGGAAUUGCGUUAGCAGUGAU[dT][dT]
	<i>antisense</i>	AUCACUGCUAACGCAUUUCCC[dT][dT]
ATG9A	<i>sense</i>	GUACAUGAAUUGCUUCUUG[dT][dT]
	<i>antisense</i>	CAAGAAGCAAUUCAUGUAC[dT][dT]

2.2.6 EDV-Programmen und Online-Werkzeuge

Tabelle 46 Elektronische Datenverarbeitungs- (EDV)-Programme

Bezeichnung	Version	Herausgeber (Sitz)
AIDA Image Analyzer	4.26	Raytest Isotopenmeßgeräte (Straubenhardt, DEU)
CorelDraw Standard 2021	23.0.0.363	Corel Corporation (Ottawa, CAN)
EndNote™ 20	20.6.24	Clarivate™ (Philadelphia, USA)
FlowJo™	10.8	BD Life Sciences (Franklin Lakes, USA)
GIMP	2.10.38	GNU General Public License
GraphPad Prism	8.0.1/10.4.0	Dotmatics (Boston, USA)
Image Studio Lite	5.2.5	LI-COR Biosciences (Lincoln, USA)
ImagJ	1.54F	National Institutes of Health (Bethesda, USA)
GelDoc System	0.2.14	Intas Science Imaging Instruments (Göttingen, DEU)
Microsoft® Excel® für Microsoft 365 MSO	2410 Build 16.0.18129.20100	Microsoft Corporation (Redmond, USA)
Microsoft® PowerPoint® für Microsoft 365 MSO	2410 Build 16.0.18129.20100	Microsoft Corporation (Redmond, USA)
Microsoft® Word für Microsoft 365 MSO	2410 Build 16.0.18129.20100	Microsoft Corporation (Redmond, USA)
NanoDrop 1000	3.7.1	Thermo Fisher Scientific (Dreieich, DEU)
Skant RE	6.0.2	Thermo Fisher Scientific (Dreieich, DEU)
Zen 2011 SP7 FP3	14.0.24.201	Carl Zeiss AG (Jena, DEU)

Tabelle 47 Online-Werkzeuge

Bezeichnung	Herausgeber	Html-Adresse
BLAST (Basic Local Alignment Search Tool)	National Library of Medicine (Bethesda, USA)	blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi
primer3web	Whitehead Institute for Biomedical Research (USA)	primer3.ut.ee
QuickGO	EMBL-EBI (GBR)	www.ebi.ac.uk/QuickGO
RBP2GO	DKFZ Heidelberg (DEU)	rbp2go.dkfz.de
UniProt	The UniProt Consortium	www.uniprot.org

3 Ergebnisse

3.1 Sphingomyelin ist Bestandteil der autophagosomalen Membran und beeinflusst die Autophagie in HeLa-Zellen

Die Makroautophagie wird durch die Bildung eines doppelmembranösen Vesikels, des Autophagosoms, charakterisiert, das während seiner Biogenese abzubauen Substrate in sich einschließt (Aman *et al.*, 2021). Dabei ist die Bildung des Autophagosoms von einer ausreichenden Verfügbarkeit von Lipiden abhängig, die für die Autophagosomenmembran benötigt werden, da Autophagosomen *de novo* gebildet werden. Die Vorläuferstruktur des Autophagosoms, die Phagophore, wird von diversen Proteinkomplexen und Zellkompartimenten mit Lipiden versorgt. Hauptversorger der Phagophore ist das ER mit dem ERES (*ER exit site*). Auch ERGIC (*ER Golgi intermediate compartment*), Mitochondrien, das endosomale System und sogar die Plasmamembran sind als direkte Lipidquellen der Phagophore beschrieben (Gomez-Sanchez *et al.*, 2021). Lipidtröpfchen assoziieren mit dem ER bei der Bildung von Phagophoren – entweder für die Bereitstellung von Fettsäuren für die Synthese neuer Phospholipide für die Phagophore oder um die Lipidhomöostase des ER aufrecht zu erhalten (Bekbulat *et al.*, 2020; Schutter *et al.*, 2020). Störungen der Lipidhomöostase führen zu Störungen der Phagophorenreifung und beeinflussen die Autophagie nachhaltig.

Die Lipidkomposition und die assoziierten Proteine einer Membran bestimmen über ihre Charakteristika und Funktionalität. Den Großteil der Membran stellen Phospholipide, deren assoziierte Fettsäuren maßgeblich die Eigenschaften der Membran bestimmen. Kurzkettige Fettsäuren bedingen eine mobilere und dünnere Membran als langkettige. Gesättigte Fettsäuren bilden eine rigide Membran, während ungesättigte Fettsäuren die Membranen fluide halten (Ali & Szabo, 2023). Sphingomyelin (SM) gehört zur Familie der Sphingolipide, die am Golgi-Apparat synthetisiert werden, und ist ein wesentlicher Bestandteil von *Lipid Rafts*, die als Reaktionsplattform für Lipide und Proteine in einer Membran dienen, indem es eine rigide Membranfläche etabliert und Interaktionen stabilisiert (Wassall & Stillwell, 2009). Das Lipidprofil einer Membran ist also maßgebend für die Struktur eines Organells und dessen Funktionalität. Das Lipidprofil von Autophagosomen ist daher umso interessanter, als dass es von verschiedensten Kompartimenten der Zelle mit distinkten Lipidprofilen in seinem Wachstum unterstützt wird.

Um das Lipidprofil von Autophagosomen genauer untersuchen zu können, müssen diese aufgereinigt werden. Verschiedenste Protokolle zur Isolation von Autophagosomen wurden bereits etabliert. Voraussetzung für jede dieser Isolationen ist aber eine genetische Manipulation, ein aufwändiges Fraktionierungsverfahren oder die Kombination aus beidem (Dengjel *et al.*, 2012; Gomez-Sanchez *et al.*, 2021; Stromhaug *et al.*, 1998). Anhand dieser Methoden

konnte bereits ein Substratprofil von Autophagosomen erstellt werden – das Cargo- und Lipidprofil naiver, nicht genetisch-manipulierter Autophagosomen bleibt allerdings größtenteils unbeschrieben.

Während dieser Doktorarbeit wurde durch die Arbeitsgruppe ein neuartiges Protokoll etabliert, mit dem sich genetisch unveränderte autophagische Vesikel mithilfe Antikörper-vermittelter Färbungen durchflusszytometrisch anreichern lassen (Schmitt *et al.*, 2022). Diese aufgereinigten Vesikel wurden genutzt, um in einem *targeted approach* Phospholipidanalysen durchzuführen und das Auftreten bestimmter Lipide in Autophagosomen zu untersuchen.

Es wurde im Folgenden Sphingomyelin als Bestandteil von Autophagosomen identifiziert. Es wurde untersucht, inwieweit Sphingomyeline selbst die Autophagie spezifisch modulieren. Da SM im Golgi-Apparat gebildet und über diesen intrazellulär verteilt wird, wurde der Transportmechanismus über ATG9A-positive Vesikel untersucht, die ebenfalls am Golgi-Apparat gebildet werden. ATG9A-positive Vesikel werden einerseits als Keim der Phago-phore und andererseits als wichtige Lipidquelle während der Reifung der Phago-phore beschrieben (Olivas *et al.*, 2023; Orsi *et al.*, 2012). Daher wurde überprüft, ob ATG9A-positive Vesikel mit SM kolokalisierten und ob SM über den Transport von ATG9A-positiven Vesikeln die Autophagie beeinflusste.

3.1.1 Sphingomyelin ist Bestandteil von autophagischen Vesikeln

Das Lipidprofil von Autophagosomen wurde unter drei verschiedenen Autophagie-Bedingungen untersucht. Zum einen wurde das Lipidprofil von autophagischen Vesikeln unter basalen Bedingungen bestimmt, zum anderen nach Induktion der Autophagie durch Nährstoffentzug sowie nach Inhibition des Proteasoms durch den Proteaseinhibitor MG132 (Schmitt *et al.*, 2022). Proteasom und Autophagie stehen in ständiger Wechselwirkung zueinander. Beispielsweise werden Autophagie-regulierende Proteine proteasomal abgebaut. Autophagische und proteasomale Degradationsprozesse kompensieren sich außerdem, wenn es zu funktionellen Beeinträchtigungen kommt (Li *et al.*, 2022).

Die autophagischen Vesikel für die Lipidomanalyse wurden von _____ unter den beschriebenen Autophagie-Bedingungen mit der auf Durchflusszytometrie-basierenden Methode isoliert. Die Lipide der autophagischen Vesikel und die des Gesamtzelllysats unter basalen Bedingungen wurden näher untersucht und das Phospholipidprofil über einen *targeted approach* von _____ an der *Lipidomics Unit* des Instituts für Physiologische Chemie der Universitätsmedizin Mainz bestimmt.

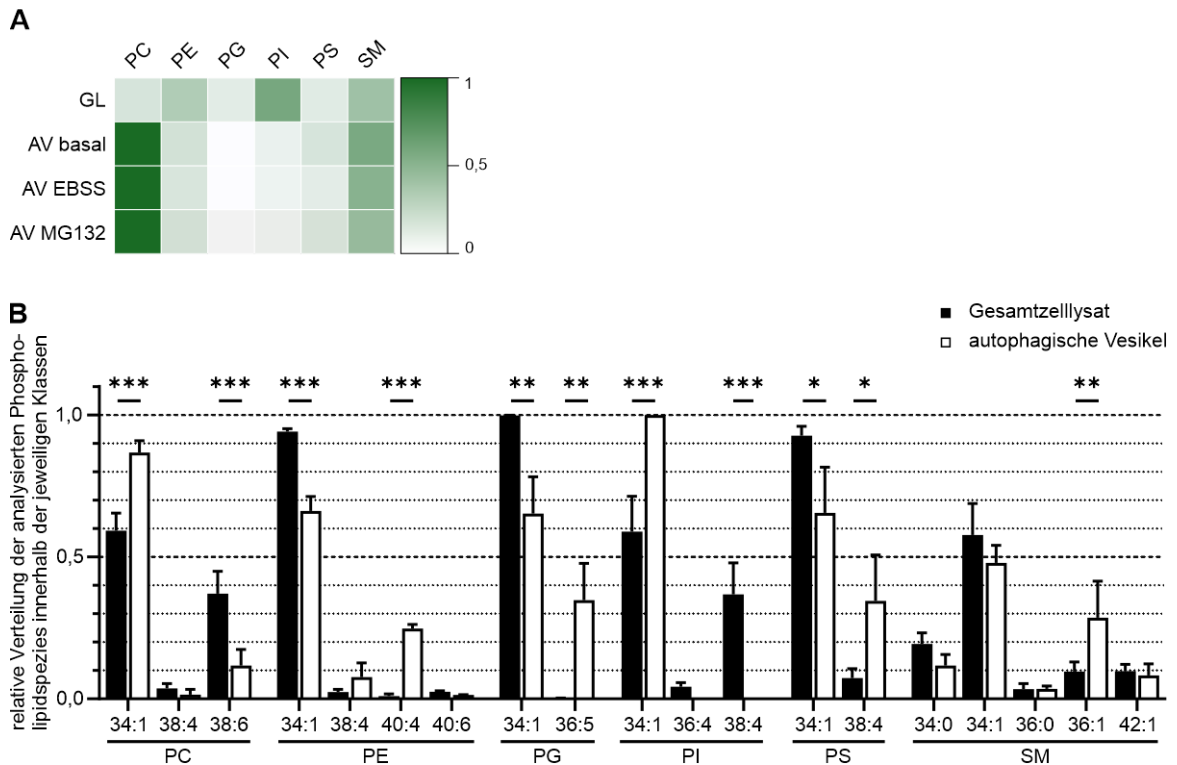


Abbildung 9 Gezielte Phospholipidomanalyse von Gesamtzelllysate und autophagischen Vesikeln Die Phospholipidprofile von Gesamtzelllysate (GL) und von autophagischen Vesikeln (AV) von HeLa WT-Zellen wurden unter basalen Autophagiebedingungen sowie nach Nährstoffentzug und Proteasom-Inhibition mittels Lipidomanalyse bestimmt. (A) *Heatmap* der Konzentration aller untersuchten Phospholipide. Dargestellt ist die Verteilung der Phospholipide relativ zur Gesamtmenge aller gemessenen Phospholipide, wobei jede Probe unabhängig für sich analysiert wurde. Zugrunde liegen die Mittelwerte der Messungen aus drei unabhängigen Versuchswiederholungen. (B) Relative Darstellung der untersuchten Phospholipide als Anteil innerhalb der entsprechenden Phospholipidklasse. Die statistische Auswertung erfolgte über eine *two-way ANOVA* mit dem Posthoc-Test nach Sidak. $n = 3$. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichungen. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,005$. Die Proben für die Phospholipidomanalyse wurden von [] generiert. Die Phospholipidomanalysen wurden von [] am Institut für Physiologische Chemie der Universitätsmedizin Mainz durchgeführt. Die Ergebnisse wurden publiziert und die Abbildungen modifiziert (Schmitt *et al.*, 2022). AV = autophagische Vesikel, PC = Phosphatidylcholin, PE = Phosphatidylethanolamin, PI = Phosphatidylinositol, PS = Phosphatidylserin, PG = Phosphatidylglycerol, SM = Sphingomyelin.

In den Analysen des Phospholipidoms wurden alle untersuchten Phospholipide sowohl im Gesamtzelllysate als auch in den autophagischen Vesikeln nachgewiesen (Abbildung 9A). Keine der Phospholipidklasse war nur in einer der beiden Proben detektierbar, sowohl im Gesamtzelllysate als auch in den autophagischen Vesikeln wurde jede der untersuchten Klassen nachgewiesen. Dabei unterschieden sich die Phospholipidprofile von Gesamtzelllysate und autophagischen Vesikeln unter basalen Bedingungen signifikant voneinander. Während der Großteil der gemessenen Phospholipide im Gesamtzelllysate zu Phosphatidylethanolamin (PE), Phosphatidylinositol (PI) oder SM zählte, war in den autophagischen Vesikeln vor allem Phosphatidylcholin (PC) angereichert. Neben Phosphatidylserin (PS) konnte auch

Phosphatidylglycerol (PG) als Bestandteil der autophagosomalen Membran identifiziert werden. Dies passt zu dem Lipidprofil, das für *S. cerevisiae* beschrieben wurde (Schutter *et al.*, 2020). Interessanterweise gab es keine signifikanten Veränderungen des Phospholipidprofils der autophagischen Vesikel in den unterschiedlichen Autophagie-Bedingungen (Schmitt *et al.*, 2022) (Abbildung 9A). Beide untersuchten Stressbedingungen, Nährstoffmangel und Proteasom-Inhibition, beeinflussten die untersuchten Lipidspiegel nicht. Dies unterstreicht, wie wichtig ein distinktes Lipidprofil für die Funktionalität der Autophagosomen ist.

Neben der Bestimmung der Phospholipidklassen wurden durch die Phospholipidanalysen auch die spezifischen, an die Phospholipide konjugierten Fettsäuren identifiziert. Zur weiteren Analyse wurden die detektierten Fettsäuren zwischen Gesamtzellysat und den autophagischen Vesikeln unter basalen Bedingungen näher verglichen. In den autophagischen Vesikeln waren die Anteile der kurzkettigen einfach-gesättigten Spezies für PC und PI signifikant erhöht, während sie in den anderen Lipidklassen vorwiegend in geringen Spiegeln detektiert wurden (Abbildung 9B). Weiterhin waren die Anteile der langkettigen mehrfach-ungesättigten Fettsäurereste an PE, PG und PS in autophagischen Vesikeln im Vergleich zum Gesamtzellysat signifikant erhöht. Von den untersuchten PI-Kombinationen wurde ausschließlich die 34:1 Spezies in den autophagischen Vesikeln detektiert, die langkettigen ungesättigten Varianten 36:4 und 38:4 wurden nicht nachgewiesen. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass PI vornehmlich an der äußeren, negativ gekrümmten Membranseite vorhanden ist, auf der es mit den Phosphorylierungen des Inositolringes in der Kopfgruppe für die Signalgebung von entscheidender Rolle ist (Palamiuc *et al.*, 2020). Allerdings konnte durch die Phospholipidomanalyse keine Aussage über die Lokalisation und den Phosphorylierungsgrad der Lipide getroffen werden.

Spannenderweise wurde bei der Lipidomanalyse neben Glycerophospholipiden auch SM in autophagischen Vesikeln nachgewiesen (Abbildung 9). SM gehört zu der Gruppe der Sphingolipide, von denen viele Spezies nicht im ER, sondern im Golgi-Apparat synthetisiert werden. Sphingolipide treten verstärkt in der Plasmamembran und weiteren Post-Golgi-Kompartimenten auf und werden hauptsächlich in Lysosomen abgebaut (Lee *et al.*, 2023; Slotte, 2013). Das SM Bestandteil autophagischer Vesikel ist, war ein neuartiger Befund, da das Lipidprofil humaner Autophagosomen bisher nicht publiziert wurde. Sphingolipide wurden weder als Bestandteil der Autophagosomenmembran von *S. cerevisiae* noch von *D. melanogaster* nachgewiesen (Laczko-Dobos *et al.*, 2021; Schutter *et al.*, 2020).

Der Nachweis von SM als Bestandteil autophagischer Vesikel unterstreicht, dass Lipide zur Synthese von autophagischen Vesikeln auch aus anderen Quellen als dem ER stammen müssen. Auch wenn das ER einer der bestbeschriebenen Lipidspender für die Phagophore

ist, so liefern im weiteren Elongationsprozess auch periphere Kompartimente einen entscheidenden Anteil an Lipiden – vermutlich auch inklusive SM. Recyclingendosomen wurden neben aus dem Golgi-Apparat entspringenden ATG9A-positiven Vesikeln als ein Keim für die Phagophore beschrieben und Endosomen fusionieren mit Autophagosomen in deren Reifeprozess. Auch Mitochondrien wurden als Lipidquelle der Phagophore beschrieben (Olivas *et al.*, 2023; Zhao & Zhang, 2019). Die Detektion von SM als einem Phospholipid, welches nicht im ER gebildet oder von diesem in der Zelle verteilt wird, ist ein klarer Hinweis darauf, dass Kompartimente wie der Golgi-Apparat eine nicht zu unterschätzende Rolle bei der Versorgung der Phagophore mit Lipiden einnehmen.

Nach der Synthese von SM im Golgi-Apparat, wird es zu den verschiedenen Organellen weitertransportiert (Maier & Hoekstra, 2003). Da SM auch als Bestandteil und Substrat von Lysosomen beschrieben war (Gabande-Rodriguez *et al.*, 2014), wurden über immunozytochemische Färbungen die Populationen der autophagischen Vesikel genauer untersucht. So konnte differenziert werden, ob die Detektion von SM einem nicht unerheblichen Anteil von Autolysosomen in der analysierten Fraktion der autophagischen Vesikel entsprang oder ob auch Autophagosomen mit SM kolokalisieren.

Um die Lokalisation von SM *in vitro* zu untersuchen, wurde BODIPY-gekoppeltes SM verwendet. Zunächst wurde analysiert, ob die Konjugation des Farbstoffes an das Sphingolipid einen Einfluss auf die zelluläre Verteilung von SM in den zu erwartenden zellulären Kompartimenten und Vesikeln hatte. Da SM als Lipid durch die Permeabilisierung, die für immunozytochemische intrazelluläre Färbungen notwendig ist, ausgewaschen werden konnte, wurden im ersten Schritt nicht permeabilisierte Zellen auf die Verteilung von SM untersucht. SM konnte nicht nur an der Plasmamembran, sondern auch in perinukleären und vesikulären Strukturen im Zytoplasma detektiert werden (Abbildung 10A). Um die perinukleäre Ansammlung von SM genauer zu charakterisieren, wurden gleichzeitig die Golgi-assoziierten Proteine GM130 (*130 kDa cis-Golgi matrix protein 1*) und TGN46 (*trans-Golgi network 46*) visualisiert. Beide Golgi-Marker kolokalisierten mit SM (Abbildung 10B und C) und bestätigten so die Spezifität des Fluorophor-gekoppelten Lipids anhand der bereits beschriebenen Verteilung von SM, auch nach Permeabilisierung der Zellmembran und damit der Beeinflussung der membranösen Architektur (Maier & Hoekstra, 2003).

Im Weiteren wurde die Kolokalisation von SM mit Proteinen, die für die Autophagie relevant sind, näher untersucht. Hierfür wurden immunozytochemische Färbungen von MAP1LC3B und LAMP2 betrachtet, sowie die Verteilung von transient überexprimiertem mCherry-ATG9A zusammen mit SM (Abbildung 11).

SM zeigte eine Kolokalisation mit mCherryATG9A sowohl in der perinukleären Verdichtung von ATG9A (vermutlich der Golgi-Apparat), als auch in über das Soma verteilten Punctae (Abbildung 11A). ATG9A-positive Vesikel knospen aus dem Golgi-Apparat (Choi *et al*, 2024). Der Nachweis von SM in ATG9A-positiven Strukturen bestärkte die Hypothese, dass diese Vesikel verantwortlich für den Transport von SM zur Phagophore sind. SM wurde außerdem nur mit LAMP2 als lysosomalem Marker und nur mit MAP1LC3B als autophagosomalen Marker kodetektiert, sowie mit beiden Proteinen zusammen. SM wurde somit als Bestandteil von Autophagosomen (Abbildung 11B), Lysosomen (Abbildung 11C) sowie Autolysosomen (Abbildung 11D) nachgewiesen. Die Detektion von SM in den Lipidomanalysen ist dementsprechend nicht nur auf Autolysosomen zurückzuführen, sondern identifizierte SM darüber hinaus spezifisch als Bestandteil reifer Autophagosomen.

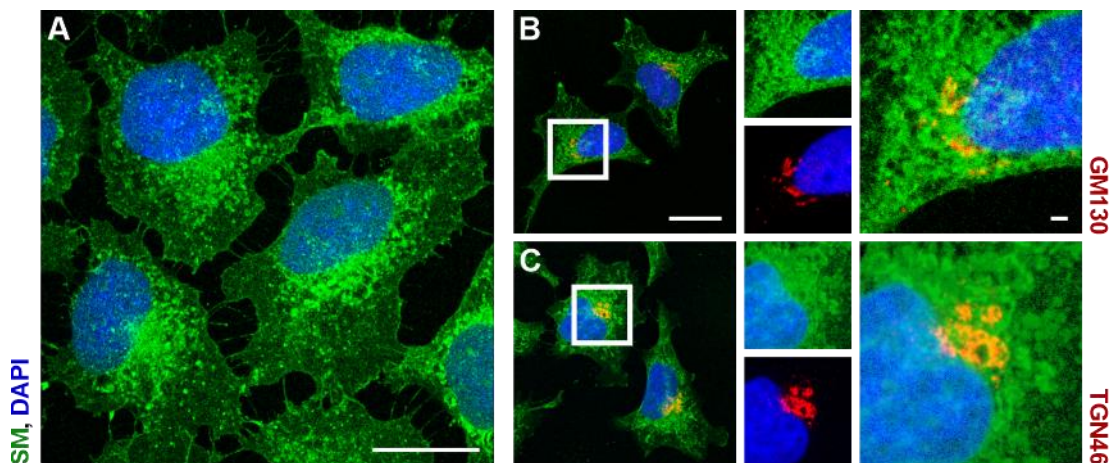


Abbildung 10 Lokalisation von Sphingomyelin in HeLa WT-Zellen Konfokale Aufnahmen nach Färbung der Membran mit BODIPY-Sphingomyelin in Grün, Dapi als Marker für die Zellkerne in Blau. Mittels immunocytochemischer Färbungen wurden die untersuchten Golgi-Marker GM130 und TGN46 angefärbt und in Rot dargestellt. Die Maßstabsskalen betragen 2 und 20 μM . (A) Sphingomyelin lokalisiert in der gesamten Zelle an der Plasmamembran und den Zellausläufern sowie perinukleären Verdichtungen und Punctae. Die Darstellung ist repräsentativ für $n = 5$. (B) Der Golgi-Marker GM130 kolokalisiert mit Sphingomyelin mit einem Pearson's Korrelationskoeffizienten von $0,53 \pm 0,1$. Die Darstellung ist repräsentativ für 48 Bilder aus $n = 3$. (C) Der Trans-Golgi-Marker TGN46 (rot) kolokalisiert mit Sphingomyelin mit einem Pearson's Korrelationseffizienten von $0,57 \pm 0,08$. Die Darstellung ist repräsentativ für 27 Aufnahmen aus $n = 2$.

Die immunocytochemischen Färbungen zeigten eine Kolokalisation von SM und autophagosomalen Strukturen. SM ist nicht nur Bestandteil lysosomaler Membranen, es ist auch lysosomales Substrat und wird unter anderem von saurer Sphingomyelinase abgebaut (Taniguchi & Okazaki, 2021). Die hier verwendete Methodik erlaubte keine Unterscheidung, ob SM Bestandteil der Membran der autophagosomalen Vesikel war oder ob es als Substrat in den Vesikeln zur lysosomalen Degradation eingeschlossen war. Es wurde allerdings be-

schrieben, dass der Cargo von Autophagosomen nur einen geringen Einfluss auf die post-analytischen Ergebnisse hat (Bieber *et al.*, 2022). Da obendrein gezeigt wurde, dass SM in ATG9A-positiven Strukturen zu finden ist, und bekannt ist, dass ATG9A-positive Vesikel sowohl als Keim für die Phagophore dienen (Olivas *et al.*, 2023) als auch die Phagophore mit Lipiden versorgen (van Vliet *et al.*, 2022), wurde postuliert, dass SM Bestandteil der autophagosomalen Membran ist und dieses für ihre Funktion notwendig ist.

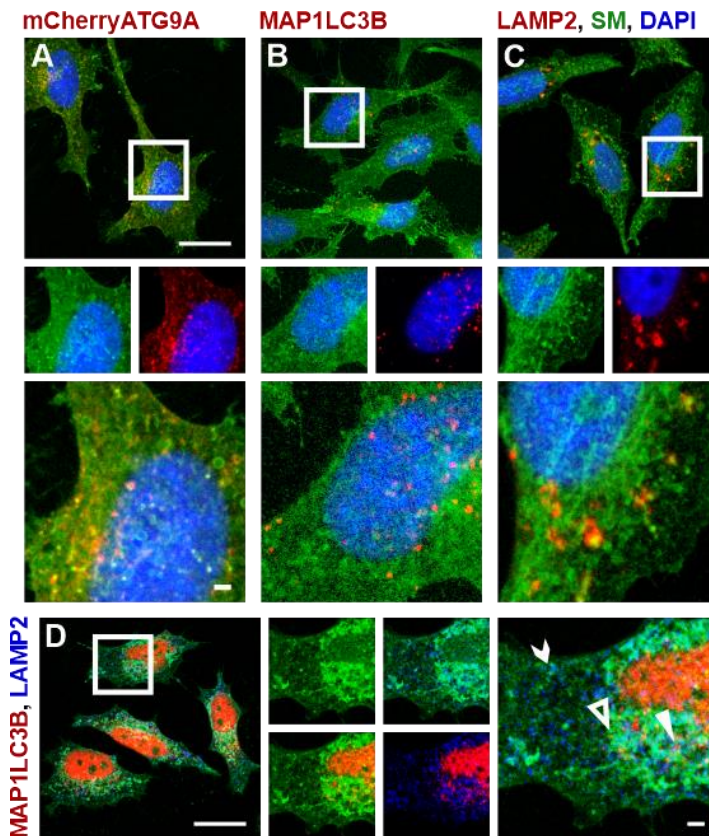


Abbildung 11 Kolokalisation von Sphingomyelin und Autophagie-assoziierten Strukturen Konfokale Aufnahmen von BODIPY-SM in Grün dargestellt, DAPI als Marker für die Zellkerne in Blau sowie unterschiedliche Autophagie-assoziierte Proteinen in Rot, sofern nicht anders angegeben. Die Maßstäbe entsprechen 2 und 20 μM . (A) mCherryATG9A und SM kolokalisieren mit einem Pearson's Korrelationskoeffizienten von $0,72 \pm 0,08$. Die Darstellung ist repräsentativ für 34 Aufnahmen aus $n = 2$. (B) MAP1LC3B kolokalisiert mit SM mit einem Pearson's Korrelationskoeffizienten von $0,44 \pm 0,09$. Die Darstellung ist repräsentativ für 49 Aufnahmen aus $n = 6$. (C) LAMP2 kolokalisiert mit SM mit einem Pearson's Korrelationskoeffizienten von $0,58 \pm 0,13$. Die Darstellung ist repräsentativ für 46 Aufnahmen aus $n = 4$. (D) MAP1LC3B (Rot) und LAMP2 (Blau) zeigen verschiedene mögliche Kolokalisationen. Der offene Pfeil zeigt auf eine SM und LAMP2 positive Struktur. Die ungefüllte Pfeilspitze zeigt auf eine Struktur, die positiv für MAP1LC3B und SM ist. Die gefüllte Pfeilspitze zeigt auf eine Struktur, die sowohl für SM, MAP1LC3B als auch LAMP2 ist.

Die Phospholipidomanalyse autophagischer Vesikel identifizierte erstmalig Sphingomyeline als Bestandteile autophagosomaler Membranen. Sphingomyelin kolokalisierte nicht nur mit reifen Autophagosomen, sondern auch mit ATG9A-positiven Vesikeln.

Dies stellt einen möglichen Transferprozess von Sphingomyelin über ATG9A-positive Vesikel zur wachsenden Phagophore und somit zu den Autophagosomen dar.

3.1.2 Sphingomyelin ist ein positiver Modulator der Autophagie

Da SM als Bestandteil der autophagosomalen Membran identifiziert wurde, wurde im Weiteren ein potenzieller Einfluss des Sphingolipids auf den autophagischen Flux genauer untersucht. Es wurde bereits beschrieben, dass eine langfristige Supplementation von SM im Mausmodell zu einer Überfrachtung des ATG9A-positiven Vesikelpools führt (Corcelle-Termeau *et al.*, 2016). Des Weiteren wurde die Bedeutung von SM bei der Beeinflussung der Autophagie durch spezifische Signalwege beschrieben (Cao *et al.*, 2019). Zuletzt konnte gezeigt werden, dass SM bedeutsam für die nicht-kanonische Autophagie bei der Markierung beschädigter intrazellulärer Kompartimente ist (Kaur *et al.*, 2023). Doch bisher wurde noch nicht gezeigt, wie SM die Autophagie beeinflusst und über welche Transportmechanismen das Sphingolipid zur Phagophore gelangt.

Um festzustellen, ob SM die autophagische Aktivität direkt beeinflusst, wurden HeLa-Zellen für 2 h mit SM behandelt und anschließend für weitere 2 h mit Bafilomycin A₁ inkubiert. Die Behandlung mit Bafilomycin A₁ inhibierte den Abbau von Autophagosomen, die daraufhin akkumulierten. Die Stärke der Akkumulation lässt eine Analyse der autophagischen Aktivität zu. Je mehr Autophagosomen in einer definierten Zeit auflaufen, desto höher ist die Aktivität des Abbauweges (Klionsky *et al.*, 2021). Zudem wurde der Einfluss von SM unter basalen Bedingungen und unter Autophagie-induzierenden Bedingungen untersucht. Um die Aufnahme von SM sicherzustellen, wurden die Zellen in Kulturmedium mit delipidisierendem Serum behandelt. So wurde die Versorgung mit allen Nährstoffen außer Lipiden gewährleistet, mit denen SM um eine Aufnahme konkurriert hätte und dementsprechend eventuell keine Wirkung gezeigt hätte. Damit konnten physiologische, basale Bedingungen imitiert werden. Zur Induktion der Autophagie wurden die Zellen in weitestgehend nährstofffreiem Medium (EBSS) kultiviert.

Da vermutet wurde, dass ATG9A-positive Vesikel für den Transport von SM aus dem Golgi-Apparat zur Phagophore entscheidend sind, wurden auch die Proteinlevel von ATG9A mittels Immunoblot untersucht. Die Behandlung mit SM verursachte keine Veränderungen des Proteinspiegels von ATG9A und beeinflusste nicht dessen Metabolismus. Offen blieb allerdings, ob es eine verstärkte Aktivierung von ATG9A durch die Supplementation von SM gab.

SM induzierte signifikant den autophagischen Flux unter basalen und Autophagie-induzierten Bedingungen. Bereits unter basalen Bedingungen führte die Supplementation von SM zu einem erhöhten autophagischen Flux (Abbildung 12A). Dieser konnte im Vergleich zu Zellen, denen kein SM angeboten wurde, um ein Viertel gesteigert werden (Abbildung 12B).

Auch in Zellen, in denen die Autophagie bereits induziert war, konnte der autophagische Flux durch die Behandlung mit SM weitergesteigert werden – hier sogar um rund 50 % im Vergleich zu Zellen ohne Zugabe von SM (Abbildung 12C und D). Ein Nährstoffentzug steigert den autophagischen Flux per se, was die zusätzliche Verstärkung des autophagischen Fluxes nach SM-Behandlung umso eindrucksvoller macht.

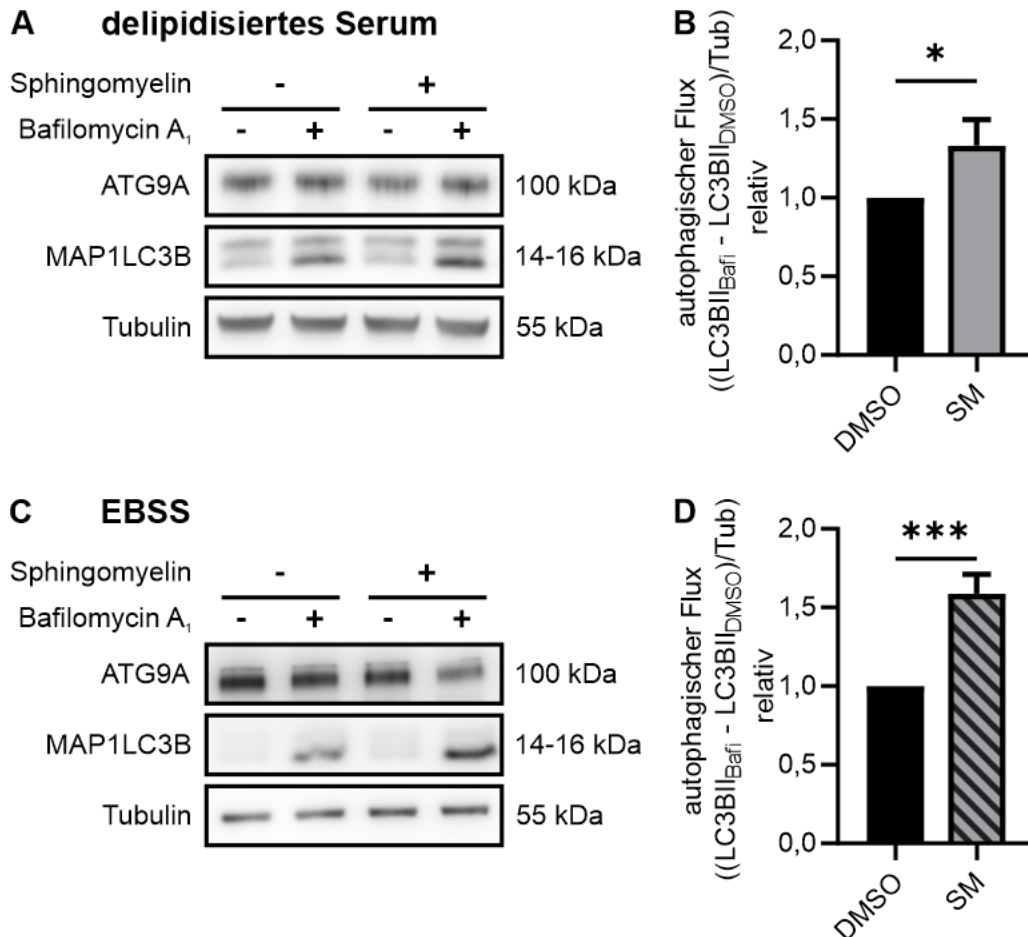


Abbildung 12 Sphingomyelin verstärkt den autophagischen Flux in HeLa WT-Zellen Immunoblots für ATG9A und MAP1LC3B, Tubulin diente der Ladekontrolle. HeLa WT-Zellen wurden mit 500 nM BODIPY-SM für 2 h gefolgt von 2 µM Bafilomycin A₁ für 2 h in Kulturmedium mit delipidiertem Serum (A) und in EBSS (C) behandelt. Die dargestellten Immunoblots sind repräsentativ für n = 3 bzw. n = 4. (B, D) Dargestellt ist die statistische Auswertung der Mittelwerte ± Standardabweichungen des autophagischen Fluxes gemessen an den Immunoblots von MAP1LC3B für (A) und (C) über den t-Test. * $P < 0,05$, *** $P < 0,005$.

Zusammenfassend wurde SM als ein positiver Modulator der Autophagie identifiziert. Nicht nur unter basalen Bedingungen wurde eine Zunahme des autophagischen Fluxes nach Supplementation von SM beobachtet. Das Sphingolipid verstärkte außerdem den autophagischen Flux weiter, als die Autophagie durch Nährstoffmangel bereits induziert war.

Um im Weiteren zu spezifizieren, ob SM den autophagischen Flux distinkt induzierte oder ob Phospholipide im Allgemeinen die Aktivität der Autophagie verstärkten, wurde der Einfluss von PC und PE auf die Autophagie untersucht.

Zunächst wurde die intrazelluläre Lokalisation von PC überprüft, um die Spezifität des an den Fluoreszenz-Farbstoff NBD gekoppelten Lipides zu verifizieren. Dabei wurde gezeigt, dass PC wie erwartet sowohl perinukleär als auch in Punctae im Soma verteilt und an der Plasmamembran lokalisierte (Abbildung 13A). Überdies kolokalisierte PC mit MAP1LC3B, was bestätigte, dass das Phospholipid in Autophagosomen vorlag und somit, wie bereits in den Lipidom-Analysen beschrieben (Abbildung 9), ein Bestandteil der autophagosomalen Membran war (Abbildung 13B).

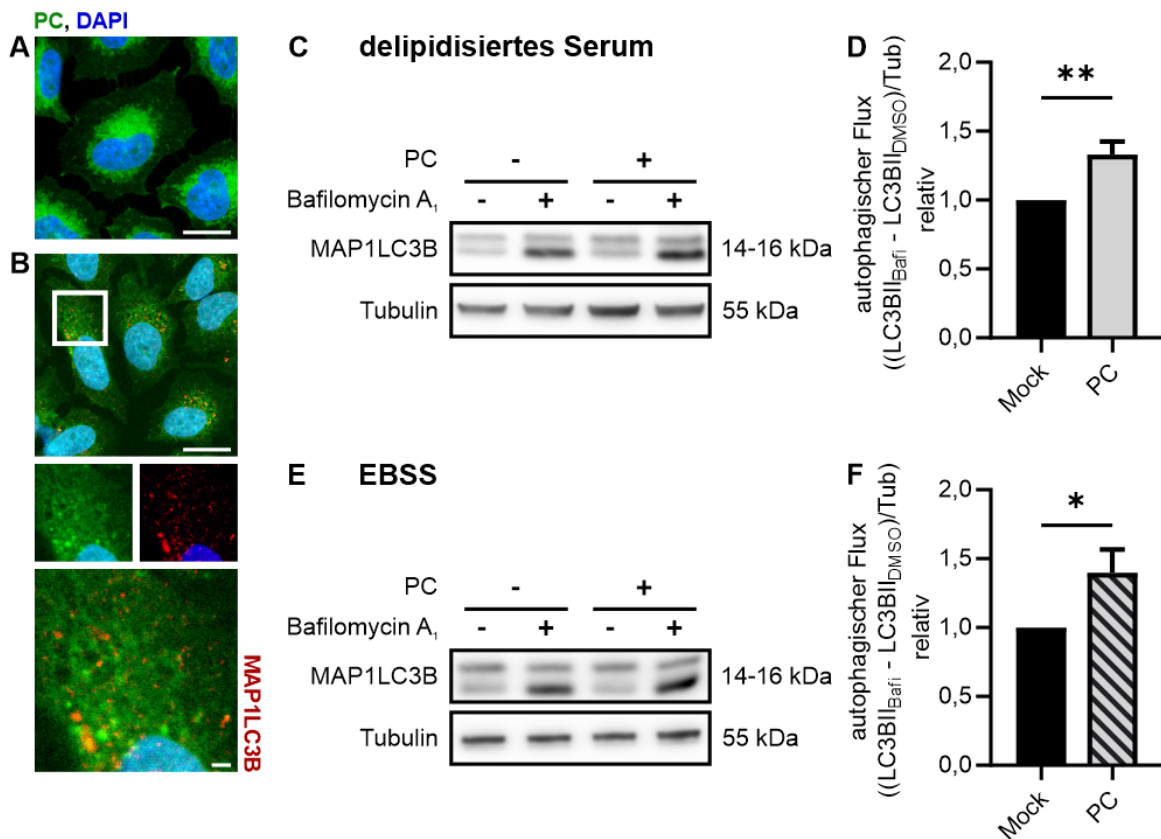


Abbildung 13 Phosphatidylcholin induziert den autophagischen Flux in HeLa WT-Zellen (A) Intrazelluläre Lokalisation von NBD-PC (Grün) in HeLa WT-Zellen. Zellkerne sind in Blau dargestellt. Maßstab = 20 µm. Die dargestellten Aufnahmen sind repräsentativ für n = 3. (B) Immunocytochemische Färbung von NBD-PC (Grün) und MAP1LC3B (Rot) zur Darstellung ihrer Kolokalisation. Zellkerne sind in Blau dargestellt. Maßstäbe = 20 und 2 µm. Die dargestellten Aufnahmen sind repräsentativ für n = 6. (C, E) Immunoblots für MAP1LC3B mit Tubulin als Ladekontrolle von HeLa WT-Zelllysaten nach Behandlung mit 500 nM Phosphatidylcholin (PC) für 2 h gefolgt von 2 µM Bafilomycin A₁ für 2 h in Kulturmedium mit delipidiertem Serum (C) und in EBSS (E). Die dargestellten Immunoblots sind repräsentativ für n = 3 und n = 4. (D, F) Dargestellt ist die statistische Auswertung der Mittelwerte ± Standardabweichungen des autophagischen Fluxes gemessen an den Immunoblots von MAP1LC3B für (D) und (F) über den t-Test. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$.

Um zu klären, ob PC die Autophagie ebenfalls modulierte, wurde der autophagische Flux in Zellen in Kulturmedium mit delipidisiertem Serum und nach Induktion der Autophagie untersucht. Wie Abbildung 13C bis F weiter dargestellt ist, verstärkte das Phospholipid PC ähnlich wie SM den autophagischen Flux unter allen untersuchten Bedingungen. Die erhöhte Verfügbarkeit von PC begünstigte also die Synthese von Autophagosomen. Diese Ergebnisse korrelierten mit einer vorangegangenen Studie, nach der PC essenziell für die Synthese von Autophagosomen ist (Andrejeva *et al.*, 2020) und wurden von den Lipidanalysen gestützt, nach denen PC unter den untersuchten Lipiden ein Hauptbestandteil war (Abbildung 9). Da Autophagosomen *de novo* synthetisiert werden, ist eine ausreichende Verfügbarkeit von Lipiden unabdingbar. Die Supplementation von SM und PC ermöglichte die vermehrte Biogenese von Autophagosomen und unterstrich, dass Lipide ein limitierender Faktor für die Bildung von Autophagosomen sein können.

Auch für PE wurde die Lokalisation in der Zelle durch ein Farbstoff-konjugiertes Derivat untersucht und es wurde die zu erwartende Verteilung beobachtet. Ähnlich wie PC lokalisierte PE in einer perinukleären Verdichtung und in intrazellulär verteilten Punctae und wurde in an der Plasmamembran beobachtet (Abbildung 14A). PE ist unter anderem der maßgebliche Lipidanker für MAP1LC3B und stellt somit einen essenziellen Bestandteil der Autophagosomenmembran dar (Ye *et al.*, 2021). Die Kolokalisationsstudien mit MAP1LC3B bestätigten das Auftreten von PE in Autophagosomen (Abbildung 14B).

Die Untersuchungen zum Einfluss von PE auf die autophagische Aktivität zeigten jedoch, dass im Gegensatz zu PC PE unter basalen Bedingungen keinen Einfluss auf den autophagischen Flux ausübte (Abbildung 14C, D). Unter Autophagie-induzierenden Bedingungen wurde sogar ein inhibitorischer Effekt von PE beobachtet. Die Proteinspiegel von MAP1LC3BII waren nach Behandlung mit Bafilomycin A₁ im Vergleich zur Kontrolle stark verringert (Abbildung 14E und F). Anders als PC und SM zeigte die Supplementation von PE keinen positiven Effekt auf die autophagische Aktivität unter basalen und Autophagie-induzierenden Bedingungen.

Die Behandlung der Zellen mit PC und PE demonstrierte, dass beide Phospholipide die Autophagie unterschiedlich beeinflussten. PC, ein wesentlicher Bestandteil der Autophagosomenmembran (Andrejeva *et al.*, 2020) (Abbildung 9), verstärkte die autophagische Aktivität. PE, das meistgenutzte Phospholipid für die Lipidierung von MAP1LC3B (Jensen *et al.*, 2022), zeigte keine Beeinflussung der autophagischen Aktivität unter basalen Bedingungen. SM als ein Membran-stabilisierendes und Reaktionsplattform bildendes Phospholipid (McCluskey *et al.*, 2022) verstärkt die autophagische Aktivität.

Dies bestätigte die Hypothese, dass die positive Modulation der Autophagie durch SM spezifisch war, da verschiedene Phospholipide die autophagische Aktivität unterschiedlich beeinflussten.

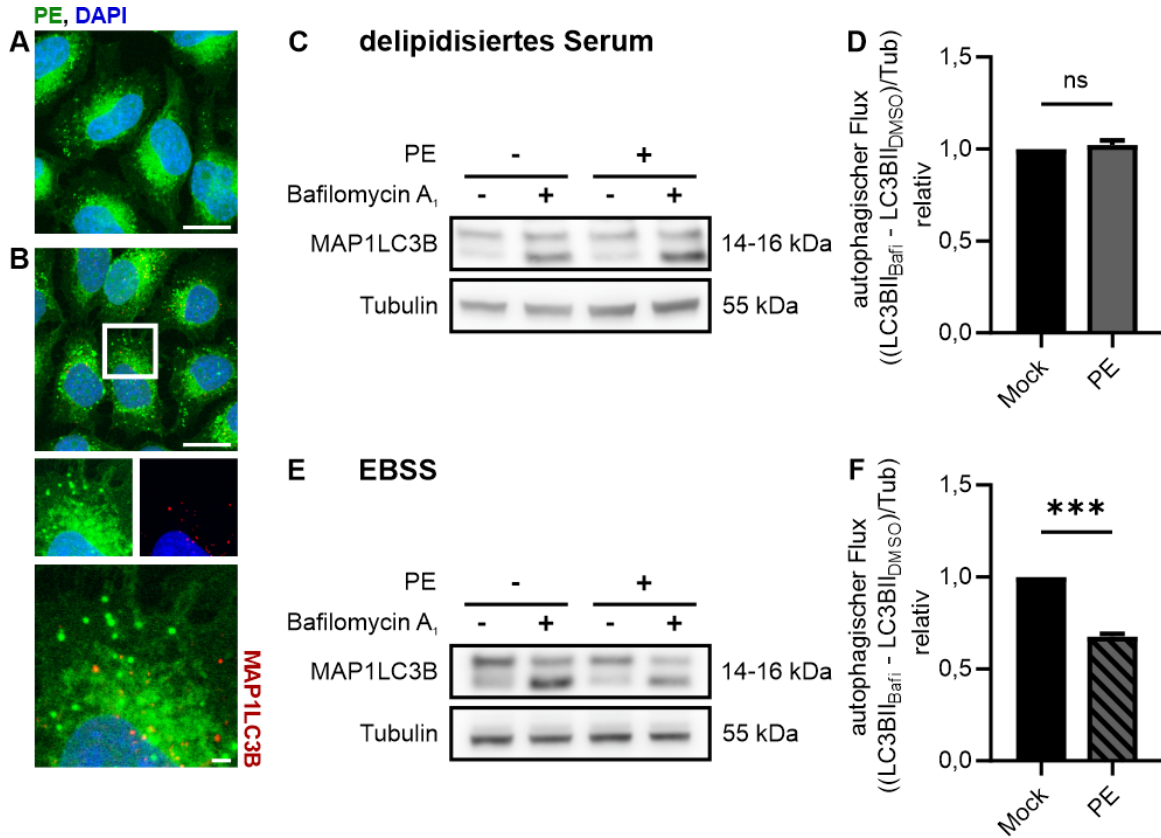


Abbildung 14 Phosphatidylethanolamin hemmt den autophagischen Flux unter Hungerbedingungen in HeLa WT-Zellen (A) Intrazelluläre Lokalisation von NBD-PE (Grün) in HeLa WT-Zellen. Zellkerne sind in Blau dargestellt. Maßstab = 20 μ m. Die dargestellten Aufnahmen sind repräsentativ für n = 3. (B) Immunocytochemische Färbung von NBD-PE (Grün) und MAP1LC3B (Rot) zur Darstellung ihrer Kolo-kalisation. Zellkerne sind in Blau dargestellt. Maßstäbe = 20 und 2 μ m. Die dargestellten Aufnahmen sind repräsentativ für n = 6. (C, E) Immunoblots für MAP1LC3B mit Tubulin als Ladekontrolle von HeLa WT-Zelllysaten nach Behandlung mit 500 nM NBD-PE für 2 h gefolgt von 2 μ M Bafilomycin A₁ für 2 h in Kulturmedium mit delipidisiertem Serum (C) und in EBSS (E). Die dargestellten Immunoblots sind repräsentativ für je n = 3. (D, F) Dargestellt ist die statistische Auswertung der Mittelwerte \pm Standardabweichungen des autophagischen Fluxes gemessen an den Immunoblots von MAP1LC3B für (D) und (F) über den t-Test. ns = nicht signifikant, *** $P < 0,005$.

Sphingomyelin induzierte den autophagischen Flux unter basalen Bedingungen sowie unter Stressbedingungen. Dieser Effekt war spezifisch, da die Supplementationen von PC und PE zeigten, dass verschiedene Phospholipide die autophagische Aktivität unterschiedlich modifizierten.

3.1.3 Sphingomyelin induziert den autophagischen Flux über einen ATG9A-abhängigen Mechanismus

SM gehört zu den komplexen Sphingolipiden, die vorwiegend im Golgi-Apparat synthetisiert werden (van Meer *et al.*, 2008). Von dort wird es in die Zellperipherie verteilt und ist vor allem in die Membran von Kompartimenten wie der Plasmamembran und den Lysosomen integriert (Lee *et al.*, 2023). Da es als Bestandteil autophagischer Vesikel identifiziert wurde (Abbildung 9) und die autophagische Aktivität verstärkte auch unter Autophagie-induzierenden Bedingung (Abbildung 12), wurde als nächstes untersucht, wie SM vom Golgi-Apparat an die Phagophore transportiert wurde.

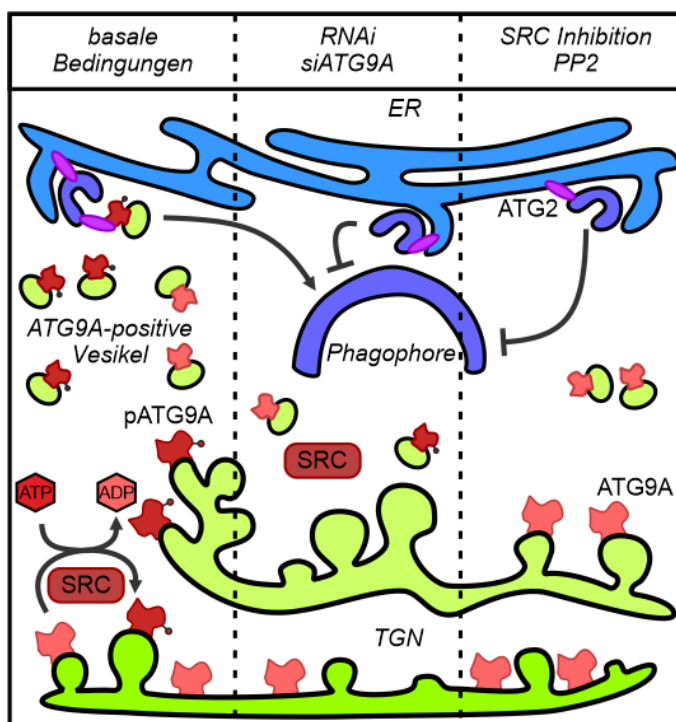


Abbildung 15 Transfermechanismus ATG9A-positiver Vesikel ATG9A lokalisiert unphosphoryliert vorwiegend am Golgi-Apparat. (Links – *basale Bedingungen*). SRC-Kinase phosphoryliert ATG9A an Y8 (pATG9A) und induziert so die Translokation zu sich vom trans-Golgi-Netzwerk abschnürenden Vesikeln. ATG9A-positive Vesikel dienen als Keim für das Omegasom und versorgen die wachsende Phagophore mit Lipiden. (Mitte – *SRC-Inhibition*) Die SRC-Kinase wird durch PP2 inhibiert und somit die Phosphorylierung von ATG9A verhindert. Das Fehlen von aktivem ATG9A an der Phagophore hat zur Folge, dass die Lipide, die von ATG2-WIPI geliefert werden, nicht korrekt über die Membrandoppelschicht verteilt werden, weswegen das Längenwachstum der Phagophore stark gestört ist. (Rechts – *RNAi*) Die Proteinspiegel von ATG9A werden durch siRNA gesenkt. ATG9A-positive Vesikel können nicht gebildet werden. Lipide werden vom ER über ATG2-WIPI transferiert, aber die Skramblase zur Verteilung der Lipide über die Membrandoppelschichten fehlt. Dies inhibiert das Wachstum der Phagophore. ADP = Adenosindiphosphat.

Am Golgi-Apparat werden diverse Vesikel gebildet, von denen einige bereits mit der Synthese von Autophagosomen in Verbindung gebracht wurden (Soreng *et al.*, 2018). Verantwortlich für den Austausch zwischen ER und Golgi-Apparat sind die COP-Vesikel, die mit *coat protein* (COP) ummantelt sind. COPI-Vesikel transferieren zwischen ERGIC und Golgi und sind außerdem für den retrograden Transport von Substraten vom Golgi-Apparat zurück zum ER verantwortlich. Sie wurden bereits als eine Lipidquelle für das Wachstum der Phagophore beschrieben (Razi *et al.*, 2009). Die dem Golgi-Apparat entspringenden COPI-Vesikel zeigen allerdings einen verringerten SM-Spiegel im Vergleich zum Golgi-Apparat selbst (Brugger *et al.*, 2000) und wurden daher nicht als primäre Transportquelle von SM zur Phagophore in Betracht gezogen.

ATG9A, das einzige integrale Membranprotein der ATG-Proteinfamilie, ist zum einen im Golgi-Apparat lokalisiert und bildet zum anderen, noch verstärkt durch die Induktion der Autophagie, einen Vesikelpool, dessen Vesikel zwischen Golgi-Apparat, endosomalem System, Plasmamembran und auch der Phagophore transferiert werden (Nishimura & Tooze, 2020). Schon unter basalen Bedingungen werden die ATG9A-positiven Vesikel durch die Zelle transportiert und bilden dabei eine Art eigenständiges Kompartiment (Mari *et al.*, 2010). ATG9A wird über Phosphorylierung aktiviert und initiiert vermehrt die Bildung ATG9A-positiver Vesikel am Golgi-Apparat. Wird die Autophagie induziert, finden zusätzliche Phosphorylierungen statt, die die Bildung ATG9A-positiver Vesikel noch weiter verstärken (Papinski *et al.*, 2014).

In Abbildung 11A wurde gezeigt, dass ATG9A-positive Strukturen mit SM kolokalisieren. Ferner wurde bereits eine Verbindung zwischen SM, der Autophagie und ATG9A-positiven Vesikeln beschrieben. SM kann mit frühen Regulationsmechanismen der Autophagie interagieren (Cao *et al.*, 2019), während es auch als Signalgeber fungieren kann, um Substrate der Autophagie zuzuführen (Kaur *et al.*, 2023). Eine exzessive Langzeit-Exposition gegenüber SM kann den ATG9A-positiven Vesikelpool überfrachten und so die Autophagie negativ modulieren (Corcelle-Termeau *et al.*, 2016). Daher fokussierten sich die nächsten Untersuchungen auf ATG9A positive Vesikel.

Die Aktivierung von ATG9A ist abhängig von der SRC-Kinase (Zhou *et al.*, 2017). Die SRC-Kinase phosphoryliert ATG9A an Y8 innerhalb der Polypeptidkette von ATG9A und ist somit hauptverantwortlich für die Initiierung der Translokation zu sich abschnürenden Vesikeln vom trans-Golgi-Netzwerk (Abbildung 15 – basale Bedingungen). Wird die SRC-Kinase inhibiert, wird ATG9A nicht phosphoryliert und akkumuliert am trans-Golgi-Netzwerk (Bekbulat *et al.*, 2020) (Abbildung 15 – SRC-Inhibition).

Der permanente Verlust von ATG9A hat schwerwiegende Konsequenzen auf molekularer, zellulärer und organischer Ebene (Choi *et al.*, 2024). Ohne ATG9A können sich keine

ATG9A-positiven Vesikel bilden und unter anderem die wachsende Phagophore mit Lipiden beliefern. Die verfügbaren Studien zeichnen sich allerdings durch eine Inkonsistenz bezüglich des autophagischen Fluxes in den verschiedenen ATG9A KO-Modellen aus. Während einige Modelle einen verringerten autophagischen Flux zeigen, sind andere Modelle durch ein komplettes Erliegen der Autophagosomenbildung charakterisiert, da kein lipidiertes MAP1LC3B detektiert wird (Imai *et al.*, 2016; Olivas *et al.*, 2023; van Vliet *et al.*, 2022). In den folgenden Untersuchungen wurden in HeLa WT-Zellen die Proteinlevel von ATG9A durch RNAi mittels siRNA verringert. Mit der Verwendung eines *Knock-Downs* (KD), also der signifikanten Verringerung der Proteinspiegel durch die Verwendung von siRNA (Abbildung 15B – RNAi), die für den sequenzspezifischen Abbau der mRNA verantwortlich ist und so die Translation des Proteins verhindert, wurde das KO-Modell umgangen (Scherer & Rossi, 2004). In parallelen Ansätzen wurde die SRC-Kinase mit dem SRC-Kinase Inhibitor PP2 inhibiert und die Aktivierung von ATG9A pharmakologisch verhindert. PP2 ist ein kompetitiver Inhibitor, der durch Bindung an das ATP-bindende Zentrum die Phosphorylierung von ATG9A verhindert (Hanke *et al.*, 1996). Anschließend wurden die Zellen erneut mit Sphingomyelin und Bafilomycin A₁ wie bereits beschrieben behandelt, um den autophagischen Flux und Veränderungen der autophagischen Aktivität zu ermitteln.

Der transiente Verlust von ATG9A führte zu keiner Veränderung des autophagischen Fluxes unter basalen Bedingungen (Abbildung 16A und C). Es waren noch schwache Proteinspiegel von ATG9A detektierbar (Abbildung 16A), die ausreichend waren, den basalen autophagischen Flux aufrechtzuerhalten. Allerdings konnte mit den stark reduzierten Proteinspiegeln von ATG9A keine Verstärkung der autophagischen Aktivität durch SM detektiert werden, wie sie unter Kontrollbedingungen durchaus beobachtet wurde (Abbildung 16C). SM verstärkte die autophagische Aktivität bei normalen ATG9A-Proteinspiegeln. Ohne ausreichende ATG9A-Proteinspiegel konnte Sphingomyelin die Autophagie nicht modulieren. Dies war eine erste Demonstration, dass die Verstärkung des autophagischen Fluxes durch SM abhängig von ATG9A war.

Um die Relevanz der Bildung ATG9A-positiver Vesikel für den Effekt von Sphingomyelin auf die Autophagie weitergehend zu untersuchen, wurde die Phosphorylierung von ATG9A durch die SRC-Kinase und damit die Mobilisierung von ATG9A und die Bildung ATG9A-positiver Vesikel inhibiert (Zhou *et al.*, 2017) (Abbildung 15 – SRC-Inhibition). Die Inhibierung der Phosphorylierung von ATG9A und der damit stark eingeschränkte Vesikeltransport vom Golgi-Apparat zur Phagophore verhinderte ebenfalls einen positiven Effekt von Sphingomyelin auf den autophagischen Flux im Vergleich zur Kontrolle (Abbildung 16B).

PP2 wirkte zwar nicht inhibierend auf den basalen autophagischen Flux und die akkumulierten Proteinspiegel von MAP1LC3BII waren vergleichbar zwischen den mit dem SRC-Kinase-Inhibitor behandelten Proben und deren Kontrolle. Allerdings konnte im Gegensatz zur Kontrolle keine verstärkte Akkumulation von MAP1LC3BII nach Bafilomycin A₁ beobachtet werden, wenn die Zellen simultan mit PP2 und SM behandelt wurden (Abbildung 16B und D).

Dass PP2 keinen Einfluss auf den basalen autophagischen Flux ausübt und dieser trotz der Inaktivierung des Vesikeltransportes nicht beeinflusst wurde, wurde bereits zuvor beobachtet (Bekbulat *et al.*, 2020). Unabhängig von der Phosphorylierung können ATG9A-positive Vesikel gebildet werden, wenn auch in sehr geringem Maße (Zhou *et al.*, 2017). Diese geringe Aktivität schien auszureichen, um die autophagische Aktivität aufrechtzuerhalten. Erst die Einwirkung von Autophagie-induzierenden Stimulatoren zeigte, dass die Aktivität des autophagischen Fluxes ohne die Aktivität der SRC-Kinase nicht gesteigert werden konnte.

Zusammengenommen wurde hier gezeigt, dass die positive Modulierung des autophagischen Fluxes durch SM abhängig von der Aktivierung von ATG9A war und schlussfolgernd vom Pool der ATG9A-positiven Vesikel.

Der transiente Verlust von ATG9A verhinderte die positive Wirkung von Sphingomyelin auf den autophagischen Flux. Nach Inhibierung der SRC-Kinase und somit der verhinderten Phosphorylierung und Aktivierung von ATG9A, wurde ebenfalls keine Induktion des autophagischen Fluxes durch Sphingomyelin beobachtet. Die Modulation der Autophagie von Sphingomyelin konnte mit der Aktivität von ATG9A und dem Transport ATG9A-positiver Vesikel korreliert werden.

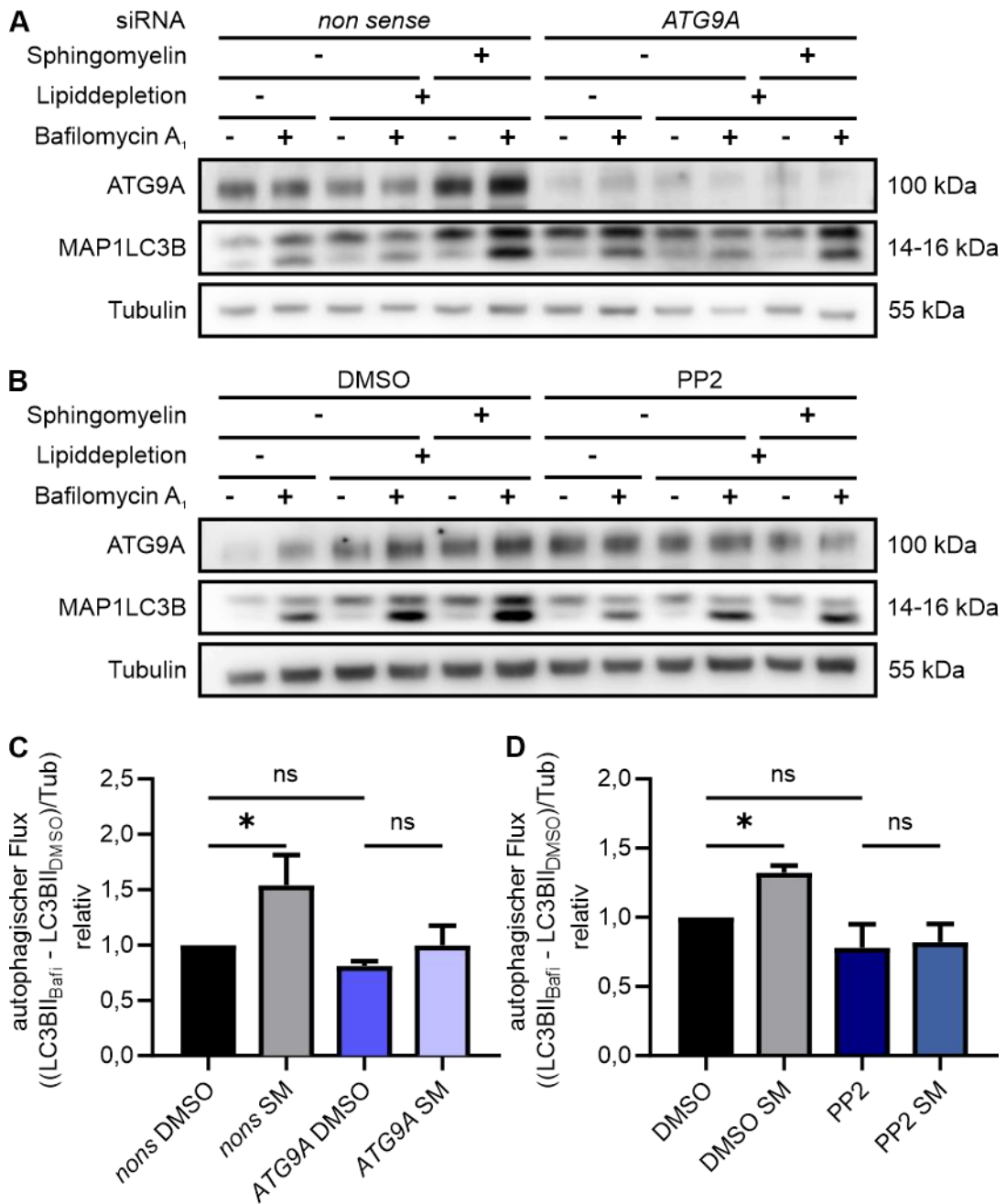


Abbildung 16 Die positive Modulation der Autophagie durch Sphingomyelin ist abhängig von ATG9A
 (A) Immunoblots von ATG9A und MAP1LC3B mit Tubulin als Ladekontrolle. HeLa WT-Zellen wurden mit *non sense* oder *siATG9A*-RNA transfiziert und nach 48 h für 2 h mit 500 nM SM und anschließend für 2 h mit 2 μ M Bafilomycin A₁ behandelt. Die dargestellten Immunoblots sind repräsentativ für n = 3. (B) Immunoblots für ATG9A und MAP1LC3B mit Tubulin als Ladekontrolle. HeLa WT-Zellen wurden 12 h mit 5 μ M PP2 behandelt. Nach 8 h wurden 500 nM SM und nach 10 h 2 μ M Bafilomycin A₁ supplementiert. Die dargestellten Immunoblots sind repräsentativ für n = 3. (C, D) Statistische Auswertung des autophagischen Fluxes anhand der Immunoblots von MAP1LC3B aus (A) und (B) über eine *one-way* ANOVA mit dem Posthoc-Test nach Tukey's. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichungen. ns = nicht signifikant, * *P* < 0,05.

3.2 Der Verlust von ATG9A sowie ATG2A und ATG2B inhibiert die Autophagie bereits unter basalen Bedingungen

In Kapitel 3.1 wurde gezeigt, dass die Supplementation spezifischer Phospholipide die Aktivität der Autophagie beeinflusst. Für ein besseres Verständnis der zugrundeliegenden Mechanismen wurde über *CRISPR/Cas9* ein doppelter KO für ATG2A und ATG2B und ein KO für ATG9A in HeLa-Zellen generiert. Alle drei Proteine sind entscheidend für die Lipidhomöostase der Zelle und die Lipidversorgung der wachsenden Phagophore. Die Phospholipid-Analysen der isolierten autophagischen Vesikel in Kapitel 3.1.1 zeigten, dass verschiedene Autophagie-Bedingungen keine Veränderungen im Profil der Phospholipide von autophagischen Vesikeln herbeiführten. Bisher ist im humanen Kontext nicht bekannt, wie sich Störungen in der Verfügbarkeit von Lipiden auf das Lipidprofil der Membranen von geschlossenen autophagischen Vesikeln auswirken, wie es in den ATG2A/B KO und ATG9A KO der Fall ist.

ATG2A und ATG2B sind Lipidtransferasen, die Phospholipide, vornehmlich PC, PE und PI, vom ER an die Phagophore transportieren (Valverde *et al.*, 2019). Es ist bekannt, dass der Verlust beider ATG2-Proteine zu einem basal stark verringerten autophagischen Flux, verkleinerten Autophagosomen und der Akkumulation von Phagophoren führt (Tang *et al.*, 2019). Für die Deletion von *Atg2* in *D. melanogaster* wurde ein verändertes Lipidprofil Atg8-positiver Strukturen beschrieben (Laczko-Dobos *et al.*, 2021). Hier wurde eindrucksvoll gezeigt, dass es bei Störungen der Lipidverfügbarkeit zwangsläufig zu Änderungen der Lipidzusammensetzung kommt. Leider konnte nicht zwischen geschlossenen Autophagosomen und Phagophoren, die im Atg2⁻ Modell akkumulierten, unterschieden werden.

ATG9A ist ein Lipidskrablase, die am Golgi-Apparat lokalisiert ist. Wird ATG9A durch Phosphorylierung aktiviert, knospen ATG9A-positive Vesikel vom Golgi-Apparat und transferieren zwischen Plasmamembran, endosomalem System, Golgi-Apparat, Phagophore und anderen Zellkompartimenten (Choi *et al.*, 2024; Papinski *et al.*, 2014; Zhou *et al.*, 2017). Der Verlust von ATG9A führt, abhängig vom verwendeten Modell, zu einem Erliegen der Autophagie oder einer Verringerung der Autophagie auch unter basalen Bedingungen (Imai *et al.*, 2016; Kishi-Itakura *et al.*, 2014; Runwal *et al.*, 2019; Zhou *et al.*, 2017).

ATG9A und ATG2A sind in ihrer Interaktion verantwortlich für den Lipidtransfer vom ER an die Phagophore und für die Verteilung der Lipide über die Phagophorenmembran (van Vliet *et al.*, 2022).

In vorrangigen Studien konnte die Arbeitsgruppe zeigen, dass RAB18, eine RAB-GTPase, die am ER und an Lipidtröpfchen lokalisiert ist, bedeutend für den Transfer von Fettsäuren in das ER ist. Funktionell unterstützt RAB18 die Lipidhomöostase des ERs und somit die Versorgung der Phagophore mit neu synthetisierten Membranlipiden. Der Verlust

von RAB18 führt zu einer Immobilisierung der Fettsäuren in den Lipidtröpfchen, was eine gestörte Fettsäure- und Phospholipidsynthese zur Folge hat und damit eine Störung der zellulären Lipidhomöostase bewirkt. Aufgrund von spezifischen Adaptionen des autophagischen Netzwerkes und einer Überaktivierung von ATG9A wird der basale autophagische Flux trotz des Verlustes von RAB18 aufrechterhalten. Allerdings lässt sich die Autophagie nicht mehr induzieren (Bekbulat *et al.*, 2020).

Im Folgenden wurden die generierten ATG2A/B KO- und ATG9A KO-Modelle bezüglich der Aktivität Autophagie-relevanter Prozesse charakterisiert. Zusätzlich wurde der RAB18 KO als Modell einer verstärkten Aktivierung von ATG9A eingeführt (Bekbulat *et al.*, 2020).

3.2.1 Der Verlust von ATG2A und ATG2B sowie der Verlust von ATG9A resultieren in einer veränderten autophagischen Aktivität

Für die Charakterisierung der über *CRISPR/Cas9*-generierten KO-Linien wurde der autophagische Flux unter basalen und unter Autophagie-induzierenden Bedingungen untersucht. Wie bereits in der Literatur beschrieben (Tang *et al.*, 2019), führte der Verlust von ATG2A/B zu einer reduzierten autophagischen Aktivität (Abbildung 17A und B). Der autophagische Flux erreichte weder unter basalen Bedingungen noch unter Nährstoffentzug die Effizienz des Fluxes im Wildtyp (WT). Interessanterweise konnte die autophagische Aktivität aber durch Induktion gesteigert werden. Die Proteinspiegel von MAP1LC3BI zeigten augenscheinlich keine Abweichungen vom WT. Dies deutete daraufhin, dass zumindest die Lipidierung von MAP1LC3B durch den Verlust von ATG2A/B keinen Adaptionen unterlag. Der ATG2A/B KO zeigte also einen stark reduzierten, aber induzierbaren autophagischen Flux.

Der stabile Verlust von ATG9A führte, wie bereits in der Literatur beschrieben, zu einer starken Verringerung der autophagischen Aktivität (Kishi-Itakura *et al.*, 2014) (Abbildung 17D). Der WT wies einen gesteigerten autophagischen Flux unter Autophagie induzierenden Bedingungen auf, bei dem die Proteinspiegel von MAP1LC3BII unter Bafilomycin A₁ mehr akkumulierten als unter basalen Bedingungen (Abbildung 17C). Die Proteinspiegel der lipidierten Form von MAP1LC3B war im ATG9A KO grundlegend stark reduziert und nach Zugabe von Bafilomycin A₁, welches ein intrazelluläres Auflaufen von autophagischen Vesikeln verursacht, war keine Akkumulation unter basalen und Autophagie-induzierenden Bedingungen zu beobachten (Abbildung 17C und D). Als Folge waren die Proteinspiegel von unlipidiertem MAP1LC3B um ein Vielfaches erhöht im Vergleich zur WT-Kontrolle (Abbildung 18). Dies deutete darauf hin, dass im Gegensatz zum ATG2A/B KO die Lipidierung

von MAP1LC3B im ATG9A KO gestört war. Ein autophagischer Flux war in den ATG9A KO-Zellen nicht nachweisbar und nicht induzierbar.

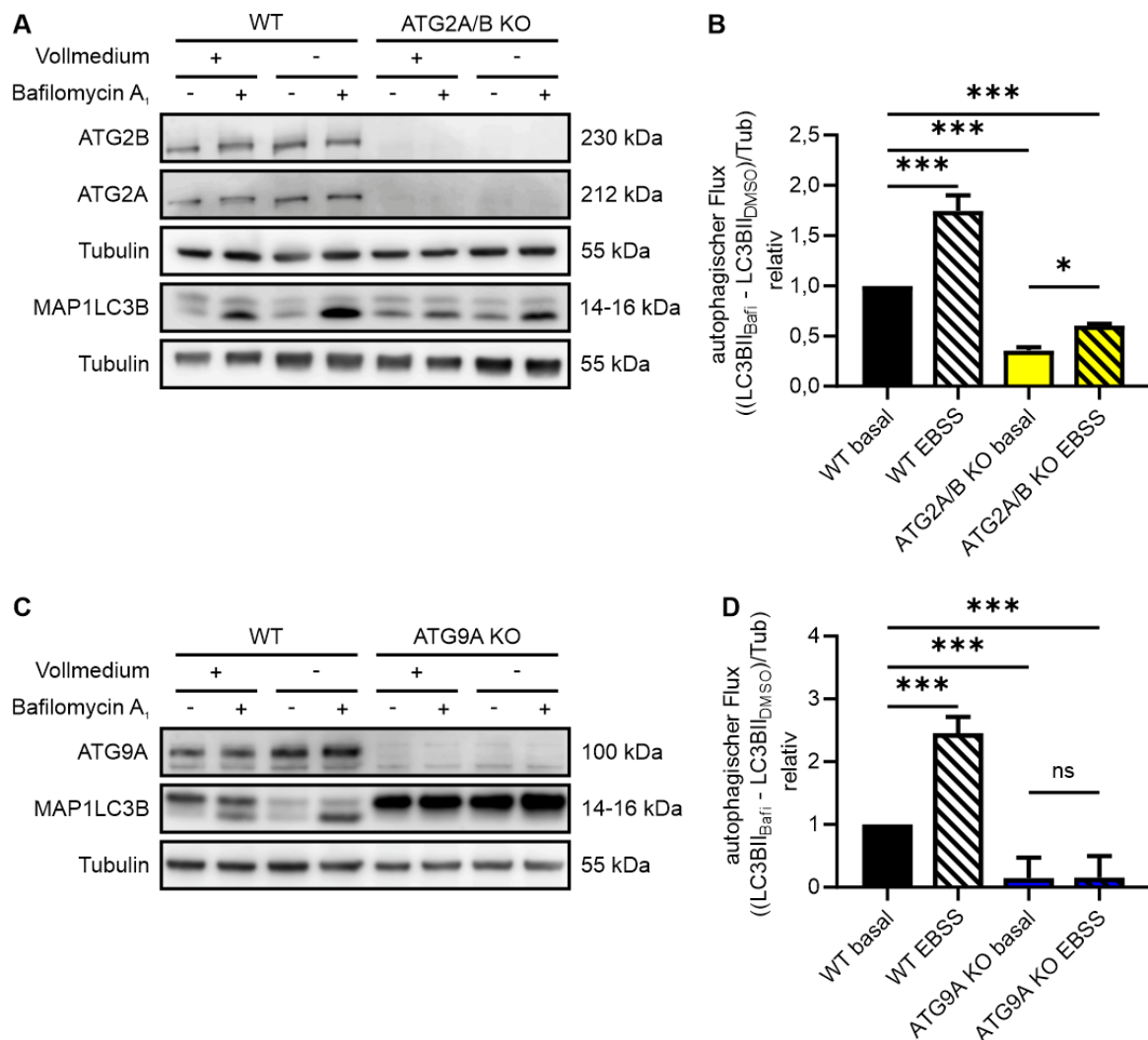


Abbildung 17 Die Knockouts von ATG2A/B und ATG9A beeinträchtigen die Autophagie (A) Immunoblots von ATG2B, ATG2A und MAP1LC3B mit Tubulin als Ladekontrolle. Geladen wurden Zelllysate aus HeLa WT- und HeLa ATG2A/B KO-Zellen. Die Zellen wurden 2 h mit Kulturmedium oder EBSS mit DMSO oder Bafilomycin A₁ behandelt. Die dargestellten Immunoblots sind repräsentativ für n = 3. (B) Statistische Auswertung des autophagischen Fluxes anhand des Immunoblots von MAP1LC3B aus (A) über eine *one-way* ANOVA mit dem Posthoc-Test nach Tukey's. Dargestellt sind die Mittelwerte ± Standardabweichungen. (C) Immunoblots von ATG9A und MAP1LC3B mit Tubulin als Ladekontrolle. Geladen wurden Zelllysate aus HeLa WT- und HeLa ATG9A KO-Zellen. Die Zellen wurden 2 h mit Kulturmedium oder EBSS und DMSO oder Bafilomycin A₁ behandelt. Die dargestellten Immunoblots sind repräsentativ für n = 5. (D) Statistische Auswertung des autophagischen Fluxes anhand des Immunoblots von MAP1LC3B aus (C) eine *one-way* ANOVA mit dem Posthoc-Test nach Tukey's. Dargestellt sind die Mittelwerte ± Standardabweichungen. ns = nicht signifikant, * *P* < 0,05, *** *P* < 0,005.

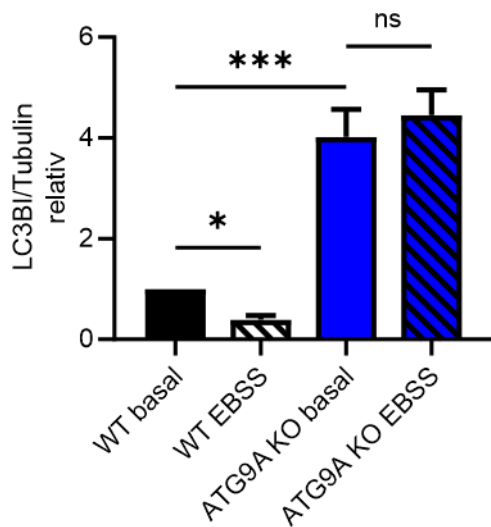


Abbildung 18 MAP1LC3BI akkumuliert im ATG9A KO
Statistische Auswertung der in Abbildung 17C dargestellten Immunoblots von MAP1LC3BI unter basalen Bedingungen und nach Nährstoffentzug ohne Bafilomycin A₁. Dargestellt sind die Mittelwerte ± Standardabweichungen aus n = 5. Ermittlung der Signifikanzen über eine *one-way* ANOVA mit dem Posthoc-Test nach Holmes-Sidak's. ns = nicht signifikant, * $P < 0,05$, *** $P < 0,005$.

Neben der Analyse der autophagischen Aktivität durch Immunoblots wurde immunocytochemisch die intrazelluläre Verteilung von MAP1LC3B und SQSTM1 in den beiden KO-Linien untersucht. In beiden KO-Linien wurden Strukturen nachgewiesen, die positiv für MAP1LC3B und SQSTM1 waren (Abbildung 19A). Nach Bafilomycin A₁-Behandlung akkumulierten distinktere Vesikel, was unterstrich, dass auch in den KO-Zellen die Bildung von Autophagosomen zumindest induziert wurde (Abbildung 19B und C). Ferner wurden in beiden KO-Linien SQSTM1-positive Strukturen nachgewiesen, die deutlich größer als Autophagosomen und ebenfalls positiv für MAP1LC3B waren, wobei diese Akkumulationen in ATG9A KO-Zellen erkennbar größer und häufiger waren als in ATG2A/B KO-Zellen (Abbildung 19B und C). Es konnte kein Bafilomycin A₁-Effekt auf diese Strukturen beobachtet werden. Die Akkumulation von SQSTM1 in Aggregat-ähnlichen Strukturen wurde zumindest in ATG9A KO Zellen beschrieben und wurde mit einer gestörten Autophagie in Verbindung gebracht (Kishi-Itakura *et al.*, 2014).

Die Akkumulation von SQSTM1 begründete sich in der Anreicherung von Phagophoren in ATG9A KO-Zellen und in der Anreicherung nicht vollständig geschlossener Autophagosomen in den ATG2A/B KO- und ATG9A KO-Zellen (Kishi-Itakura *et al.*, 2014; Maeda *et al.*, 2020) (Abbildung 19).

Die Akkumulationen von SQSTM1 wurde auch per Immunoblot detektiert (Abbildung 20A und C). Die Quantifizierung der SQSTM1-Proteinspiegel im ATG2A/B KO wiesen eine etwa zweieinhalbfache Erhöhung und im ATG9A KO eine circa fünffache Verstärkung der SQSTM1-Spiegel nach (Abbildung 20B). Außerdem konnten, wie in Abbildung 20C zu erkennen ist, in ATG9A KO Zelllysaten SQSTM1-Polymere detektiert werden. Die Akkumulation von polymerem SQSTM1 wurde spannenderweise als Marker für Alterungsprozesse bestimmt, auch wenn dies mit einer Erhöhung des autophagischen Fluxes und nicht mit einer Störung der Autophagie einherging (Gamerding *et al.*, 2009). Im Vergleich zu den

WT-Zelllysaten waren die Proteinspiegel des polymeren SQSTM1 in ATG9A KO Zelllysaten um das 30-fache erhöht (Abbildung 20D).

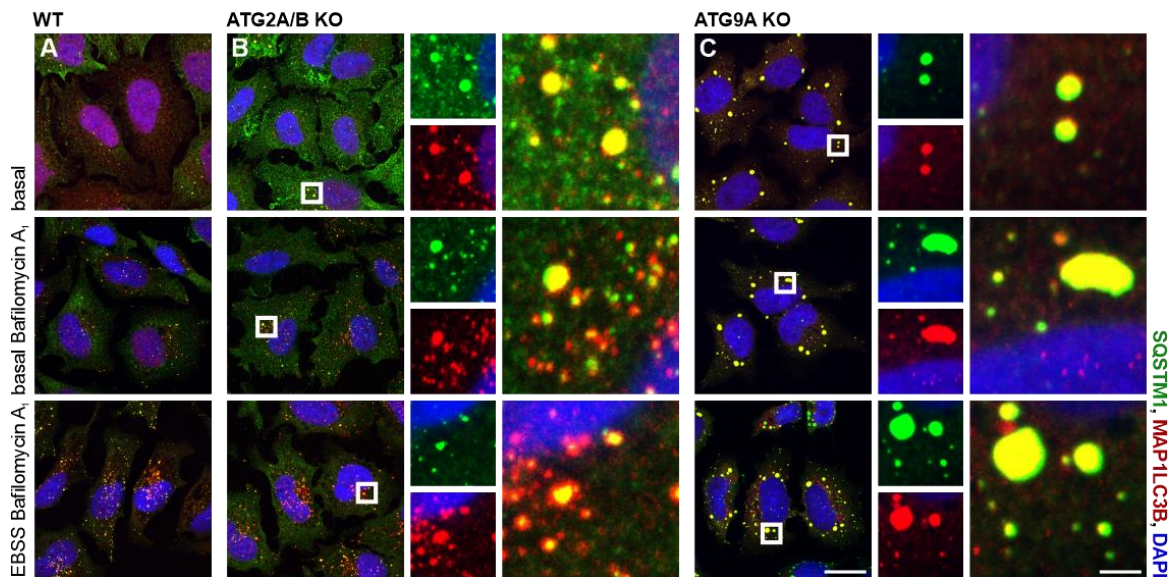


Abbildung 19 Immunocytochemische Darstellung Autophagosomen-assoziiierter Strukturen in HeLa ATG2A/B KO und ATG9A KO Dargestellt sind SQSTM1 in Grün, MAP1LC3B in Rot, Dapi in Blau. Maßstäbe = 20 und 2 µm. Dargestellt sind Zellen aus basalen Bedingungen (oben), unter Bafilomycin A₁-Behandlung für 2 h (Mitte) und unter EBSS mit Bafilomycin A₁ für 2 h (unten). (A) HeLa WT-Zellen. Die dargestellten Aufnahmen sind repräsentativ für n = 7. (B) HeLa ATG2A/B KO-Zellen. Die dargestellten Aufnahmen sind repräsentativ für n = 4. (C) HeLa ATG9A KO-Zellen. Die dargestellten Aufnahmen sind repräsentativ für n = 3.

Um die SQSTM1-positiven Strukturen in den KO-Zellen genauer zu charakterisieren, wurden diese unter Ausnutzung ihrer hohen Dichte mit einem auf Zentrifugation basierendem Protokoll isoliert (Witan *et al.*, 2008) und sowohl die Überstands- als auch die Pelletfraktion im Immunoblot untersucht. Sowohl in WT-Zellen als auch in ATG9A KO-Zellen wurden in der Pelletfraktion vermehrt SQSTM1-Polymere detektiert, wobei die SQSTM1-Spiegel im ATG9A KO im Vergleich zum WT stark erhöht waren (Abbildung 20C). Der Vergleich der Gesamtzelllysate von WT und ATG9A KO zeigte obendrein SQSTM1-Polymere mit verschiedenen Molekulargewichten – unter anderem auch eine Bande mit einem Molekulargewicht von etwa 150 kDa, die im WT nicht beobachtet wurde (Abbildung 20C). Die durch den Verlust von ATG9A verursachte starke Verringerung der Autophagie führte dementsprechend zu einer Akkumulation von SQSTM1 und daraus resultierend zu einer Anhäufung von unterschiedlichen Polymeren des Substratrezeptors.

Neben SQSTM1 wurde MAP1LC3B untersucht. Im WT wurde, wie zu erwarten, die unlipidierte, lösliche Form von MAP1LC3B im Überstand nachgewiesen und die lipidierte, Vesikel-assoziierte Form vorwiegend in der Pelletfraktion detektiert. Im Gegensatz dazu wurden

im ATG9A KO nicht nur lipidiertes, sondern auch unlipidiertes MAP1LC3B in der Pelletfraktion nachgewiesen. Offensichtlich assoziierte unlipidiertes MAP1LC3B, dass im WT ausschließlich in der löslichen Fraktion detektiert wurde, im ATG9A KO mit hochmolekularen, pelletierbaren SQSTM1-Strukturen (Abbildung 20C).

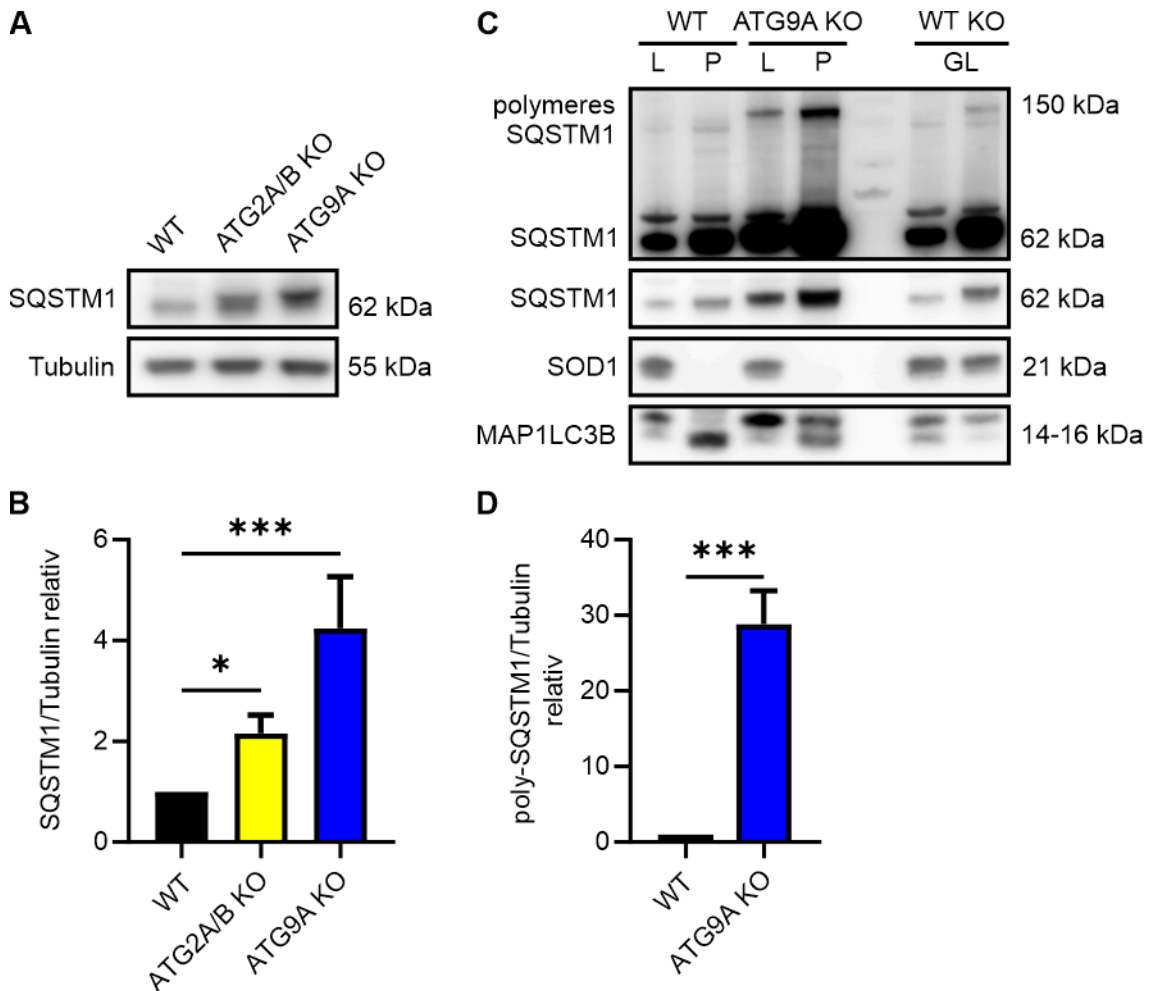


Abbildung 20 Die Proteinspiegel von SQSTM1 sind in ATG2A/B KO und ATG9A KO erhöht (A) Immunoblots von SQSTM1 und Tubulin aus HeLa WT-, ATG2A/B KO- und ATG9A KO-Zellen. (B) Die Immunoblots aus (A) wurden statistisch ausgewertet über eine *one-way* ANOVA mit dem Posthoc-Test nach Tukey's. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichung aus $n = 4$. (C) Immunoblots von SQSTM1, SOD1 und MAP1LC3B aus HeLa WT- und ATG9A KO-Zellen. Die Proteinlysate wurden für die Untersuchung von Aggregaten aufbereitet und die lösliche Fraktion (L) gegen die Pelletfraktion (P) aufgetragen. Als Kontrolle diente Gesamtzelllysate (GL). (D) Die Immunoblots der polymeren SQSTM1-Proteinspiegel in HeLa WT- und ATG9A KO-Zellen wurden statistisch ausgewertet über den t-Test. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichungen aus $n = 3$. * $P < 0,05$, *** $P < 0,005$.

Immunozytochemische Untersuchungen zeigten eine Akkumulation von SQSTM1- und MAP1LC3B-positiven Strukturen in den ATG9A KO-Zellen (Abbildung 19C). Die proteinbiochemischen Analysen bestätigten die immunozytochemischen Studien und zeigten eine Akkumulation von SQSTM1-Polymeren und mit diesen assoziierten MAP1LC3B (Abbildung

20). Zusammenfassend wurde angenommen, dass die Phagophorenbildung in ATG9A KO-Zellen gestört war, weshalb polymeres SQSTM1 akkumulierte. Zusätzlich kam es zu einer gestörten Lipidierung von MAP1LC3B, welche dann in einer vermehrten Anreicherung von *liquid-liquid-phase separation*- und MAP1LC3B-SQSTM1-reichen Strukturen resultierte (Sun *et al.*, 2018).

Der Verlust von ATG2A und ATG2B sowie von ATG9A beeinträchtigte die Autophagie unterschiedlich stark und führte in beiden KO-Modellen zur Akkumulation von SQSTM1 in Aggregat-ähnlichen Strukturen, in denen sich auch MAP1LC3B anreichte.

3.2.2 Der Verlust von ATG9A beeinflusst die lysosomale Funktion, der Verlust von ATG2A/B nicht

Der Verlust von ATG9A hatte schwerwiegenden Störungen in der Biogenese von Autophagosomen zur Folge und der autophagische Flux war beinahe vollständig depletiert. Der Verlust von ATG2A und ATG2B führte zu einer stark reduzierten autophagischen Aktivität. Der Flux war zwar induzierbar, doch auch nach der Induktion der Autophagie erreichte er nicht die Effizienz des basalen autophagischen Fluxes von WT-Zellen.

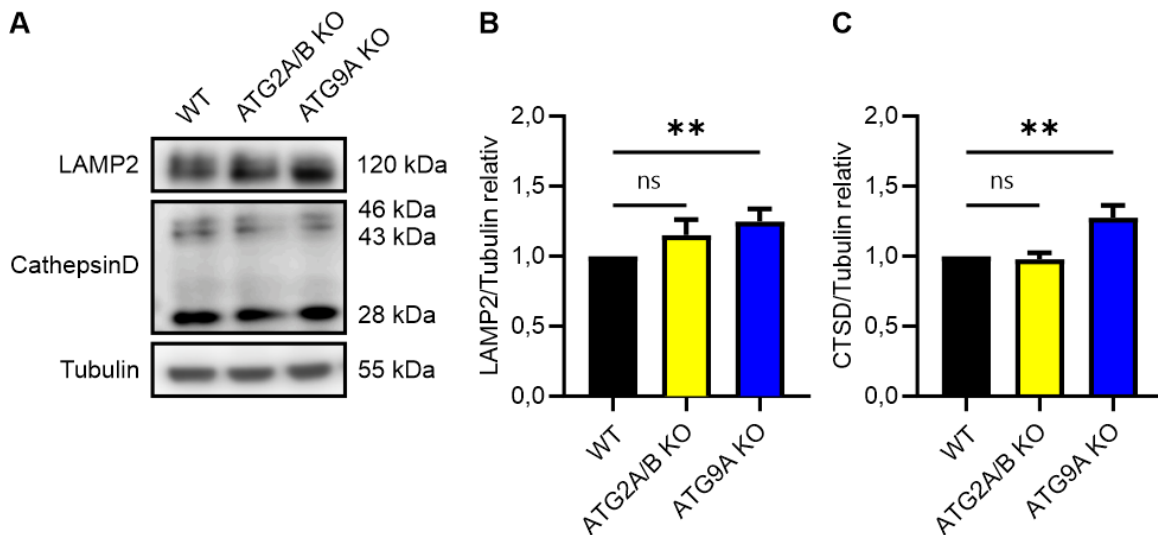


Abbildung 21 Die Spiegel lysosomaler Proteine sind in ATG2A/B KO-Zellen unverändert, in ATG9A KO-Zellen erhöht (A) Immunoblots von LAMP2 und Cathepsin D (CTSD) mit Tubulin als Ladekontrolle von HeLa WT-, ATG2A/B KO- und ATG9A KO-Zellen. (B, C) Die Immunoblots von LAMP2 und CTSD wurden statistische ausgewertet über eine *one-way* ANOVA mit einem Posthoc-Test nach Tukey's. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichung aus $n = 4$. ns = nicht signifikant, ** $P < 0,01$.

Die Einschränkungen der Makroautophagie ließen keine Aussage über die Effizienz anderer Degradationswege zu. Die Makroautophagie stellt einen potenten Degradationsprozess

dar mit einem großen Portfolio verschiedenster Substrate, inklusive Organellen, die der lysosomalen Degradation zugeführt werden. Als alternative Degradationswege stehen das UPS, die Chaperon-vermittelte und -assoziierte Autophagie sowie die Mikroautophagie zur Verfügung, wobei die autophagischen Prozesse direkt von der Funktionsfähigkeit des Lysosoms abhängig sind (Jin *et al.*, 2013; Li *et al.*, 2022).

Um die Lysosomen in den ATG9A KO- und ATG2A/B KO-Zellen genauer zu analysieren, wurden zunächst die Proteinspiegel von LAMP2 und Cathepsin D (CTSD) untersucht (Abbildung 21). LAMP2 ist ein lysosomales Transmembranprotein, das verschiedene Moleküle ins Lysosom transportiert (Terasawa *et al.*, 2016). CTSD ist eine lysosomale, saure Protease und wird in ihrer Proform zum Lysosom transportiert (Zaidi *et al.*, 2008). Dort wird sie prozessiert und die schwere Kette von CTSD entspricht dem aktiven Enzym (Bunk *et al.*, 2021).

In ATG2A/B KO-Zellen konnten keine signifikanten Veränderungen der Proteinspiegel von LAMP2 und CTSD beobachtet werden. Die ATG9A KO-Zellen dagegen zeigten signifikant erhöhte Proteinspiegel für LAMP2 und ein verstärktes Vorliegen der schweren Kette von CTSD (Abbildung 21B und C).

Die Ergebnisse für LAMP2 und CTSD im ATG9A KO-Modell deuteten entweder auf eine erhöhte Anzahl aktiver Lysosomen hin oder auf eine Akkumulation nicht funktionsfähiger oder funktionseingeschränkter Lysosomen. Um die Funktionalität der Lysosomen zu überprüfen, wurde die enzymatische Aktivität der Lysosomen anhand der Substratumsetzung von Cathepsin B sowie Cathepsin D und E gemessen. Weiter wurde auch die Aktivität des Proteasoms quantifiziert. Das Proteasom kann die Autophagie bis zu einem Grad kompensieren und Veränderungen der proteasomalen Aktivität können Hinweise auf Adaptionen geben (Raffeiner *et al.*, 2023). Dabei wurden in allen Assays spezifische Substrate genutzt, bei deren erfolgreicher Spaltung durch die Cathepsine oder die proteasomalen Proteasen ein Fluorophor freigesetzt wurde (Gamerding *et al.*, 2009). Durch die Quantifizierung des Fluorophors wurde die maximale Reaktionsgeschwindigkeit bestimmt.

Interessanterweise wiesen ATG9A KO-Zellen eine signifikant verringerte Aktivität der Cathepsine D und E (Abbildung 22A und B) sowie von Cathepsin B auf (Abbildung 22 C und D). Dies deutete zusammen mit den erhöhten Proteinspiegeln von LAMP2 und CTSD (Abbildung 21) daraufhin, dass nicht funktionsfähiger Lysosomen in ATG9A KO-Zellen vorlagen. Der Verlust von ATG9A beeinflusste also nicht nur die Biogenese der Autophagosomen, sondern auch die Funktionalität der Lysosomen. In ATG2A/B KO-Zellen zeigte sich lediglich eine Tendenz zu einer reduzierten Aktivität der lysosomalen Hydrolasen, die allerdings nicht signifikant war. Ähnlich wie bei der autophagischen Aktivität, die durch den Verlust der Lipidtransferasen reduziert, aber noch vorhanden war im Gegensatz zu den

ATG9A KO-Zellen (Abbildung 17), war auch die lysosomale Aktivität deutlich weniger beeinträchtigt.

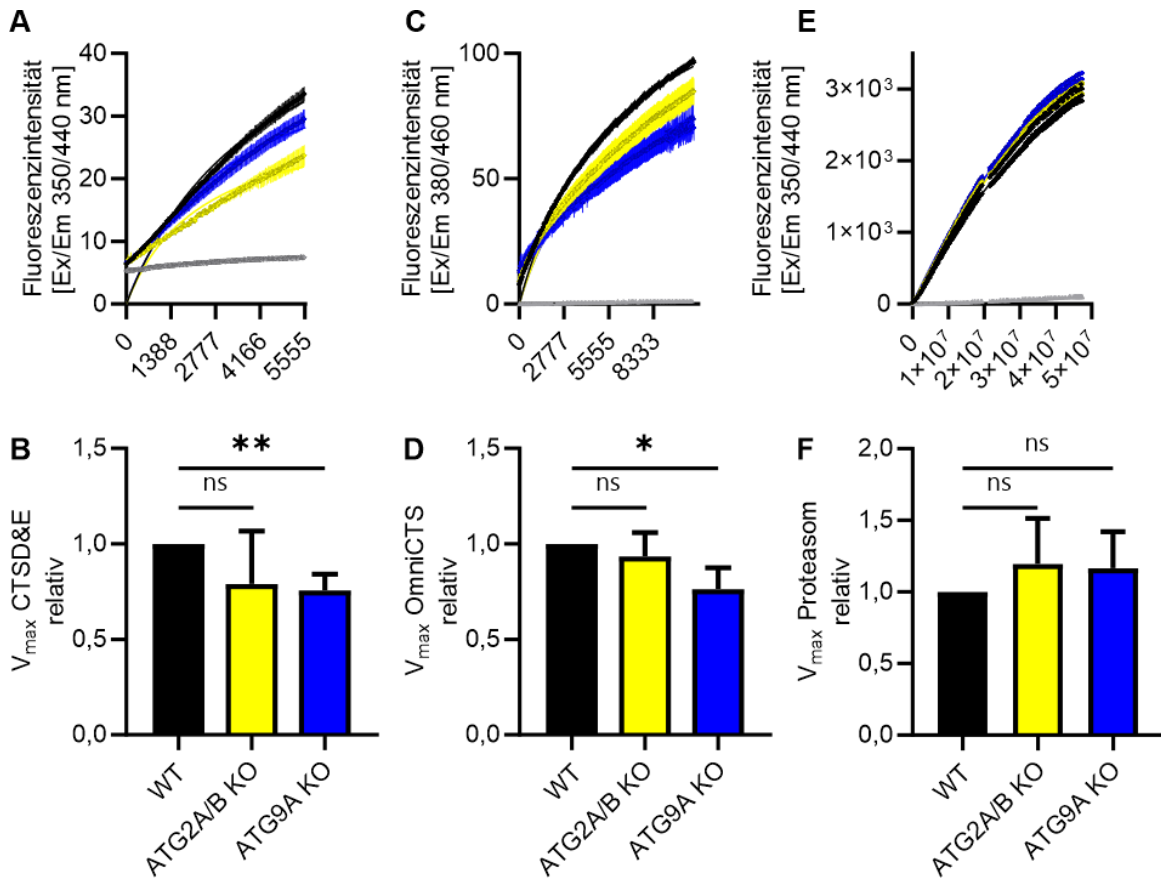


Abbildung 22 Die Aktivität lysosomaler Cathepsine ist in ATG9A KO-Zellen verringert, die Aktivität des Proteasoms ist unverändert In schwarz sind die Proben des WT, in Gelb des ATG2A/B KO und in Blau des ATG9A KO dargestellt. Die Negativkontrolle des Substratumsatzes ist in grau dargestellt. (A) Die Fluoreszenzintensität des Substrates für die Cathepsine D und E wurde über Zeit erfasst. Je mehr Substrat umgesetzt wurde, desto höher wurde die Fluoreszenzintensität. (B) Die maximalen Umsatzgeschwindigkeit (v_{max}) kalkuliert aus den Fluoreszenzintensitäten über die Zeit aus (A) wurde über den t-Test statistisch ausgewertet. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichungen von v_{max} aus $n = 3$. (C) Die Fluoreszenzintensität des Substrates für die Cathepsin B wurde über Zeit erfasst. (D) V_{max} kalkuliert aus den Fluoreszenzintensitäten über die Zeit aus (C) wurde über den t-Test statistisch ausgewertet. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichungen von v_{max} aus $n = 3$. (E) Die Fluoreszenzintensität des Substrates für das Proteasom wurde über Zeit erfasst. (F) V_{max} kalkuliert aus den Fluoreszenzintensitäten über die Zeit aus (E) wurde über den t-Test statistisch ausgewertet. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichungen von v_{max} aus $n = 4$. ns = nicht signifikant, * $P < 0,05$.

Die Aktivität des Proteasoms war weder in ATG2A/B KO- noch im ATG9A KO-Zellen signifikant verändert (Abbildung 22A), auch wenn in beiden KO-Modellen die Tendenz einer erhöhten Aktivität zu erkennen war (Abbildung 22B). Die Akkumulation von SQSTM1 und ubiquitiniertem Material kann das Proteasom überlasten und zu einer Inhibition der protea-

somalen Aktivität führen. Gleichzeitig wurde beschrieben, dass das Proteasom die Autophagie teilweise kompensieren kann (Korolchuk *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2013). In den untersuchten KO-Zellmodellen schien das Proteasom weder durch Proteinaggregate inhibiert zu sein noch einen signifikant kompensatorischen Effekt zu zeigen.

Zusammenfassend wies das ATG9A KO-Modell schwerwiegende Beeinträchtigungen der Autophagie auf. Der autophagische Flux war signifikant reduziert und nicht induzierbar (Abbildung 17C und D), während unlipidiertes MAP1LC3BI in den ATG9A KO-Zellen akkumulierte (Abbildung 18). Auch SQSTM1 akkumulierte in den ATG9A KO-Zellen (Abbildung 20) und es wurden vergrößerte MAP1LC3B-SQSTM1-positive Strukturen, die keine Autophagosomen waren, in den Zellen beobachtet (Abbildung 19). Daneben wurde gezeigt, dass die Funktion der Lysosomen in den ATG9A KO-Zellen beeinträchtigt war (Abbildung 22). Daher wurde das ATG9A KO-Modell für weitere Untersuchungen zur Modulation der autophagischen Aktivität durch Lipide ausgeschlossen.

Der Verlust von ATG9A führte neben den Störungen autophagischer Prozesse auch zu einer gestörten Funktionalität der Lysosomen. Obwohl erhöhte Proteinspiegel von LAMP2 und der schweren Kette von CTSD detektiert werden konnte, war die Enzymaktivität verschiedener Cathepsine signifikant verringert. Die ATG2A/B KO-Zellen zeigten keine Veränderungen der lysosomalen Enzymaktivität. Das Proteasom war weder im ATG2A/B KO-Modell noch in den ATG9A KO-Modell in seiner Aktivität modifiziert, auch wenn eine tendenziell erhöhte Enzymaktivität beobachtet werden konnte.

3.2.3 Die Regulation von ATG9A in ATG2A/B KO- und RAB18 KO-Zellen

Neben der Analyse des autophagischen Fluxes und der lysosomalen Funktion, wurde in ATG2A/B KO-Zellen auch ATG9A untersucht. Da in ATG2A/B KO-Zellen aufgrund des fehlenden Lipidtransfers vom ER an die Phagophorenmembran die Lipidhomöostase gestört war, wurden die Proteinspiegel und die Lokalisation von ATG9A untersucht. ATG9A-positive Vesikel sind eine Lipidquelle für die Phagophorenmembran (Orsi *et al.*, 2012). Eine Veränderung der ATG9A-Proteinspiegel oder eine veränderte Lokalisation von ATG9A konnte auf eine kompensatorische Modulation hindeuten, um die Versorgung der Phagophorenmembran mit Lipiden aufrechtzuerhalten.

Tatsächlich waren die Proteinspiegel von ATG9A im ATG2A/B KO-Zelllysat signifikant erhöht im Vergleich zum WT unter basalen Bedingungen (Abbildung 23A und B). Erhöhte Proteinspiegel gaben allerdings keinen Hinweis auf eine veränderte Aktivität von ATG9A. Diese wird vor allem über posttranslationale Modifikationen wie die Phosphorylierungen von SRC-Kinase und ULK-Komplex gesteuert (Zhou *et al.*, 2017).

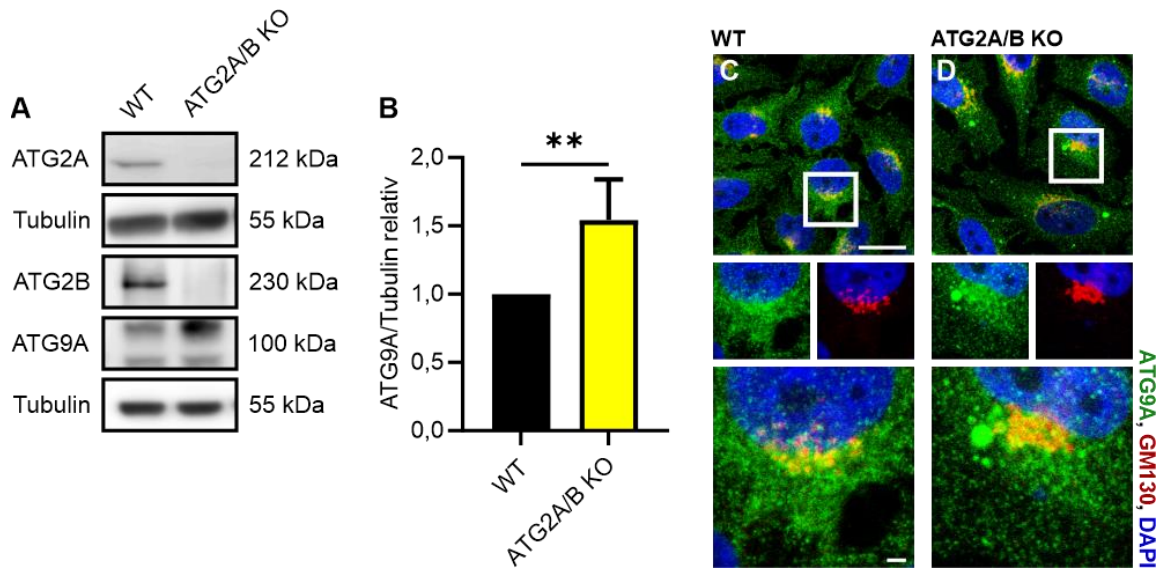


Abbildung 23 In ATG2A/B KO-Zellen sind die ATG9A-Proteinspiegel erhöht und die Lokalisation von ATG9A ist verändert (A) Immunoblots von ATG2A, ATG2B, ATG9A mit Tubulin als Ladekontrolle aus HeLa WT-, ATG2A/B KO- und ATG9A KO-Zellen. Repräsentativ für n = 4. (B) Statistische Auswertung der Immunoblots von ATG9A über den t-Test. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichungen aus n = 3. (C und D) Immunocytochemische Färbungen von ATG9A (Grün), GM130 (Rot) und Dapi (Blau). Die Aufnahmen zeigen Zellen unter basalen Autophagie-Bedingungen und sind repräsentativ für n = 3. Maßstäbe entsprechen 20 und 2 μ m. Dargestellt sind HeLa WT (C) und HeLa ATG2A/B KO Zellen (D). ** $P < 0,01$

In immunocytochemischen Färbungen, die in Abbildung 23C und D dargestellt sind, wurde gezeigt, dass ATG9A schon unter basalen Autophagiebedingungen in den ATG2A/B KO-Zellen perinukleär und in Strukturen außerhalb des Golgi Apparates akkumulierte. Spannderweise kolokalisieren diese ATG9A-positiven Strukturen in bereits publizierten Studien mit MAP1LC3B und SQSTM1 (Olivas *et al.*, 2023). ATG9A war zudem in distinkten Punctae in den ATG2A/B KO-Zellen im gesamten intrazellulären Raum lokalisiert. Dies erhärtete die Theorie, dass die Aktivität von ATG9A nach Verlust von ATG2A/B bereits unter basalen Bedingungen verändert war.

In Kapitel 3.1.3 wurde gezeigt, dass Sphingomyelin die Autophagie modulierte und dieser Prozess von ATG9A und dem ATG9A-positiven Vesikeltransfer abhängig war. In ATG2A/B KO-Zellen wurden erhöhte Proteinspiegel von ATG9A nachgewiesen und ATG9A zeigte eine veränderte intrazelluläre Lokalisation außerhalb des Golgi Apparates unter basalen Autophagie-Bedingungen, die auf eine gesteigerte Aktivität hindeuten. Des Weiteren war der ATG2A/B KO mit Störungen der Lipidversorgung zur Phagozytose vom ER ein hervorragendes Modell, um die Modulation der autophagischen Aktivität durch SM als einem Phospholipid, das nicht vom ER an die Phagozytose geliefert wird, genauer zu betrachten.

Ein zusätzliches zelluläres Modellsystem einer gestörten Lipidhomöostase mit Modifikationen der Aktivität von ATG9A sind die bereits beschriebene RAB18 KO-Zellen (Bekbulat *et al.*, 2020). RAB18 gehört zur Familie der RAB-GTPasen und ist unter anderem an Lipidtröpfchen und dem ER lokalisiert. Im aktiven Zustand vermittelt RAB18 die Fusion von Lipidtröpfchen mit dem ER. Dies resultiert in einer verstärkten Mobilisation von Fettsäuren aus Triacylglyceriden. Die Fettsäuren werden unter anderem für die Synthese von Lipiden genutzt. Der Verlust von RAB18 verhindert die erfolgreiche Fusion von Lipidtröpfchen und ER, so dass Fettsäuren nicht mobilisiert werden können und Lipidtröpfchen in der Zelle akkumulieren. Dies hat sekundär zur Folge, dass auch die Lipidzufuhr vom ER zur Phagophore gestört ist. Unter basalen Autophagie-Bedingungen ist keine Veränderung des autophagischen Fluxes zwischen RAB18 KO-Zellen und WT-Zellen festzustellen (Bekbulat *et al.*, 2020) (Abbildung 24A). Allerdings ist der autophagische Flux nach Verlust von RAB18 nicht mehr induzierbar. Während die Proteinspiegel von MAP1LC3BII in WT-Zellen unter EBSS und Bafilomycin A₁ deutlich ansteigen, zeigt sich in RAB18 KO-Zellen kein Unterschied der autophagischen Aktivität zwischen basalen und induzierenden Bedingungen (Bekbulat *et al.*, 2020) (Abbildung 24A und B).

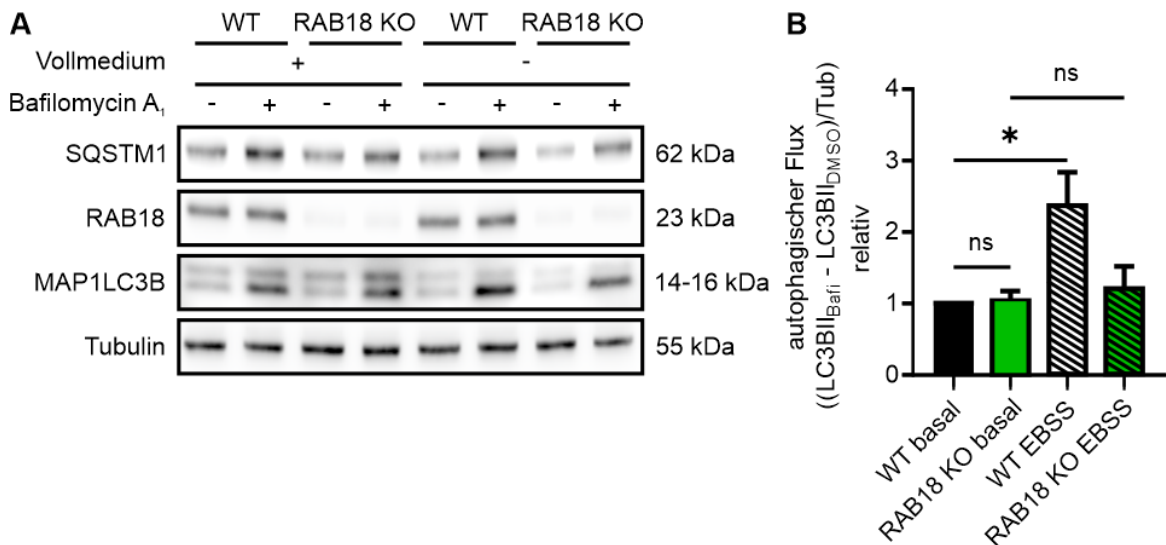


Abbildung 24 Der Verlust von RAB18 beeinträchtigt die Autophagie (A) Immunoblots von SQSTM1, RAB18, MAP1LC3B mit Tubulin als Ladekontrolle. Die Zellen wurden 2 h in Kulturmedium oder EBSS mit DMSO oder Bafilomycin A₁ inkubiert. Repräsentativ für n = 4. (B) Statistische Auswertung des autophagischen Fluxes anhand des Immunoblots von MAP1LC3B aus (A) über *one-way* ANOVA. Dargestellt sind die Mittelwerte ± Standardabweichung aus n = 4. ns = nicht signifikant, * *P* < 0,05. Modifiziert nach Bekbulat *et al.*, 2020.

Um die gestörte Lipidversorgung vom ER zur Phagophore zu kompensieren, weist ATG9A eine erhöhte Aktivität auf. Dadurch gelingt die Aufrechterhaltung der basalen Autophagie. Diese Aktivierung wird über die Phosphorylierung von Y8 von ATG9A vermittelt (Zhou *et al.*, 2017). Die totalen ATG9A-Proteinspiegel zwischen WT-Zellen und RAB18 KO-Zellen sind

vergleichbar unter basalen und Autophagie-induzierenden Bedingungen. In RAB18 KO-Zellen ist allerdings ATG9A schon unter basalen Autophagiebedingungen verstärkt an Y8 phosphoryliert. Eine Steigerung der Phosphorylierung unter Autophagie-induzierenden Bedingungen wird nicht beobachtet (Abbildung 25A und B).

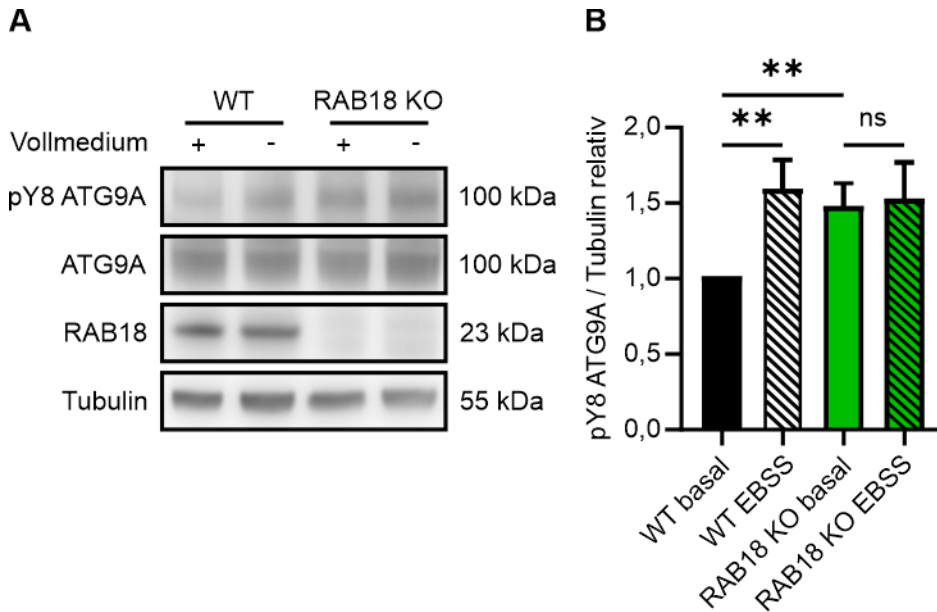


Abbildung 25 Der Verlust von RAB18 erhöht die Aktivität von ATG9A (A) Immunoblots von pY8 ATG9A, ATG9A, RAB18 mit Tubulin als Ladekontrolle. Die Zellen wurden 2 h in EBSS inkubiert. (B) Statistische Auswertung der Immunoblots aus (A) über *one-way* ANOVA. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichungen aus $n = 4$. ns = nicht signifikant, ** $P < 0,01$. Modifiziert nach Bekbulat *et al.*, 2020.

Um die Modulation des autophagischen Fluxes durch Sphingomyelin besser zu verstehen und genauer zu untersuchen, standen zwei Modelle mit Modifikationen von ATG9A zur Verfügung. In ATG2A/B KO-Zellen waren die Proteinspiegel und möglicherweise die Aktivität von ATG9A verändert und in RAB18 KO-Zellen war die Aktivität von ATG9A erhöht.

Der Verlust von ATG2A/B führte neben einer reduzierten, aber induzierbaren autophagischen Aktivität auch zu einer Regulierung der ATG9A-Proteinspiegel und einer veränderten Lokalisation von ATG9A. Das RAB18 KO-Zellmodell wurde für weitere Untersuchungen zur Modulation der autophagischen Aktivität durch Sphingomyelin eingeführt. Der Verlust von RAB18 führt zu einem nicht induzierbaren autophagischen Flux sowie einer erhöhten Aktivität von ATG9A durch eine erhöhte Phosphorylierung an Y8.

3.3 Sphingomyelin moduliert die autophagische Aktivität auch in Autophagie-gestörten Modellen

In Kapitel 3.1 wurde gezeigt, dass SM in HeLa WT-Zellen die autophagische Aktivität unter basalen Bedingungen sowie unter Nährstoffentzug positiv modulierte. Darüber hinaus wurden Hinweise darauf gewonnen, dass der positive Effekt von SM auf die Autophagie von ATG9A abhängig ist. In Kapitel 3.2 wurden genetische Depletionsmodelle charakterisiert, deren autophagische Aktivität stark eingeschränkt war und die einen erhöhten Proteinspiegel von ATG9A oder eine erhöhte Aktivität von ATG9A aufwiesen.

Um weiter zu untersuchen, ob SM die autophagische Aktivität über den ATG9A-positiven Vesikeltransfer moduliert, wurde im Folgenden der Einfluss des Sphingolipids in ATG2A/B KO- und RAB18 KO-Zellen evaluiert.

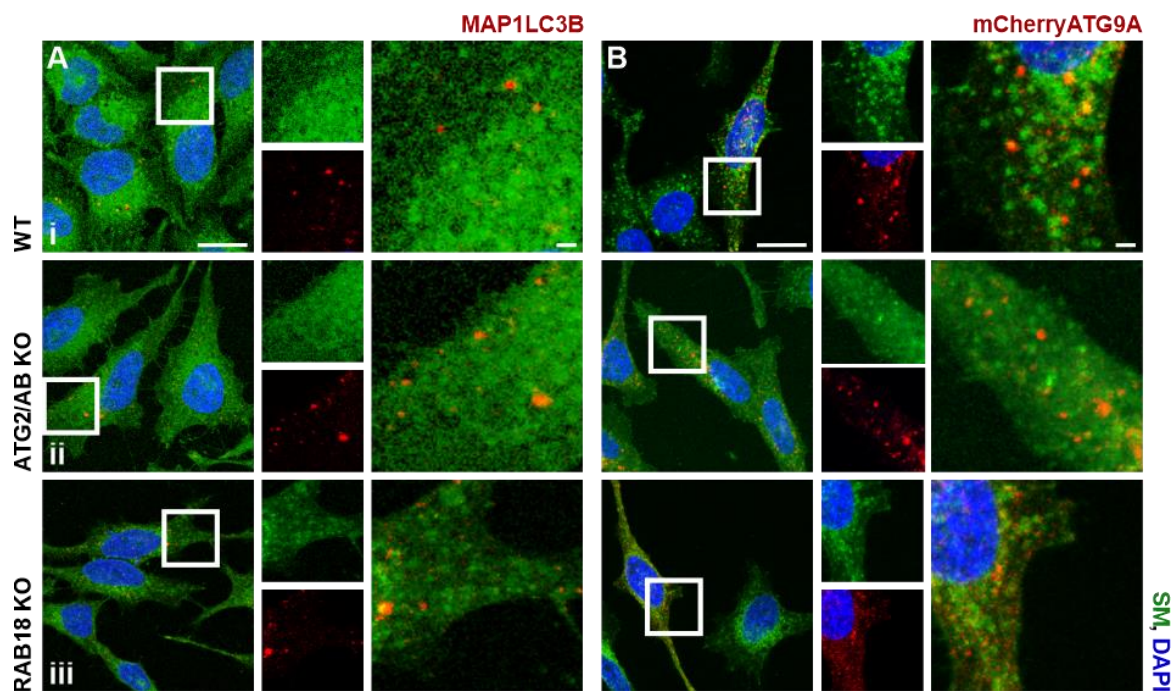


Abbildung 26 Sphingomyelin kolokalisiert in ATG2A/B KO- und in RAB18 KO-Zellen mit MAP1LC3B und mCherryATG9A BODIPY-SM ist in grün dargestellt, DAPI in Blau. Die Maßstäbe betragen 2 und 20 μM . (A) MAP1LC3B (Rot) und SM kolokalisieren in WT-Zellen (i), ATG2A/B KO-Zellen (ii) und RAB18 KO-Zellen (iii). (B) mCherryATG9A kolokalisiert mit SM in allen drei Zellmodellen. Die gezeigten Darstellungen sind repräsentativ für $n = 3$.

In Kapitel 3.1.1 wurde für HeLa WT-Zellen gezeigt, dass SM sowohl mit MAP1LC3B als auch mCherryATG9A kolokalisiert. Es wurde nun untersucht, ob SM mit Autophagie-assoziierten Proteinen kolokalisierte, wenn es zu einem Verlust von ATG2A/B oder RAB18 und damit zu einer Störung der Lipidhomöostase und der autophagischen Prozesse in den Zellen kam. Auch in den KO-Modellen kolokalisierte SM sowohl mit MAP1LC3B positiven als auch mit ATG9A-positiven Strukturen (Abbildung 26). Weder der Verlust von ATG2A/B noch

der von RAB18, die zu veränderten Proteinspiegeln oder einer erhöhten Aktivität von ATG9A in den Zellen führten, hatten einen Einfluss auf die Lokalisation von SM in MAP1LC3B-positiven Strukturen (Abbildung 26A) und in ATG9A-positiven Vesikeln (Abbildung 26B). Die Störungen der Lipidhomöostase zeigte also keine Auswirkungen auf die intrazelluläre Verteilung von SM.

Im Weiteren wurde der Einfluss von SM auf die autophagische Aktivität in beiden KO-Modellen untersucht. Interessanterweise verursachte SM in RAB18 KO-Zellen eine Verstärkung des autophagischen Fluxes sowohl unter basalen Bedingungen als auch nach Autophagie-Induktion. In vorherigen Studien wurde gezeigt, dass sich der autophagische Flux in RAB18 KO-Zellen allein durch Nährstoffentzug nicht induzieren lässt (Bekbulat *et al.*, 2020). Die zusätzliche Behandlung mit SM modulierte allerdings die autophagische Aktivität auch unter Autophagie-induzierenden Bedingungen positiv. Da auch gezeigt ist, dass ATG9A in diesem Modell eine erhöhte Aktivität aufweist (Bekbulat *et al.*, 2020), unterstrich dies die Theorie, dass ATG9A für den grundlegenden Mechanismus verantwortlich ist, durch den Sphingomyelin die Autophagie beeinflusst.

In ATG2A/B KO-Zellen wurde die autophagische Aktivität durch die Behandlung mit SM erst nach Autophagie-Induktion gefördert (Abbildung 27). Im ATG2A/B KO war der autophagische Flux unter basalen Bedingungen trotz Sphingomyelinbehandlung nicht beeinflusst (Abbildung 27B). Erst die Kombination aus Nährstoffentzug und SM-Behandlung modulierte die autophagische Aktivität positiv. Unter basalen Bedingungen lag in den ATG2A/B KO-Zellen ATG9A teilweise geclustert vor (Olivas *et al.*, 2023) (Abbildung 23D). Dies gab allerdings keinen Aufschluss über die Phosphorylierungen und somit die Aktivität von ATG9A. Allerdings wiesen immunzytochemischen Analysen daraufhin, dass ATG9A vermehrt in Vesikeln in den ATG2A/B KO-Zellen vorlag (Abbildung 23D). Demnach konnte vermutet werden, dass die Induktion der Autophagie und die daraus resultierende zusätzliche Phosphorylierung notwendig waren, um ATG9A verstärkt zu aktivieren und dessen Mobilisierung zu fördern. Durch die additive Aktivierung von ATG9A und die Vergrößerung des ATG9A-positiven Vesikelpools konnte SM die autophagische Aktivität schließlich positiv modulieren (Abbildung 27C).

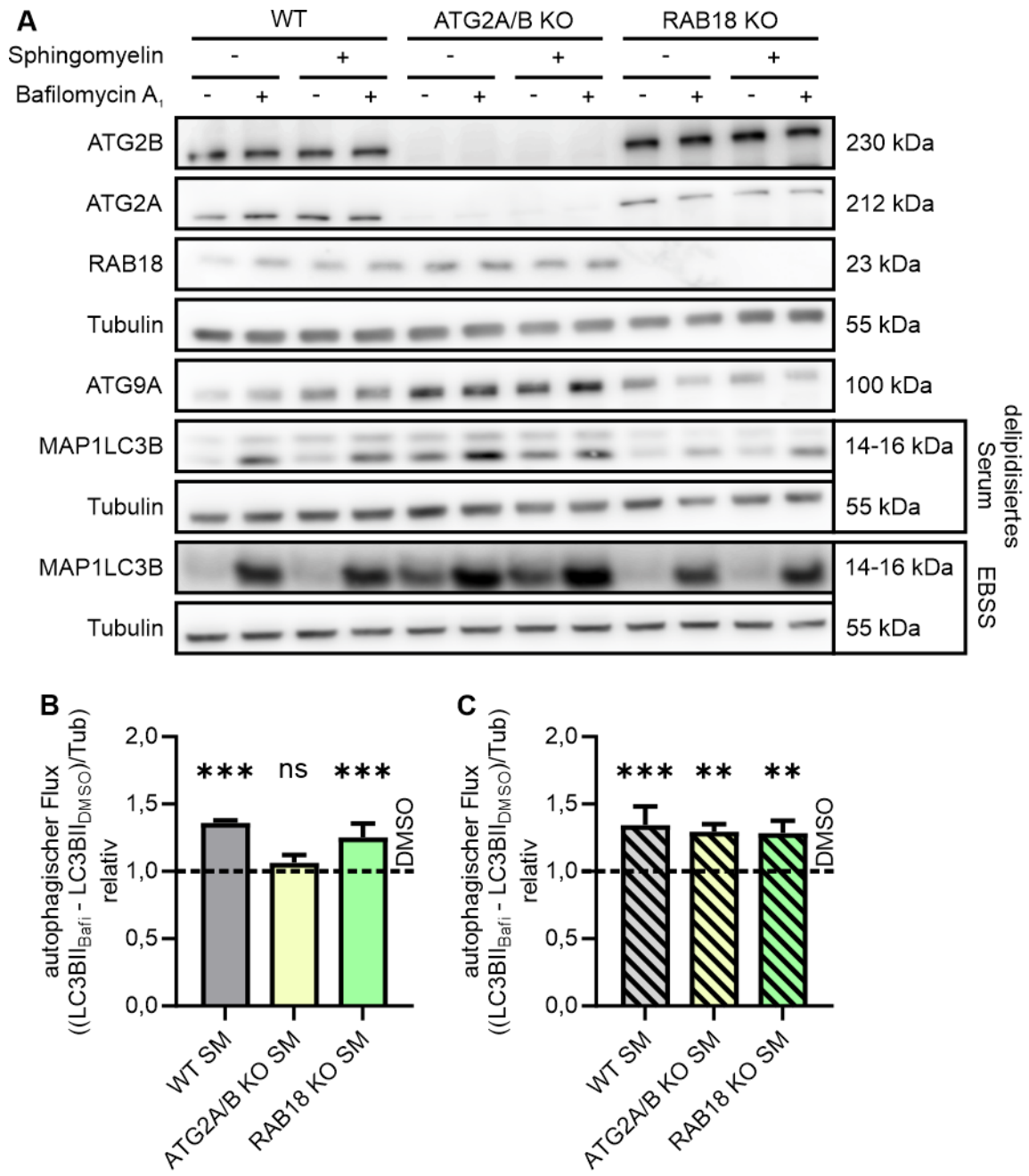


Abbildung 27 Sphingomyelin fördert den autophagischen Flux in ATG2A/B KO-Zellen und in RAB18 KO-Zellen (A) Immunoblots von ATG2B, ATG2A, ATG9A, MAP1LC3B, RAB18 und Tubulin nach Behandlung mit 500 nM BODIPY-SM für 2 h gefolgt von 2 µM Bafilomycin A₁ für 2 h in Kulturmedium mit delipidiertem Serum und EBSS. (B, C) Statistische Auswertung des autophagischen Fluxes anhand des Immunoblots von MAP1LC3B aus (A) mit Bezug zur jeweiligen DMSO-Kontrolle über eine *one way* ANOVA mit dem Posthoc-Test nach Tukey's. Dargestellt sind die Mittelwerte ±Standardabweichungen aus n = 3 bzw. n = 6. ns = nicht signifikant, ** *P* < 0,01, *** *P* < 0,005.

EBSS

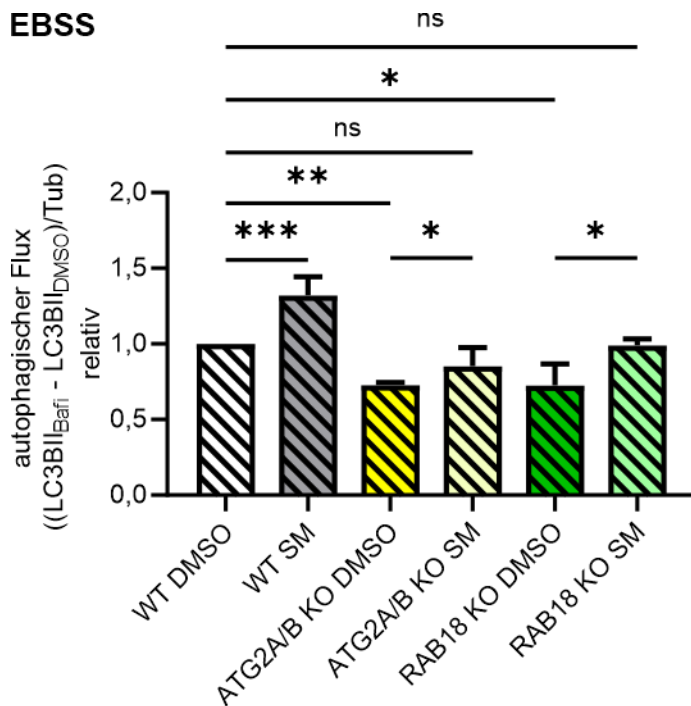


Abbildung 28 Sphingomyelin erhöht den autophagischen Flux unter Auto-phagie-induzierenden Bedingungen in den KO-Zelllinien auf ein vergleichbares Niveau zum unbehandelten wt ohne Sphingomyelin Statistische Auswertung der in Abbildung 27 gezeigten Immunoblots von MAP1LC3B für EBSS mit Normierung auf HeLa wt DMSO über eine *one way* ANOVA mit dem Posthoc-Test nach Tukey's. Dargestellt sind die Mittelwerte ± Standardabweichungen aus n = 3 bzw. n = 6. ns = nicht signifikant, * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,005$.

Faszinierenderweise wiesen beide KO-Modelle nach Behandlung mit SM unter Autophagie-induzierenden Bedingungen einen ähnlich starken autophagischen Flux auf wie der WT ohne SM (Abbildung 28). Beide Depletionsmodelle zeigten ohne Supplementation von SM eine deutlich verringerte autophagische Aktivität unter Autophagie-induzierenden Bedingungen verglichen mit dem WT, doch durch die Behandlung mit SM wurde erstmals ein autophagischer Flux auf Höhe des WT unter Autophagie-Induktion erzielt (Abbildung 17 und Abbildung 24). Dies lässt vermuten, dass die kurzzeitige Behandlung mit SM Mechanismen aktivierte und unterstützte, die die Autophagie über die Induzierbarkeit durch Hungerbedingungen hinaus steigerte.

Anhand der gezeigten Veränderungen der ATG9A-Proteinspiegel und -Aktivität in den KO-Modellen ließ sich die Hypothese weiter bestätigen, dass SM über den ATG9A-Vesikeltransport die Autophagie modulieren und SM den ATG9A-Vesikeltransport zusätzlich zu den Hungerbedingungen steigern konnte.

In ATG2A/B KO- und RAB18 KO-Zellen erhöhte Sphingomyelin den autophagischen Flux nach Induktion der Autophagie. In RAB18 KO-Zellen wurde zudem die autophagische Aktivität auch unter basalen Bedingungen verstärkt. Da die Aktivität bzw. Lokalisation von ATG9A sowohl im ATG2A/B KO-Modell als auch im RAB18 KO-Modell verändert war, untermauerten diese Ergebnisse die Hypothese, dass die Modulationen von ATG9A für den erhöhten autophagischen Flux verantwortlich waren.

3.4 Anpassungen des Isolationsprotokolles ermöglichen die Isolation distinkterer Autophagosomen-Populationen und auch anderer Organellen

Autophagosomen sind einzigartige, doppelmembranöse Vesikel. Sie werden de novo gebildet und die dafür notwendigen Lipide werden von unterschiedlichsten Kompartimenten und Organellen an die Phagophorenmembran transportiert. Während ihrer Biogenese werden ATG8-Proteine an PE konjugiert und in die Autophagosomenmembran eingebaut (Shpilka *et al.*, 2011). Störungen in der Lipidverfügbarkeit führen zu Störungen der autophagischen Aktivität (Kern & Behl, 2020; Menzies *et al.*, 2017). Das exakte Lipidprofil humaner autophagosomaler Membranen und welche Lipide welcher Lipidquelle entstammen, ist allerdings bisher kaum beschrieben.

In einer vorangegangenen Studie wurde das Phospholipidom humaner autophagischer Vesikel anhand eines *targeted approach* näher untersucht (Schmitt *et al.*, 2022). Das nachgewiesene Lipidprofil dieser autophagischen Vesikel unterschied sich signifikant von dem des Gesamtzelllysats. Darüber hinaus wurde aber kein Einfluss Autophagie-modulierender Bedingungen auf das Lipidprofil autophagischer Vesikel nachgewiesen (Abbildung 9A). Dies unterstrich die Relevanz einer distinkten Lipidkomposition autophagischer Vesikel für deren Funktionalität. Daher sollte als nächstes das Lipidprofil von Autophagosomen aus Modellen untersucht werden, die durch eine Störung in der Lipidversorgung der Phagophore charakterisiert waren. In den ATG2A/B KO-Zellen war der Lipidtransfer vom ER an die Phagophore gestört, in den ATG9A KO-Zellen waren ATG9A-positive Vesikel als Keim der Phagophore und Lipidquelle nicht verfügbar (Noda, 2021).

Die Funktionalität eines Autophagosoms wird unter anderem über dessen Fähigkeit, mit Lysosomen für die Degradation des Cargos zu fusionieren, bestimmt (Aman *et al.*, 2021). Um die Funktionalität der autophagischen Vesikel näher bestimmen zu können, verlagerte sich der Fokus auch auf die Isolation von reifen, azidifizierten Lysosomen. Für die Anreicherung autophagischer Vesikel wurden Zellen standardmäßig mit Bafilomycin A₁ behandelt und Proteaseinhibitor zu den Proben gegeben, um die Ansäuerung von Lysosomen und die Fusion von Autophagosomen und Amphisomen mit Lysosomen zu inhibieren und der eventuellen Verdauung relevanter Proteine an und in Vesikeln vorzubeugen. Die Isolation von autophagischen Vesikeln und Lysosomen zur Untersuchung der Fähigkeit zur Fusion erforderte nun eine Isolation dieser Vesikel ohne jedwede Behandlung, die die Fusion oder die lysosomalen Enzyme beeinträchtigen könnte.

Im Folgenden wurde das Aufreinigungsprotokoll autophagischer Vesikel optimiert, um distinkte Populationen von Autophagosomen zu isolieren, auch andere Organellen anreichern zu können und die Proteine der aufgereinigten Vesikel auf Immunoblots besser darzustellen.

3.4.1 Fluoreszenzgekoppelte Lipide sind ein zusätzlicher Marker für Autophagosomen

Autophagosomen werden während ihrer de novo Synthese um Substrate herum gebildet und daneben werden Substrate zum entstehenden Autophagosom transportiert (Aman *et al.*, 2021; Mancias & Kimmelman, 2016).

Während der Analyse des Phospholipidprofils der autophagischen Vesikel wurde vermutet, dass lipidhaltige Substrate innerhalb der Autophagosomen die Ergebnisse beeinflussen. Dementsprechend wurde nach einer Methode gesucht, die es ermöglichte, Membranen mit konjugiertem MAP1LC3BII von anderen Membranen unterscheiden und trennen zu können. Hierfür wurden autophagische Vesikel aus Zellen isoliert, die mit Fluorophor-gekoppeltem PE behandelt wurden. Wie in Abbildung 14B gezeigt werden konnte, wurde PE in die autophagosomale Membran integriert. Damit war das Phospholipid PE neben den ATG8-Proteinen (allGABARAPs) ein zusätzlicher, potenzieller Selektionsmarker für autophagische Vesikel am Durchflusszytometer.

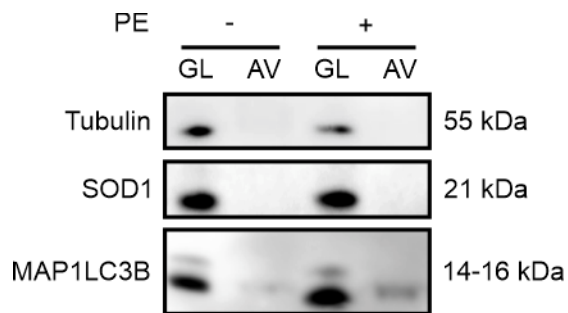


Abbildung 29 Isolation autophagische Vesikel mittels eines Fluorophor-gekoppelten Lipides Immunoblots von MAP1LC3B, SOD1 und Tubulin. Geladen wurden je $5 \cdot 10^6$ autophagische Vesikel (AV) im Vergleich zum Gesamtzelllysate (GL) aus ohne und PE behandelten Zellen. Die dargestellten Immunoblots sind repräsentativ für $n = 5$.

Für die Isolation autophagische Vesikel wurden die Zellen wie bereits beschrieben mit PE behandelt und standardmäßig für die durchflusszytometrische Isolation vorbereitet, wobei die Gating-Strategie für die Lipid-gefärbten Vesikel angepasst wurde. Die Messungen am Durchflusszytometer zeigten keine Abweichungen im Vergleich zu nicht mit Lipiden gefärbten Proben. Auch wenn die Populationen der allGABARAPs-positiven Vesikel wie auch die der PE-positiven Vesikel jede für sich betrachtet einen hohen Anteil der POI stellten, so war die Population der doppelpositiven Vesikel deutlich geringer (Abbildung 7). Die Doppelfärbung diskriminierte also bereits am Durchflusszytometer einen erheblichen Teil einfacher positiver Strukturen.

Die Qualität der Isolation wurde mittels Immunoblot-Analysen untersucht. Dabei wurde kein Unterschied zwischen Isolaten festgestellt, die mit oder ohne PE aufgereinigt wurden. Die Reinheit der Isolatfraktionen wurde durch den Ausschluss der unlipidierten Form von MAP1LC3B, sowie von SOD1 (Superoxiddismutase 1) und Tubulin bestätigt (Abbildung 29). SOD1 ist ein im Zytosol vorliegendes Protein, das als Kontrolle genutzt wurde, um zytosolische Rückstände nachzuweisen. Das Auftreten der lipidierten Form von MAP1LC3B in den

Isolaten zeigte zusätzlich, dass Autophagosomen isoliert wurden. Die Markierung autophagischer Vesikel mit Fluorophor-gekoppelten PE ermöglichte somit ihre erfolgreiche Aufreinigung.

Autophagische Vesikel wurden in Kombination von allGABARAPs und Phosphatidylethanolamin isoliert. Lipide als zusätzlicher Selektionsmarker bei der Aufreinigung von Autophagosomen erlauben eine Diskriminierung zwischen Autophagosomen und anderen Strukturen.

3.4.2 Der Verlust von ATG9A verhindert die Aufreinigung autophagischer Vesikel

Die Phagophore bildet sich am ER aus dem Omegasom und wird während des Wachstums von verschiedenen Quellen mit Lipiden versorgt. ATG2A und ATG2B transferieren Lipide vom ER und ATG9A-positive Vesikel liefern Lipide an die Phagophorenmembran (Noda, 2021). Der Verlust von ATG2A/B und ATG9A stört die Lipidversorgung und beeinträchtigt die autophagische Aktivität (Imai *et al.*, 2016; Valverde *et al.*, 2019) (Abbildung 17).

Um untersuchen zu können, wie die gestörte Lipidhomöostase die Lipidkomposition der Autophagosomen beeinflusst, wurden autophagische Vesikel aus ATG9A KO- und ATG2A/B-KO-Zellen isoliert (Abbildung 30).

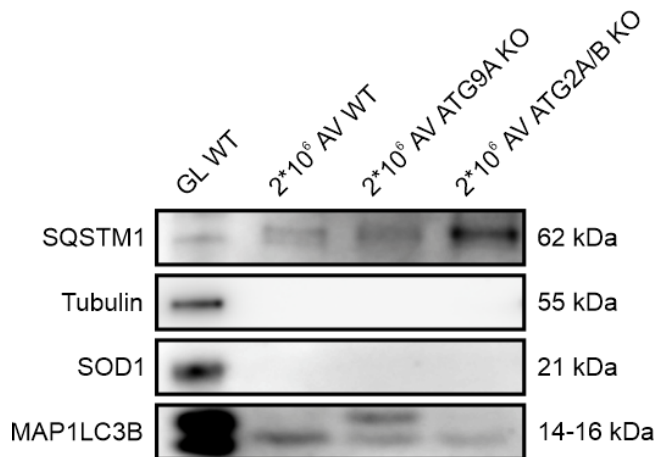


Abbildung 30 Isolate autophagischer Vesikel aus HeLa WT und KO-Zelllinien Immunoblots von SQSTM1, Tubulin, SOD1 und MAP1LC3B von Gesamtzelllysat (GL) aus HeLa WT und autophagische Vesikeln (AV) aus HeLa WT-Zellen, ATG9A KO- und ATG2A/B KO-Zellen behandelt mit 2 μ M Bafilomycin A₁ für 2 h. Es wurden je 2*10⁶ autophagische Vesikel pro Probe geladen. Die dargestellten Immunoblots sind repräsentativ für n = 3.

Die Isolate und deren Qualität wurden im Immunoblot untersucht. Dabei wurde gezeigt, dass autophagische Vesikel aus HeLa WT-Zellen und ATG2A/B KO-Zellen erfolgreich aufgereinigt wurden – lipidiertes MAP1LC3B sowie SQSTM1 wurden in den aufgereinigten Fraktionen nachgewiesen, wohingegen unlipidiertes MAP1LC3B, SOD1 und Tubulin ausgeschlossen wurden (Abbildung 30).

In den Isolatfraktion aus ATG9A KO-Zellen wurde ebenfalls lipidiertes MAP1LC3B und SQSTM1 detektiert, während SOD1 und Tubulin ausgeschlossen wurden. Allerdings wurde

nach wie vor unlipidiertes MAP1LC3B nachgewiesen (Abbildung 30). Obwohl es nicht lipidiert war, wurde es zytometrisch erkannt und aufgereinigt. Die Aufreinigung anhand von ATG8-Proteinen war nicht ausreichend, um reine Autophagosomen aus ATG9A KO-Zellen zu isolieren.

Es wurde vermutet, dass das unlipidierte MAP1LC3B in der Isolatfraktion der ATG9A KO-Zellen aus den MAP1LC3B-SQSTM1-positiven Aggregaten stammte, die schon in Abbildung 19 visualisiert wurden und von denen bereits in Abbildung 20 per Immunoblot gezeigt wurde, dass sie wie Autophagosomen anhand ihrer Dichte angereichert werden konnten. Allerdings ist bisher nicht beschrieben, ob Lipide in die MAP1LC3B-SQSTM1-positiven Aggregate integriert sind (Runwal *et al.*, 2019). Da ATG8-Proteine allein kein ausreichendes Selektionskriterium für Autophagosomen aus ATG9A KO-Zellen waren, wurde Fluorophor-gekoppeltes PE als zusätzlicher Marker für die Aufreinigung von Autophagosomen inkludiert (siehe Kapitel 3.4.1). Die Kombination aus der Selektion für ATG8-Protein und PE sollte die Spezifität für Autophagosomen in der Durchflusszytometrie erhöhen und die Aggregate diskriminieren. Nichtsdestotrotz wurde auch mit diesem Ansatz keine reine Autophagosomenpopulation aus ATG9A KO-Zellen isoliert. SOD1 und Tubulin wurden im Immunoblot weiterhin ausgeschlossen und lipidiertes MAP1LC3B wurde nachgewiesen, was den Erfolg der Isolation bestätigte. Doch auch mit PE als zusätzlichem Selektionsmarker wurde unlipidiertes MAP1LC3B in den Isolaten detektiert (Abbildung 31A).

Da bisher keine Integration von Lipiden in die MAP1LC3B-SQSTM1-positiven Strukturen beschrieben wurde (Runwal *et al.*, 2019), wurde die Verteilung von Fluorophor-gekoppelten Lipiden in ATG9A KO-Zellen zusammen mit MAP1LC3B genauer untersucht. Sowohl PE als auch PC wurden genauer betrachtet, da beide Lipide im Phospholipidom der Autophagosomen nachgewiesen wurden (Abbildung 9) und eine Kollokalisierung von MAP1LC3B in HeLa WT-Zellen bereits gezeigt wurde (Abbildung 13 und Abbildung 14). Immunfluoreszenzaufnahmen der ATG9A KO-Zellen bestätigten, dass in die MAP1LC3B-SQSTM1-Aggregate Lipide integriert waren. Nicht nur PE, auch PC kollokalisierte mit MAP1LC3B. Dabei waren die Lipide nicht nur in kleineren Punctae, sondern auch in den vergrößerten Strukturen, die MAP1LC3B positiv waren, lokalisiert (Abbildung 31B und C). Die Aufreinigung reiner autophagischer Vesikel war somit auch mit der Kombination aus allGABARAPs und PE als Selektionsmarker nicht möglich.

Da sich keine reine Autophagosomen aus den ATG9A KO Zellen isolieren ließen, wurde dieses Modell für die Untersuchung des Lipidprofils von Autophagosomen als ungeeignet betrachtet. Allerdings bot es die Möglichkeit, in späteren Studien ATG9A genauer zu untersuchen, indem Plasmide transkribierend für bspw. mit Fluorophor-gekoppeltem ATG9A mit spezifischen Punktmutationen oder Teildeletion eingebracht werden an strukturellen Stellen

im Protein, die eine entscheidende Beeinflussung der Funktion von ATG9A nach sich ziehen.

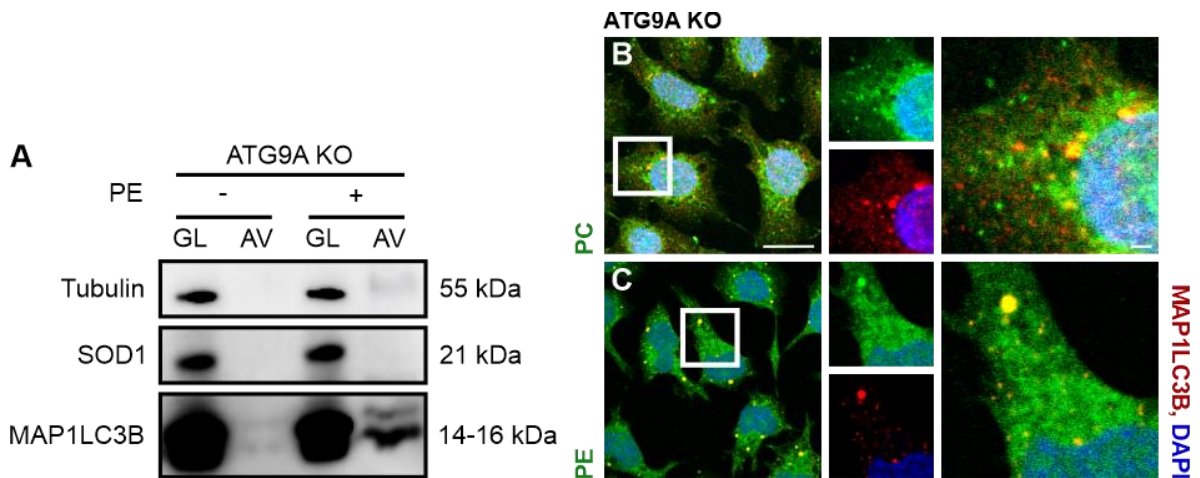


Abbildung 31 Lipide sind in die nicht-autophagosomalen MAP1LC3B-positive Strukturen in den ATG9A KO-Zellen integriert (A) Immunoblots von MAP1LC3B, SOD1 und Tubulin. Es wurden Gesamtzellsätze (GL) und $2 \cdot 10^6$ autophagische Vesikel (AV) aus ATG9A KO-Zellen ohne und mit PE-Behandlung geladen. Die dargestellten Immunoblots sind repräsentativ für drei voneinander unabhängige Versuche. Repräsentativ für $n = 4$. (B, C) Immunocytochemische Färbungen von PC (B) und PE (C), jeweils in Grün dargestellt, zur Untersuchung der Kollokalisierung mit MAP1LC3B (Rot) in ATG9A KO-Zellen. Die Zellkerne sind in Blau dargestellt. Maßstäbe = 20 und 2 µm. Die dargestellten Aufnahmen sind repräsentativ für je $n = 3$.

Die Isolation autophagischer Vesikel aus ATG9A KO-Zellen war nicht möglich. Auch die Kombination von allGABARAPs und Phosphatidylethanolamin erlaubte keine Diskriminierung zwischen Autophagosomen und Strukturen positiv für unlipidiertes MAP1LC3B.

3.4.3 Optimierungen der Isolation ermöglichen die Aufreinigung reiner Autophagosomen

Das Protokoll zur Isolation der Autophagosomen wurde an drei Stellen überprüft. Erstens wurden die Zellen üblicherweise im Vorfeld der Isolation autophagischer Vesikel mit Bafilomycin A₁ behandelt, damit eine möglichst große Zahl autophagischer Strukturen in der Zelle vorliegt. Da dies jedoch auch darin resultierte, dass Amphisomen – also das Fusionsprodukt aus Autophagosomen und Endosomen – in den Zellen akkumulierten, wurde auf die Behandlung mit Bafilomycin A₁ verzichtet.

Zweitens wurden Pufferbedingungen abgeändert. Die Proteine autophagischer Vesikel wurden standardmäßig nach der Isolation durch die Durchflusszytometrie präzipitiert. Durch die Resuspension der Proteinpräzipitate in Ureapuffer, kam es zu Veränderungen im Laufverhalten niedermolekularer Proteine in der SDS-PAGE. Die lipidierte Form von MAP1LC3B

lief deswegen etwas höher als die des Gesamtlysates (Schmitt *et al.*, 2022). Für eine bessere Analyse der Formen von MAP1LC3B wurde eine adaptierte Präzipitation mit einem alternativen Ladepuffer getestet.

Die autophagischen Vesikel wurden bisher vorwiegend allein über ein ATG8-Protein sortiert (Schmitt *et al.*, 2022). Um die Spezifität der Antikörper-vermittelten Isolation zu erhöhen und beispielsweise nicht-autophagische Vesikel, die MAP1LC3B-positiv sind, auszuschließen (Heckmann *et al.*, 2019; Sanjuan *et al.*, 2007), wurde drittens und letztens eine Doppelfärbung mit zwei unterschiedlichen Antikörpern etabliert. An die autophagosomale Membran sind stets mehrere ATG8-Proteine konjugiert. Daher wurden Autophagosomen mit Antikörpern gegen MAP1LC3B und allGABARAPs gefärbt und isoliert (Jacquet *et al.*, 2021).

Um zu verhindern, dass Amphisomen in den Zellen akkumulierten, wurden Isolate aus Zellen ohne Behandlung mit Bafilomycin A₁ aufgereinigt. Die nachfolgende Analyse der Isolate im Immunoblot wies die lipidierte Form von MAP1LC3B nur schwach nach, während SQSTM1 nach wie vor detektierbar war. Die Kontrollproben mit Isolaten, die aus mit Bafilomycin A₁ behandelten Zellen aufgereinigt waren, zeigten klar nachweisbar lipidiertes MAP1LC3B (Abbildung 32A). Dies war ein Hinweis darauf, dass die Akkumulation der Autophagosomen und Amphisomen zu einer Verschiebung der Balance zwischen der Lipidierung und Delipidierung von ATG8-Proteinen führte (Nakatogawa *et al.*, 2012). Dadurch konnte erklärt werden, warum bei gleichen SQSTM1-Proteinspiegeln die Proteinmenge von lipidiertem MAP1LC3B pro Autophagosom unter Bafilomycin A₁ höher war als ohne. Zur Überprüfung dieser Hypothese fehlten aber weiterführende Versuche. Auch wenn SQSTM1 als Autophagierezeptor detektierbar war, wurden Zellen für die Isolation von autophagischen Vesikeln weiterhin mit Bafilomycin A₁ behandelt.

Im Weiteren wurde die Chloroform:Methanol-Fällung und die Proteinresuspension nach der Präzipitation optimiert, um das veränderte Laufverhalten der niedermolekularen Proteine in der SDS-PAGE zu verhindern. Dafür wurden zum einen Isolate nach etablierter Methode präzipitiert und vergleichend dazu nach einer ähnlichen Präzipitationsmethode basierend auf einer weiteren Chloroform:Methanol-Methode (Wessel & Flugge, 1984). Zum anderen wurden die Präzipitate nicht nur in Urea-Puffer, sondern auch in DTT-Ladepuffer resuspendiert (Koontz, 2014). Zur Analyse der Effekte der angepassten Präzipitation und der veränderten Resuspension wurde MAP1LC3B im Immunoblot untersucht. In Urea-CHAPS-Puffer wurde wie erwartet ein verändertes Laufverhaltens für lipidiertes MAP1LC3B beobachtet, unabhängig von der Präzipitation (Abbildung 32B). Im DTT-Ladepuffer nach Koontz dagegen liefen die lipidierten Formen von MAP1LC3B im Gesamtzelllysate und im Isolat auf einer

Höhe (Koontz, 2014). Daneben erschienen Proben, die mit der veränderten Chloroform:Methanol-Fällung nach Wessel und Flugge präzipitiert wurden, stärkere Proteinbanden zu ergeben (Wessel & Flugge, 1984).

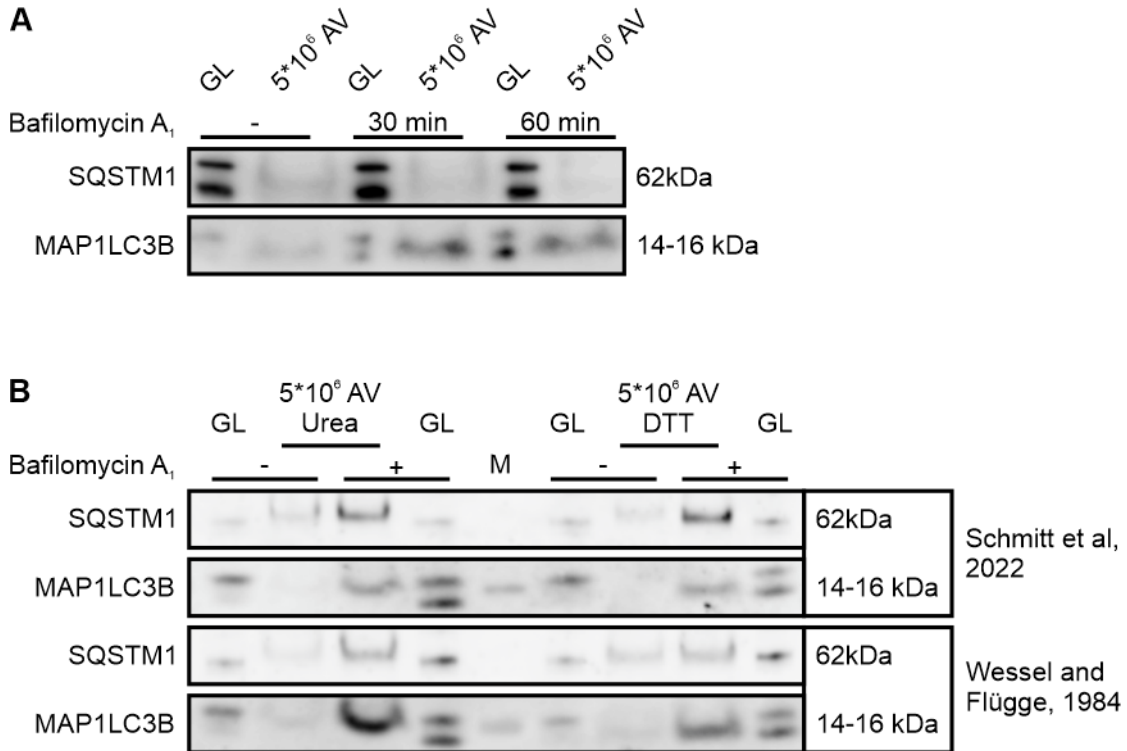


Abbildung 32 Optimierungen des Isolationsprotokolles (A) Immunoblots für SQSTM1 und MAP1LC3B mit Gesamtzelllysat und 5*10⁶ autophagischen Vesikeln isoliert mit allGABARAPs. Die geladenen Proben stammten aus Zellen, die entweder nicht, 30 min oder 60 min mit 1 µM Bafilomycin A₁ behandelt wurden. Die Präzipitate der autophagischen Vesikel wurden in Urea-CHAPS-Puffer resuspendiert. Repräsentativ für n = 3. (B) Immunoblots für SQSTM1 und MAP1LC3B mit Gesamtzelllysat und 5*10⁶ autophagischen Vesikeln isoliert mit allGABARAPs. Die geladenen Proben stammten aus Zellen, die nicht oder 1 h mit 1 µM Bafilomycin A₁ behandelt wurden. Die autophagischen Vesikel wurden entweder nach Schmitt et al oder nach Wessel und Flügge präzipitiert und die Präzipitate entweder in Urea-CHAPS-Puffer oder in DTT-Puffer gelöst und geladen. Repräsentativ für n = 8. M = Proteinleiter.

Für nachfolgende Versuche wurde das Isolationsprotokoll der Autophagosomen angepasst und Antikörper verwendet, die gegen MAP1LC3B und allGABARAPs gerichtet waren (Abbildung 6). Da dadurch Vesikel aufgereinigt wurden, die positiv für mehrere ATG8-Proteine waren, konnte davon ausgegangen werden, dass die Isolate vorwiegend Autophagosomen und kaum andere vesikuläre Strukturen beinhalten. Eine stringente Gating-Strategie am Durchflusszytometer, die beide Populationen angefärbter Strukturen berücksichtigte, verringerte das Risiko falsch positiver Vesikel immuns.

Optimierungen des Aufreinigungsprozederes ermöglichen die Isolation einer reineren Autophagosomenfraktion sowie eine verbesserte Darstellung der Proteine im Immunoblot.

3.4.4 Isolation von Lysosomen mittels Durchflusszytometrie

Autophagosomen fusionieren mit Lysosomen, um eingeschlossenes Substrat dem Abbau zuzuführen (Aman *et al.*, 2021). Die Funktionalität eines Autophagosoms kann also über seine Fähigkeit, ein geschlossenes doppelmembranöses Vesikel zu bilden und final mit dem Lysosom zu fusionieren, beschrieben werden. Gleichmaßen kann die Funktionalität eines Lysosoms darüber bestimmt werden, ob es das ihm zugeführte Substrat degradieren und mit Autophagosomen fusionieren kann (Trivedi *et al.*, 2020).

In späteren Studien sollte die Funktionalität von Autophagosomen und Lysosomen anhand ihres Fusionsvermögens bewertet werden. Daher wurde ein Isolationsprotokoll für Lysosomen entwickelt. Basierend auf dem Protokoll zur Anreicherung von Autophagosomen, wurden Antikörper gerichtet gegen lysosomale Membranproteine verwendet. Weiter wurden die Lysosomen mit dem pH-sensitiven Farbstoff LysoTracker RedDND99 gefärbt, so dass erneut mehrere fluoreszierende Selektionsmarker am Durchflusszytometer für die Anreicherung der Vesikel genutzt wurden.

Um die Funktion der Lysosomen nicht zu beeinträchtigen, wurde für deren Aufreinigung auf die Behandlung mit Bafilomycin A₁ und Proteaseinhibitoren verzichtet. Bafilomycin A₁ hemmt die Funktion der V-ATPase, die zur Ansäuerung der Lysosomen für deren Funktionsfähigkeit entscheidend ist, und verhindert die Fusion von Autophagosomen und Lysosomen. Proteaseinhibitoren beinhalten membrangängige Komponenten und hemmen die Funktion einer Vielzahl von Enzymen, auch lysosomalen (Klionsky *et al.*, 2021; Mauvezin & Neufeld, 2015). Daher wurde die Behandlung der Zellen und Zellysate mit Bafilomycin A₁ und Proteaseinhibitor für die Untersuchung der Lysosomen ausgelassen.

Für die Isolation von Lysosomen wurde die Gating-Strategie, wie in Kapitel 2.1.3.2.3 in Abbildung 8 dargestellt, angepasst. Die zu isolierende Population wurde über LAMP2 in Abhängigkeit von LysoTracker RedDND99 definiert. Von der Population der sauren Organellen waren etwa 70 % positiv für LAMP2.

In den Isolaten konnten per Immunoblotting sowohl LAMP1 als auch LAMP2 detektiert werden (Abbildung 33). Die Familie der LAMPs umfasst Transmembranproteine, die in der Membran von Lysosomen lokalisiert sind (Terasawa *et al.*, 2016). Sie sind wichtig für den Transport von Substraten in das Lysosom.

Von CTSD wurde die schwere Kette und Spuren der Proformen in der Lysosomenfraktion nachgewiesen. CTSD ist eine saure Protease, die innerhalb von Lysosomen aktiv ist. Sie wird in ihrer Proform ins Lysosom transportiert und dort über Proteolyse aktiviert (Saku *et*

al, 1991). Der Proteinnachweis von CTSD zeigte eine Anreicherung der schweren Kette und eine Abreicherung der Pro-Form, die kaum noch detektiert werden konnte, im Vergleich zum Gesamtzelllysate (Bunk *et al.*, 2021).

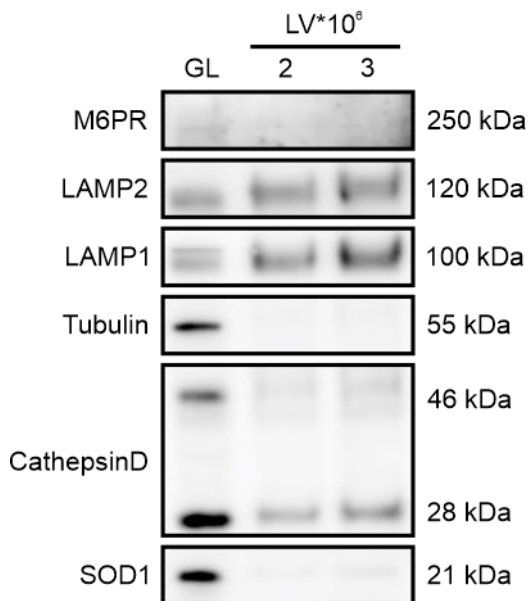


Abbildung 33 Lysosomen wurden erfolgreich in der Durchflusszytometrie isoliert Immunoblots für Mannose-6-Phosphat-Rezeptor (M6PR), LAMP2 und LAMP1, Tubulin, Cathepsin D (CTSD) und SOD1 mit Gesamtzelllysate und je 2 und 3*10⁶ lysosomalen Vesikeln. Die dargestellten Immunoblots sind repräsentativ für n = 3.

SOD1, Tubulin und M6PR (Mannose-6-Phosphat-Rezeptor) konnten nicht nachgewiesen werden. M6PR ist ein Transporter, der lysosomale Proteine vom Golgi-Apparat entlang des endosomalen Systems zu den Lysosomen und deren Vorläufern transportiert. Dabei wird der Transporter selbst recycelt und ist nicht im reifen Lysosom lokalisiert (Hille-Rehfeld, 1995).

Der Nachweis von in der Lysosomenmembran angesiedelten sowie dem Lumen des Lysosoms zugeordneten Proteinen in Abwesenheit von Markern anderer Zellkompartimente verdeutlichte, dass durch die durchflusszytometrische Isolation erfolgreich Lysosomen angereichert wurden.

Durch Anpassungen des Isolationsprotokoll konnte die Isolation von Lysosomen etabliert werden, die reich an lysosomalen Markern, aber frei von Markern anderer Zellkompartimente waren.

3.5 Isolation von RNA aus Autophagosomen

Neben dem Fokus auf die Lipidversorgung und das Lipidprofil der Autophagosomen, war ebenfalls der autophagosomale Cargo von Interesse in dieser Arbeit. Während das Protein-Cargoprofil von Autophagosomen bereits charakterisiert ist, ist das RNA-Substratprofil der Autophagosomen größtenteils unbeschrieben (Mancias *et al.*, 2014; Overbye *et al.*, 2007; Zhou *et al.*, 2022).

Die Homöostase der RNA ist streng orchestriert (Tatosyan *et al.*, 2020). Der Abbau unterschiedlicher RNA-Spezies findet in verschiedensten Zellkompartimenten statt, unter anderem auch über die Autophagie und die Degradation im Lysosom (Houghton *et al.*, 2022; Saha *et al.*, 1979). Dabei können lysosomale Membranproteine wie LAMP2C und SIDT2 in einem CMA-ähnlichen Prozess RNA direkt für den lysosomalen Abbau ins Lysosom transferieren, RNautophagie genannt (Aizawa *et al.*, 2016; Fujiwara *et al.*, 2013). RBPs wie die des ribosomalen Komplexes oder RNA-bindende Organellen wie Peroxisomen und Stressgranula sind ebenfalls als selektive Autophagiesubstrate bekannt und führen verschiedenste RNA-Moleküle der autophagosomalen Degradation zu (Buchan *et al.*, 2013; Burnett *et al.*, 2015; Wyant *et al.*, 2018). Zudem interagiert MAP1LC3B direkt mit der *PRMT1* mRNA für deren Degradation (Hwang *et al.*, 2022). Ob noch andere RNA-Typen neben der rRNA und anderer mRNA-Typen spezifisch autophagisch abgebaut werden, ist bisher nicht bekannt.

Grundlegend können Proteine mit unterschiedlichen RNA-Typen interagieren. Es wird zwischen langer und kurzer RNA unterschieden sowie deren Lokalität und Funktionalität. Die sn/snoRNA ist hauptsächlich im Zellkern lokalisiert und ist an der Regulation der Transkription beteiligt. Lange RNA-Typen wie circRNA und lncRNA interagieren sowohl im Zellkern als auch im Zytosol mit unterschiedlichen Proteinen. Die miRNA bindet vor allem zur Regulation an Proteine und kann diese beispielsweise der Degradation zuführen. In die Translation sind schließlich rRNA, tRNA und mRNA involviert.

In einer vorangegangenen Studie wurden durch eine Proteom-Analyse alle Proteine, die in autophagischen Vesikeln vorliegen, charakterisiert (Schmitt *et al.*, 2022). Innerhalb dieser Proteine wurden hier nun jene Proteine identifiziert, die gleichzeitig RBPs und Autophagiesubstrat darstellten. Um schließlich die RNA in Autophagosomen zu untersuchen, wurde ein Protokoll etabliert, mit dem RNA aus Autophagosomen isoliert wurde. Diese RNA wurde mittels verschiedener RNA-Typen, die anhand der analysierten RBPs gewählt wurden, auf ihre Reinheit untersucht und charakterisiert.

3.5.1 Zahlreiche Autophagiesubstrate sind RNA-bindende Proteine

Für die Identifikation der RBPs wurden die durch die Proteom-Analyse identifizierten Autophagiesubstrate mit der RBP2GO-Datenbank abgeglichen (Caudron-Herger *et al.*, 2021).

In dieser Datenbank sind alle Proteine aufgeführt, die bekannterweise mit RNA interagieren. Pro in der Massenspektrometrie identifiziertem Peptid konnten mitunter mehrere Gene bzw. Proteine gelistet werden. Die Liste der Gene der identifizierten Proteine diente als umfassendere Basis für die Identifikation der RBPs. Die Proteomdaten wurden erst mit allen dokumentierten Genen RNA-interagierender Proteine verglichen und dann über den GO-Terminus *GO:0003723 RNA binding* genauer charakterisiert. Über den ersten Vergleich wurden alle Gene und deren Proteine identifiziert, die als RNA-interagierend beschrieben wurden. Dies betraf dementsprechend auch Proteine, die bspw. über miRNA reguliert werden (Urdaneta *et al*, 2019). Der zweite Vergleich identifizierte schließlich Gene und deren Proteine, die mit der RNA eine funktionelle Einheit für deren molekulare Funktion bilden.

Tabelle 48 Verteilung der RBP-Gene in den Proteomdaten

Proteomics basal	Total
nicht-RBPs	1786
nicht klassische RBPs	2347
klassische RBP	1120
<i>insgesamt</i>	<i>5253</i>

Von 5253 detektierten Genen wurden 3467 identifiziert, die RBPs kodieren. Von diesen fielen 1120 unter den GO-Terminus „RNA bindend“ (Tabelle 48). 1120 Gene kodierten dementsprechend für Proteine, die eine funktionelle Einheit mit der RNA bildeten.

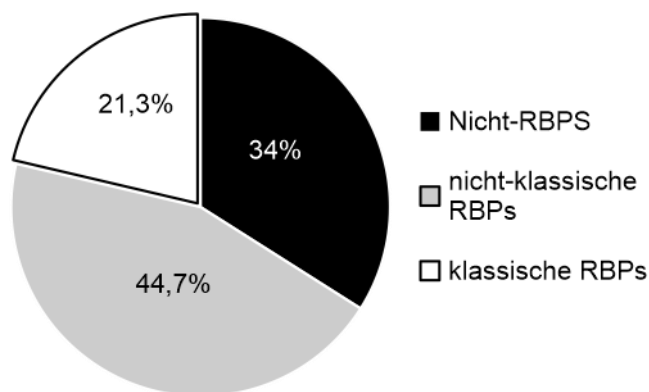


Abbildung 34 Relative Verteilung RNA-bindender Proteine innerhalb der identifizierten Autophagiesubstrate Kreisdiagramm der relativen Verteilung der Gene des Proteoms aus basalen Bedingungen, gemessen in autophagischen Vesikeln. Es wurde anhand der Bindungsfähigkeit an diverse RNA-Typen differenziert. Klassische RBPs binden RNA für deren Funktionalität, nicht-klassische RBPs werden von RNA für deren Funktionalität gebunden. Für den Abgleich wurde die RBP2GO-Datenbank des DKFZ genutzt (Caudron-Herger *et al*, 2021)

Proteine, die zur Regulation oder Funktionalität an eine RNA binden und somit unter den GO-Terminus *GO:0003723* fallen, wurden im Weiteren als klassische RBPs definiert. Die restlichen Proteine, die von RNA-Spezies reguliert werden, wurden im Weiteren als nicht-klassische RBPs beschrieben. Wie zusammenfassend in Abbildung 34 dargestellt, wurden 66 % der durch die Proteom-Analysen bestimmten Autophagiesubstrate als RNA-interagie-

rende Proteine identifiziert. Davon wurden 21,3 % der Proteine als klassische RBPs identifiziert. Die gebundene RNA wird somit mit hoher Wahrscheinlichkeit zusammen mit den Proteinen der Autophagie und somit dem Lysosom zugeführt, um einen vollständigen Abbau zu gewährleisten.

Die klassischen RBPs wurden auf ihre molekularen Funktionen anhand der untergeordneten GO-Termini untersucht. Die vorgenommenen Analysen ließen keinen Rückschluss darauf zu, ob sich GO-Termini in manchen Proteinen überschneiden.

Tabelle 49 Detektierte GO-Termini der klassischen RBPs

Molekulare Funktion	GO:0003723	total
nicht zugeordnet	GO:0003729	549
<i>mRNA binding</i>	GO:0003727	180
<i>single-stranded RNA binding</i>	GO:0019843	55
<i>rRNA binding</i>	GO:0003725	51
<i>double-stranded RNA binding</i>	GO:0000049	50
<i>tRNA binding</i>	GO:0017069	33
<i>snRNA binding</i>	GO:0036002	33
<i>pre-mRNA binding</i>	GO:0061980	29
<i>regulatory RNA binding</i>	GO:0000178	26
<i>exosome (RNase complex)</i>	GO:0030515	19
<i>snoRNA binding</i>	GO:0000339	19
<i>RNA cap binding</i>	GO:0070034	15
<i>telomerase RNA binding</i>	GO:0035613	13
<i>RNA stem-loop binding</i>	GO:1905216	8
<i>positive regulation of RNA binding</i>	GO:0008312	8
<i>7 S RNA binding</i>	GO:0033204	7
<i>ribonuclease P RNA binding</i>	GO:0070883	7
<i>pre-miRNA binding</i>	GO:0070878	4
<i>primary miRNA binding</i>	GO:0002151	4
<i>G-quadruplex RNA binding</i>	GO:0061752	3
<i>telomeric repeat-containing RNA binding</i>	GO:0071208	2
<i>histone pre-mRNA DCP binding</i>	GO:0001069	2
<i>regulatory region RNA binding</i>	GO:0042835	1
<i>BRE binding</i>	GO:1905215	1
<i>negative regulation of RNA binding</i>	GO:0003729	1

Etwa die Hälfte der Proteine konnten keiner spezifischen molekularen Funktion zugeordnet werden. Die meisten der klassischen RBPs waren in translationale Prozesse eingebunden, mit 180 Proteinen vornehmlich in die mRNA-Bindung. 51 RBPs wurden für die Interaktion mit Ribosomen und sieben mit SRP in Verbindung gebracht. Der Bindung der tRNA wurde 33 Proteinen zugeordnet (siehe Übersicht Tabelle 49). Ein Großteil der identifizierten RBPs

waren dementsprechend in die Translation eingebunden, passend zu den ribosomalen Proteinen in Autophagosomen, die durch Schmitt et al beschrieben wurden (Schmitt *et al.*, 2022; Wyant *et al.*, 2018).

Darüber hinaus wurden RBPs detektiert, die mit snRNA und snoRNA interagieren sowie RBPs, die mit ihrer gebundenen RNA an der Transkription beteiligt sind. Dies zusammen – die Detektion von Proteinen des Exosomen-RNase-Komplexes in Kombination mit dem Nachweis von Telomerase-interagierenden Proteinen – zeigte, dass Teile des Nukleus bereits unter basalen Bedingungen Autophagiesubstrat waren (Mucino-Hernandez *et al*, 2023). Auch wenn Telomerase interagierende Proteine identifiziert wurden, waren keine Bestandteile des Telomerasekomplexes selbst in den Daten der Proteom-Analyse nachzuweisen. Der Telomerasekomplex wird von im Nukleus lokalisierten Proteasomen abgebaut (Jung *et al*, 2013).

Die Bindung einzel- und doppelsträngiger RNA ist vor allem für immunologische Prozesse von Bedeutung bei der Erkennung von RNA-basierten Viren. Der Nachweis der RBPs, die mit dieser RNA interagieren, reflektiert die grundlegende immunologische Homöostase der Zellen (Suleiman *et al*, 2024).

Von den klassischen RBPs wurden 270 Proteine identifiziert, die mit verschiedensten Krankheiten assoziiert wurden. Davon wurden acht Proteine mit ALS (amyotrophe Lateralsklerose) und vier mit Parkinson's Krankheit in Verbindung gebracht, wobei ein Protein, Ataxin-2, mit beiden Erkrankungen assoziiert wurde. ALS und PD sind, unter anderem, durch eine gestörte Autophagie gekennzeichnet. ALS ist eine neurodegenerative Erkrankung, bei der die Motoneuronen des Motorkortex, des Hirnstammes und des Rückenmarkes absterben und es so zu einer Denervierung der Skelettmuskulatur kommt. Hauptverantwortlich für Degeneration der Motoneuronen sind Proteinaggregate von TDP43 (*transactive response DNA binding protein 43 kDa*) und SOD1 (Mead *et al*, 2023). PD ist eine weitere neurodegenerative Erkrankung mit proteinopatischer Symptomatik. Der Verlust von dopaminergen Neuronen in der *Substantia nigra* und die Bildung von α -Synuclein-Aggregaten in Lewy-Körpern führt zu Beeinträchtigungen der Skelettmuskulatur und der kognitiven Leistung (Poewe *et al*, 2017). Eine weiterführende Analyse der Proteomdaten könnte noch mehr Verbindungen zu pathogenen Proteinen, die mit RNA interagieren, identifizieren.

Die vertiefende Analyse der Proteom-Daten zeigte, dass rund zwei Drittel der beschriebenen Autophagiesubstrate RNA-bindende Proteine sind und potenziell RNA mit in das Autophagosom einbringen. Davon wurden rund 20 % als klassische RBPs definiert. Diese waren vornehmlich in translationale und transkriptionelle Prozesse involviert.

3.5.2 RNA-Isolation aus Autophagosomen

Basierend auf der optimierten Isolation aus Kapitel 3.4.3, wurde RNA aus den aufgereinigten Autophagosomen isoliert. Die Präzipitation der RNA erfolgte über eine Trizol-basierte Fällung (Roth *et al.*, 2018). Wegen der Doppelmembran der Autophagosomen und des daraus resultierenden hohen Lipid-Anteils im Vergleich zum Nukleinsäure-Anteil, musste die RNA-Isolation auf die Aufreinigung aus lipidreichen Quellen angepasst werden.

Die Qualität der Autophagosomenisolation wurde zusätzlich auf Proteinebene per Immunoblot überprüft (Abbildung 35A). Sowohl lipidiertes MAP1LC3B als auch SQSTM1 wurden in den Isolatfraktionen nachgewiesen und Tubulin und GAPDH (*Glycerinaldehyd-3-phosphat Dehydrogenase*), ein zytosolisches Protein, wurden ausgeschlossen. Auch wurden die Isolate auf RBPs untersucht. SRP9, ein Protein des SRP-Komplexes und in den Proteomdaten als Autophagiesubstrat nachgewiesen, wurde in der Isolatfraktion detektiert. Telomerase, die im Zellkern lokalisiert ist und mit der TER interagiert, wurde in den aufgereinigten Autophagosomen ausgeschlossen. Das Fehlen zytosolischer, zytoskelettaler oder nukleärer Bestandteile in den Isolaten unterstrich die Reinheit der Autophagosomen.

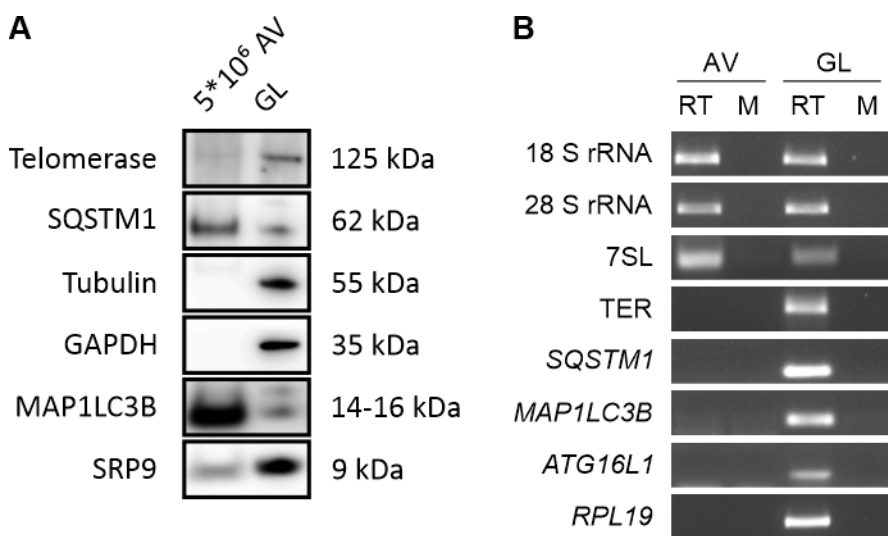


Abbildung 35 Nachweis von RNA-bindenden Proteinen und diversen RNA-Spezies in Autophagosomen
 (A) Immunoblots von Telomerase, SQSTM1, Tubulin, GAPDH, MAP1LC3B und SRP9 von Gesamtzelllysat und $5 \cdot 10^6$ Autophagosomen. Die dargestellten Immunoblots sind repräsentativ für $n = 5$. (B) Agarosegele von 18 S und 28 S rRNA, 7SL, TER sowie der mRNA von *SQSTM1*, *MAP1LC3B*, *ATG16L1* und *RPL19* aus RNA-Extrakten von Gesamtzelllysat und Autophagosomen. Es wurden je zwischen 250 und 500 ng RNA für die RT-Reaktion eingesetzt. Die Agarosegele wurden teilweise von technischen Assistierenden angefertigt. Die dargestellten RT-PCR-Ergebnisse sind repräsentativ für $n = 12$.

Parallel zur Qualitätskontrolle der Isolate auf Proteinebene, wurde die RNA aus den aufgereinigten Autophagosomen isoliert. Berechnet aus dem Durchschnitt von vier unabhängigen Versuchswiederholungen, wurden pro 10 Millionen Autophagosomen 3408 ± 458 ng RNA isoliert. Die Qualität der RNA wurde photometrisch über den Quotienten von 260 nm/280 nm

überprüft und lag bei $1,95 \pm 0,04$ – mit einem Quotienten zwischen 1,8 und 2 gilt die RNA in einer Probe als rein (Wilfinger *et al.*, 1997).

Um den Erfolg der RNA-Isolation und die Qualität der isolierten RNA-Moleküle zu überprüfen, wurden definierte RNA-Spezies in den Isolaten untersucht. Anhand der Ergebnisse aus den Proteom-Analysen wurde die rRNA aus 18 S und 28 S untersucht, sowie die RNA 7SL, die mit SRP interagiert. Die mit diesen RNA-Molekülen interagierenden Proteine wurden in den Proteomdaten identifiziert und SRP9 wurde in den Isolaten detektiert. Dementsprechend war auch die an die RBPs gebundene RNA als in den Autophagosomen vorliegend zu erwarten. Als Kontrolle wurden TER, die mit der Telomerase interagierende RNA, sowie die mRNAs von *RPL19*, *MAP1LC3B*, *SQSTM1* sowie *ATG16L1* genutzt. Der Telomerase-Komplex wurde nicht in den Proteomdaten nachgewiesen und nur ausgewählte mRNA-Moleküle scheinen autophagisch abgebaut zu werden (Hwang *et al.*, 2022).

Nach der RNA-Isolation wurden RT-PCR-Analysen für die ausgewählten RNA-Typen durchgeführt. Dabei wurden sowohl 18 S als auch 28 S rRNA in der Isolatfraktion der Autophagosomen detektiert. Überdies wurde 7SL, die RNA-Komponente des SRP-Komplexes, in den Autophagosomen nachgewiesen. Die mit der Telomerase interagierende RNA TER wurde nicht in den aufgereinigten Autophagosomen nachgewiesen. Die mit der Telomerase interagierende RNA ist im Nukleus lokalisiert (Mason *et al.*, 2011). Der fehlende Nachweis der TER schloss die Kontamination durch Bestandteile des Zellkerns aus. Darüber hinaus wurde keine der untersuchten mRNA-Moleküle in den aufgereinigten Autophagosomen nachgewiesen. Die RT-PCRs für *ATG16L1*, *MAP1LC3B*, *SQSTM1* und *RPL19* zeigten keine Amplifikate im Agarosegel (Abbildung 35B). Es wurde zwar beschrieben, dass MAP1LC3B mit mRNA interagiert (Hwang *et al.*, 2022), doch dieser Prozess ist sehr selektiv und MAP1LC3B bindet nicht jede mRNA. RPL19 (*ribosomal protein L19*) ist das codierende Gen für ein ribosomales Protein, dessen mRNA als robuste Kontrolle für PCR-Analysen genutzt wird (Fiddler & Clarke, 2021). Der Ausschluss dieser mRNA disqualifizierte eine zytosolische Kontamination.

Zusammenfassend wurde RNA erfolgreich aus Autophagosomen isoliert. Anhand dieser Ergebnisse ist eine Transkriptom-Analyse mittels RNA-Sequenzierung unter Ausschluss der rRNA geplant, die RNA-Moleküle in Autophagosomen charakterisiert und mögliche Signalsequenzen in der RNA identifizieren kann.

Es wurde erfolgreich RNA aus Autophagosomen isoliert. Es wurden sowohl die ribosomalen RNAs sowie 7SL nachgewiesen, während TER und verschiedene mRNAs nicht detektiert wurden. Dies stimmte mit den identifizierten RBPs überein und unterstrich die Reinheit und Spezifität der RNA-Isolation aus aufgereinigten Autophagosomen.

4 Diskussion

Die Autophagie ist ein konservierter Degradationsprozess in Eukaryoten. Unter basalen Bedingungen werden kontinuierlich Substrate über die Autophagie lysosomal von sauren Hydrolasen abgebaut. Unter diversen Stressbedingungen, wie bspw. einem Nährstoffentzug, wird dieser Prozess induziert (Aman *et al.*, 2021; Musiwaro *et al.*, 2013). Charakteristisch für die Makroautophagie/Autophagie ist die *de novo* Synthese des doppelmembranösen Autophagosoms. Dieses Vesikel bildet sich aus der Phagophore, die am ER gebildet wird und die während ihrer Reifung abzubauenen Cargo in sich einschließt. Das reife Autophagosom fusioniert schließlich mit dem Lysosom und das eingeschlossene Material wird abgebaut (Mizushima *et al.*, 2001). Autophagosomen werden stetig neu gebildet, daher ist die Autophagie stark von der Lipidverfügbarkeit in der Zelle abhängig (Kern & Behl, 2020). Hauptversorger der Phagophore mit Lipiden ist das ER. Doch auch das endosomale System, der Golgi, Mitochondrien und die Plasmamembran wurden als Lipidquellen beschrieben. Indirekt unterstützen Lipidtröpfchen die Autophagie, indem sie in ausreichendem Maße Fettsäuren zur Verfügung stellen, die zur Synthese von Lipiden im ER genutzt werden (Lamb *et al.*, 2013; Nishimura & Tooze, 2020).

Ziel dieser Arbeit war es, sowohl die Versorgung der Autophagosomen mit Lipiden aus der Zellperipherie außerhalb des ER als auch die Beladung der Autophagosomen mit RNA als Substrat näher zu untersuchen. Es wurde gezeigt, dass SM, das nicht über das ER an die Phagophore transferiert wird, die autophagische Aktivität in Abhängigkeit von ATG9A moduliert. Außerdem wurde erstmals erfolgreich RNA aus Autophagosomen isoliert.

4.1 Sphingomyelin ist unerlässlich für die Autophagie

Die Lipidversorgung der *de novo* gebildeten Autophagosomen erfolgt aus einer Vielzahl verschiedener Zellkompartimente. Allerdings ist noch nicht völlig aufgeklärt, welche Lipide aus welchen Kompartimenten stammen (Lamb *et al.*, 2013; Nishimura & Tooze, 2020). Die Untersuchung des Lipidprofils von Autophagosomen kann Hinweise darauf geben, welche Zellkompartimente an der Lipidversorgung beteiligt sind und wie sich die Lipidversorgung näher untersuchen lässt.

Das Lipidprofil von Autophagosomen aus Säugerzellen wurde bisher nicht näher beschrieben, obwohl selbst unter Nährstoffentzug vermehrt Autophagosomen *de novo* gebildet werden (Aman *et al.*, 2021). Über eine Phospholipidomanalyse mit *targeted approach* wurde das Phospholipidprofil von autophagischen Vesikeln unter basalen Bedingungen, Autophagie-Induktion und Proteasom-Inhibition näher untersucht. Dabei wurde gezeigt, dass sowohl unterschiedliche Phosphoglyceride sowie überdies Sphingomyeline Bestandteile der Autophagosomenmembran sind (siehe Abbildung 9).

Es wurden signifikante Unterschiede in der Verteilung der Lipidklassen zwischen Gesamtzelllysat und autophagischen Vesikeln beobachtet – die Anforderungen an vesikuläre Strukturen unterscheiden sich stark von den Anforderungen beispielsweise an die Plasmamembran. So wurden im Gesamtzelllysat vorrangig PI, PE und SM detektiert, während in den Autophagosomen PC und SM die dominierenden Lipidklassen waren (siehe Abbildung 9A). Obwohl es klare Unterschiede in der Verteilung der einzelnen gemessenen Lipide gab, so wurde doch jede Lipidspezies, die im Gesamtzelllysat detektiert wurde, auch in den autophagischen Vesikeln detektiert.

In der Lipidomanalyse wurden vorrangig Glycerophospholipide betrachtet. Vor allem PC 34:1 war in den autophagischen Vesikeln angereichert (Abbildung 9B). Dies war passend zu Studien, die zeigen, dass Störungen in der PC-Synthese zu Beeinträchtigungen in der Reifung von Autophagosomen führen (Polyansky *et al.*, 2022). Eine Supplementation von PC kann die gestörte Autophagie dabei nicht wiederherstellen (Andrejeva *et al.*, 2020). Die kurzkettigen, einfach gesättigten Fettsäurekonjugate begünstigen die Fluidität der Membran und damit ihre Bioaktivität (Renne & Ernst, 2023), was wahrscheinlich die Fusion mit anderen Vesikeln wie Lysosomen vereinfacht. Daher bedingt eine Störung der PC-Synthese ein gehemmtes Wachstum der Phagophorenmembran, die größtenteils aus PC aufgebaut ist, sowie in der Konsequenz Beeinträchtigungen der autophagischen Aktivität.

Neben PC wurde auch PE in den autophagosomalen Membranen detektiert, dass unter anderem als Anker für die ATG8-Proteine dient. Ähnlich wie SM wird PE nicht nur am ER gebildet, allerdings wird es nach seiner Synthese in der mitochondrialen Membran über das ER verteilt (Mavuduru *et al.*, 2024). PE zeichnet sich durch die Bildung negativ gekrümmter Membranen aus und die langen, mehrfach ungesättigten Fettsäurereste, die in der Lipidomanalyse auch an PE detektiert wurden (siehe Abbildung 9B), begünstigen eine negative Krümmung der Membran zusätzlich (Kunduri *et al.*, 2022; Marsh, 2007). Daher wird PE vor allem in der inneren Membran von Vesikeln oder an Membranen mit starker Krümmung gefunden (Thomas *et al.*, 2025). Die Autophagosomenmembran ist äußerst dünn und dementsprechend ist die Krümmung an den *rim*, den Rändern der wachsenden Phagophore, besonders stark (Bieber *et al.*, 2022). Es wird vermutet, dass PE sich hier ansammelt und MAP1LC3B vorwiegend an den *rim* lipidiert wird, da manche der in die Lipidierung involvierten Proteine Krümmungen in der Membran erkennen und an diese favorisiert binden (Nath *et al.*, 2014; Shatz *et al.*, 2016). MAP1LC3B bindet über seine LIR-Domänen Substrate und kann vermutlich durch die favorisierte Lokalisation von PE in der Innenseite der wachsenden Phagophore die gebundenen Substrate besser halten, damit diese in das Autophagosom eingeschlossen werden. Ist PE an äußeren Membranen exponiert, begünstigt es Fusionsereignisse, wie sie bei der Fusion von Autophagosomen mit Lysosomen gebraucht werden

(Emoto & Umeda, 2000). Auf der Kehrseite steigt der mechanische Stress auf Membranen, wenn PE über die Doppelmembran ungünstig verteilt wird (Marsh, 2007).

PS und PI zeichnen sich durch eine negative Ladung in der Kopfgruppe aus, daher fungieren sie auch als Signalmoleküle. PS ist vorwiegend an der inneren Membran von zellulären Strukturen lokalisiert. Wird es exponiert, dient PS als Signalgeber während der Phagozytose. Einige Proteine weisen eine Interaktionsdomäne speziell für PS auf und initiieren so bspw. die Fusion von Membranen (Leventis & Grinstein, 2010; Matsumoto *et al.*, 2017; Xu *et al.*, 2013). PI wird am Inositolring modifiziert und die Stelle und Zahl der angefügten Phosphatgruppen vermittelt die Interaktion mit unterschiedlichen Reaktionspartnern. Die dynamische Modifikation der PIP-Spezies ist wichtig für die Reifung des endosomalen Systems und ebenso für den Lebenszyklus der Autophagosomen (Palamiuc *et al.*, 2020; Posor *et al.*, 2022). Beispielsweise transportieren ATG9A-positive Vesikel eine PI4-Kinase, die für die Reifung der Phagophore entscheidend ist, damit neben PI3P, das während der Initiierung der Phagophore mit WIPI und ATG2 interagiert, auch PI4P gebildet wird (Dooley *et al.*, 2014; Judith *et al.*, 2019).

Spannenderweise wurde SM als Bestandteil der Autophagosomenmembran identifiziert. In der Verteilung der einzelnen SM-Spezies innerhalb aller gemessenen SM-Lipide wurde eine signifikante Anreicherung spezifischer SM detektiert (siehe Abbildung 9B), was auf einen aktiven Transportmechanismus hinweisen kann. Die komplexen Sphingolipide, zu denen SM gehört, nehmen unter den Membranlipiden eine besondere Position ein, da sie nicht am ER synthetisiert oder über dieses verteilt werden. Sie werden am Golgi synthetisiert und von diesem dann in der Zelle distribuiert (McCluskey *et al.*, 2022; Rabionet *et al.*, 2014). Daher ist SM vorwiegend mit dem Golgi-Apparat, der Plasmamembran und dem endosomalen System assoziiert (Companioni *et al.*, 2021). Hier wurde nun gezeigt, dass SM von den gemessenen Lipiden einen Hauptbestandteil der autophagosomalen Membran bildete. Nicht nur Strukturen positiv für lysosomale Marker kolokalisierten mit MAP1LC3B und SM, SM kolokalisierte auch mit Strukturen, die ausschließlich positiv für MAP1LC3B waren (siehe Abbildung 11D). Damit wurde erstmals gezeigt, dass SM nicht nur mit Lysosomen und Autolysosomen, sondern auch mit Autophagosomen assoziierte.

Aufgrund seiner Struktur verfestigt SM Membranen, in die es integriert wird. Es weist eine annähernd zylindrische Form auf, die bei der Bildung planarer Membranen von Vorteil ist. Außerdem hat es einen hohen Schmelzpunkt und zeigt eine geringe Sensitivität gegenüber pH-Änderungen oder Konzentrationsgefällen von Salzen, weshalb es für die Bildung robuster Membranen wichtig ist. Zusätzlich gibt es oftmals ein Ungleichgewicht zwischen den assoziierten Fettsäureresten. Während die Sphingosinbase vorwiegend eine kurzkettige und

gesättigte Fettsäure ist, wird im Gegenzug eine langkettige und einfach- oder mehrfach ungesättigte zweite Fettsäure assoziiert (Barenholz & Thompson, 1999; Quinville *et al.*, 2021). Durch dieses strukturelle Ungleichgewicht wird die Interaktion von SM mit Cholesterol vereinfacht. SM-reiche Mikrodomänen reichern sich mit Cholesterol an und interagieren mit dem Signallipid PI (Kinoshita & Kato, 2008; Taniguchi & Okazaki, 2021). Dies spielt beispielsweise bei der Versorgung der Phagophorenmembran mit Lipiden aus dem ER eine Rolle und bei der Interaktion von SNARE-Proteinen bei der Fusion von Vesikeln, wie der Fusion von Autophagosomen und Lysosomen (Osawa *et al.*, 2020; Taniguchi & Okazaki, 2021; van Meer *et al.*, 2008). Des Weiteren ist SM essenziell für die strukturelle Funktion und die Bildung von doppelmembranösen Vesikeln (Gewaid *et al.*, 2020). Dies ist ebenfalls von Bedeutung bei der Bildung von Autophagosomen.

Die Detektion von SM in der Autophagosomenmembran (siehe Abbildung 11B und D) verdeutlichte, dass Lipide aus den post-Golgi-Kompartimenten für die Synthese der Autophagosomen benötigt werden, und ermöglichte zudem die Untersuchung von spezifischen Transportmechanismen.

Interessanterweise wurden keine Unterschiede zwischen den autophagischen Vesikeln aus verschiedenen Autophagiebedingungen beobachtet. Das Lipidprofil veränderte sich trotz verschiedener Stressbedingungen nicht (Abbildung 9A). Dies deutete klar daraufhin, dass das Lipidprofil der autophagosomalen Membran von funktioneller Bedeutung ist. Passend zu dem aufrecht erhaltenem Lipidprofil der Autophagosomen unter verschiedenen Autophagiebedingungen, wurde in *S. cerevisiae* und *D. melanogaster* gezeigt, dass Veränderungen in der Lipidkomposition autophagischer Membranen die autophagische Aktivität beeinträchtigen. Phagophoren und autophagosomale, nicht geschlossene Strukturen akkumulieren und reife Autophagosomen, die mit den verdauenden Organellen fusionieren könnten, werden kaum gebildet (Laczko-Dobos *et al.*, 2021; Schutter *et al.*, 2020). Ein distinktes Lipidprofil der autophagosomalen Membran scheint dementsprechend wichtig zu sein für (1) die adäquate Versorgung der Phagophorenmembran mit Lipiden (Polyansky *et al.*, 2022), (2) für die Fusion der Autophagosomen mit Endosomen zu Amphisomen sowie (3) für die Fusion von Autophagosomen und Amphisomen mit Lysosomen (Dall'Armi *et al.*, 2013).

4.1.1 Sphingomyelin moduliert die autophagische Aktivität in Abhängigkeit von ATG9A-positiven Vesikeln

Da SM erstmalig als Bestandteil der autophagosomalen Membran beschrieben wurde und bekannt ist, dass eine Limitation von Lipiden die autophagische Aktivität beeinträchtigt, wurde im Zuge dieser Arbeit überprüft, ob eine Supplementation von SM die autophagische Aktivität beeinflusst.

Tatsächlich modulierte SM nach einer kurzen Behandlung in geringer Konzentration unter Lipiddepletion die autophagische Aktivität positiv (siehe Abbildung 12). Sowohl unter basalen Bedingungen als auch nach Induktion der Autophagie wurde eine signifikante Steigerung des autophagischen Fluxes nachgewiesen. Durch die Supplementation von SM wurde die autophagische Aktivität gesteigert.

SM war hinter PC am stärksten in der autophagosomalen Membran vertreten (siehe Abbildung 9A). Eine gesteigerte Verfügbarkeit von SM könnte daher in einer vermehrten Bildung von Autophagosomen und somit in einer gesteigerten autophagischen Aktivität resultieren. Eine erhöhte Verfügbarkeit von PC ist bereits mit einer gesteigerten autophagischen Aktivität in Verbindung gebracht (Andrejeva *et al.*, 2020). Die gesteigerte Verfügbarkeit von SM könnte einen ähnlichen Effekt auf die autophagische Aktivität haben und damit zeigen, dass die Verfügbarkeit von SM ein limitierender Faktor der Autophagosomenbiogenese sein kann.

Verschiedene Studien zeigen bereits einen Zusammenhang zwischen SM und der Autophagie. SM fungiert als Signalmolekül an beschädigten Membranen, um die Autophagie zu induzieren. Daneben wirkt es zusammen mit Harnsäure positiv auf die autophagische Aktivität. Doch alle Studien konzentrieren sich auf eine exzessive langanhaltende Exposition gegenüber SM (Cao *et al.*, 2019; Kaur *et al.*, 2023). Bisher wurde nicht überprüft, wie sich eine niedrig-dosierte und kurzfristige Supplementation von SM auf die Autophagie auswirkt.

Aufgrund der geringen Zeitspanne, die für die Behandlung gewählt wurde, wurde eine Stoffwechselung von SM zu Ceramid ausgeschlossen. Ceramid ist ebenfalls ein bekannter Modulator der Autophagie. Im Gegensatz zu dem mit vorwiegend proliferativen Wirkungen in Zusammenhang gebrachtem SM, verursacht Ceramid eine pro-apoptische Reaktionskaskade, die unter anderem zum Autophagie-vermittelten Zelltod und einem verringerten Transport von Nährstoffen in die Zelle führt (Guenther *et al.*, 2008; Pattingre *et al.*, 2009). Außerdem fördert Ceramid die Permeabilisierung von Membranen (Taniguchi & Okazaki, 2021). Zwar wurden die Zellen nicht auf eine Stressreaktion während der SM-Behandlung untersucht, allerdings war keine vermehrte Abrundung der Zellen oder eine auffällige Zahl gelöster Zellen im Behandlungsmedium während der Versuche zu beobachten. Die geringe Behandlungsdauer gewährleistete zusätzlich, dass SM nicht massiv akkumulieren konnte. Die Überladung des zellulären Systems mit SM induziert Schäden in der lysosomalen Membran und zeitgleich die Biogenese neuer Lysosomen. Weiter bedingt die Akkumulation von SM eine funktionelle Störung der Mitochondrien (Carsana *et al.*, 2022; Gabande-Rodriguez *et al.*, 2014). Durch die in dieser Arbeit etablierte, kurzzeitige und niedrig konzentrierte Behandlung mit SM wurden diese Effekte umgangen. Um endgültig auszuschließen, dass die Modulation der Autophagie nicht auf SM, sondern Ceramid beruht, müssen

weiterführende Studien sich auf die SM-Ceramid-Achse konzentrieren. Beispielsweise sollte die Inhibierung von saurer und neutraler Sphingomyelinase, die SM in Ceramid umwandeln, die Modulation der Autophagie noch verstärken und eine Anreicherung von Ceramid aufgrund der Behandlung mit SM verhindern (Taniguchi & Okazaki, 2021).

Um die Spezifität der Wirkung von SM auf die Autophagie zu überprüfen, wurde auch der Einfluss von PE auf die autophagische Aktivität überprüft. Dafür wurden Zellen direkt mit PE behandelt. Es wurde keine Modulation der autophagischen Aktivität nach kurzfristiger Supplementation von PE unter basalen Bedingungen beobachtet (siehe Abbildung 14C und D). Unter Autophagie-Induktion wurde sogar eine inhibierende Wirkung von PE auf den autophagischen Flux nachgewiesen (siehe Abbildung 14E und F). Augenscheinlich stehen diese Ergebnisse im Gegensatz zu bisherigen Erkenntnissen. Rockenfeller *et al* beschreiben, dass eine Reduktion der PE-Spiegel mit einem verringerten autophagischen Flux verbunden ist (Rockenfeller *et al*, 2015). Dabei zeigt der Verlust der mitochondrialen Synthese von PE die größten Konsequenzen und nicht alle biologischen Prozesse können durch die Behandlung mit Ethanolamin, dem Vorläufer von PE, kompensiert werden (Muthukumar & Nachiappan, 2013; Nebauer *et al*, 2007). Mit der Überexpression der synthetisierenden Proteine von PE oder der Supplementation von Ethanolamin geht obendrein ein positiver Effekt auf die Autophagie einher (Rockenfeller *et al.*, 2015). Hier zeigt sich allerdings der größte Unterschied zwischen den publizierten Studien und dieser Arbeit – der positive Einfluss von PE auf die Autophagie stützt sich auf die Untersuchung von genetischen Modifikationen der PE-Synthese oder die Supplementation mit für die PE-Synthese notwendigen Bestandteilen. In dieser Arbeit wurde PE direkt und nur über einen kurzen Zeitraum supplementiert. Da PE über die Zellmembran aufgenommen wurde, ist es möglich, dass es Störungen in der Membranhomöostase verursachte. PE provoziert, vor allem wenn es exponiert ist, Krümmungen und mechanischen Stress in der Membran (Marsh, 2007). Obendrein ist vorwiegend mitochondrial synthetisiertes PE für biologische Prozesse wie die Autophagie von Bedeutung (Hailey *et al.*, 2010) – es ist möglich, dass das internalisierte PE die Autophagie nicht so modulierte, wie intrinsisch synthetisiertes PE.

Die Transferwege von PC und PE über Transferasen wie ATG2A und ATG2B an die Phagophorenmembran sind bereits beschrieben (Hailey *et al.*, 2010; McEwan & Ryan, 2022). Im Weiteren wurde in dieser Arbeit untersucht, wie SM in die Autophagosomenmembran transportiert wurde und über welchen Mechanismus SM die Autophagie modulierte. Da SM vorrangig im Golgi-Apparat synthetisiert wird, lag nahe, dass es von dort an die Phagophorenmembran transferiert wurde. COP-Vesikel, die hauptsächlich zwischen Golgi-Apparat und ER transferieren und zusätzlich als Lipidquelle der Phagophorenmembran beschrieben sind, zeigen verringerte SM-Spiegel im Vergleich zum Golgi-Apparat und wurden daher auf

der Suche nach einem Transportvesikel vorrangig nicht berücksichtigt (Brugger *et al.*, 2000; Razi *et al.*, 2009). Im Vergleich dazu korreliert eine exzessive Exposition des zellulären Systems gegenüber SM mit der Beeinträchtigung des Transfers ATG9A-positiver Vesikel, die wie SM am Golgi-Apparat gebildet werden (Corcelle-Termeau *et al.*, 2016; Slotte, 2013). Daher wurden ATG9A-positive Vesikel als mögliches Transfermedium von SM an die Phagophore näher untersucht.

ATG9A liegt inaktiv vorwiegend am Golgi-Apparat vor und nach seiner Aktivierung durch Phosphorylierung durch die SRC-Kinase schnüren sich vermehrt ATG9A-positive Vesikel vom Golgi-Apparat ab (siehe Abbildung 36 – basale Bedingungen). Die Induktion der Autophagie verstärkt die Vesikelbildung noch weiter, in dem ATG9A zusätzlich von ULK1 phosphoryliert wird (Zhou *et al.*, 2017) (siehe Abbildung 36 – Autophagie-Induktion). Durch die Phosphorylierungen wird u.a. die Interaktion von ATG9A mit AP-Proteinen (Adapter-Proteine) verbessert, die wiederum mit für die Membrankrümmung und Abschnürung der ATG9A-positiven Vesikel verantwortlich sind (Mattera *et al.*, 2017; Popovic & Dikic, 2014). Dementsprechend stammt die Vesikelmembran ebenfalls vom Golgi-Apparat und ist prädestiniert dafür, SM zu beinhalten. Tatsächlich wurde gezeigt, dass ATG9A-positive Vesikel mit SM kolokalisierten (Abbildung 11A). Nicht nur in den perinukleären Verdichtungen kolokalisierten ATG9A und SM, auch in über das Zytoplasma verteilten Punctae wurden Kolo-kalisation beobachtet. Dies demonstrierte, dass SM auch Bestandteil von ATG9A-positiven Vesikeln war.

Zur weiteren Untersuchung des Zusammenhanges zwischen ATG9A und SM, wurden die Proteinlevel und die Aktivität von ATG9A während der SM-Supplementation manipuliert. Die Proteinspiegel von ATG9A wurden über einen RNAi-Ansatz verringert und zusätzlich wurde die Aktivierung von ATG9A inhibiert, indem die phosphorylierende SRC-Kinase mit PP2 inhibiert wurde (siehe Abbildung 15).

Die Supplementation von SM unter eingeschränkter Verfügbarkeit von ATG9A zeigte keine weitere Modulation der autophagischen Aktivität durch SM (siehe Abbildung 16). Stark verringerte ATG9A-Proteinspiegel sowie eine Inhibition des Transfers ATG9A-positiver Vesikel neutralisierten den Einfluss von SM auf die Autophagie. Bei verringerten ATG9A-Proteinspiegeln und einer Inaktivität von ATG9A wären schon unter basalen Bedingungen Beeinträchtigungen der autophagischen Aktivität zu erwarten. Der transiente Verlust von ATG9A zeigte eine tendenzielle Verringerung des autophagischen Fluxes, allerdings ohne Signifikanz – dies korreliert mit bereits publizierten Studien, die eine hohe Inkonsistenz bei der Auswirkung eines transienten oder permanenten Verlustes von ATG9A zeigen (Imai *et al.*, 2016; Olivas *et al.*, 2023; van Vliet *et al.*, 2022). Auch von der Behandlung mit PP2 ist bereits

bekannt, dass sie unter basalen Bedingungen keine signifikante Auswirkung auf den autophagischen Flux zeigt (Bekbulat *et al.*, 2020).

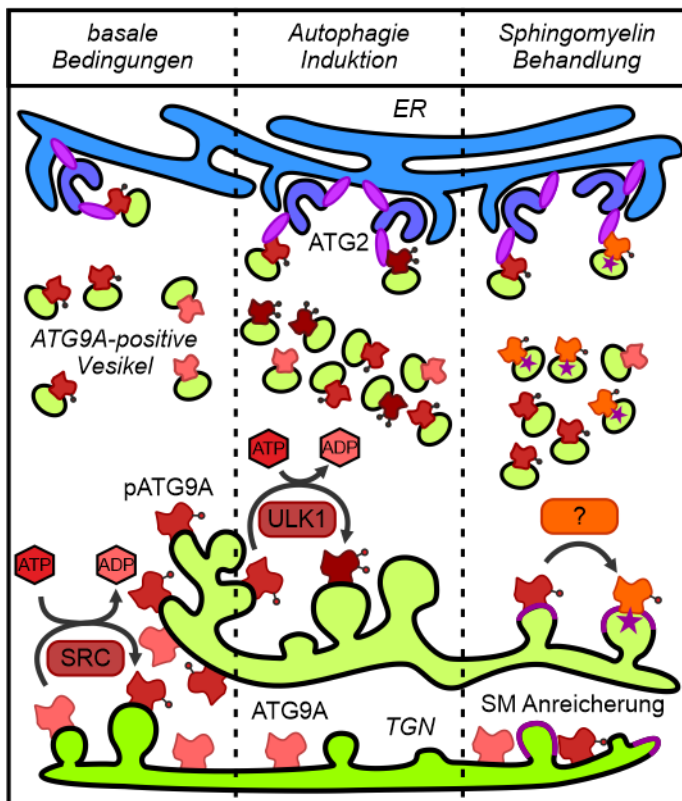


Abbildung 36 Initiierungsmechanismen der Abschnürung ATG9A-positiver Vesikel (basale Bedingungen) ATG9A wird von der SRC-Kinase phosphoryliert. Dies verstärkt die Bindung an Interaktionspartner und erleichtert die Abschnürung ATG9A-positiver Vesikel. Auch unabhängig von SRC-Kinase bildet sich eine kleine Population ATG9A-positiver Vesikel. Die Vesikel, die mit phosphoryliertem ATG9A dekoriert sind, transferieren zwischen Post-Golgi-Kompartimenten und Phagophore, die sie mit Lipiden versorgen. (Autophagie-Induktion) ATG9A wird zusätzlich von ULK1 phosphoryliert in Abhängigkeit der Phosphorylierung der SRC-Kinase. Die Vesikelabschnürung wird weiter unterstützt und so vergrößert sich die Population ATG9A-positiver Vesikel. Die wachsende Phagophore kann mit mehr Lipiden versorgt werden und mehr ATG9A-positive Vesikel können als Keim für Phagophoren genutzt werden. (Sphingomyelin- Behandlung) Die Abschnürung ATG9A-positiver Vesikel wird abhängig von der SRC-Kinase vermittelten Phosphorylierung und unabhängig von ULK1 verstärkt. Eine Hypothese ist, dass sich SM-reiche Domänen im TGN und auf ATG9A-positiven Vesikeln bilden bzw. dass SM-reiche Membranen auf ATG9A-positiven Vesikeln angereichert werden.

Es wurde vermutet, dass SM entweder vermehrt durch ATG9A-positive Vesikel zur Phagophore transportiert wurde und ein limitierendes Lipid bei der Autophagosomenbiogenese darstellt, oder dass SM eine Modulation von ATG9A initiiert (Phosphorylierung, Ubiquitinierung, etc.) oder dass SM die Abschnürung ATG9A positiver Vesikel bzw. die Interaktion von AT9A mit seinen interagierenden, die Abschnürung der Vesikel vermittelnden Proteinen begünstigt (Shirahama-Noda *et al*, 2013). Dieser Prozess war wahrscheinlich abhängig von der Phosphorylierung durch die SRC-Kinase, aber unabhängig von der Phosphorylierung

durch den ULK-Komplex, da SM die autophagische Aktivität nach Induktion der Autophagie noch weiter steigern, aber ohne Aktivität der SRC-Kinase die autophagische Aktivität nicht modulieren konnte (Abbildung 36 – Sphingomyelin-Behandlung). ATG9A konnte somit nicht an seine Interaktionspartner, die für die Vesikelabschnürung verantwortlich sind, binden und möglicherweise blieb das supplementierte SM zusammen mit ATG9A am Golgi-Apparat lokalisiert.

Zur weiteren Überprüfung dieser Hypothesen sollte in zukünftigen Untersuchungen durch Immunfluoreszenzstudien die Lokalisation von SM und ATG9A unter PP2-Behandlung genauer betrachtet werden. Ein interessanter Aspekt für weitere Studien ist, wie die Bindung von ATG9A an seine Interaktionspartner mit SM verändert ist und ob SM Phosphorylierungen oder andere posttranslationale Modifikationen an ATG9A initiiert.

4.1.2 In Modellen mit adaptierter ATG9A-Aktivität und gestörter Lipidhomöostase moduliert Sphingomyelin die Autophagie positiv

Um besser zu verstehen, wie SM die autophagische Aktivität modulierte, wurden Zellen mit ATG2A/B KO und RAB18 KO näher untersucht, die eine gestörte Lipidhomöostase, eine negativ modulierte autophagische Aktivität sowie eine modulierte ATG9A-Aktivität aufzeigten (siehe 3.2). Die genetische Depletion von ATG2A/B verursachte eine massive Einschränkung des Lipidtransfers vom ER an die Phagophore. Durch den genetischen Verlust von RAB18 wurde die Mobilisierung der Lipidtröpfchen und somit der in ihnen als TAGs gespeicherten Fettsäuren massiv gestört (Bekbulat *et al.*, 2020; Velikkakath *et al.*, 2012). Diese Beeinträchtigungen der Lipidhomöostase resultieren in Adaptionen der ATG9A-Aktivität und Expression. In ATG2A/B KO-Zellen liegt ATG9A vermehrt außerhalb des Golgi-Apparates vor, um die Bildung von Phagophoren zu unterstützen (Holzer *et al.*, 2024). In RAB18 KO-Zellen sind die Phosphorylierungsspiegel von ATG9A und damit der Transfer ATG9A-positiver Vesikel signifikant erhöht, um die Störungen in der Lipidversorgung zu kompensieren (Bekbulat *et al.*, 2020).

In den KO-Modellen mit adaptierter ATG9A-Aktivität wurden Kollokationen von SM und ATG9A nachgewiesen (siehe Abbildung 26B). Die Störung der Lipidhomöostase sowie die Adaptionen von ATG9A änderten nichts an der Kollokation. Anhand der Kollokationsstudien konnte keine Aussage über den SM-Gehalt der ATG9A-positiven Vesikel getroffen werden und damit nicht geklärt werden, ob vermehrt SM über ATG9A-positive Vesikel an die Phagophore transferiert wird, wenn die Lipidversorgung der Phagophorenmembran gestört ist.

Ein faszinierender Befund war, dass SM die autophagische Aktivität in ATG2A/B KO-Zellen nicht unter basalen Bedingungen, sondern erst nach Induktion der Autophagie erhöhte

(siehe Abbildung 27C). In diesen Zellen lag ATG9A unter basalen Bedingungen in perinukleären Akkumulationen außerhalb des Golgi-Apparates vor (siehe Abbildung 23D). Von diesen Akkumulationen ist beschrieben, dass sie mit Phagophorenmarkern kolokalisieren (Olivas *et al.*, 2023). Daher erscheint es möglich, dass SM die Nutzung ATG9A-positiver Vesikel als Keim der Phagophore vereinfacht, da SM in ATG2A/B KO-Zellen, in denen ATG9A-positive Vesikel bereits verstärkt als solche genutzt werden, die autophagische Aktivität nicht weiter erhöhen konnte (siehe Abbildung 27B).

Gleichzeitig scheint SM die Bindung von Interaktionspartnern zu stabilisieren und so die Abschnürung der ATG9A-positiven Vesikel vom Golgi-Apparat und die Interaktion von ATG9A mit den Proteinen, die für die Bildung der Phagophoren verantwortlich sind, zu unterstützen. In RAB18 KO-Zellen verstärkte SM bereits unter basalen Bedingungen die Autophagie weiter, obwohl ATG9A-positive Vesikel bereits vermehrt in den Zellen transferieren und als Initiierungsplattform der Phagophorenbildung dienen können. Außerdem sind die Proteinspiegel von ATG2B in RAB18 KO-Zellen erhöht (Bekbulat *et al.*, 2020). ATG2-Proteine interagieren mit ATG9A für eine effektive Verteilung der Lipide über die Phagophoremembran (van Vliet *et al.*, 2022). Es ist also möglich, dass SM die Interaktion zwischen ATG9A, das verstärkt mobilisiert ist, und ATG2B, das verstärkt transkribiert wird, weiter stabilisiert und so die autophagische Aktivität erhöht, um in RAB18 KO-Zellen die autophagische Aktivität aufrecht zu erhalten. Überdies ist möglich, dass die Supplementation von SM die SM-Level in den ATG9A-positiven Vesikeln erhöhte. Damit könnte mehr SM an die Phagophore transportiert werden und die Synthese der Phagophore wäre erleichtert worden und damit die autophagische Aktivität insgesamt erhöht. Diese Hypothese wird dadurch gestützt, dass die exzessive Exposition gegenüber SM im *in vitro* Modell zu einer Überschwemmung der ATG9A-positiven Vesikel mit SM führt, wodurch diese Vesikel bioreaktiv inert werden (Corcelle-Termeau *et al.*, 2016). Diese Studie bestätigt, dass die SM-Spiegel ATG9A-positiver Vesikel adaptierbar sind und somit ATG9A-positive Vesikel vermehrt SM an die Phagophoremembran liefern können, um deren Synthese zu beschleunigen.

In beiden KO-Modellen wurde die autophagische Aktivität unter Autophagie-induzierenden Bedingungen weiter verstärkt (siehe Abbildung 27). SM modulierte in beiden KO-Modellen die autophagische Aktivität sogar so positiv, dass der autophagische Flux von WT-Zellen unter Autophagie-Induktion ohne SM erreicht werden konnte (siehe Abbildung 28), obwohl für beide KO-Modelle bisher eine erniedrigte autophagische Aktivität unter Autophagie-Induktion beschrieben ist (Bekbulat *et al.*, 2020; Velikkakath *et al.*, 2012) (siehe Abbildung 17A und B sowie Abbildung 24).

Dies deutet daraufhin, dass, trotz molekularer Einschränkungen der autophagischen Aktivität, der autophagische Flux durch SM-Supplementation auf ein vergleichbares Level mit

uneingeschränkten Autophagiemechanismen angehoben werden kann. Dafür sind vermutlich vermehrt Lipide zur Bildung der Autophagosomen sowie eine verbesserte Vesikelinteraktion von Nöten.

4.1.3 Ausblick

Neben den bereits erwähnten, vertiefenden Experimenten, sind Kollokalisations- und Interaktionsstudien mit PIP-bildenden Proteinen äußerst interessant. Vor allem PI3P ist als ein wichtiges, die Biogenese des Autophagosoms einleitendes Lipid beschrieben (Dooley *et al.*, 2014). PIPs interagieren mit SM bei der Bildung der *Lipid Rafts* und in der Membran von ATG9A-positive Vesikeln liegen Proteine der PIK-Klasse vor, die die Phosphorylierung der PIPs modulieren (Holzer *et al.*, 2024; Judith *et al.*, 2019; Kinoshita & Kato, 2008; Longo *et al.*, 2025). In der Phospholipidomanalyse der autophagischen Membranen wurde unter den untersuchten PI-Spezies ausschließlich PI 34:1 detektiert (siehe Abbildung 9B). Die invertiert-konische Struktur der PI wird durch die kurzkettigen Fettsäurereste unterstützt und prädestiniert PI 34:1, höchst wahrscheinlich an der äußeren Membran zu lokalisieren. Dort können sie über Modifikationen am Inositolring als Signalmoleküle fungieren und die Reifung sowie die Reaktivität des Autophagosoms beeinflussen (Palamiuc *et al.*, 2020).

Die SM- und PI-Spiegel lassen sich über vergleichende chromatografische Untersuchungen oder über Lipidomanalysen der Autophagosomen und der ATG9A-postiven Vesikel ohne und mit SM-Behandlung bestimmen, für deren Aufreinigung das Isolationsprotokoll adaptiert werden kann, ähnlich wie bei der Aufreinigung von Lysosomen (siehe Abbildung 33). Für ATG9A-positive Vesikel aus Neuronen ist bereits ein äußerst diverses Membranprofil beschrieben – hier sind ATG9A-positive Vesikel auch an der Sekretion von Neurotransmittern beteiligt (Binotti *et al.*, 2024). Vergleichende Phosphoproteom- und Proteomanalysen der ATG9A-postiven Vesikel ohne und mit SM-Behandlung können obendrein Aufschluss darüber geben, ob Proteine, die die Biogenese des Autophagosoms initiieren, auf ATG9A-postiven Vesikeln angereichert sind, wenn ATG9A-positive Vesikel vermehrt als Keim der Phagophoren dienen, und ob SM translationale Modulationen von ATG9A initiiert. Darüber hinaus können die Proteomdaten genutzt werden, um Interaktionspartner von ATG9A zu bestimmen und Lipid-bindende Proteine zu identifizieren, die die Autophagie ebenfalls modulieren. Immunopräzipitationen sind schließlich dafür geeignet, eine verstärkte Bindung an Proteine wie AP-Proteine oder ATG2A und ATG2B nachzuweisen, die mit ATG9A interagieren. Mit diesem Methodenspektrum lässt sich weiter untersuchen, wie SM die ATG9A-positiven Vesikel und damit die Autophagie moduliert.

4.2 Anpassungen des Isolationsprotokolls

Für die Isolation genetisch unmanipulierter Autophagosomen wurde das neuartige Isolationsprotokoll etabliert, das die Anreicherung von Autophagosomen anhand einer Antikörperbasierten Markierung mit Fluorophoren und anschließender Fluoreszenz-vermittelter Sortierung am Durchflusszytometer ermöglicht. Bisherige Studien zur Untersuchung von Autophagosomen basieren auf der Anreicherung von Autophagosomen per Differenzialzentrifugation oder auf der genetischen Manipulation von ATG8-Proteinen, um diese mit verschiedenen Markern zu versehen (Dengjel *et al.*, 2012; Gomez-Sanchez *et al.*, 2021; Stromhaug *et al.*, 1998). Die Antikörper-vermittelte Markierung der Autophagosomen mit anschließender Sortierung am Durchflusszytometer umgeht die genetische Manipulation und es ist keine aufwendige Aufbereitung der doppelmembranösen Vesikel notwendig (Schmitt *et al.*, 2022). Das Isolationsverfahren lässt sich zudem auf andere vesikuläre und granuläre Populationen übertragen. So konnten Lipidtröpfchen (Schmitt, 2023, S.38 und 99) und im Zuge dieser Arbeit Lysosomen angereichert werden (siehe Abbildung 33). Kritisch für die Anwendung des Isolationsverfahren ist, dass die zu isolierenden Strukturen über ein spezifisches Antigen oder eine spezifische Antigen-Kombination verfügen, um die Antikörper-Markierung mit einem Fluorophor zu gewährleisten. Alternativ muss ein Struktur-spezifischer fluoreszierender Farbstoff verfügbar sein, um eine durchflusszytometrische Sortierung zu ermöglichen.

Die Funktionalität von Autophagosomen kann über deren Fähigkeit definiert werden, Cargo zu mobilisieren und mit dem Lysosom zu fusionieren, während die Funktionalität von Lysosomen über ihre Fähigkeit definiert wird, Substrate bspw. aus Autophagosomen abzubauen (Zhao & Zhang, 2019). Während der Einfluss von Proteinen auf die Fusion von Autophagosomen mit Lysosomen bereits mehrfach untersucht und beschrieben ist, bleibt die Rolle der Lipide auf die Fusion größtenteils unberücksichtigt (Ebner *et al.*, 2018; Itakura *et al.*, 2012; Nguyen *et al.*, 2016). Dabei ist von Modellen mit gestörter Lipidhomöostase bekannt, dass die Autophagie stark beeinträchtigt sein kann. Unter anderem resultieren diese Störungen der Lipidhomöostase in einer beeinträchtigten Reifung der Phagophore (Kishi-Itakura *et al.*, 2014; Olivas *et al.*, 2023; Rockenfeller *et al.*, 2015). Studien, die das Lipidprofil autophagischer Strukturen im Kontext einer gestörten Lipidhomöostase untersuchen, differenzieren aber nicht zwischen Phagophoren und geschlossenen Autophagosomen. Dadurch bleibt unklar, inwiefern ein verändertes Lipidprofil die Reifung der Phagophore zum Autophagosom beeinflusst – akkumulierende Phagophoren müssten ein signifikant verändertes Lipidprofil verglichen mit Autophagosomen aufweisen, wenn ein verändertes Lipidprofil die Reifung des Autophagosoms beeinflusst. Ferner lassen die vorhandenen Studien die Fusionsfähigkeit der gebildeten Autophagosomen mit Lysosomen außen vor (Laczko-Dobos *et al.*, 2021; Schutter *et al.*, 2020).

4.2.1 Die Isolation von Autophagosomen aus KO-Modellen

Im Zuge dieser Arbeit wurde versucht, Autophagosomen aus ATG2A/B KO- und ATG9A KO-Zellen zu isolieren, die beide eine beeinträchtigte autophagische Aktivität u.a. aufgrund einer gestörten Lipidhomöostase aufweisen. Die ATG2-Proteine sind als Lipidtransferasen verantwortlich für den Transfer von Lipiden vom ER an die Phagophorenmembran (Valverde *et al.*, 2019). Aufgrund seiner Skramblase-Aktivität ist ATG9A für die Membranintegrität der Autophagosomen unerlässlich, da es Lipide gleichmäßig über die Lipiddoppelschicht verteilt (Choi *et al.*, 2024). ATG2A bindet an ATG9A und gewährleistet so einen kontinuierlichen Lipidfluss und eine effiziente Verteilung der Lipide über die Lipiddoppelschicht der Phagophorenmembran (Maeda *et al.*, 2020).

Zellen mit einem ATG2A/B KO wiesen einen stark reduzierten autophagischen Flux auf, der sich nach Induktion der Autophagie zwar steigern ließ und trotzdem nicht das Niveau des Fluxes unter basalen Bedingungen in WT-Zellen erreichte (siehe Abbildung 17A und B). Immunozytochemische Färbungen von MAP1LC3B und SQSTM1 zeigten neben punktierten Kolokalisationen deutlich vergrößerte Akkumulationen, in denen die beiden Autophagosomenmarker kolokalisierten (siehe Abbildung 19B). Es ist bekannt, dass MAP1LC3B über Lipidation in diese Akkumulationen inkorporiert ist und dass es sich bei den punktierten Kolokalisationen von MAP1LC3B und SQSTM1 vorwiegend um Phagophoren und keine geschlossenen Autophagosomen handelt (Bozic *et al.*, 2020).

Der Verlust von ATG9A führte zur starken Beeinträchtigung der Autophagie. Die autophagische Aktivität kam fast vollständig zum Erliegen und MAP1LC3B wurde kaum lipidiert (siehe Abbildung 17C und D). Dadurch reicherte sich unlipidiertes MAP1LC3B in den Zellen an (siehe Abbildung 18) und es wurde eine massive Akkumulation von SQSTM1 beobachtet (siehe Abbildung 20). Ohne eine Skramblase, die den Übergang von Lipiden von einer Seite der Lipiddoppelschicht zur anderen ermöglicht und so eine gleichmäßige Verteilung der Lipide gewährleistet, reifen die Phagophoren nicht und schließen sich nicht zu Autophagosomen.

Werden Autophagosomen nicht geschlossen und Phagophoren akkumulieren in der Zelle, reichern sich Substrate an (Choi *et al.*, 2024; Kishi-Itakura *et al.*, 2014). SQSTM1 ist ein universeller Autophagierezeptor und fungiert zusätzlich als Keim der Phagophorenbildung. SQSTM1-Moleküle bilden Polymere und unterliegen dann einer Phasenseparation, wodurch sich eine Gel-artige Struktur bildet und Cargo komprimiert gesammelt wird. Diese SQSTM1-Gele rekrutieren Proteine für die Initiierung der Phagophorenbildung (Kageyama *et al.*, 2021; Turco *et al.*, 2019). Ist die Synthese der Autophagosomen gestört, akkumulieren die SQSTM1-Gele und unterliegen samt Cargo auch Fusionen miteinander (Huang *et al.*, 2025). Dementsprechend wurden veränderte SQSTM1-Polymere in ATG9A KO-Zellen beobachtet

(siehe Abbildung 20), in denen Substrate aufgrund der erheblich gestörten Autophagie akkumulierten. Da der Cargo auch in ATG2A/B KO-Zellen nicht effizient in Autophagosomen eingeschlossen wird und dementsprechend nicht lysosomal abgebaut wurde, akkumulierte auch hier SQSTM1 (siehe Abbildung 20A und C). Allerdings war die Bildung der Autophagosomen, wenn auch stark eingeschränkt, nicht komplett verhindert in den ATG2A/B KO-Zellen, daher akkumulierte SQSTM1 weniger stark als in den ATG9A KO-Zellen und es wurde kein verändertes Polymurmuster detektiert (siehe Abbildung 20).

Eine gestörte Autophagosomenbildung kann zusätzlich die Funktionalität der Lysosomen oder des Proteasoms beeinflussen. Tatsächlich wurde eine Beeinträchtigung der lysosomalen Funktion durch den Verlust von ATG9A beobachtet. Obwohl die Proteinspiegel lysosomaler Marker signifikant in den ATG9A KO-Zellen erhöht waren (siehe Abbildung 21), war die Aktivität der lysosomalen Cathepsine signifikant reduziert (siehe Abbildung 22). Dies deutete daraufhin, dass nicht nur makroautophagische Prozesse, sondern alle lysosomalen Degradationsprozesse gestört waren und funktionsbeeinträchtigte Lysosomen in den ATG9A KO-Zellen akkumulierten. In den ATG2A/B KO-Zellen wurde keine Beeinträchtigung der lysosomalen Funktion beobachtet (siehe Abbildung 22). Während ATG2A/B vor allem für den Lipidaustausch zwischen ER und anderen Organellen wie Phagophore, Lipidtröpfchen und Mitochondrien verantwortlich sind, interagieren ATG9A-positive Vesikel mit dem gesamten endosomalen System und beeinflussen dessen Reifung und Homöostase und somit auch indirekt die Reifung von Lysosomen. Damit wirkt sich der Verlust von ATG2A/B vorwiegend auf die Synthese der Autophagosomen aus, während der Verlust von ATG9A neben der Autophagie auch andere zelluläre Prozesse beeinflusst, da es nicht nur an der Synthese von Autophagosomen beteiligt ist, sondern auch an der endo-lysosomalen Homöostase und damit an der Reifung von Lysosomen und deren Funktionalität (Binotti *et al.*, 2024; Kishi-Itakura *et al.*, 2014).

Ist die Autophagie gestört, kann das UPS adaptieren. Fällt das autophagische System aus, kompensiert das UPS teilweise die mangelnde lysosomale Degradation. Dies funktioniert allerdings nur bis zu einem gewissen Maß. Das UPS kann keine Organellen verdauen und Proteinaggregate sind für das UPS nicht zugänglich. Aggregate sind in der Lage, das UPS zu blockieren und somit auch die proteasomale Degradation zu inhibieren (Li *et al.*, 2022). Daher wurde neben der lysosomalen Funktion auch die Funktion des UPS in den KO-Modellen getestet, allerdings wurde keine Adaption festgestellt. Trotz der Akkumulation von Cargo wurde das UPS nicht blockiert und war weiterhin voll funktionsfähig. Es wurde sogar eine tendenzielle Erhöhung der proteasomalen Funktion festgestellt, die allerdings nicht signifikant war (siehe Abbildung 22).

Um zu untersuchen, inwieweit der Verlust von ATG9A und ATG2A/B ein verändertes Lipidprofil von Autophagosomen provozierte, wurden Autophagosomen aus beiden KO-Linien isoliert. Aus ATG2A/B KO-Zellen wurden erfolgreich Autophagosomen angereichert und in den Isolaten wurde ausschließlich lipidiertes MAP1LC3B detektiert (siehe Abbildung 30). Isolate aus ATG9A KO-Zellen dagegen zeigten stets sowohl lipidiertes als auch unlipidiertes MAP1LC3B. Auch unter Verwendung eines Lipids als zusätzlichem Marker für Autophagosomen wurde keine reine Fraktion von Autophagosomen aus den ATG9A KO-Zellen isoliert (siehe Abbildung 31A). Der Verlust von ATG9A resultiert in der Akkumulation von SQSTM1, lipidiertem und unlipidiertem MAP1LC3B in Aggregat-ähnlichen Strukturen in den Zellen (Kishi-Itakura *et al.*, 2014). MAP1LC3B wurde zwar unverändert in den ATG9A KO-Zellen lipidiert, die gebildeten Strukturen reiften nicht weiter aus zu Autophagosomen (siehe Abbildung 31B und C). Wie bereits im Aggregationsassay gezeigt, wiesen diese Strukturen eine so hohe Dichte auf (siehe Abbildung 20C und D), dass sie auch durch das Isolationsprotokoll angereichert wurden, und eine durchflusszytometrische Differenzierung zwischen Aggregaten und Autophagosomen war technisch nicht möglich. Somit war im Zuge dieser Arbeit eine Anreicherung von Autophagosomen aus ATG9A KO-Zellen nicht möglich und die Lipidprofile der Autophagosomen aus den KO-Zellen wurden nicht näher bestimmt.

Ein möglicher Ansatz, zwischen nicht geschlossenen Strukturen und geschlossenen Autophagosomen zu unterscheiden, wäre die Einbringung exogenen MAP1LC3B mit einem Halo-Tag (*haloalkane dehalogenase*). Dieser interagiert mit Liganden, die bspw. an einen Fluorophor gekoppelt sind. Es gibt Membran-permeable und Membran-impermeable Halo-Liganden mit unterschiedlichen Konjugaten. Unter Einsatz dieser Liganden könnte aufgrund der unterschiedlichen Fluoreszenzen zwischen geschlossenen Autophagosomen und offenen Vorläuferstrukturen unterschieden werden (Takahashi *et al.*, 2018). Dies würde allerdings den großen Vorteil des Isolationsprotokoll, Zellen nicht genetisch für eine Isolation manipulieren zu müssen, hinfällig machen.

4.2.2 Die Isolation von Lysosomen ermöglicht ein besseres Verständnis der Fusion von Autophagosomen und Lysosomen

Nicht nur das Lipidprofil von Autophagosomen, auch das von Lysosomen ist relevant bei der Fusion mit Autophagosomen. So bestimmen beispielsweise PIP-Spezies mit über die Reformation des Autolysosoms zum Lysosom, welches dann wiederum erneut mit Autophagosomen fusionieren kann (Trivedi *et al.*, 2020). Im Zuge dieser Arbeit wurde das Isolationsprotokoll der Autophagosomen für die Isolationen von Lysosomen adaptiert. Ähnlich wie bei der Isolation von Autophagosomen gibt es auch für die Anreicherung von Lysosomen bereits Protokolle, aber auch diese basieren auf aufwendigen Fraktionierungen (Schroder *et al.*, 2010). Im hier etablierten Isolationsprotokoll wurden nicht nur LAMP-Proteine, die u.a.

für den Transport von Substraten in das Lysosom hinein verantwortlich sind, angefärbt. Der Farbstoff LysoTracker®RedDND99 färbt das Lumen saurer Organellen und die Einbeziehung des pH-Wertes als Selektionskriterium ist bisher in keinem Isolationsprotokoll erfolgt. Seine Verwendung erlaubte eine differenzierte Sortierung reifer, azidifizierter Lysosomen (siehe Abbildung 8). In den so isolierten Lysosomen wurden LAMP-Proteine nachgewiesen, während zytosolische und zytoskelettäre Proteine ausgeschlossen wurden (siehe Abbildung 33). Zudem wurde vor allem die schwere Kette von Cathepsin D im Immunoblot nachgewiesen, während die Proform kaum detektierbar war – dies belegt, dass Cathepsin D prozessiert und wahrscheinlich hydrolytisch aktiv war. Somit wurde gezeigt, dass reaktive Lysosomen ebenfalls über das Isolationsprotokoll angereichert wurden.

In weiteren Studien ließe sich aufbauend auf beide Isolationsprotokolle ein *in vitro*-Assay etablieren, der die Fusion von Autophagosomen und Lysosomen misst (siehe Abbildung 37). Da SNARE-Proteine für die Fusion von Autophagosomen und Lysosomen zu Autolysosomen benötigt werden, ist eine Verfeinerung der Isolationen um die auf den Vesikeln lokalisierten SNARE-Proteinen sinnvoll (Zhao & Zhang, 2019). Dementsprechend würden Autophagosomen zusätzlich anhand von STX17 (*syntaxin 17*) sortiert werden und fusionsbereite Lysosomen mittels VAMP8 (*vessicle associated protein 8*) weiter differenziert werden. Da nicht nur die Vesikel-assoziierten SNARE-Proteine, sondern auch zytosolische SNAREs wie SNAP29 (*synaptosomal associated protein 29*) für die Bildung von Autolysosomen erforderlich sind, müsste im Fusionspuffer Zytosol enthalten sein, damit alle SNARE-Proteine zusammen die Fusion erfolgreich initiieren (Itakura *et al.*, 2012). Dies kann entweder per Immunoblot anhand der Degradation von bspw. SQSTM1 quantifiziert werden oder bereits publizierten Studien folgend per Immunocytochemie (Sanchez-Martin *et al.*, 2023).

Anhand dieses Fusionsassay lässt sich die Funktionalität der Autophagosomen und Lysosomen aus den KO-Modellen ermitteln. Es wurde bereits beschrieben, dass ATG2-Deletionsmodelle ein verändertes Lipidprofil autophagischer Strukturen aufweisen (Laczko-Dobos *et al.*, 2021) und für das ATG9A-Deletionsmodell ist ebenfalls ein verändertes Lipidprofil zu erwarten, da ATG9A-positive Vesikel die wachsende Phagophore nicht mehr mit Lipiden versorgen (Olivas *et al.*, 2023; Orsi *et al.*, 2012). Über die Kombination von Lysosomen aus WT-Zellen, die funktions- und fusionsfähig sind, und Autophagosomen aus den KO-Modellen ließe sich die Funktionalität der Autophagosomen mit verändertem Lipidprofil genauer untersuchen.

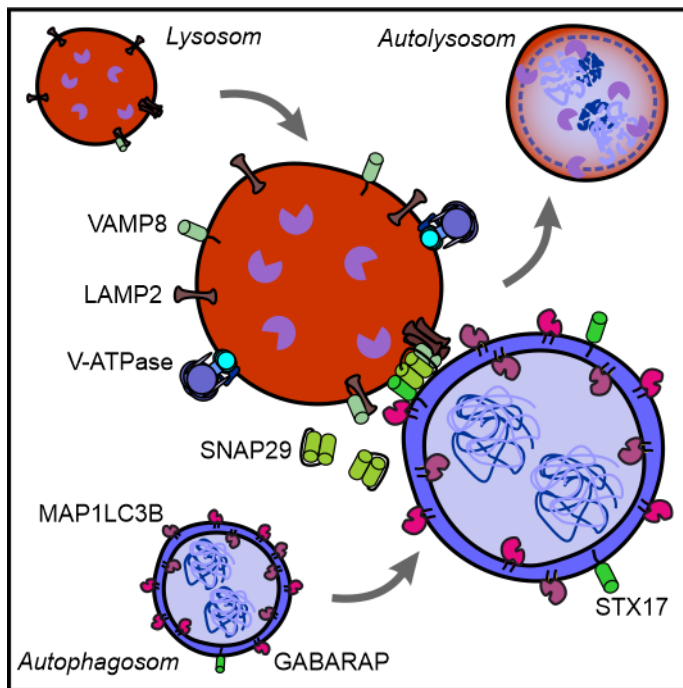


Abbildung 37 Fusion von Autophagosom und Lysosom Schematisch dargestellt ist die Fusion von Autophagosom und Lysosom. An die Membran reifer Autophagosomen lagern sich Fusions-vermittelnde Proteine wie STX17 an. An der Lysosomenmembran lokalisiert VAMP8. Zusammen mit SNAP29 vermitteln die SNARE-Proteine die Fusion von Autophagosom und Lysosom in Zusammenarbeit mit LAMP2 und GABARAP.

4.2.3 Isolation von autophagosomalen Membranen

Der *targeted approach* der Lipidomanalyse fokussierte sich auf Glycerophospholipide und hinterließ so einen blinden Fleck in Bezug auf andere Membranlipide und Membranbestandteile wie TAGs und DAGs, Ceramid, Glykolipide und auch Organell-spezifische Lipide wie Cardiolipine, die ausschließlich in der inneren Membran von Mitochondrien lokalisiert sind.

Um die Membranen besser zu markieren, wurden Autophagosomen nicht nur anhand von ATG8-Proteinen, sondern auch in Kombination mit Fluorophor-gekoppelten Lipiden isoliert (siehe Abbildung 7). Dadurch sollten autophagosomale Membranen deutlich von anderen Membranen differenziert werden. Die Zellen wurden vor der Isolation der Autophagosomen mit fluoreszenz-gekoppeltem PE inkubiert. Da MAP1LC3B vorwiegend an PE konjugiert wird, zeigt eine Kolo-kalisation beider Moleküle deutlich Autophagosomen an (Nebauer *et al.*, 2007). Die Kolo-kalisation von MAP1LC3B und PE am Durchflusszytometer zeigte eine distinkte Population von Autophagosomen. Dabei wurden bei proteinbiochemischen Untersuchungen keine Unterschiede zwischen Autophagosomen angereichert ohne oder mit Lipid festgestellt, die Aufreinigung war für beide Versuchsansätze erfolgreich (siehe Abbildung 29). Damit wurde das erste Aufreinigungsprotokoll etabliert, dass nicht nur auf Proteinen, sondern auch auf Lipiden basierte.

Die Markierung von zwei unterschiedlichen Autophagosomen-Komponenten bietet die Möglichkeit, Membranfragmente von Autophagosomen anzureichern. Die in dieser Arbeit

analysierten Phospholipide (siehe Abbildung 9) stimmen zwar mit bereits publizierten Studien über das Lipidprofil isolierter Autophagosomen aus *D. melanogaster* und *S. cerevisiae* überein (Laczko-Dobos *et al.*, 2021; Schutter *et al.*, 2020). In einem *untargeted approach*, also einer kompletten Gesamtlipidom-Analyse, können aber zusätzlich alle Lipide der Membranen erfasst werden (dos Santos & Vuckovic, 2024). Dies bringt die Notwendigkeit mit sich, zwischen den Membranen der Autophagosomen selbst und den Membranen der Substrate zu differenzieren, um falsch positive Ergebnisse zu vermeiden.

Nach erfolgreicher Isolation der Autophagosomen soll für den *untargeted approach* der Lipidomanalyse die Doppelmembran ohne Kontamination mit Cargo-Komponenten aufgereinigt werden. Dafür könnte man die Autophagosomen mittels eines Detergens aufbrechen, um den Cargo auszuwaschen, und die Membranen erneut durchflusszytometrisch aufzureinigen (Nameta *et al.*, 2016). Dies birgt allerdings das Risiko, die Lipide der Cargomembran mit denen der Autophagosomenmembranen zu vermischen und Lipide oder MAP1LC3B aus der Membran herauszuwaschen.

Ein anderer Ansatz ist die mechanische Öffnung der Autophagosomen, um Substrate auszuwaschen. Die Membranfragmente können anschließend über eine Immunopräzipitation gegen MAP1LC3B oder ein anderes ATG8-Protein angereichert werden. So könnten nur die Membranfragmente der Autophagosomen ohne eine mögliche Kontamination der Substratmembranen analysiert werden und so einen tieferen Einblick in das Lipidprofil autophagosomaler Membranen liefern.

4.3 RNA und RNA-bindende Proteine werden autophagosomal abgebaut

Neben den Lipiden, die strukturgebend für die Autophagosomenmembran sind, wurde ein weiterer Fokus dieser Arbeit auf den Cargo der Autophagosomen gelegt. Das Profil der Proteinsubstrate von Autophagosomen ist in mehreren Studien näher beschrieben (Dengjel *et al.*, 2012; Le Guerroue *et al.*, 2017; Schmitt *et al.*, 2022; Zhou *et al.*, 2022). Allerdings bleibt die RNA als autophagisches Substrat bisher kaum beachtet, obwohl schon Saha *et al.* in einer Studie von 1979 erstmals saure, im Lysosomen lokalisierte Nukleasen beschreiben (Saha *et al.*, 1979).

Nur wenige Studien widmen sich den Mechanismen, durch die RNA autophagisch degradiert wird (Kolapalli *et al.*, 2025). Der RNA-Katabolismus findet teilweise im Nukleus und vorwiegend im Zytosol statt und als Signal zum Abbau werden Modifikationen und Stranganzahl der RNA erkannt (Houseley & Tollervey, 2009). Doppelsträngige RNA wird favorisiert abgebaut, um beispielsweise einer Infektion mit Viren entgegenzuwirken – dieses Prinzip machen sich RNAi-Ansätze zu nutzen (Scherer & Rossi, 2004). Ein weiteres mögliches Degradationssignal stellen die N6-Methyladenosin-Modifikationen (m⁶A) dar (Huang *et al.*, 2021). Diese Modifikationen regulieren den Lebenszyklus eines RNA-Moleküls und werden

von bestimmten *Reader*-Proteinen erkannt (Frye *et al.*, 2018). Wird eine dieser Methylierungen als Abbausignal erkannt, initiiert sie für die Degradation der RNA die Entfernung der Kappe am 5'-Ende des RNA-Stranges. Auch die starke Verkürzung der Poly-Adenosinkette am 3'-Ende des RNA-Stranges gibt ein Signal zum Abbau. Wird eine RNA aufgrund ihrer Modifikationen als zum Abbau markiert erkannt, zerlegen Ribonukleasen die RNA-Stränge in ihre einzelnen Nukleinsäuren (Frye *et al.*, 2018). Für diesen Abbau müssen die RNA-Moleküle linearisiert vorliegen und erreichbar sein für die Nukleasen. Sind die RNA-Moleküle aggregiert oder an RBPs gebunden, können die Ribonukleasen die RNA nicht effizient abbauen (Tatosyan *et al.*, 2020). Daher werden RNA-Aggregate, RNA speichernde Organellen, RBPs mit gebundener RNA sowie einzelne RNA-Moleküle neben der klassischen Degradation über die Nukleasen im Zytosol und Zellkern über die Autophagie lysosomal abgebaut.

Im Zuge der RNautophagie wird RNA direkt ins Lysosom transferiert (siehe Abbildung 38). LAMP2C und SIDT2 binden Nukleinsäuren über die Interaktion von einer Poly-Guanin-Sequenz auf der RNA und einem Arginin-reichen Motiv auf den Proteinen. Die Nukleinsäure wird dadurch von den beiden lysosomalen Transmembranproteinen direkt ins Lumen der Lysosomen transportiert (Aizawa *et al.*, 2016; Fujiwara *et al.*, 2015). Zum anderen werden verschiedene RNA-Typen direkt oder als Bindungspartner ins Autophagosom eingeschlossen. MAP1LC3B bindet mit einem Arginin-reichen Motiv, während der RNaphagie spezifisch an die Sequenz AAUAAA auf der RNA, und schließt so die RNA in das Autophagosom ein (Hwang *et al.*, 2022). Ferner sind RBPs sowie Ribosomen und Stressgranula, die RNA speichern, Autophagiesubstrat und werden im Zuge der Ribophagie und Granulophagie ins Autophagosom eingeschlossen (siehe Abbildung 38). Passend zu diesen selektiven Autophagiemechanismen, wurden mindestens 26 Proteine innerhalb der isolierten Autophagosomen als Bestandteile von Ribonuklease-Komplexen identifiziert (siehe Tabelle 49). Die teilweise sehr stark gebundene RNA wird zusammen mit den Proteinen in das Autophagosom eingeschlossen. Proteine und RNA werden dann parallel abgebaut. Ob das Degradationssignal dieser RNA-bindenden Komplexe einzig von deren Proteinen oder auch von der gebundenen RNA stammt, ist bisher nicht näher untersucht (Buchan *et al.*, 2013; Nakatogawa, 2018).

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war die Untersuchung von Ribonukleinsäuren in Autophagosomen. Die tieferegehende Analyse der Proteomdaten von Autophagosomen, die unter basalen Bedingungen isoliert wurden, identifizierte rund 21 % der Substrate als RBPs, die gebundene RNA in die Autophagosomen einbringen konnten (Schmitt *et al.*, 2022). Ein Schwachpunkt der durchgeführten Analyse der Proteomdaten war, dass nur die GO-Termini

für die molekulare Funktion (Caudron-Herger *et al.*, 2021) und nicht die für biologische Prozesse oder zelluläre Komponenten untersucht wurden (siehe Tabelle 49). Weiterführende bioinformatische Ansätze könnten noch mehr Proteine erkennen bzw. die bereits identifizierten Proteine spezifizieren, die möglicherweise an einer selektiven RNaphagie beteiligt sind.

In weiteren Analysen war es in dieser Arbeit möglich, erstmals RNA aus Autophagosomen mit einer hohen Reinheit und Spezifität zu isolieren (siehe Abbildung 35B). Um die Untersuchung des Transkriptoms von Autophagosomen zu ermöglichen, musste RNA quantitativ aus diesen isoliert werden. Zur Qualitätsprüfung wurde die isolierte RNA auf bekannte RNA-Substrate untersucht und auf RNA-Moleküle getestet, von denen entweder bekannt ist oder von denen die Proteomdaten zeigten, dass sie nicht in Autophagosomen vorliegt.

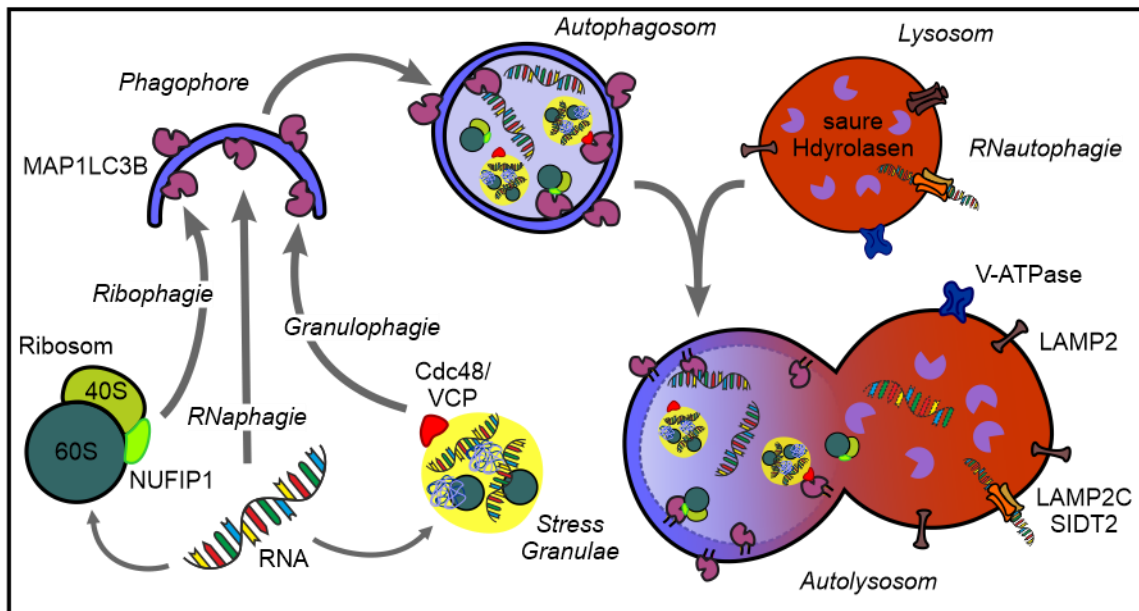


Abbildung 38 RNA als autophagischer Cargo Schematische Darstellung der möglichen Transportwege von RNA in das Lysosom. RNA wird über die Interaktion mit MAP1LC3B ins Autophagosom aufgenommen, RNaphagie genannt. RNA-Moleküle werden indirekt über die Ribophagie und Granulophagie im Autophagosom eingeschlossen. RNA wird auch über die RNautophagie direkt ins Lysosom transferiert über die Interaktion mit LAMP2C und SIDT2. Dies ist ein mit der CMA verwandter Prozess. Schlussendlich wird die RNA im Lysosom von sauren Nukleasen abgebaut.

Interessant bei der Qualitätskontrolle der isolierten RNA aus den Autophagosomen war vor allem die Detektion des SRP-Komplexes mit seiner interagierenden RNA 7SL (siehe Abbildung 35). SRP liegt im Zytoplasma vor und bindet an ein Signalpeptid an frisch transkribierten Polypeptiden, die noch mit dem Ribosom assoziiert sind. Durch die Bindung von SRP an das Signalpeptid wird der gesamte Proteinkomplex ans ER lokalisiert, da SRP mit seinem Rezeptor an der ER-Membran interagiert (Nyathi *et al.*, 2013). Damit ist SRP mitverantwortlich für die Transkription transmembraner und membranassoziierter Proteine in

die ER-Membran. Während der Translokation des Ribosomenkomplexes zur ER-Membran interagiert der SRP-Komplex mit beiden ribosomalen Untereinheiten (Wild *et al.*, 2002). Der Nachweis von SRP bedeutet entweder, dass es während seiner Interaktion mit Ribosomen abgebaut wird, dass es möglicherweise ein spezifisches autophagisches Substrat ist oder dass es während der ER-Phagie ins Autophagosom eingeschlossen wird, wenn es mit seinem dort lokalisierten Rezeptor interagiert.

Neben den RNA-Isolationen aus Autophagosomen, die in dieser Arbeit vorgestellt wurden, veröffentlichte jüngst eine Studie das Profil der mRNA-Moleküle mit m⁶A-Modifikationen aus Autophagosomen, die mit dem Isolationsprotokoll angereichert wurden (Ho-Xuan *et al.*, 2025). Ähnlich wie das in dieser Arbeit etablierte RNA-Isolationsprotokoll, wird auch die RNA in der Studie von Ho-Xuan *et al.* mit TriReagent/Trizol, Chloroform und Isopropanol präzipitiert. Allerdings sind die Inkubations- und Zentrifugationszeiten nach der Präzipitation mit Isopropanol sehr viel länger gewählt. Anstatt die RNA 10 min wie in dieser Arbeit zu präzipitieren, wird die RNA über Nacht präzipitiert. Und anstelle einer 10 min Zentrifugation wird die präzipitierte RNA in 60 min bei einer geringeren g-Zahl pelletiert (Ho-Xuan *et al.*, 2025). Auch wenn sich die verlängerte Präzipitation nicht nennenswert auf die isolierte RNA-Menge in ng / 10000 Autophagosomen auswirkt, scheint sie doch den Vorteil zu haben, die isolierte RNA über einen Bioanalyser darstellen zu können. Während die in dieser Arbeit isolierte RNA im Agarosegel mit RNA-Farbstoff nicht visualisierbar war, beschreiben Ho-Xuan *et al.* ein distinktes RNA-Profil der Autophagosomen im Vergleich zum Gesamtzellysat, welches auf Selektionsmechanismen hindeutet. So scheint bspw. die große Untereinheit der Ribosomen in den Autophagosomen abgereichert zu sein im Vergleich zur kleinen ribosomalen Untereinheit (Ho-Xuan *et al.*, 2025). Zudem zeigt die Studie, dass m⁶N-RNA-Moleküle von ihren *Reader*-Proteinen unter verschiedenen Wachstumsbedingungen selektiv der Autophagie zugeführt werden. Damit wird zum ersten Mal ein adaptierbarer RNaphagie-Mechanismus beschrieben.

Die Studie von Ho-Xuan *et al.* sowie die Ergebnisse dieser Arbeit belegen, dass RNA aus mit dem Isolationsprotokoll angereicherten Autophagosomen über eine Trireagent/Trizol-Fällung erfolgreich präzipitiert und analysiert werden kann. Die Ergebnisse der Studie von Hu-Xuan *et al.* belegen überdies, dass es Selektionsmechanismen für den spezifischen autophagischen Abbau bestimmter RNA-Moleküle gibt. Dies kann als Grundlage für RNA-Sequenzierungen und -Analysen genutzt werden, um das genaue RNA-Substratprofil von Autophagosomen zu bestimmen. Auf diese Weise können Sequenzen und Modifikationen identifiziert werden, die als Degradationssignal fungieren, und die RNA-Typen identifiziert werden, die autophagosomal unter verschiedenen Autophagie-, Stress- und pathologischen Bedingungen abgebaut werden.

4.3.1 Das Lipidprofil von Autophagosomen im Kontext der Substrat- und der Fusionspezifität

All die in Kapitel 4.3 beschriebenen Mechanismen, um RNA ins Lysosom zu transportieren, zielen auf die Degradation der RNA im Lysosom ab. Neben der degradativen Autophagie können Proteinkomplexe und RBPs auch über die sekretorische Autophagie aus der Zelle heraus transportiert werden. Inwieweit die innere Membran der Autophagosomen dabei stabil bleibt, ist nicht bekannt (Ponpuak *et al*, 2015). MAP1LC3B spielt zum einen eine Rolle bei der stetigen Beladung von MVBs zur Synthese von EVs (extrazelluläre Vesikel) und deren Beladung mit RBPs. Hier dient das Substrat, das aus der Zelle sekretiert wird, der interzellulären Kommunikation. Die EVs werden vorrangig mit RBPs und verschiedenen RNA-Spezies beladen (Debnath & Leidal, 2022). Wenn die Autophagie bzw. die lysosomale Degradation im pathologischen Kontext gestört ist, kann die sekretorische Autophagie gesteigert werden, und MAP1LC3B dekoriert dann Autophagosomen, die mit der Plasmamembran fusionieren (Nakamura *et al*, 2024; Solvik *et al*, 2022; Xu *et al*, 2018b). Inwieweit eine Fusion mit späten Endosomen und MVBs für die sekretorische Autophagie und die Verschmelzung des Autophagosoms mit der Plasmamembran notwendig ist, muss noch endgültig geklärt (Debnath & Leidal, 2022; Li *et al*, 2024; New & Thomas, 2019).

Während an der degradativen Autophagie vorwiegend STX17 und RAB7 beteiligt sind, sind für die sekretorische Autophagie vorrangig SEC22B und RAB8A von Bedeutung (Li *et al*, 2024). SEC22B (*SEC22 homolog B, vesicle trafficking protein*) ist ein SNARE-Protein, das unter anderem für den Vesikeltransfer vom ER zum Golgi nötig ist (Sun *et al*, 2020). Es weist eine Transmembranregion auf und bevorzugt damit wahrscheinlich ein distinktes Lipidprofil der Membran, in die es integriert, ähnlich wie die ATG2-Proteine (Osawa *et al*, 2020). Der Mechanismus, der entscheidet, wann die degradative und wann die sekretorische Autophagie greift, ist bisher nicht genau geklärt.

Interessanterweise ist nicht nur MAP1LC3B ein entscheidender Faktor für die sekretorische Autophagie (Leidal & Debnath, 2021). Ohne die neutrale Sphingomyelinase findet keine Sezernierung der Autophagosomen und MVBs statt. Die sekretorische Autophagie ist also an den SM-Metabolismus in der Plasmamembran gekoppelt und beweist damit, wie wichtig das Lipidprofil von Autophagosomen und deren Zielorganell für ihre Funktionalität ist (Leidal *et al*, 2020).

Es ist beschrieben, dass sich degradative und sekretorische Autophagosomen anhand der Proteine unterscheiden, mit denen sie dekoriert und mit denen sie beladen sind. Damit sind sie durch das etablierte Isolationsprotokoll am Durchflusszytometer theoretisch voneinander zu unterscheiden. Die Untersuchung der Proteine und RNA-Spezies der unterschiedlichen Autophagosomen könnte Selektionsprozesse und Autophagierezeptoren spezifisch für die sekretorische oder die degradative Autophagie identifizieren. Außerdem wäre ein weiterer

interessanter Punkt, ob sich die Lipidprofile der beiden Populationen voneinander unterscheiden, und ob ein verändertes Lipidprofil einen Einfluss auf den eingeschlagenen Autophagieprozess ausübt.

5 Referenzen

5.1 Literaturverzeichnis

Agudo-Canalejo J, Schultz SW, Chino H, Migliano SM, Saito C, Koyama-Honda I, Stenmark H, Brech A, May AI, Mizushima N *et al* (2021) Wetting regulates autophagy of phase-separated compartments and the cytosol. *Nature* 591: 142-146

Aizawa S, Fujiwara Y, Contu VR, Hase K, Takahashi M, Kikuchi H, Kabuta C, Wada K, Kabuta T (2016) Lysosomal putative RNA transporter SIDT2 mediates direct uptake of RNA by lysosomes. *Autophagy* 12: 565-578

Alemu EA, Lamark T, Torgersen KM, Birgisdottir AB, Larsen KB, Jain A, Olsvik H, Overvatn A, Kirkin V, Johansen T (2012) ATG8 family proteins act as scaffolds for assembly of the ULK complex: sequence requirements for LC3-interacting region (LIR) motifs. *J Biol Chem* 287: 39275-39290

Ali O, Szabo A (2023) Review of Eukaryote Cellular Membrane Lipid Composition, with Special Attention to the Fatty Acids. *Int J Mol Sci* 24

Allwright M, Guennewig B, Hoffmann AE, Rohleder C, Jieu B, Chung LH, Jiang YC, Lemos Wimmer BF, Qi Y, Don AS *et al* (2024) ReTimeML: a retention time predictor that supports the LC-MS/MS analysis of sphingolipids. *Sci Rep* 14: 4375

Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ (1990) Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* 215: 403-410

Aman Y, Schmauck-Medina T, Hansen M, Morimoto RI, Simon AK, Bjedov I, Palikaras K, Simonsen A, Johansen T, Tavernarakis N *et al* (2021) Autophagy in healthy aging and disease. *Nat Aging* 1: 634-650

Andrejeva G, Gowan S, Lin G, Wong Te Fong AL, Shamsaei E, Parkes HG, Mui J, Raynaud FI, Asad Y, Vizcay-Barrena G *et al* (2020) De novo phosphatidylcholine synthesis is required for autophagosome membrane formation and maintenance during autophagy. *Autophagy* 16: 1044-1060

Axe EL, Walker SA, Manifava M, Chandra P, Roderick HL, Habermann A, Griffiths G, Ktistakis NT (2008) Autophagosome formation from membrane compartments enriched in phosphatidylinositol 3-phosphate and dynamically connected to the endoplasmic reticulum. *J Cell Biol* 182: 685-701

Baker RW, Hughson FM (2016) Chaperoning SNARE assembly and disassembly. *Nat Rev Mol Cell Biol* 17: 465-479

Baldwin SA, Yao SY, Hyde RJ, Ng AM, Foppolo S, Barnes K, Ritzel MW, Cass CE, Young JD (2005) Functional characterization of novel human and mouse equilibrative nucleoside transporters (hENT3 and mENT3) located in intracellular membranes. *J Biol Chem* 280: 15880-15887

Bandyopadhyay U, Kaushik S, Varticovski L, Cuervo AM (2008) The chaperone-mediated autophagy receptor organizes in dynamic protein complexes at the lysosomal membrane. *Mol Cell Biol* 28: 5747-5763

Barenholz Y, Thompson TE (1999) Sphingomyelin: biophysical aspects. *Chem Phys Lipids* 102: 29-34

Bartz R, Li WH, Venables B, Zehmer JK, Roth MR, Welti R, Anderson RG, Liu P, Chapman KD (2007) Lipidomics reveals that adiposomes store ether lipids and mediate phospholipid traffic. *J Lipid Res* 48: 837-847

Bekbulat F, Schmitt D, Feldmann A, Huesmann H, Eimer S, Juretschke T, Beli P, Behl C, Kern A (2020) RAB18 Loss Interferes With Lipid Droplet Catabolism and Provokes Autophagy Network Adaptations. *J Mol Biol* 432: 1216-1234

Bhujabal Z, Birgisdottir AB, Sjøttem E, Brenne HB, Overvatn A, Habisov S, Kirkin V, Lamark T, Johansen T (2017) FKBP8 recruits LC3A to mediate Parkin-independent mitophagy. *EMBO Rep* 18: 947-961

Bieber A, Capitanio C, Erdmann PS, Fiedler F, Beck F, Lee CW, Li D, Hummer G, Schulman BA, Baumeister W *et al* (2022) In situ structural analysis reveals membrane shape transitions during autophagosome formation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 119: e2209823119

Binotti B, Jahn R, Perez-Lara A (2021) An overview of the synaptic vesicle lipid composition. *Arch Biochem Biophys* 709: 108966

Binotti B, Ninov M, Cepeda AP, Ganzella M, Matti U, Riedel D, Urlaub H, Sambandan S, Jahn R (2024) ATG9 resides on a unique population of small vesicles in presynaptic nerve terminals. *Autophagy* 20: 883-901

Birgisdottir AB, Lamark T, Johansen T (2013) The LIR motif - crucial for selective autophagy. *J Cell Sci* 126: 3237-3247

Bjorkoy G, Lamark T, Brech A, Outzen H, Perander M, Overvatn A, Stenmark H, Johansen T (2005) p62/SQSTM1 forms protein aggregates degraded by autophagy and has a protective effect on huntingtin-induced cell death. *J Cell Biol* 171: 603-614

Bogurcu-Seidel N, Ritschel N, Acker T, Nemeth A (2023) Beyond ribosome biogenesis: noncoding nucleolar RNAs in physiology and tumor biology. *Nucleus* 14: 2274655

Borbolis F, Syntichaki P (2015) Cytoplasmic mRNA turnover and ageing. *Mech Ageing Dev* 152: 32-42

Bozic M, van den Bekerom L, Milne BA, Goodman N, Roberston L, Prescott AR, Macartney TJ, Dawe N, McEwan DG (2020) A conserved ATG2-GABARAP family interaction is critical for phagophore formation. *EMBO Rep* 21: e48412

Broadbent DG, McEwan CM, Tsang TM, Poole DM, Naylor BC, Price JC, Schmidt JC, Andersen JL (2023) The formation of ubiquitin rich condensates triggers recruitment of the ATG9A lipid transfer complex to initiate basal autophagy. *bioRxiv*

Brugger B, Sandhoff R, Wegehangel S, Gorgas K, Malsam J, Helms JB, Lehmann WD, Nickel W, Wieland FT (2000) Evidence for segregation of sphingomyelin and cholesterol during formation of COPI-coated vesicles. *J Cell Biol* 151: 507-518

Buchan JR, Kolaitis RM, Taylor JP, Parker R (2013) Eukaryotic stress granules are cleared by autophagy and Cdc48/VCP function. *Cell* 153: 1461-1474

Bunk J, Prieto Huarcaya S, Drobny A, Dobert JP, Walther L, Rose-John S, Arnold P, Zunke F (2021) Cathepsin D Variants Associated With Neurodegenerative Diseases Show Dysregulated Functionality and Modified alpha-Synuclein Degradation Properties. *Front Cell Dev Biol* 9: 581805

Burnett SF, Farre JC, Nazarko TY, Subramani S (2015) Peroxisomal Pex3 activates selective autophagy of peroxisomes via interaction with the pexophagy receptor Atg30. *J Biol Chem* 290: 8623-8631

Calado RT, Young NS (2009) Telomere diseases. *N Engl J Med* 361: 2353-2365

Calo D, Eichler J (2011) Crossing the membrane in Archaea, the third domain of life. *Biochim Biophys Acta* 1808: 885-891

- Campomenosi P, Salis S, Lindqvist C, Mariani D, Nordstrom T, Acquati F, Taramelli R (2006) Characterization of RNASET2, the first human member of the Rh/T2/S family of glycoproteins. *Arch Biochem Biophys* 449: 17-26
- Cao Y, Wen J, Li Y, Chen W, Wu Y, Li J, Huang G (2019) Uric acid and sphingomyelin enhance autophagy in iPS cell-originated cardiomyocytes through lncRNA MEG3/miR-7-5p/EGFR axis. *Artif Cells Nanomed Biotechnol* 47: 3774-3785
- Capitano C, Bieber A, Wilfling F (2023) How Membrane Contact Sites Shape the Phagophore. *Contact (Thousand Oaks)* 6: 25152564231162495
- Carsana EV, Lunghi G, Prioni S, Mauri L, Loberto N, Prinetti A, Zucca FA, Bassi R, Sonnino S, Chiricozzi E *et al* (2022) Massive Accumulation of Sphingomyelin Affects the Lysosomal and Mitochondria Compartments and Promotes Apoptosis in Niemann-Pick Disease Type A. *J Mol Neurosci* 72: 1482-1499
- Caudron-Herger M, Jansen RE, Wassmer E, Diederichs S (2021) RBP2GO: a comprehensive pan-species database on RNA-binding proteins, their interactions and functions. *Nucleic Acids Res* 49: D425-D436
- Cebollero E, van der Vaart A, Zhao M, Rieter E, Klionsky DJ, Helms JB, Reggiori F (2012) Phosphatidylinositol-3-phosphate clearance plays a key role in autophagosome completion. *Curr Biol* 22: 1545-1553
- Chakraborty D, Felzen V, Hiebel C, Sturner E, Perumal N, Manicam C, Sehn E, Grus F, Wolfrum U, Behl C (2019) Enhanced autophagic-lysosomal activity and increased BAG3-mediated selective macroautophagy as adaptive response of neuronal cells to chronic oxidative stress. *Redox Biol* 24: 101181
- Chandrasekaran V, Juszkiwicz S, Choi J, Puglisi JD, Brown A, Shao S, Ramakrishnan V, Hegde RS (2019) Mechanism of ribosome stalling during translation of a poly(A) tail. *Nat Struct Mol Biol* 26: 1132-1140
- Chen RH, Chen YH, Huang TY (2019) Ubiquitin-mediated regulation of autophagy. *J Biomed Sci* 26: 80
- Chiang HL, Terlecky SR, Plant CP, Dice JF (1989) A role for a 70-kilodalton heat shock protein in lysosomal degradation of intracellular proteins. *Science* 246: 382-385
- Chiduzza GN, Garza-Garcia A, Almacellas E, De Tito S, Pye VE, van Vliet AR, Cherepanov P, Tooze SA (2024) ATG9B is a tissue-specific homotrimeric lipid scramblase that can compensate for ATG9A. *Autophagy* 20: 557-576
- Choi J, Jang H, Xuan Z, Park D (2024) Emerging roles of ATG9/ATG9A in autophagy: implications for cell and neurobiology. *Autophagy* 20: 2373-2387
- Chowdhury S, Otomo C, Leitner A, Ohashi K, Aebersold R, Lander GC, Otomo T (2018) Insights into autophagosome biogenesis from structural and biochemical analyses of the ATG2A-WIPI4 complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 115: E9792-E9801
- Cohen-Kaplan V, Livneh I, Avni N, Fabre B, Ziv T, Kwon YT, Ciechanover A (2016) p62- and ubiquitin-dependent stress-induced autophagy of the mammalian 26S proteasome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 113: E7490-E7499
- Companioni O, Mir C, Garcia-Mayea Y, ME LL (2021) Targeting Sphingolipids for Cancer Therapy. *Front Oncol* 11: 745092
- Contu VR, Sakai R, Fujiwara Y, Kabuta C, Wada K, Kabuta T (2023) Nucleic acid uptake occurs independent of lysosomal acidification but dependent on ATP consumption during RNautophagy/DNautophagy. *Biochem Biophys Res Commun* 644: 105-111

- Corbo JH, Chung J (2024) Mechanisms of lipid droplet degradation. *Curr Opin Cell Biol* 90: 102402
- Corcelle-Termeau E, Vindelov SD, Hamalisto S, Mograbi B, Keldsbo A, Brasen JH, Favaro E, Adam D, Szyniarowski P, Hofman P *et al* (2016) Excess sphingomyelin disturbs ATG9A trafficking and autophagosome closure. *Autophagy* 12: 833-849
- Cossarizza A, Chang HD, Radbruch A, Acs A, Adam D, Adam-Klages S, Agace WW, Aghaeepour N, Akdis M, Allez M *et al* (2019) Guidelines for the use of flow cytometry and cell sorting in immunological studies (second edition). *Eur J Immunol* 49: 1457-1973
- Cuervo AM, Wong E (2014) Chaperone-mediated autophagy: roles in disease and aging. *Cell Res* 24: 92-104
- Dall'Armi C, Devereaux KA, Di Paolo G (2013) The role of lipids in the control of autophagy. *Curr Biol* 23: R33-45
- Damgaard RB (2021) The ubiquitin system: from cell signalling to disease biology and new therapeutic opportunities. *Cell Death Differ* 28: 423-426
- Danieli A, Vucak G, Baccarini M, Martens S (2023) Sequestration of translation initiation factors in p62 condensates. *Cell Rep* 42: 113583
- De Duve C, Wattiaux R (1966) Functions of lysosomes. *Annu Rev Physiol* 28: 435-492
- de la Ballina LR, Munson MJ, Simonsen A (2020) Lipids and Lipid-Binding Proteins in Selective Autophagy. *J Mol Biol* 432: 135-159
- Debnath J, Leidal AM (2022) Secretory autophagy during lysosome inhibition (SALI). *Autophagy* 18: 2498-2499
- Dengjel J, Hoyer-Hansen M, Nielsen MO, Eisenberg T, Harder LM, Schandorff S, Farkas T, Kirkegaard T, Becker AC, Schroeder S *et al* (2012) Identification of autophagosome-associated proteins and regulators by quantitative proteomic analysis and genetic screens. *Mol Cell Proteomics* 11: M111 014035
- Dikic I, Schulman BA (2023) An expanded lexicon for the ubiquitin code. *Nat Rev Mol Cell Biol* 24: 273-287
- Dooley HC, Razi M, Polson HE, Girardin SE, Wilson MI, Tooze SA (2014) WIPI2 links LC3 conjugation with PI3P, autophagosome formation, and pathogen clearance by recruiting Atg12-5-16L1. *Mol Cell* 55: 238-252
- dos Santos ACA, Vuckovic D (2024) Current status and advances in untargeted LC-MS tissue lipidomics studies in cardiovascular health. *Trac-Trend Anal Chem* 170
- Drizyte-Miller K, Schott MB, McNiven MA (2020) Lipid Droplet Contacts With Autophagosomes, Lysosomes, and Other Degradative Vesicles. *Contact (Thousand Oaks)* 3: 1-13
- Dupont N, Chauhan S, Arko-Mensah J, Castillo EF, Masedunskas A, Weigert R, Robenek H, Proikas-Cezanne T, Deretic V (2014) Neutral lipid stores and lipase PNPLA5 contribute to autophagosome biogenesis. *Curr Biol* 24: 609-620
- Ebner P, Poetsch I, Deszcz L, Hoffmann T, Zuber J, Ikeda F (2018) The IAP family member BRUCE regulates autophagosome-lysosome fusion. *Nat Commun* 9: 599
- Emoto K, Umeda M (2000) An essential role for a membrane lipid in cytokinesis. Regulation of contractile ring disassembly by redistribution of phosphatidylethanolamine. *J Cell Biol* 149: 1215-1224

- Feldmann A, Bekbulat F, Huesmann H, Ulbrich S, Tatzelt J, Behl C, Kern A (2017) The RAB GTPase RAB18 modulates macroautophagy and proteostasis. *Biochem Biophys Res Commun* 486: 738-743
- Fiddler JL, Clarke SL (2021) Evaluation of candidate reference genes for quantitative real-time PCR analysis in a male rat model of dietary iron deficiency. *Genes Nutr* 16: 17
- Frye M, Harada BT, Behm M, He C (2018) RNA modifications modulate gene expression during development. *Science* 361: 1346-1349
- Fujiwara Y, Furuta A, Kikuchi H, Aizawa S, Hatanaka Y, Konya C, Uchida K, Yoshimura A, Tamai Y, Wada K *et al* (2013) Discovery of a novel type of autophagy targeting RNA. *Autophagy* 9: 403-409
- Fujiwara Y, Hase K, Wada K, Kabuta T (2015) An RNautophagy/DNautophagy receptor, LAMP2C, possesses an arginine-rich motif that mediates RNA/DNA-binding. *Biochem Biophys Res Commun* 460: 281-286
- Fujiwara Y, Oroku K, Zhou Y, Takahashi M, Katayama T, Wada K, Tsutsumi N, Sato T, Kabuta T (2024) Expression of RNautophagy/DNautophagy-related genes is regulated under control of an innate immune receptor. *RNA Biol* 21: 1-9
- Gabande-Rodriguez E, Boya P, Labrador V, Dotti CG, Ledesma MD (2014) High sphingomyelin levels induce lysosomal damage and autophagy dysfunction in Niemann Pick disease type A. *Cell Death Differ* 21: 864-875
- Gallagher SR, Desjardins PR (2008) Quantitation of DNA and RNA with absorption and fluorescence spectroscopy. *Curr Protoc Protein Sci* Appendix 3: Appendix 4K
- Gamerding M, Carra S, Behl C (2011) Emerging roles of molecular chaperones and co-chaperones in selective autophagy: focus on BAG proteins. *J Mol Med (Berl)* 89: 1175-1182
- Gamerding M, Hajieva P, Kaya AM, Wolfrum U, Hartl FU, Behl C (2009) Protein quality control during aging involves recruitment of the macroautophagy pathway by BAG3. *EMBO J* 28: 889-901
- Ge L, Melville D, Zhang M, Schekman R (2013) The ER-Golgi intermediate compartment is a key membrane source for the LC3 lipidation step of autophagosome biogenesis. *Elife* 2: e00947
- Gewaid H, Aoyagi H, Arita M, Watashi K, Suzuki R, Sakai S, Kumagai K, Yamaji T, Fukasawa M, Kato F *et al* (2020) Sphingomyelin Is Essential for the Structure and Function of the Double-Membrane Vesicles in Hepatitis C Virus RNA Replication Factories. *J Virol* 94
- Ghadami S, Dellinger K (2023) The lipid composition of extracellular vesicles: applications in diagnostics and therapeutic delivery. *Front Mol Biosci* 10: 1198044
- Gomez-Sanchez R, Tooze SA, Reggiori F (2021) Membrane supply and remodeling during autophagosome biogenesis. *Curr Opin Cell Biol* 71: 112-119
- Gonzalez-Santamarta M, Bouvier C, Rodriguez MS, Xolalpa W (2022) Ubiquitin-chains dynamics and its role regulating crucial cellular processes. *Semin Cell Dev Biol* 132: 155-170
- Guardia CM, Tan XF, Lian T, Rana MS, Zhou W, Christenson ET, Lowry AJ, Faraldo-Gomez JD, Bonifacino JS, Jiang J *et al* (2020) Structure of Human ATG9A, the Only Transmembrane Protein of the Core Autophagy Machinery. *Cell Rep* 31: 107837
- Guenther GG, Peralta ER, Rosales KR, Wong SY, Siskind LJ, Edinger AL (2008) Ceramide starves cells to death by downregulating nutrient transporter proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105: 17402-17407

Hailey DW, Rambold AS, Satpute-Krishnan P, Mitra K, Sougrat R, Kim PK, Lippincott-Schwartz J (2010) Mitochondria supply membranes for autophagosome biogenesis during starvation. *Cell* 141: 656-667

Hanke JH, Gardner JP, Dow RL, Changelian PS, Brissette WH, Weringer EJ, Pollok BA, Connelly PA (1996) Discovery of a novel, potent, and Src family-selective tyrosine kinase inhibitor. Study of Lck- and FynT-dependent T cell activation. *J Biol Chem* 271: 695-701

Hara T, Takamura A, Kishi C, Iemura S, Natsume T, Guan JL, Mizushima N (2008) FIP200, a ULK-interacting protein, is required for autophagosome formation in mammalian cells. *J Cell Biol* 181: 497-510

Harayama T, Riezman H (2018) Understanding the diversity of membrane lipid composition. *Nat Rev Mol Cell Biol* 19: 281-296

Hartmann D, Lucks J, Fuchs S, Schiffmann S, Schreiber Y, Ferreiros N, Merckens J, Marschalek R, Geisslinger G, Grosch S (2012) Long chain ceramides and very long chain ceramides have opposite effects on human breast and colon cancer cell growth. *Int J Biochem Cell Biol* 44: 620-628

Hase K, Fujiwara Y, Kikuchi H, Aizawa S, Hakuno F, Takahashi S, Wada K, Kabuta T (2015) RNautophagy/DNautophagy possesses selectivity for RNA/DNA substrates. *Nucleic Acids Res* 43: 6439-6449

Heckmann BL, Teubner BJW, Tummers B, Boada-Romero E, Harris L, Yang M, Guy CS, Zakharenko SS, Green DR (2019) LC3-Associated Endocytosis Facilitates beta-Amyloid Clearance and Mitigates Neurodegeneration in Murine Alzheimer's Disease. *Cell* 178: 536-551 e514

Heride C, Urbe S, Clague MJ (2014) Ubiquitin code assembly and disassembly. *Curr Biol* 24: R215-220

Hiebel C, Kromm T, Stark M, Behl C (2014) Cannabinoid receptor 1 modulates the autophagic flux independent of mTOR- and BECLIN1-complex. *J Neurochem* 131: 484-497

Hille-Rehfeld A (1995) Mannose 6-phosphate receptors in sorting and transport of lysosomal enzymes. *Biochim Biophys Acta* 1241: 177-194

Hirata E, Ohya Y, Suzuki K (2017) Atg4 plays an important role in efficient expansion of autophagic isolation membranes by cleaving lipidated Atg8 in *Saccharomyces cerevisiae*. *PLoS One* 12: e0181047

Ho-Xuan H, Bruckmann A, Natali L, Prieto-Garcia C, Stuke JFM, Brunello L, Vicente A, Pfab A, Wesseling H, Cano-Franco S *et al* (2025) YTHDF proteins and m(6)A-RNA clients undergo autophagic turnover during contact inhibition. *Cell Rep* 44: 116188

Hollenstein DM, Kraft C (2020) Autophagosomes are formed at a distinct cellular structure. *Curr Opin Cell Biol* 65: 50-57

Holzer E, Martens S, Tulli S (2024) The Role of ATG9 Vesicles in Autophagosome Biogenesis. *J Mol Biol* 436: 168489

Homma Y, Hiragi S, Fukuda M (2021) Rab family of small GTPases: an updated view on their regulation and functions. *FEBS J* 288: 36-55

Houghton OH, Mizielińska S, Gomez-Suaga P (2022) The Interplay Between Autophagy and RNA Homeostasis: Implications for Amyotrophic Lateral Sclerosis and Frontotemporal Dementia. *Front Cell Dev Biol* 10: 838402

Houseley J, Tollervey D (2009) The many pathways of RNA degradation. *Cell* 136: 763-776

- Huang W, Chen TQ, Fang K, Zeng ZC, Ye H, Chen YQ (2021) N6-methyladenosine methyltransferases: functions, regulation, and clinical potential. *J Hematol Oncol* 14: 117
- Huang X, Zhang J, Yao J, Mi N, Yang A (2025) Phase separation of p62: roles and regulations in autophagy. *Trends Cell Biol*
- Hwang HJ, Ha H, Lee BS, Kim BH, Song HK, Kim YK (2022) LC3B is an RNA-binding protein to trigger rapid mRNA degradation during autophagy. *Nat Commun* 13: 1436
- Imai K, Hao F, Fujita N, Tsuji Y, Oe Y, Araki Y, Hamasaki M, Noda T, Yoshimori T (2016) Atg9A trafficking through the recycling endosomes is required for autophagosome formation. *J Cell Sci* 129: 3781-3791
- Ishida Y, Nayak S, Mindell JA, Grabe M (2013) A model of lysosomal pH regulation. *J Gen Physiol* 141: 705-720
- Itakura E, Kishi-Itakura C, Mizushima N (2012) The hairpin-type tail-anchored SNARE syntaxin 17 targets to autophagosomes for fusion with endosomes/lysosomes. *Cell* 151: 1256-1269
- Jacquemyn J, Cascalho A, Goodchild RE (2017) The ins and outs of endoplasmic reticulum-controlled lipid biosynthesis. *EMBO Rep* 18: 1905-1921
- Jacquet M, Guittaut M, Fraichard A, Despouy G (2021) The functions of Atg8-family proteins in autophagy and cancer: linked or unrelated? *Autophagy* 17: 599-611
- Jarc E, Petan T (2019) Lipid Droplets and the Management of Cellular Stress. *Yale J Biol Med* 92: 435-452
- Jensen LE, Rao S, Schuschnig M, Cada AK, Martens S, Hummer G, Hurley JH (2022) Membrane curvature sensing and stabilization by the autophagic LC3 lipidation machinery. *Sci Adv* 8: eadd1436
- Jin M, Liu X, Klionsky DJ (2013) SnapShot: Selective autophagy. *Cell* 152: 368-368 e362
- Judith D, Jefferies HBJ, Boeing S, Frith D, Snijders AP, Tooze SA (2019) ATG9A shapes the forming autophagosome through Arfaptin 2 and phosphatidylinositol 4-kinase IIIbeta. *J Cell Biol* 218: 1634-1652
- Jung HY, Wang X, Jun S, Park JI (2013) Dyrk2-associated EDD-DDB1-VprBP E3 ligase inhibits telomerase by TERT degradation. *J Biol Chem* 288: 7252-7262
- Juretschke T, Beli P (2021) Causes and consequences of DNA damage-induced autophagy. *Matrix Biol* 100-101: 39-53
- Kabaya Y, Mizushima N, Ueno T, Yamamoto A, Kirisako T, Noda T, Kominami E, Ohsumi Y, Yoshimori T (2000) LC3, a mammalian homologue of yeast Apg8p, is localized in autophagosome membranes after processing. *EMBO J* 19: 5720-5728
- Kageyama S, Gudmundsson SR, Sou YS, Ichimura Y, Tamura N, Kazuno S, Ueno T, Miura Y, Noshiro D, Abe M *et al* (2021) p62/SQSTM1-droplet serves as a platform for autophagosome formation and anti-oxidative stress response. *Nat Commun* 12: 16
- Kakuta S, Yamaguchi J, Suzuki C, Sasaki M, Kazuno S, Uchiyama Y (2017) Small GTPase Rab1B is associated with ATG9A vesicles and regulates autophagosome formation. *FASEB J* 31: 3757-3773
- Karanasios E, Walker SA, Okkenhaug H, Manifava M, Hummel E, Zimmermann H, Ahmed Q, Domart MC, Collinson L, Ktistakis NT (2016) Autophagy initiation by ULK complex assembly on ER tubulovesicular regions marked by ATG9 vesicles. *Nat Commun* 7: 12420

- Kaur N, de la Ballina LR, Haukaas HS, Torgersen ML, Radulovic M, Munson MJ, Sabirsh A, Stenmark H, Simonsen A, Carlsson SR *et al* (2023) TECPR1 is activated by damage-induced sphingomyelin exposure to mediate noncanonical autophagy. *EMBO J* 42: e113105
- Kern A, Behl C (2020) On-demand autophagic network adaptations upon limited lipid availability. *Autophagy* 16: 1348-1350
- Kimura S, Noda T, Yoshimori T (2008) Dynein-dependent movement of autophagosomes mediates efficient encounters with lysosomes. *Cell Struct Funct* 33: 109-122
- Kinoshita M, Kato S (2008) Intermolecular interaction of phosphatidylinositol with the lipid raft molecules sphingomyelin and cholesterol. *Biophysics (Nagoya-shi)* 4: 1-9
- Kishi-Itakura C, Koyama-Honda I, Itakura E, Mizushima N (2014) Ultrastructural analysis of autophagosome organization using mammalian autophagy-deficient cells. *J Cell Sci* 127: 4089-4102
- Klecker T, Braun RJ, Westermann B (2017) Lipid Droplets Guard Mitochondria during Autophagy. *Dev Cell* 42: 1-2
- Klionsky DJ, Abdel-Aziz AK, Abdelfatah S, Abdellatif M, Abdoli A, Abel S, Abeliovich H, Abildgaard MH, Abudu YP, Acevedo-Arozena A *et al* (2021) Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy (4th edition)(1). *Autophagy* 17: 1-382
- Knorr RL, Nakatogawa H, Ohsumi Y, Lipowsky R, Baumgart T, Dimova R (2014) Membrane morphology is actively transformed by covalent binding of the protein Atg8 to PE-lipids. *PLoS One* 9: e115357
- Kolapalli SP, Nielsen TM, Frankel LB (2025) Post-transcriptional dynamics and RNA homeostasis in autophagy and cancer. *Cell Death Differ* 32: 27-36
- Koontz L (2014) TCA precipitation. *Methods Enzymol* 541: 3-10
- Koressaar T, Lepamets M, Kaplinski L, Raime K, Andreson R, Remm M (2018) Primer3_masker: integrating masking of template sequence with primer design software. *Bioinformatics* 34: 1937-1938
- Koressaar T, Remm M (2007) Enhancements and modifications of primer design program Primer3. *Bioinformatics* 23: 1289-1291
- Korfhage JL, Wan N, Elhan H, Kauffman L, Pineda M, Fuller DM, Thiam AR, Reinisch KM, Melia TJ (2023) ATG2A-mediated bridge-like lipid transport regulates lipid droplet accumulation. *bioRxiv*
- Korolchuk VI, Mansilla A, Menzies FM, Rubinsztein DC (2009) Autophagy inhibition compromises degradation of ubiquitin-proteasome pathway substrates. *Mol Cell* 33: 517-527
- Korschgen H, Baeken M, Schmitt D, Nagel H, Behl C (2023) Co-chaperone BAG3 enters autophagic pathway via its interaction with microtubule associated protein 1 light chain 3 beta. *Traffic* 24: 564-575
- Krahmer N, Guo Y, Wilfling F, Hilger M, Lingrell S, Heger K, Newman HW, Schmidt-Supprian M, Vance DE, Mann M *et al* (2011) Phosphatidylcholine synthesis for lipid droplet expansion is mediated by localized activation of CTP:phosphocholine cytidylyltransferase. *Cell Metab* 14: 504-515
- Kumar AV, Mills J, Lapierre LR (2022) Selective Autophagy Receptor p62/SQSTM1, a Pivotal Player in Stress and Aging. *Front Cell Dev Biol* 10: 793328
- Kunduri G, Acharya U, Acharya JK (2022) Lipid Polarization during Cytokinesis. *Cells* 11

- Kwon YT, Ciechanover A (2017) The Ubiquitin Code in the Ubiquitin-Proteasome System and Autophagy. *Trends Biochem Sci* 42: 873-886
- Laczko-Dobos H, Maddali AK, Jipa A, Bhattacharjee A, Vegh AG, Juhasz G (2021) Lipid profiles of autophagic structures isolated from wild type and Atg2 mutant Drosophila. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids* 1866: 158868
- Lamb CA, Yoshimori T, Tooze SA (2013) The autophagosome: origins unknown, biogenesis complex. *Nat Rev Mol Cell Biol* 14: 759-774
- Larsson S, Resjo S, Gomez MF, James P, Holm C (2012) Characterization of the lipid droplet proteome of a clonal insulin-producing beta-cell line (INS-1 832/13). *J Proteome Res* 11: 1264-1273
- Le Guerroue F, Eck F, Jung J, Starzetz T, Mittelbronn M, Kaulich M, Behrends C (2017) Autophagosomal Content Profiling Reveals an LC3C-Dependent Piecemeal Mitophagy Pathway. *Mol Cell* 68: 786-796 e786
- Lee M, Lee SY, Bae YS (2023) Functional roles of sphingolipids in immunity and their implication in disease. *Exp Mol Med* 55: 1110-1130
- Leidal AM, Debnath J (2021) Emerging roles for the autophagy machinery in extracellular vesicle biogenesis and secretion. *FASEB Bioadv* 3: 377-386
- Leidal AM, Huang HH, Marsh T, Solvik T, Zhang D, Ye J, Kai F, Goldsmith J, Liu JY, Huang YH et al (2020) The LC3-conjugation machinery specifies the loading of RNA-binding proteins into extracellular vesicles. *Nat Cell Biol* 22: 187-199
- Leventis PA, Grinstein S (2010) The distribution and function of phosphatidylserine in cellular membranes. *Annu Rev Biophys* 39: 407-427
- Li Q, Peng G, Liu H, Wang L, Lu R, Li L (2024) Molecular mechanisms of secretory autophagy and its potential role in diseases. *Life Sci* 347: 122653
- Li Y, Li S, Wu H (2022) Ubiquitination-Proteasome System (UPS) and Autophagy Two Main Protein Degradation Machineries in Response to Cell Stress. *Cells* 11
- Liou W, Geuze HJ, Geelen MJ, Slot JW (1997) The autophagic and endocytic pathways converge at the nascent autophagic vacuoles. *J Cell Biol* 136: 61-70
- Listenberger LL, Han X, Lewis SE, Cases S, Farese RV, Jr., Ory DS, Schaffer JE (2003) Triglyceride accumulation protects against fatty acid-induced lipotoxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 3077-3082
- Lolicato F, Nickel W, Haucke V, Ebner M (2024) Phosphoinositide switches in cell physiology - From molecular mechanisms to disease. *J Biol Chem* 300: 105757
- Longatti A, Lamb CA, Razi M, Yoshimura S, Barr FA, Tooze SA (2012) TBC1D14 regulates autophagosome formation via Rab11- and ULK1-positive recycling endosomes. *J Cell Biol* 197: 659-675
- Longo A, Manganelli V, Misasi R, Riitano G, Caglar TR, Fasciolo E, Recalchi S, Sorice M, Garofalo T (2025) Extracellular Vesicles in the Crosstalk of Autophagy and Apoptosis: A Role for Lipid Rafts. *Cells* 14
- Lubke T, Lobel P, Sleat DE (2009) Proteomics of the lysosome. *Biochim Biophys Acta* 1793: 625-635
- Lum JJ, DeBerardinis RJ, Thompson CB (2005) Autophagy in metazoans: cell survival in the land of plenty. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6: 439-448

Maeda S, Otomo C, Otomo T (2019) The autophagic membrane tether ATG2A transfers lipids between membranes. *Elife* 8

Maeda S, Yamamoto H, Kinch LN, Garza CM, Takahashi S, Otomo C, Grishin NV, Forli S, Mizushima N, Otomo T (2020) Structure, lipid scrambling activity and role in autophagosome formation of ATG9A. *Nat Struct Mol Biol* 27: 1194-1201

Maier O, Hoekstra D (2003) Trans-Golgi network and subapical compartment of HepG2 cells display different properties in sorting and exiting of sphingolipids. *J Biol Chem* 278: 164-173

Mancias JD, Kimmelman AC (2016) Mechanisms of Selective Autophagy in Normal Physiology and Cancer. *J Mol Biol* 428: 1659-1680

Mancias JD, Wang X, Gygi SP, Harper JW, Kimmelman AC (2014) Quantitative proteomics identifies NCOA4 as the cargo receptor mediating ferritinophagy. *Nature* 509: 105-109

Mari M, Griffith J, Rieter E, Krishnappa L, Klionsky DJ, Reggiori F (2010) An Atg9-containing compartment that functions in the early steps of autophagosome biogenesis. *J Cell Biol* 190: 1005-1022

Marsh D (2007) Lateral pressure profile, spontaneous curvature frustration, and the incorporation and conformation of proteins in membranes. *Biophys J* 93: 3884-3899

Marshall RS, Vierstra RD (2019) Dynamic Regulation of the 26S Proteasome: From Synthesis to Degradation. *Front Mol Biosci* 6: 40

Martens S, Fracchiolla D (2020) Activation and targeting of ATG8 protein lipidation. *Cell Discov* 6: 23

Martin S, Driessen K, Nixon SJ, Zerial M, Parton RG (2005) Regulated localization of Rab18 to lipid droplets: effects of lipolytic stimulation and inhibition of lipid droplet catabolism. *J Biol Chem* 280: 42325-42335

Maruyama T, Noda NN (2017) Autophagy-regulating protease Atg4: structure, function, regulation and inhibition. *J Antibiot (Tokyo)* 71: 72-78

Mason M, Schuller A, Skordalakes E (2011) Telomerase structure function. *Curr Opin Struct Biol* 21: 92-100

Matoba K, Kotani T, Tsutsumi A, Tsuji T, Mori T, Noshiro D, Sugita Y, Nomura N, Iwata S, Ohsumi Y *et al* (2020) Atg9 is a lipid scramblase that mediates autophagosomal membrane expansion. *Nat Struct Mol Biol* 27: 1185-1193

Matsumoto A, Takahashi Y, Nishikawa M, Sano K, Morishita M, Charoenviriyakul C, Saji H, Takakura Y (2017) Role of Phosphatidylserine-Derived Negative Surface Charges in the Recognition and Uptake of Intravenously Injected B16BL6-Derived Exosomes by Macrophages. *J Pharm Sci* 106: 168-175

Mattera R, Park SY, De Pace R, Guardia CM, Bonifacino JS (2017) AP-4 mediates export of ATG9A from the trans-Golgi network to promote autophagosome formation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 114: E10697-E10706

Mauvezin C, Neufeld TP (2015) Bafilomycin A1 disrupts autophagic flux by inhibiting both V-ATPase-dependent acidification and Ca-P60A/SERCA-dependent autophagosome-lysosome fusion. *Autophagy* 11: 1437-1438

Mavuduru VA, Vadupu L, Ghosh KK, Chakraborty S, Gulyas B, Padmanabhan P, Ball WB (2024) Mitochondrial phospholipid transport: Role of contact sites and lipid transport proteins. *Prog Lipid Res* 94: 101268

- McCluskey G, Donaghy C, Morrison KE, McConville J, Duddy W, Duguez S (2022) The Role of Sphingomyelin and Ceramide in Motor Neuron Diseases. *J Pers Med* 12
- McEwan DG, Ryan KM (2022) ATG2 and VPS13 proteins: molecular highways transporting lipids to drive membrane expansion and organelle communication. *FEBS J* 289: 7113-7127
- McMahon HT, Gallop JL (2005) Membrane curvature and mechanisms of dynamic cell membrane remodelling. *Nature* 438: 590-596
- Mead RJ, Shan N, Reiser HJ, Marshall F, Shaw PJ (2023) Amyotrophic lateral sclerosis: a neurodegenerative disorder poised for successful therapeutic translation. *Nat Rev Drug Discov* 22: 185-212
- Melia TJ, Lystad AH, Simonsen A (2020) Autophagosome biogenesis: From membrane growth to closure. *J Cell Biol* 219
- Memme JM, Hood DA (2020) Molecular Basis for the Therapeutic Effects of Exercise on Mitochondrial Defects. *Front Physiol* 11: 615038
- Menzies FM, Fleming A, Caricasole A, Bento CF, Andrews SP, Ashkenazi A, Fullgrabe J, Jackson A, Jimenez Sanchez M, Karabiyik C *et al* (2017) Autophagy and Neurodegeneration: Pathogenic Mechanisms and Therapeutic Opportunities. *Neuron* 93: 1015-1034
- Mizushima N, Yamamoto A, Hatano M, Kobayashi Y, Kabeya Y, Suzuki K, Tokuhiisa T, Ohsumi Y, Yoshimori T (2001) Dissection of autophagosome formation using Apg5-deficient mouse embryonic stem cells. *J Cell Biol* 152: 657-668
- Mucino-Hernandez G, Acevo-Rodriguez PS, Cabrera-Benitez S, Guerrero AO, Merchant-Larios H, Castro-Obregon S (2023) Nucleophagy contributes to genome stability through degradation of type II topoisomerases A and B and nucleolar components. *J Cell Sci* 136
- Murphy DJ (2001) The biogenesis and functions of lipid bodies in animals, plants and microorganisms. *Prog Lipid Res* 40: 325-438
- Musiwaro P, Smith M, Manifava M, Walker SA, Ktistakis NT (2013) Characteristics and requirements of basal autophagy in HEK 293 cells. *Autophagy* 9: 1407-1417
- Muthukumar K, Nachiappan V (2013) Phosphatidylethanolamine from phosphatidylserine decarboxylase2 is essential for autophagy under cadmium stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *Cell Biochem Biophys* 67: 1353-1363
- Nair U, Yen WL, Mari M, Cao Y, Xie Z, Baba M, Reggiori F, Klionsky DJ (2012) A role for Atg8-PE deconjugation in autophagosome biogenesis. *Autophagy* 8: 780-793
- Nakamura Y, Sawai T, Kakiuchi K, Arawaka S (2024) Neuronal activity promotes secretory autophagy for the extracellular release of alpha-synuclein. *J Biol Chem* 300: 107419
- Nakatogawa H (2018) Spoon-Feeding Ribosomes to Autophagy. *Mol Cell* 71: 197-199
- Nakatogawa H, Ishii J, Asai E, Ohsumi Y (2012) Atg4 recycles inappropriately lipidated Atg8 to promote autophagosome biogenesis. *Autophagy* 8: 177-186
- Nameta M, Saijo Y, Ohmoto Y, Katsuragi K, Yamamoto K, Yamamoto T, Ishibashi K, Sasaki S (2016) Disruption of Membranes of Extracellular Vesicles Is Necessary for ELISA Determination of Urine AQP2: Proof of Disruption and Epitopes of AQP2 Antibodies. *Int J Mol Sci* 17
- Nath S, Dancourt J, Shteyn V, Puente G, Fong WM, Nag S, Bewersdorf J, Yamamoto A, Antony B, Melia TJ (2014) Lipidation of the LC3/GABARAP family of autophagy proteins relies on a membrane-curvature-sensing domain in Atg3. *Nat Cell Biol* 16: 415-424

Nebauer R, Rosenberger S, Daum G (2007) Phosphatidylethanolamine, a limiting factor of autophagy in yeast strains bearing a defect in the carboxypeptidase Y pathway of vacuolar targeting. *J Biol Chem* 282: 16736-16743

Neurohr GE, Terry RL, Lengefeld J, Bonney M, Brittingham GP, Moretto F, Miettinen TP, Vaites LP, Soares LM, Paulo JA *et al* (2019) Excessive Cell Growth Causes Cytoplasm Dilution And Contributes to Senescence. *Cell* 176: 1083-1097 e1018

New J, Thomas SM (2019) Autophagy-dependent secretion: mechanism, factors secreted, and disease implications. *Autophagy* 15: 1682-1693

Nguyen TN, Padman BS, Usher J, Oorschot V, Ramm G, Lazarou M (2016) Atg8 family LC3/GABARAP proteins are crucial for autophagosome-lysosome fusion but not autophagosome formation during PINK1/Parkin mitophagy and starvation. *J Cell Biol* 215: 857-874

Nishimura T, Tamura N, Kono N, Shimanaka Y, Arai H, Yamamoto H, Mizushima N (2017) Autophagosome formation is initiated at phosphatidylinositol synthase-enriched ER subdomains. *EMBO J* 36: 1719-1735

Nishimura T, Tooze SA (2020) Emerging roles of ATG proteins and membrane lipids in autophagosome formation. *Cell Discov* 6: 32

Noda NN (2021) Atg2 and Atg9: Intermembrane and interleaflet lipid transporters driving autophagy. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids* 1866: 158956

Noda NN (2024) Structural view on autophagosome formation. *FEBS Lett* 598: 84-106

Noda NN, Ohsumi Y, Inagaki F (2009) ATG systems from the protein structural point of view. *Chem Rev* 109: 1587-1598

Noda T (2017) Regulation of Autophagy through TORC1 and mTORC1. *Biomolecules* 7

Nyathi Y, Wilkinson BM, Pool MR (2013) Co-translational targeting and translocation of proteins to the endoplasmic reticulum. *Biochim Biophys Acta* 1833: 2392-2402

Ohsaki Y, Suzuki M, Fujimoto T (2014) Open questions in lipid droplet biology. *Chem Biol* 21: 86-96

Okazaki N, Yan J, Yuasa S, Ueno T, Kominami E, Masuho Y, Koga H, Muramatsu M (2000) Interaction of the Unc-51-like kinase and microtubule-associated protein light chain 3 related proteins in the brain: possible role of vesicular transport in axonal elongation. *Brain Res Mol Brain Res* 85: 1-12

Olivas TJ, Wu Y, Yu S, Luan L, Choi P, Guinn ED, Nag S, De Camilli PV, Gupta K, Melia TJ (2023) ATG9 vesicles comprise the seed membrane of mammalian autophagosomes. *J Cell Biol* 222

Olson BJ, Markwell J (2007) Assays for determination of protein concentration. *Curr Protoc Pharmacol Appendix* 3: 3A

Olzmann JA, Carvalho P (2019) Dynamics and functions of lipid droplets. *Nat Rev Mol Cell Biol* 20: 137-155

Orsi A, Razi M, Dooley HC, Robinson D, Weston AE, Collinson LM, Tooze SA (2012) Dynamic and transient interactions of Atg9 with autophagosomes, but not membrane integration, are required for autophagy. *Mol Biol Cell* 23: 1860-1873

Osawa T, Fujikawa K, Shimamoto K (2024) Structures, functions, and syntheses of glyceroglycophospholipids. *Front Chem* 12: 1353688

- Osawa T, Ishii Y, Noda NN (2020) Human ATG2B possesses a lipid transfer activity which is accelerated by negatively charged lipids and WIPI4. *Genes Cells* 25: 65-70
- Osawa T, Kotani T, Kawaoka T, Hirata E, Suzuki K, Nakatogawa H, Ohsumi Y, Noda NN (2019) Atg2 mediates direct lipid transfer between membranes for autophagosome formation. *Nat Struct Mol Biol* 26: 281-288
- Overbye A, Fengsrud M, Seglen PO (2007) Proteomic analysis of membrane-associated proteins from rat liver autophagosomes. *Autophagy* 3: 300-322
- Palamiuc L, Ravi A, Emerling BM (2020) Phosphoinositides in autophagy: current roles and future insights. *FEBS J* 287: 222-238
- Pan X, Dutta D, Lu S, Bellen HJ (2023) Sphingolipids in neurodegenerative diseases. *Front Neurosci* 17: 1137893
- Pankiv S, Clausen TH, Lamark T, Brech A, Bruun JA, Outzen H, Overvatn A, Bjorkoy G, Johansen T (2007) p62/SQSTM1 binds directly to Atg8/LC3 to facilitate degradation of ubiquitinated protein aggregates by autophagy. *J Biol Chem* 282: 24131-24145
- Papinski D, Schuschnig M, Reiter W, Wilhelm L, Barnes CA, Maiolica A, Hansmann I, Pfaffenwimmer T, Kijanska M, Stoffel I *et al* (2014) Early steps in autophagy depend on direct phosphorylation of Atg9 by the Atg1 kinase. *Mol Cell* 53: 471-483
- Pattingre S, Bauvy C, Carpentier S, Levade T, Levine B, Codogno P (2009) Role of JNK1-dependent Bcl-2 phosphorylation in ceramide-induced macroautophagy. *J Biol Chem* 284: 2719-2728
- Pfisterer SG, Bakula D, Frickey T, Cezanne A, Brigger D, Tschan MP, Robenek H, Proikas-Cezanne T (2014) Lipid droplet and early autophagosomal membrane targeting of Atg2A and Atg14L in human tumor cells. *J Lipid Res* 55: 1267-1278
- Poewe W, Seppi K, Tanner CM, Halliday GM, Brundin P, Volkmann J, Schrag AE, Lang AE (2017) Parkinson disease. *Nat Rev Dis Primers* 3: 17013
- Poillet-Perez L, Jacquet M, Hervouet E, Gauthier T, Fraichard A, Borg C, Pallandre JR, Gonzalez BJ, Ramdani Y, Boyer-Guittaut M *et al* (2017) GABARAPL1 tumor suppressive function is independent of its conjugation to autophagosomes in MCF-7 breast cancer cells. *Oncotarget* 8: 55998-56020
- Polson HE, de Lartigue J, Rigden DJ, Reedijk M, Urbe S, Clague MJ, Tooze SA (2010) Mammalian Atg18 (WIPI2) localizes to omegasome-anchored phagophores and positively regulates LC3 lipidation. *Autophagy* 6: 506-522
- Polyansky A, Shatz O, Fraiberg M, Shimoni E, Dadosh T, Mari M, Reggiori FM, Qin C, Han X, Elazar Z (2022) Phospholipid imbalance impairs autophagosome completion. *EMBO J* 41: e110771
- Pomorski T, Hrafnisdottir S, Devaux PF, van Meer G (2001) Lipid distribution and transport across cellular membranes. *Semin Cell Dev Biol* 12: 139-148
- Ponpuak M, Mandell MA, Kimura T, Chauhan S, Cleyrat C, Deretic V (2015) Secretory autophagy. *Curr Opin Cell Biol* 35: 106-116
- Popovic D, Dikic I (2014) TBC1D5 and the AP2 complex regulate ATG9 trafficking and initiation of autophagy. *EMBO Rep* 15: 392-401
- Posor Y, Jang W, Haucke V (2022) Phosphoinositides as membrane organizers. *Nat Rev Mol Cell Biol* 23: 797-816

Puri C, Vicinanza M, Ashkenazi A, Gratian MJ, Zhang Q, Bento CF, Renna M, Menzies FM, Rubinsztein DC (2018) The RAB11A-Positive Compartment Is a Primary Platform for Autophagosome Assembly Mediated by WIPI2 Recognition of PI3P-RAB11A. *Dev Cell* 45: 114-131 e118

Quinville BM, Deschenes NM, Ryckman AE, Walia JS (2021) A Comprehensive Review: Sphingolipid Metabolism and Implications of Disruption in Sphingolipid Homeostasis. *Int J Mol Sci* 22

Rabionet M, Gorgas K, Sandhoff R (2014) Ceramide synthesis in the epidermis. *Biochim Biophys Acta* 1841: 422-434

Raffener M, Zhu S, Gonzalez-Fuente M, Ustun S (2023) Interplay between autophagy and proteasome during protein turnover. *Trends Plant Sci* 28: 698-714

Rambold AS, Cohen S, Lippincott-Schwartz J (2015) Fatty acid trafficking in starved cells: regulation by lipid droplet lipolysis, autophagy, and mitochondrial fusion dynamics. *Dev Cell* 32: 678-692

Ravikumar B, Moreau K, Jahreiss L, Puri C, Rubinsztein DC (2010) Plasma membrane contributes to the formation of pre-autophagosomal structures. *Nat Cell Biol* 12: 747-757

Razi M, Chan EY, Tooze SA (2009) Early endosomes and endosomal coatomer are required for autophagy. *J Cell Biol* 185: 305-321

Renne MF, Ernst R (2023) Membrane homeostasis beyond fluidity: control of membrane compressibility. *Trends Biochem Sci* 48: 963-977

Rockenfeller P, Koska M, Pietrocola F, Minois N, Knittelfelder O, Sica V, Franz J, Carmona-Gutierrez D, Kroemer G, Madeo F (2015) Phosphatidylethanolamine positively regulates autophagy and longevity. *Cell Death Differ* 22: 499-508

Roth R, Madhani HD, Garcia JF (2018) Total RNA Isolation and Quantification of Specific RNAs in Fission Yeast. *Methods Mol Biol* 1721: 63-72

Rousseau A, Bertolotti A (2018) Regulation of proteasome assembly and activity in health and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol* 19: 697-712

Rudnik S, Damme M (2021) The lysosomal membrane-export of metabolites and beyond. *FEBS J* 288: 4168-4182

Runwal G, Stamatakou E, Siddiqi FH, Puri C, Zhu Y, Rubinsztein DC (2019) LC3-positive structures are prominent in autophagy-deficient cells. *Sci Rep* 9: 10147

Saha BK, Graham MY, Schlessinger D (1979) Acid ribonuclease from HeLa cell lysosomes. *J Biol Chem* 254: 5951-5957

Saku T, Sakai H, Shibata Y, Kato Y, Yamamoto K (1991) An immunocytochemical study on distinct intracellular localization of cathepsin E and cathepsin D in human gastric cells and various rat cells. *J Biochem* 110: 956-964

Sanchez-Martin P, Kriegenburg F, Alves L, Adam J, Elsaesser J, Babic R, Mancilla H, Licheva M, Tascher G, Munch C *et al* (2023) ULK1-mediated phosphorylation regulates the conserved role of YKT6 in autophagy. *J Cell Sci* 136

Sanchez-Martin P, Sou YS, Kageyama S, Koike M, Waguri S, Komatsu M (2020) NBR1-mediated p62-liquid droplets enhance the Keap1-Nrf2 system. *EMBO Rep* 21: e48902

Sanjuan MA, Dillon CP, Tait SW, Moshiah S, Dorsey F, Connell S, Komatsu M, Tanaka K, Cleveland JL, Withoff S *et al* (2007) Toll-like receptor signalling in macrophages links the autophagy pathway to phagocytosis. *Nature* 450: 1253-1257

Scharenberg SG, Dong W, Ghoochani A, Nyame K, Levin-Konigsberg R, Krishnan AR, Rawat ES, Spees K, Bassik MC, Abu-Remaileh M (2023) An SPNS1-dependent lysosomal lipid transport pathway that enables cell survival under choline limitation. *Sci Adv* 9: eadf8966

Schepers J, Behl C (2021) Lipid droplets and autophagy-links and regulations from yeast to humans. *J Cell Biochem* 122: 602-611

Scherer L, Rossi JJ (2004) RNAi applications in mammalian cells. *Biotechniques* 36: 557-561

Scherer WF, Syverton JT, Gey GO (1953) Studies on the propagation in vitro of poliomyelitis viruses. IV. Viral multiplication in a stable strain of human malignant epithelial cells (strain HeLa) derived from an epidermoid carcinoma of the cervix. *J Exp Med* 97: 695-710

Schindelin J, Arganda-Carreras I, Frise E, Kaynig V, Longair M, Pietzsch T, Preibisch S, Rueden C, Saalfeld S, Schmid B *et al* (2012) Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat Methods* 9: 676-682

Schlutermann D, Berleth N, Deitersen J, Wallot-Hieke N, Friesen O, Wu W, Stuhldreier F, Sun Y, Berning L, Friedrich A *et al* (2021) FIP200 controls the TBK1 activation threshold at SQSTM1/p62-positive condensates. *Sci Rep* 11: 13863

Schmitt D, Bozkurt S, Henning-Domres P, Huesmann H, Eimer S, Bindila L, Behrends C, Boyle E, Wilfling F, Tascher G *et al* (2022) Lipid and protein content profiling of isolated native autophagic vesicles. *EMBO Rep* 23: e53065

Schroder BA, Wrocklage C, Hasilik A, Saftig P (2010) The proteome of lysosomes. *Proteomics* 10: 4053-4076

Schutter M, Giavalisco P, Brodesser S, Graef M (2020) Local Fatty Acid Channeling into Phospholipid Synthesis Drives Phagophore Expansion during Autophagy. *Cell* 180: 135-149 e114

Seglen PO, Bohley P (1992) Autophagy and other vacuolar protein degradation mechanisms. *Experientia* 48: 158-172

Shatz O, Holland P, Elazar Z, Simonsen A (2016) Complex Relations Between Phospholipids, Autophagy, and Neutral Lipids. *Trends Biochem Sci* 41: 907-923

Shirahama-Noda K, Kira S, Yoshimori T, Noda T (2013) TRAPPIII is responsible for vesicular transport from early endosomes to Golgi, facilitating Atg9 cycling in autophagy. *J Cell Sci* 126: 4963-4973

Shpilka T, Weidberg H, Pietrokovski S, Elazar Z (2011) Atg8: an autophagy-related ubiquitin-like protein family. *Genome Biol* 12: 226

Shvets E, Abada A, Weidberg H, Elazar Z (2011) Dissecting the involvement of LC3B and GATE-16 in p62 recruitment into autophagosomes. *Autophagy* 7: 683-688

Slotte JP (2013) Biological functions of sphingomyelins. *Prog Lipid Res* 52: 424-437

Solvik TA, Nguyen TA, Tony Lin YH, Marsh T, Huang EJ, Wiita AP, Debnath J, Leidal AM (2022) Secretory autophagy maintains proteostasis upon lysosome inhibition. *J Cell Biol* 221

Soreng K, Neufeld TP, Simonsen A (2018) Membrane Trafficking in Autophagy. *Int Rev Cell Mol Biol* 336: 1-92

Spang N, Feldmann A, Huesmann H, Bekbulat F, Schmitt V, Hiebel C, Koziollek-Drechsler I, Clement AM, Moosmann B, Jung J *et al* (2014) RAB3GAP1 and RAB3GAP2 modulate basal and rapamycin-induced autophagy. *Autophagy* 10: 2297-2309

Statello L, Guo CJ, Chen LL, Huarte M (2021) Gene regulation by long non-coding RNAs and its biological functions. *Nat Rev Mol Cell Biol* 22: 96-118

Stromhaug PE, Berg TO, Fengsrud M, Seglen PO (1998) Purification and characterization of autophagosomes from rat hepatocytes. *Biochem J* 335 (Pt 2): 217-224

Suleiman AA, Al-Chalabi R, Shaban SA (2024) Integrative role of small non-coding RNAs in viral immune response: a systematic review. *Mol Biol Rep* 51: 107

Sun D, Wu R, Zheng J, Li P, Yu L (2018) Polyubiquitin chain-induced p62 phase separation drives autophagic cargo segregation. *Cell Res* 28: 405-415

Sun W, Tian BX, Wang SH, Liu PJ, Wang YC (2020) The function of SEC22B and its role in human diseases. *Cytoskeleton (Hoboken)* 77: 303-312

Takahashi Y, He H, Tang Z, Hattori T, Liu Y, Young MM, Serfass JM, Chen L, Gebru M, Chen C *et al* (2018) An autophagy assay reveals the ESCRT-III component CHMP2A as a regulator of phagophore closure. *Nat Commun* 9: 2855

Takahashi Y, Liang X, Hattori T, Tang Z, He H, Chen H, Liu X, Abraham T, Imamura-Kawasawa Y, Buchkovich NJ *et al* (2019) VPS37A directs ESCRT recruitment for phagophore closure. *J Cell Biol* 218: 3336-3354

Tang Z, Takahashi Y, He H, Hattori T, Chen C, Liang X, Chen H, Young MM, Wang HG (2019) TOM40 Targets Atg2 to Mitochondria-Associated ER Membranes for Phagophore Expansion. *Cell Rep* 28: 1744-1757 e1745

Taniguchi M, Okazaki T (2021) Role of ceramide/sphingomyelin (SM) balance regulated through "SM cycle" in cancer. *Cell Signal* 87: 110119

Tatosyan KA, Ustyantsev IG, Kramerov DA (2020) [RNA Degradation in Eukaryotic Cells]. *Mol Biol (Mosk)* 54: 542-561

Tauchi-Sato K, Ozeki S, Houjou T, Taguchi R, Fujimoto T (2002) The surface of lipid droplets is a phospholipid monolayer with a unique Fatty Acid composition. *J Biol Chem* 277: 44507-44512

Terasawa K, Tomabechi Y, Ikeda M, Ehara H, Kukimoto-Niino M, Wakiyama M, Podyma-Inoue KA, Rajapakshe AR, Watabe T, Shirouzu M *et al* (2016) Lysosome-associated membrane proteins-1 and -2 (LAMP-1 and LAMP-2) assemble via distinct modes. *Biochem Biophys Res Commun* 479: 489-495

Thakur M, Brooksbank C, Finn RD, Firth HV, Foreman J, Freeberg M, Gurwitz KT, Harrison M, Hulcoop D, Hunt SE *et al* (2025) EMBL's European Bioinformatics Institute (EMBL-EBI) in 2024. *Nucleic Acids Res* 53: D10-D19

Thibaudeau TA, Smith DM (2019) A Practical Review of Proteasome Pharmacology. *Pharmacol Rev* 71: 170-197

Thomas A, Muller R, Farley S, Kojic A, Stein F, Haberkant P, Schultz C (2025) Trifunctional lipid derivatives: PE's mitochondrial interactome. *Chem Commun (Camb)* 61: 2564-2567

Tooze J, Hollinshead M, Ludwig T, Howell K, Hoflack B, Kern H (1990) In exocrine pancreas, the basolateral endocytic pathway converges with the autophagic pathway immediately after the early endosome. *J Cell Biol* 111: 329-345

- Trendel J, Schwarzl T, Horos R, Prakash A, Bateman A, Hentze MW, Krijgsveld J (2019) The Human RNA-Binding Proteome and Its Dynamics during Translational Arrest. *Cell* 176: 391-403 e319
- Trivedi PC, Bartlett JJ, Puliniikunnil T (2020) Lysosomal Biology and Function: Modern View of Cellular Debris Bin. *Cells* 9
- Tsuboyama K, Koyama-Honda I, Sakamaki Y, Koike M, Morishita H, Mizushima N (2016) The ATG conjugation systems are important for degradation of the inner autophagosomal membrane. *Science* 354: 1036-1041
- Turco E, Fracchiolla D, Martens S (2020) Recruitment and Activation of the ULK1/Atg1 Kinase Complex in Selective Autophagy. *J Mol Biol* 432: 123-134
- Turco E, Savova A, Gere F, Ferrari L, Romanov J, Schuschnig M, Martens S (2021) Reconstitution defines the roles of p62, NBR1 and TAX1BP1 in ubiquitin condensate formation and autophagy initiation. *Nat Commun* 12: 5212
- Turco E, Witt M, Abert C, Bock-Bierbaum T, Su MY, Trapannone R, Sztacho M, Danieli A, Shi X, Zaffagnini G *et al* (2019) How RB1CC1/FIP200 claws its way to autophagic engulfment of SQSTM1/p62-ubiquitin condensates. *Autophagy* 15: 1475-1477
- UniProt C (2025) UniProt: the Universal Protein Knowledgebase in 2025. *Nucleic Acids Res* 53: D609-D617
- Untergasser A, Cutcutache I, Koressaar T, Ye J, Faircloth BC, Remm M, Rozen SG (2012) Primer3--new capabilities and interfaces. *Nucleic Acids Res* 40: e115
- Urdaneta EC, Vieira-Vieira CH, Hick T, Wessels HH, Figini D, Moschall R, Medenbach J, Ohler U, Granneman S, Selbach M *et al* (2019) Purification of cross-linked RNA-protein complexes by phenol-toluol extraction. *Nat Commun* 10: 990
- Urwin H, Authier A, Nielsen JE, Metcalf D, Powell C, Froud K, Malcolm DS, Holm I, Johannsen P, Brown J *et al* (2010) Disruption of endocytic trafficking in frontotemporal dementia with CHMP2B mutations. *Hum Mol Genet* 19: 2228-2238
- Vagne Q, Vrel JP, Sens P (2020) A minimal self-organisation model of the Golgi apparatus. *Elife* 9
- Valverde DP, Yu S, Boggavarapu V, Kumar N, Lees JA, Walz T, Reinisch KM, Melia TJ (2019) ATG2 transports lipids to promote autophagosome biogenesis. *J Cell Biol* 218: 1787-1798
- van Meer G, Voelker DR, Feigenson GW (2008) Membrane lipids: where they are and how they behave. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9: 112-124
- van Vliet AR, Chiduzza GN, Maslen SL, Pye VE, Joshi D, De Tito S, Jefferies HBJ, Christodoulou E, Roustan C, Punch E *et al* (2022) ATG9A and ATG2A form a heteromeric complex essential for autophagosome formation. *Mol Cell* 82: 4324-4339 e4328
- Varela YR, Gonzalez-Ramirez EJ, Iriondo MN, Ballesteros U, Etxaniz A, Montes LR, Goni FM, Alonso A (2023) Lipids in Mitochondrial Macroautophagy: Phase Behavior of Bilayers Containing Cardiolipin and Ceramide. *Int J Mol Sci* 24
- Velikkakath AK, Nishimura T, Oita E, Ishihara N, Mizushima N (2012) Mammalian Atg2 proteins are essential for autophagosome formation and important for regulation of size and distribution of lipid droplets. *Mol Biol Cell* 23: 896-909
- von Muhlinen N, Akutsu M, Ravenhill BJ, Foeglein A, Bloor S, Rutherford TJ, Freund SM, Komander D, Randow F (2012) LC3C, bound selectively by a noncanonical LIR motif in NDP52, is required for antibacterial autophagy. *Mol Cell* 48: 329-342

Wang XJ, Yu J, Wong SH, Cheng AS, Chan FK, Ng SS, Cho CH, Sung JJ, Wu WK (2013) A novel crosstalk between two major protein degradation systems: regulation of proteasomal activity by autophagy. *Autophagy* 9: 1500-1508

Wang Y, Dahmane S, Ti R, Mai X, Zhu L, Carlson LA, Stjepanovic G (2025) Structural basis for lipid transfer by the ATG2A-ATG9A complex. *Nat Struct Mol Biol* 32: 35-47

Wassall SR, Stillwell W (2009) Polyunsaturated fatty acid-cholesterol interactions: domain formation in membranes. *Biochim Biophys Acta* 1788: 24-32

Webber JL, Tooze SA (2010) Coordinated regulation of autophagy by p38alpha MAPK through mAtg9 and p38IP. *EMBO J* 29: 27-40

Weidberg H, Shvets E, Shpilka T, Shimron F, Shinder V, Elazar Z (2010) LC3 and GATE-16/GABARAP subfamilies are both essential yet act differently in autophagosome biogenesis. *EMBO J* 29: 1792-1802

Wessel D, Flugge UI (1984) A method for the quantitative recovery of protein in dilute solution in the presence of detergents and lipids. *Anal Biochem* 138: 141-143

Wild K, Weichenrieder O, Strub K, Sinning I, Cusack S (2002) Towards the structure of the mammalian signal recognition particle. *Curr Opin Struct Biol* 12: 72-81

Wilfinger WW, Mackey K, Chomczynski P (1997) Effect of pH and ionic strength on the spectrophotometric assessment of nucleic acid purity. *Biotechniques* 22: 474-476, 478-481

Witan H, Kern A, Koziollek-Drechsler I, Wade R, Behl C, Clement AM (2008) Heterodimer formation of wild-type and amyotrophic lateral sclerosis-causing mutant Cu/Zn-superoxide dismutase induces toxicity independent of protein aggregation. *Hum Mol Genet* 17: 1373-1385

Wyant GA, Abu-Remaileh M, Frenkel EM, Laqtom NN, Dharamdasani V, Lewis CA, Chan SH, Heinze I, Ori A, Sabatini DM (2018) NUFIP1 is a ribosome receptor for starvation-induced ribophagy. *Science* 360: 751-758

Xu D, Li Y, Wu L, Li Y, Zhao D, Yu J, Huang T, Ferguson C, Parton RG, Yang H *et al* (2018a) Rab18 promotes lipid droplet (LD) growth by tethering the ER to LDs through SNARE and NRZ interactions. *J Cell Biol* 217: 975-995

Xu J, Camfield R, Gorski SM (2018b) The interplay between exosomes and autophagy - partners in crime. *J Cell Sci* 131

Xu P, Baldrige RD, Chi RJ, Burd CG, Graham TR (2013) Phosphatidylserine flipping enhances membrane curvature and negative charge required for vesicular transport. *J Cell Biol* 202: 875-886

Yamada T, Carson AR, Caniggia I, Umabayashi K, Yoshimori T, Nakabayashi K, Scherer SW (2005) Endothelial nitric-oxide synthase antisense (NOS3AS) gene encodes an autophagy-related protein (APG9-like2) highly expressed in trophoblast. *J Biol Chem* 280: 18283-18290

Yamashita A, Hayashi Y, Nemoto-Sasaki Y, Ito M, Oka S, Tanikawa T, Waku K, Sugiura T (2014) Acyltransferases and transacylases that determine the fatty acid composition of glycerolipids and the metabolism of bioactive lipid mediators in mammalian cells and model organisms. *Prog Lipid Res* 53: 18-81

Yau R, Rape M (2016) The increasing complexity of the ubiquitin code. *Nat Cell Biol* 18: 579-586

Ye Y, Tyndall ER, Bui V, Tang Z, Shen Y, Jiang X, Flanagan JM, Wang HG, Tian F (2021) An N-terminal conserved region in human Atg3 couples membrane curvature sensitivity to conjugase activity during autophagy. *Nat Commun* 12: 374

- Young AR, Chan EY, Hu XW, Kochl R, Crawshaw SG, High S, Hailey DW, Lippincott-Schwartz J, Tooze SA (2006) Starvation and ULK1-dependent cycling of mammalian Atg9 between the TGN and endosomes. *J Cell Sci* 119: 3888-3900
- Yu L, McPhee CK, Zheng L, Mardones GA, Rong Y, Peng J, Mi N, Zhao Y, Liu Z, Wan F *et al* (2010) Termination of autophagy and reformation of lysosomes regulated by mTOR. *Nature* 465: 942-946
- Yu ZQ, Ni T, Hong B, Wang HY, Jiang FJ, Zou S, Chen Y, Zheng XL, Klionsky DJ, Liang Y *et al* (2012) Dual roles of Atg8-PE deconjugation by Atg4 in autophagy. *Autophagy* 8: 883-892
- Yuan N, Song L, Zhang S, Lin W, Cao Y, Xu F, Fang Y, Wang Z, Zhang H, Li X *et al* (2015) Bafilomycin A1 targets both autophagy and apoptosis pathways in pediatric B-cell acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica* 100: 345-356
- Zaffagnini G, Savova A, Danieli A, Romanov J, Tremel S, Ebner M, Peterbauer T, Sztacho M, Trapannone R, Tarafder AK *et al* (2018) p62 filaments capture and present ubiquitinated cargos for autophagy. *EMBO J* 37
- Zaidi N, Maurer A, Nieke S, Kalbacher H (2008) Cathepsin D: a cellular roadmap. *Biochem Biophys Res Commun* 376: 5-9
- Zatloukal K, Stumptner C, Fuchsbichler A, Heid H, Schnoelzer M, Kenner L, Kleinert R, Prinz M, Aguzzi A, Denk H (2002) p62 Is a common component of cytoplasmic inclusions in protein aggregation diseases. *Am J Pathol* 160: 255-263
- Zhao J, Zhai B, Gygi SP, Goldberg AL (2015) mTOR inhibition activates overall protein degradation by the ubiquitin proteasome system as well as by autophagy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 112: 15790-15797
- Zhao YG, Zhang H (2019) Autophagosome maturation: An epic journey from the ER to lysosomes. *J Cell Biol* 218: 757-770
- Zhou B, Boudreau N, Coulber C, Hammarback J, Rabinovitch M (1997) Microtubule-associated protein 1 light chain 3 is a fibronectin mRNA-binding protein linked to mRNA translation in lamb vascular smooth muscle cells. *J Clin Invest* 100: 3070-3082
- Zhou C, Ma K, Gao R, Mu C, Chen L, Liu Q, Luo Q, Feng D, Zhu Y, Chen Q (2017) Regulation of mATG9 trafficking by Src- and ULK1-mediated phosphorylation in basal and starvation-induced autophagy. *Cell Res* 27: 184-201
- Zhou D, Borsa M, Puleston DJ, Zellner S, Capera J, Sanderson S, Schifferer M, Hester SS, Ge X, Fischer R *et al* (2022) Mapping autophagosome contents identifies interleukin-7 receptor-alpha as a key cargo modulating CD4+ T cell proliferation. *Nat Commun* 13: 5174
- Zhuang J, Du X, Liu K, Hao J, Wang H, An R, Liang X (2024) DNase II Can Efficiently Digest RNA and Needs to Be Redefined as a Nuclease. *Cells* 13
- Zientara-Rytter K, Subramani S (2020) Mechanistic Insights into the Role of Atg11 in Selective Autophagy. *J Mol Biol* 432: 104-122

5.2 Weitere Referenzen

Lawrence, Francis: Die Tribute von Panem – Catching Fire [Film] United States: Color Force und Lionsgate, 2013

Schmitt, Daniel: Die RAB GTPase RAB18 als Bindeglied zwischen Lipidtröpfchen und Makroautophagie und die Charakterisierung der Phospholipid- und Cargo-Komposition nativer autophagischer Vesikel. Dissertation, Biologie, Johanner Gutenberg-Universität Mainz, 2023

6 Anhang

6.1 Abkürzungen

6.1.1 Abkürzungen für Bezeichnungen

7SL	<i>RNA component of signal recognition particle 7SL</i>
Acetyl-CoA	Acetyl-Coenzym A
ADP	Adenosindiphosphat
AF	AlexaFluor
AMP	Adenosinmonophosphat
AMPK	<i>AMP-activated kinase</i>
AP	<i>Adapter Protein</i>
APC	Allophycocyanin
APS	Ammoniumpersulfat
ATG	<i>autophagy related gene</i>
ATP	Adenosintriphosphat
AV	autophagisches Vesikel
BAG	<i>Bcl-2-associated athanogene</i>
BCA	Biuret-Bicinchoninsäure (T-4)-[2-[1-(3,5-dimethyl-2H-pyrrol-2-ylidene-κN)ethyl]-3,5-dimethyl-1H-pyrrolato-κN]difluoro-boron
BODIPY	
BSA	<i>Bovine Serum Albumin</i>
bspw.	beispielsweise
<i>C. elegans</i>	<i>Caenorhabditis elegans</i>
Cas9	<i>CRISPR associated protein 9</i>
CD	<i>Cluster of Differentiation</i>
Cdc48	<i>cell division cycle 48</i>
cDNA	<i>complementary DNA</i>
Cer	Ceramid
CHAPS	3-[(3-Cholamidopropyl)-dimethylammonio]-1-propansulfonat
CHOL	Cholesterin
circRNA	<i>circular RNA</i>
CL	Cardiolipin
CMA	<i>Chaperone mediated autophagy</i>
COP	<i>coat protein</i>
CRISPR	<i>Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats</i>
CTS	Cathepsine
Cy	Cyanin
<i>D. melanogaster</i>	<i>Drosophila melanogaster</i>
DAG	Diacylglycerol
DAPI	4,6-Diamidino-2-Phenylindol-dihydrochlorid-hydrat
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DFG	Deutsche Fördergesellschaft
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>

DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
DTT	1,4-Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EBSS	<i>Earle's Balanced Salt Solution</i>
EDTA	Ethylendiamin-tetraessigsäure
EGTA	Ethylenglykol-bis-(2-aminoethyl)-tetraessigsäure, 1,2-Bis-(2-aminoethoxyethan)- <i>N,N,N',N'</i> -tetraessigsäure
ER	endoplasmatisches Retikulum
ERES	<i>ER exit site</i>
ERGIC	<i>ER Golgi intermediate compartment</i>
ESCRT	<i>endosomal sorting complex required for transport</i>
et al	<i>et alii</i>
etc.	<i>etcetera</i>
EV	Extrazelluläre Vesikel
FACS	<i>Fluorescence Activated Cell Sorting</i>
FCS	<i>Fetal Calv Serum</i>
FIP200	<i>focal adhesion kinase family–interacting protein of 200 kDa</i>
GABARAP	<i>γ-aminobutyric acid type A receptor-associated protein</i>
GABARAPL	<i>γ-aminobutyric acid type A receptor-associated protein like</i>
GAPDH	<i>glyceraldehyd-3-phosphat dehydrogenase</i>
GATE16	<i>Golgi-associated ATPase enhancer of 16 kDa</i>
GenTSV	Gentechnische Schutzverordnung
ggf.	gegebenenfalls
GL	Gesamtzellysat
GM130	<i>130 kDa cis-Golgi matrix protein 1</i>
GTP	Guanosintriphosphat
GVO	Genetisch veränderter Organismus
Halo	<i>haloalkane dehalogenase</i>
HeLa	Henrietta Lacks-Zervixkarzinom-Epithelzellen
HEPES	<i>N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure</i>
HRP	<i>Horseradish Peroxidase</i>
IM	Isolationsmembran
KD	<i>Knock Down</i>
KFERQ	Lysin-Phenylalanin-Glutaminsäure-Arginin-Glutamin
KO	<i>Knock Out</i>
L	Lösliche Fraktion
LAMP	<i>lysosomal associated membrane protein</i>
LIR	<i>LC3 interacting region</i>
lncRNA	<i>long non-coding RNA</i>
LV	lysosomale Vesikel
m ⁶ A	N ⁶ -Methyladenosin
M6PR	<i>mannose-6-phosphate receptor</i>
MAP1LC3	<i>microtubule-associated proteins 1A/1B light chain 3</i>

MES	2-(N-Morpholino)Ethansulfonsäure
miRNA	<i>micro RNA</i>
MOPS	3-(N-Morpholino)propansulfonsäure
mRNA	<i>messenger RNA</i>
mTOR	<i>mammalian target of rapamycin</i>
MVB	<i>multivesicular bodies</i>
NBD	Nitrobenzoxadiazole
NUFIP1	<i>nuclear fragile X mental retardation-interacting protein 1</i>
P	Pelletfraktion
PA	Phosphatidat
pATG9A	Phosphoryliertes ATG9A
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
PC	Phosphatidylcholin
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PE	Phosphatidylethanolamin
PE	Phycoerythrin
PFA	Paraformaldehyd
PG	Phosphatidylglycerol
PI/PtdIn	Phosphatidylinositol
PI3K	Phosphatidylinositol 3-kinase
PI3P	Phosphatidylinositol-3-phosphat
PP2	<i>1-tert-Butyl-3-(4-chlorophenyl)-1H-pyrazolo[3,4-d]pyrimidin-4-amine</i>
PS	Phosphatidylserin
pY8	Phospho-Tyrosin an Stelle 8
RAB	<i>Ras-related in brain</i>
RBP	RNA-bindende Proteine
RNA	Ribonukleinsäure
RNAi	<i>RNA interference</i>
RPL19	<i>ribosomal protein L19</i>
rRNA	ribosomale RNA
RT	Reverse Transkription
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SDS	Natriumlaurylsulfat
SDS-PAGE	<i>sodiumdodecylsulfat polyacrylamide gel electrophoresis</i>
SEC22B	<i>SEC22 homolog B, vesicle trafficking protein</i>
sek AK	sekundärer Antikörper
SIDT	<i>systemic RNA-interference deficient-1 transmembrane family</i>
siRNA	<i>small interfering RNA</i>
Sph	Sphingosin
SM	Sphingomyelin
SNAP29	<i>synaptosomal associated protein 29</i>
SNARE	<i>soluble N-ethylmaleimide-sensitive-factor attachment receptor</i>
snoRNA	<i>small nucleolar RNA</i>
snRNA	<i>small nuclear RNA</i>

SOD1	Superoxiddismutase 1
SQSTM1	<i>Sequestome1/p62</i>
SRC	<i>proto-oncogene sarcoma tyrosine-protein kinase</i>
SRP	<i>signal recognition particle</i>
STX17	Syntaxin 17
TAG	Triacylglycerol
TBS	<i>Tris Buffered Salin</i>
TBS/T	<i>Tris Buffered Salin/Tween</i>
TDP43	<i>trans-activation response DNA binding protein 43</i>
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TER	<i>Telomerase RNA component</i>
TGN	Trans-Golgi Netzwerk
tRNA	<i>transfer RNA</i>
Tub	Tubulin
u.a.	unter anderem
ULK1	<i>UNC51-like kinase 1</i>
UPS	Ubiquitin-Proteasom-System
usw.	und so weiter
V-ATPase	<i>vacuolar-type adenosine 5'-triphosphatase</i>
VAMP8	<i>vesicle associated protein 8</i>
VCP	<i>valosin-containing protein</i>
VPS	<i>vacuolar protein sorting</i>
WIPI	<i>WD-40 repeat containing protein that interacts with PtdIns</i>
WT	Wildtyp

6.1.2 Einheiten und Maße

° C	Grad Celsius
A	<i>Area</i>
ANOVA	<i>analysis of variance</i>
BP	Bandpass Filter
bp	Basenpaare
cm	Zentimeter
cm ²	Quadratcentimeter
Em	Emission
Ex	Extinktion
FSC	<i>Forward Scatter</i>
g	Fallbeschleunigung
h	Stunde
H	<i>Height</i>
kDa	Kilodalton
l	Liter
M	Molar
m	Masse
max	maximal
min	Minute

ml	Milliliter
mM	Millimolar
N	Stickstoff-gebunden
nm	Nanomolar
ns	nicht signifikant
pH	potentia hydrogenii
pM	Pikomolar
POI	<i>Population of Interest</i>
RT	Raumtemperatur
sec	Sekunde
sn	<i>stereospecifically numbered</i> (bei Lipiden)
SSC	<i>Side Scatter</i>
U	<i>Unit</i> / katalytische Einheit
µl	Mikroliter
µM	Mikromolar
V	Volumen
v	Geschwindigkeit
W	<i>Width</i>

6.2 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 Übersicht autophagischer Prozesse Die Autophagie ist ein lysosomaler Abbauweg. (A)

Bei der Mikroautophagie werden Substrate direkt in das Lysosom über einen Pinozytose-ähnlichen Mechanismus aufgenommen. Das Degradationsmotiv KFERQ kann dabei als Signal dienen, aber es werden auch Substrate Motiv-unabhängig aufgenommen. (B) Die Makroautophagie ist durch die *de novo* Synthese des doppelmembranösen Autophagosoms charakterisiert. Die Vorläuferstruktur ist die Phagophore, die während der Reifung zum Autophagosom um Substrate herum wächst und diese in sich einschließt. Die Makroautophagie kann unselektiv zytosolisches Material in das Autophagosom einschließen (Bulk-Autophagie genannt). Bei der selektiven Makroautophagie erkennen spezialisierte Autophagierezeptoren spezifische Substrate. Folgend aufgelistet sind Beispiele für prominente Rezeptoren: Cdc48/VCP interagiert mit Stressgranula, Lamin B1 mit Abschnürungen des Nukleus, NUFIP1 mit Ribosomen. MAP1LC3B kann direkt mit Nukleinsäuren interagieren. Die genauen Rezeptoren der Lipophagie sind noch unbekannt. SQSTM1 ist ein Autophagierezeptor, der unter anderem mit ubiquitinierten Substraten interagiert, beispielweise im Zuge der Aggrephagie. (C) Während der Chaperon-vermittelten Autophagie (CMA) erkennen Chaperone bestimmte exponierte Sequenzen wie das KFERQ-Motiv und führen die Substrate dem Lysosom in Zusammenarbeit mit Transportern zu. LAMP2A ist dabei der bevorzugte Transporter für Proteine, während LAMP2C und SIDT2 mit dem Nukleinsäuretransport in Verbindung gebracht wurden.

KFERQ = Lysin-Phenylalanin-Glutaminsäure-Arginin-Glutamin;
 MAP1LC3B = *Microtubule-associated proteins 1A/1B light chain 3B*;
 SQSTM1 = *Sequestome 1/p62*; Cdc48 = *cell division cycle 48*; VCP = *valosin-containing protein*; NUFIP1 = *Nuclear fragile X mental retardation-interacting protein 1*; LAMP = *Lysosomal associated membrane protein*; SIDT2 = *systemic RNA-interference deficient-1 transmembrane family, member 2*..... 2

Abbildung 2 Biogenese von Autophagosomen (A) Schematische Darstellung der Biogenese eines

Autophagosoms. Während der Initiierung regulieren mTOR und AMPK den ULK-Komplex, der über die Aktivierung des PI3K-Komplexes die Bildung einer Isolationsmembran initiiert. ATG8-Proteine werden von den ATG4-Proteasen zu ATG8-I hydrolysiert. Nach der IM-Keimung wird ATG8-I über ATG7, ATG3 und den E3-Komplex an das Phospholipid PE konjugiert und als ATG8-II in die Phagophorenmembran integriert. Die Membran wächst und wird während der Reifung zum Autophagosom vom ESCRT-Komplex geschlossen. ATG8-II wird von ATG4-Proteasen teilweise von der Außenseite des Autophagosoms dekonjugiert und das reife Autophagosom fusioniert entweder mit Endosomen zu Amphisomen oder direkt mit Lysosomen zu Autolysosomen. An der Fusion sind ATG8-Proteine, LAMP2, der SNARE-Komplex und RAB7 beteiligt. Die V-ATPase kriert das für die Fusion notwendige saure Milieu der Lysosomen. Saure Hydrolasen verdauen den Cargo zu einzelnen Nährstoffgrundbausteinen, die ins Zytosol transportiert werden. Das Autolysosom reformiert sich zu einem Lysosom und steht für weitere Fusionen bereit. (B) Die IM bildet sich am ER, aber auch SQSTM1/Ubiquitin-Tropfen und ATG9A-positive Vesikel können als Startpunkt der Phagophorenbildung dienen.

mTOR = *mammalian target of rapamycin*; AMPK = *AMP-activated kinase*; ULK = *UNC51-like kinase*; PI3K = *phosphatidylinositol 3-kinase*; ATG = *autophagy related gene*; PE = *Phosphatidylethanolamin*; ESCRT = *endosomal sorting complex required for transport*; SNARE = *soluble N-ethylmaleimide-sensitive-factor attachment receptor*; RAB = *Ras-related in brain*; V-ATPase = *vacuolar-type adenosine 5'-triphosphatase*; ER = *endoplasmatisches Retikulum*; IM = *Isolationsmembran*. 4

Abbildung 3 Die Membran wachsender Autophagosomen wird von diversen Kompartimenten mit Lipiden versorgt Die Phagophore wird direkt vom ER mit Lipiden versorgt, die vom ATG2-WIPI-Komplex transferiert werden. Am ERES generierte COPI-Vesikel und vom Golgi-Apparat sezernierte COPII-Vesikel liefern ebenfalls Lipide für das Wachstum der Phagophore. ERGIC und ERES stehen in engem Kontakt zur Phagophore und beeinflussen deren Formgebung. ATG9A-positive Vesikel werden am TGN gebildet und transferieren ebenfalls Membranbestandteile. Vermittelt durch RAB11 knospen endosomale Vesikel vom Recyclingendosom ab und liefern Lipide an die Phagophore. Es wurden auch Verbindungen zur Plasmamembran und den Mitochondrien beschrieben. Lipidtröpfchen werden durch die Aktivierung von RAB18 mobilisiert, die die Lipidversorgung der Phagophore indirekt unterstützen. MVB = *multivesicular bodies*; TGN = *trans-Golgi Netzwerk*; ERGIC = *ER Golgi intermediate compartment*; ERES = *ER exit site*; COP = *coat protein*; WIPI = *WD-40 repeat containing protein that interacts with PI*. 8

Abbildung 4 Übersicht über die Syntheseorte von Phospholipiden sowie die Struktur ausgewählter Phospholipide (A) Übersicht über die Syntheseorte der Phospholipide. Lipidtröpfchen liefern Fettsäuren sowie Di und Triacylglycerole und Acetyl-Coenzym A, die über verschiedenste Synthesewege am ER zu PA, PE, PI, PS, Cholesterin und Ceramid verarbeitet werden. Mitochondrien synthetisieren Cardiolipin, PA, PG und PE, wobei nur die Glycerophospholipide ans ER transferiert werden. Vom ER werden Ceramide zum Golgi-Apparat geleitet, in dessen Membran unter anderem SM produziert wird. Ceramid und SM werden an die Plasmamembran transportiert. Dort stehen sie in stetiger Balance mit Sphingosin als Signalmoleküle. (B) Strukturformeln der einfachen Sphingolipide Sphingosin und Ceramid sowie des komplexen Sphingolipides Sphingomyelin, und Strukturformel von Phosphatidylcholin. In Rot dargestellt ist das Lipidgerüst der Phospholipide, in Violett die Fettsäurereste und in Grün die Phosphatkopfgruppe. Alle Sphingolipide bauen auf einer Sphingosinbase als Grundgerüst auf. Ceramid wird über die Konjugation einer Fettsäure an das Stickstoffatom gebildet. Sphingomyelin wird durch die Konjugation von Phosphocholin an die erste Hydroxygruppe der Sphingosinbase gebildet. Glycerophospholipide wie PC bauen auf Glycerin auf, an dessen erstes Kohlenstoffatom die Kopfgruppe und an dessen zweites und drittes die beiden Fettsäuren konjugiert sind. Die Kopfgruppe besteht aus einem Phosphat und einem Konjugat, wie hier Cholin. Cer = Ceramid; Sph = Sphingosin; CL = Cardiolipin; CH = Cholesterin; DG = Diacylglycerol; TG = Triacylglycerol. 14

Abbildung 5 Gating-Strategie zur Isolation von autophagischen Vesikeln Zuerst wurde per *Sideward Scatter* (SSC) und *Forward Scatter* (FSC) die *Population of Interest* (POI) festgelegt und über

ein weiteres Gate wurden Dubletten diskriminiert. Anschließend wurde anhand der Kontrollen ein Fenster mithilfe der Fluoreszenzintensität für die Population autophagischer Vesikel festgelegt. 32

Abbildung 6 Gating-Strategie zur Isolation von autophagischen Vesikeln nach Markierung mit zwei unterschiedlichen Antikörpern Zuerst wurde per SSC und FSC die POI festgelegt und über ein weiteres Gate wurden Dubletten diskriminiert. Anschließend wurde anhand der sekundär Antikörper-Kontrolle ein Fenster mithilfe der Fluoreszenzintensität für die Population MAP1LC3B positiver Vesikel festgelegt. Hieraus ergab sich anhand der allGABARAPs-Färbung eine Population aus Autophagosomen. 33

Abbildung 7 Gating-Strategie für autophagische Vesikel gefärbt mit fluoreszierendem Lipid Zuerst wurde mit SSC und FSC die POI festgelegt und über ein weiteres Gate wurden Dubletten diskriminiert. Anschließend wurde anhand der Kontrollen mithilfe der Fluoreszenzintensität ein Fenster für die Population autophagischer Vesikel festgelegt. Die Gates für NBD und PE wurden unabhängig voneinander festgelegt, während die Isolation der autophagischen Vesikel über das PE-definierte Gate in Abhängigkeit vom NBD-Gate durchgeführt wurde. 34

Abbildung 8 Gating-Strategie für lysosomale Vesikel Zuerst wurde mit SSC und FSC die POI festgelegt und über ein weiteres Gate wurden Dubletten diskriminiert. Anschließend wurde anhand der Kontrollen ein Fenster für die Population azidifizierter Vesikel anhand der LysoTracker RedDND-99-Färbung festgelegt. Die Population lysosomaler Vesikel wurde hiervon abhängig anhand von LAMP2 oder LAMP1 bestimmt. 34

Abbildung 9 Gezielte Phospholipidomanalyse von Gesamtzelllysat und autophagischen Vesikeln Die Phospholipidprofile von Gesamtzelllysat (GL) und von autophagischen Vesikeln (AV) von HeLa WT-Zellen wurden unter basalen Autophagiebedingungen sowie nach Nährstoffentzug und Proteasom-Inhibition mittels Lipidomanalyse bestimmt. (A) *Heatmap* der Konzentration aller untersuchten Phospholipide. Dargestellt ist die Verteilung der Phospholipide relativ zur Gesamtmenge aller gemessenen Phospholipide, wobei jede Probe unabhängig für sich analysiert wurde. Zugrunde liegen die Mittelwerte der Messungen aus drei unabhängigen Versuchswiederholungen. (B) Relative Darstellung der untersuchten Phospholipide als Anteil innerhalb der entsprechenden Phospholipidklasse. Die statistische Auswertung erfolgte über eine *two-way* ANOVA mit dem Posthoc-Test nach Sidak. $n = 3$. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichungen. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,005$. Die Proben für die Phospholipidomanalyse wurden von generiert. Die Phospholipidomanalysen wurden von am Institut für Physiologische Chemie der Universitätsmedizin Mainz durchgeführt. Die Ergebnisse wurden publiziert und die Abbildungen modifiziert (Schmitt *et al.*, 2022). AV = autophagische Vesikel, PC = Phosphatidylcholin, PE = Phosphatidylethanolamin, PI = Phosphatidylinositol, PS = Phosphatidylserin, PG = Phosphatidylglycerol, SM = Sphingomyelin. 57

Abbildung 10 Lokalisation von Sphingomyelin in HeLa WT-Zellen Konfokale Aufnahmen nach Färbung der Membran mit BODIPY-Sphingomyelin in Grün, Dapi als Marker für die Zellkerne in Blau. Mittels immunozytochemischer Färbungen wurden die untersuchten Golgi-Marker GM130

und TGN46 angefärbt und in Rot dargestellt. Die Maßstabsskalen betragen 2 und 20 μM . (A) Sphingomyelin lokalisiert in der gesamten Zelle an der Plasmamembran und den Zellausläufern sowie perinukleären Verdichtungen und Punctae. Die Darstellung ist repräsentativ für $n = 5$. (B) Der Golgi-Marker GM130 kolokalisiert mit Sphingomyelin mit einem Pearson's Korrelationskoeffizienten von $0,53 \pm 0,1$. Die Darstellung ist repräsentativ für 48 Bilder aus $n = 3$. (C) Der Trans-Golgi-Marker TGN46 (rot) kolokalisiert mit Sphingomyelin mit einem Pearson's Korrelationseffizienten von $0,57 \pm 0,08$. Die Darstellung ist repräsentativ für 27 Aufnahmen aus $n = 2$ 60

Abbildung 11 Kolokalisation von Sphingomyelin und Autophagie-assoziierten Strukturen Konfokale Aufnahmen von BODIPY-SM in Grün dargestellt, DAPI als Marker für die Zellkerne in Blau sowie unterschiedliche Autophagie-assoziierte Proteinen in Rot, sofern nicht anders angegeben. Die Maßstäbe entsprechen 2 und 20 μM . (A) mCherryATG9A und SM kolokalisieren mit einem Pearson's Korrelationskoeffizienten von $0,72 \pm 0,08$. Die Darstellung ist repräsentativ für 34 Aufnahmen aus $n = 2$. (B) MAP1LC3B kolokalisiert mit SM mit einem Pearson's Korrelationskoeffizienten von $0,44 \pm 0,09$. Die Darstellung ist repräsentativ für 49 Aufnahmen aus $n = 6$. (C) LAMP2 kolokalisiert mit SM mit einem Pearson's Korrelationskoeffizienten von $0,58 \pm 0,13$. Die Darstellung ist repräsentativ für 46 Aufnahmen aus $n = 4$. (D) MAP1LC3B (Rot) und LAMP2 (Blau) zeigen verschiedene mögliche Kolokalisationen. Der offene Pfeil zeigt auf eine SM und LAMP2 positive Struktur. Die ungefüllte Pfeilspitze zeigt auf eine Struktur, die positiv für MAP1LC3B und SM ist. Die gefüllte Pfeilspitze zeigt auf eine Struktur, die sowohl für SM, MAP1LC3B als auch LAMP2 ist. 61

Abbildung 12 Sphingomyelin verstärkt den autophagischen Flux in HeLa WT-Zellen Immunoblots für ATG9A und MAP1LC3B, Tubulin diente der Ladekontrolle. HeLa WT-Zellen wurden mit 500 nM BODIPY-SM für 2 h gefolgt von 2 μM Bafilomycin A_1 für 2 h in Kulturmedium mit delipidisiertem Serum (A) und in EBSS (C) behandelt. Die dargestellten Immunoblots sind repräsentativ für $n = 3$ bzw. $n = 4$. (B, D) Dargestellt ist die statistische Auswertung der Mittelwerte \pm Standardabweichungen des autophagischen Fluxes gemessen an den Immunoblots von MAP1LC3B für (A) und (C) über den t-Test. * $P < 0,05$, *** $P < 0,005$ 63

Abbildung 13 Phosphatidylcholin induziert den autophagischen Flux in HeLa WT-Zellen (A) Intrazelluläre Lokalisation von NBD-PC (Grün) in HeLa WT-Zellen. Zellkerne sind in Blau dargestellt. Maßstab = 20 μm . Die dargestellten Aufnahmen sind repräsentativ für $n = 3$. (B) Immunozytochemische Färbung von NBD-PC (Grün) und MAP1LC3B (Rot) zur Darstellung ihrer Kolokalisation. Zellkerne sind in Blau dargestellt. Maßstäbe = 20 und 2 μm . Die dargestellten Aufnahmen sind repräsentativ für $n = 6$. (C, E) Immunoblots für MAP1LC3B mit Tubulin als Ladekontrolle von HeLa WT-Zelllysaten nach Behandlung mit 500 nM Phosphatidylcholin (PC) für 2 h gefolgt von 2 μM Bafilomycin A_1 für 2 h in Kulturmedium mit delipidisiertem Serum (C) und in EBSS (E). Die dargestellten Immunoblots sind repräsentativ für $n = 3$ und $n = 4$. (D, F) Dargestellt ist die statistische Auswertung der Mittelwerte \pm Standardabweichungen des

autophagischen Fluxes gemessen an den Immunoblots von MAP1LC3B für (D) und (F) über den t-Test. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$.	64
Abbildung 14 Phosphatidylethanolamin hemmt den autophagischen Flux unter Hungerbedingungen in HeLa WT-Zellen (A) Intrazelluläre Lokalisation von NBD-PE (Grün) in HeLa WT-Zellen. Zellkerne sind in Blau dargestellt. Maßstab = 20 μm . Die dargestellten Aufnahmen sind repräsentativ für $n = 3$. (B) Immunocytochemische Färbung von NBD-PE (Grün) und MAP1LC3B (Rot) zur Darstellung ihrer Kolo-kalisation. Zellkerne sind in Blau dargestellt. Maßstäbe = 20 und 2 μm . Die dargestellten Aufnahmen sind repräsentativ für $n = 6$. (C, E) Immunoblots für MAP1LC3B mit Tubulin als Ladekontrolle von HeLa WT-Zelllysaten nach Behandlung mit 500 nM NBD-PE für 2 h gefolgt von 2 μM Bafilomycin A_1 für 2 h in Kulturmedium mit delipidiertem Serum (C) und in EBSS (E). Die dargestellten Immunoblots sind repräsentativ für je $n = 3$. (D, F) Dargestellt ist die statistische Auswertung der Mittelwerte \pm Standardabweichungen des autophagischen Fluxes gemessen an den Immunoblots von MAP1LC3B für (D) und (F) über den t-Test. ns = nicht signifikant, *** $P < 0,005$.	66
Abbildung 15 Transfermechanismus ATG9A-positiver Vesikel ATG9A lokalisiert unphosphoryliert vorwiegend am Golgi-Apparat. (<i>Links – basale Bedingungen</i>). SRC-Kinase phosphoryliert ATG9A an Y8 (pATG9A) und induziert so die Translokation zu sich vom trans-Golgi-Netzwerk abschnürenden Vesikeln. ATG9A-positive Vesikel dienen als Keim für das Omegasom und versorgen die wachsende Phagophore mit Lipiden. (<i>Mitte – SRC-Inhibition</i>) Die SRC-Kinase wird durch PP2 inhibiert und somit die Phosphorylierung von ATG9A verhindert. Das Fehlen von aktivem ATG9A an der Phagophore hat zur Folge, dass die Lipide, die von ATG2-WIPI geliefert werden, nicht korrekt über die Membrandoppelschicht verteilt werden, weswegen das Längenwachstum der Phagophore stark gestört ist. (<i>Rechts – RNAi</i>) Die Proteinspiegel von ATG9A werden durch siRNA gesenkt. ATG9A-positive Vesikel können nicht gebildet werden. Lipide werden vom ER über ATG2-WIPI transferiert, aber die Skramblase zur Verteilung der Lipide über die Membrandoppelschichten fehlt. Dies inhibiert das Wachstum der Phagophore. ADP = Adenosindiphosphat.	67
Abbildung 16 Die positive Modulation der Autophagie durch Sphingomyelin ist abhängig von ATG9A (A) Immunoblots von ATG9A und MAP1LC3B mit Tubulin als Ladekontrolle. HeLa WT-Zellen wurden mit <i>non sense</i> oder <i>siATG9A</i> -RNA transfiziert und nach 48 h für 2 h mit 500 nM SM und anschließend für 2 h mit 2 μM Bafilomycin A_1 behandelt. Die dargestellten Immunoblots sind repräsentativ für $n = 3$. (B) Immunoblots für ATG9A und MAP1LC3B mit Tubulin als Ladekontrolle. HeLa WT-Zellen wurden 12 h mit 5 μM PP2 behandelt. Nach 8 h wurden 500 nM SM und nach 10 h 2 μM Bafilomycin A_1 supplementiert. Die dargestellten Immunoblots sind repräsentativ für $n = 3$. (C, D) Statistische Auswertung des autophagischen Fluxes anhand der Immunoblots von MAP1LC3B aus (A) und (B) über eine <i>one-way</i> ANOVA mit dem Posthoc-Test nach Tukey's. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichungen. ns = nicht signifikant, * $P < 0,05$.	71

- Abbildung 17 Die *Knockouts* von ATG2A/B und ATG9A beeinträchtigen die Autophagie (A) Immunoblots von ATG2B, ATG2A und MAP1LC3B mit Tubulin als Ladekontrolle. Geladen wurden Zelllysate aus HeLa WT- und HeLa ATG2A/B KO-Zellen. Die Zellen wurden 2 h mit Kulturmedium oder EBSS mit DMSO oder Bafilomycin A₁ behandelt. Die dargestellten Immunoblots sind repräsentativ für n = 3. (B) Statistische Auswertung des autophagischen Fluxes anhand des Immunoblots von MAP1LC3B aus (A) über eine *one-way* ANOVA mit dem Posthoc-Test nach Tukey's. Dargestellt sind die Mittelwerte ± Standardabweichungen. (C) Immunoblots von ATG9A und MAP1LC3B mit Tubulin als Ladekontrolle. Geladen wurden Zelllysate aus HeLa WT- und HeLa ATG9A KO-Zellen. Die Zellen wurden 2 h mit Kulturmedium oder EBSS und DMSO oder Bafilomycin A₁ behandelt. Die dargestellten Immunoblots sind repräsentativ für n = 5. (D) Statistische Auswertung des autophagischen Fluxes anhand des Immunoblots von MAP1LC3B aus (C) eine *one-way* ANOVA mit dem Posthoc-Test nach Tukey's. Dargestellt sind die Mittelwerte ± Standardabweichungen. ns = nicht signifikant, * $P < 0,05$, *** $P < 0,005$ 74
- Abbildung 18 MAP1LC3BI akkumuliert im ATG9A KO Statistische Auswertung der in Abbildung 17C dargestellten Immunoblots von MAP1LC3BI unter basalen Bedingungen und nach Nährstoffentzug ohne Bafilomycin A₁. Dargestellt sind die Mittelwerte ± Standardabweichungen aus n = 5. Ermittlung der Signifikanzen über eine *one-way* ANOVA mit dem Posthoc-Test nach Holmes-Sidak's. ns = nicht signifikant, * $P < 0,05$, *** $P < 0,005$ 75
- Abbildung 19 Immunozytochemische Darstellung Autophagosomen-assoziiierter Strukturen in HeLa ATG2A/B KO und ATG9A KO Dargestellt sind SQSTM1 in Grün, MAP1LC3B in Rot, Dapi in Blau. Maßstäbe = 20 und 2 µM. Dargestellt sind Zellen aus basalen Bedingungen (oben), unter Bafilomycin A₁-Behandlung für 2 h (Mitte) und unter EBSS mit Bafilomycin A₁ für 2 h (unten). (A) HeLa WT-Zellen. Die dargestellten Aufnahmen sind repräsentativ für n = 7. (B) HeLa ATG2A/B KO-Zellen. Die dargestellten Aufnahmen sind repräsentativ für n = 4. (C) HeLa ATG9A KO-Zellen. Die dargestellten Aufnahmen sind repräsentativ für n = 3. 76
- Abbildung 20 Die Proteinspiegel von SQSTM1 sind in ATG2A/B KO und ATG9A KO erhöht (A) Immunoblots von SQSTM1 und Tubulin aus HeLa WT-, ATG2A/B KO- und ATG9A KO-Zellen. (B) Die Immunoblots aus (A) wurden statistisch ausgewertet über eine *one-way* ANOVA mit dem Posthoc-Test nach Tukey's. Dargestellt sind die Mittelwerte ± Standardabweichung aus n = 4. (C) Immunoblots von SQSTM1, SOD1 und MAP1LC3B aus HeLa WT- und ATG9A KO-Zellen. Die Proteinlysate wurden für die Untersuchung von Aggregaten aufbereitet und die lösliche Fraktion (L) gegen die Pelletfraktion (P) aufgetragen. Als Kontrolle diente Gesamtzelllysate (GL). (D) Die Immunoblots der polymeren SQSTM1-Proteinspiegel in HeLa WT- und ATG9A KO-Zellen wurden statistisch ausgewertet über den t-Test. Dargestellt sind die Mittelwerte ± Standardabweichungen aus n = 3. * $P < 0,05$, *** $P < 0,005$ 77
- Abbildung 21 Die Spiegel lysosomaler Proteine sind in ATG2A/B KO-Zellen unverändert, in ATG9A KO-Zellen erhöht (A) Immunoblots von LAMP2 und Cathepsin D (CTSD) mit Tubulin als Ladekontrolle von HeLa WT-, ATG2A/B KO- und ATG9A KO-Zellen. (B, C) Die Immunoblots von LAMP2 und CTSD wurden statistisch ausgewertet über eine *one-way* ANOVA mit einem

Posthoc-Test nach Tukey's. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichung aus $n = 4$.
 ns = nicht signifikant, ** $P < 0,01$ 78

Abbildung 22 Die Aktivität lysosomaler Cathepsine ist in ATG9A KO-Zellen verringert, die Aktivität
 des Proteasoms ist unverändert In schwarz sind die Proben des WT, in Gelb des ATG2A/B KO
 und in Blau des ATG9A KO dargestellt. Die Negativkontrolle des Substratumsatzes ist in grau
 dargestellt. (A) Die Fluoreszenzintensität des Substrates für die Cathepsine D und E wurde über
 Zeit erfasst. Je mehr Substrat umgesetzt wurde, desto höher wurde die Fluoreszenzintensität.
 (B) Die maximalen Umsatzgeschwindigkeit (v_{max}) kalkuliert aus den Fluoreszenzintensitäten
 über die Zeit aus (A) wurde über den t-Test statistisch ausgewertet. Dargestellt sind die
 Mittelwerte \pm Standardabweichungen von v_{max} aus $n = 3$. (C) Die Fluoreszenzintensität des
 Substrates für die Cathepsin B wurde über Zeit erfasst. (D) v_{max} kalkuliert aus den
 Fluoreszenzintensitäten über die Zeit aus (C) wurde über den t-Test statistisch ausgewertet.
 Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichungen von v_{max} aus $n = 3$. (E) Die
 Fluoreszenzintensität des Substrates für das Proteasom wurde über Zeit erfasst. (F) v_{max}
 kalkuliert aus den Fluoreszenzintensitäten über die Zeit aus (E) wurde über den t-Test
 statistisch ausgewertet. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichungen von v_{max} aus
 $n = 4$. ns = nicht signifikant, * $P < 0,05$ 80

Abbildung 23 In ATG2A/B KO-Zellen sind die ATG9A-Proteinspiegel erhöht und die Lokalisation von
 ATG9A ist verändert (A) Immunoblots von ATG2A, ATG2B, ATG9A mit Tubulin als Ladekontrolle
 aus HeLa WT-, ATG2A/B KO- und ATG9A KO-Zellen. Repräsentativ für $n = 4$. (B) Statistische
 Auswertung der Immunoblots von ATG9A über den t-Test. Dargestellt sind die
 Mittelwerte \pm Standardabweichungen aus $n = 3$. (C und D) Immunocytochemische Färbungen
 von ATG9A (Grün), GM130 (Rot) und Dapi (Blau). Die Aufnahmen zeigen Zellen unter basalen
 Autophagie-Bedingungen und sind repräsentativ für $n = 3$. Maßstäbe entsprechen 20 und 2 μ m.
 Dargestellt sind HeLa WT (C) und HeLa ATG2A/B KO Zellen (D). ** $P < 0,01$ 82

Abbildung 24 Der Verlust von RAB18 beeinträchtigt die Autophagie (A) Immunoblots von SQSTM1,
 RAB18, MAP1LC3B mit Tubulin als Ladekontrolle. Die Zellen wurden 2 h in Kulturmedium oder
 EBSS mit DMSO oder Bafilomycin A_1 inkubiert. Repräsentativ für $n = 4$. (B) Statistische
 Auswertung des autophagischen Fluxes anhand des Immunoblots von MAP1LC3B aus (A) über
one-way ANOVA. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichung aus $n = 4$. ns = nicht
 signifikant, * $P < 0,05$. Modifiziert nach Bekbulat *et al.*, 2020. 83

Abbildung 25 Der Verlust von RAB18 erhöht die Aktivität von ATG9A (A) Immunoblots von pY8
 ATG9A, ATG9A, RAB18 mit Tubulin als Ladekontrolle. Die Zellen wurden 2 h in EBSS inkubiert.
 (B) Statistische Auswertung der Immunoblots aus (A) über *one-way* ANOVA. Dargestellt sind
 die Mittelwerte \pm Standardabweichungen aus $n = 4$. ns = nicht signifikant, ** $P < 0,01$. Modifiziert
 nach Bekbulat *et al.*, 2020. 84

Abbildung 26 Sphingomyelin kolokalisiert in ATG2A/B KO- und in RAB18 KO-Zellen mit MAP1LC3B
 und mCherryATG9A BODIPY-SM ist in grün dargestellt, DAPI in Blau. Die Maßstäbe betragen
 2 und 20 μ m. (A) MAP1LC3B (Rot) und SM kolokalisieren in WT-Zellen (i), ATG2A/B KO-Zellen

- (ii) und RAB18 KO-Zellen (iii). (B) mCherryATG9A kolokalisiert mit SM in allen drei Zellmodellen. Die gezeigten Darstellungen sind repräsentativ für $n = 3$ 85
- Abbildung 27 Sphingomyelin fördert den autophagischen Flux in ATG2A/B KO-Zellen und in RAB18 KO-Zellen (A) Immunoblots von ATG2B, ATG2A, ATG9A, MAP1LC3B, RAB18 und Tubulin nach Behandlung mit 500 nM BODIPY-SM für 2 h gefolgt von 2 μ M Bafilomycin A₁ für 2 h in Kulturmedium mit delipidisierendem Serum und EBSS. (B, C) Statistische Auswertung des autophagischen Fluxes anhand des Immunoblots von MAP1LC3B aus (A) mit Bezug zur jeweiligen DMSO-Kontrolle über eine *one way* ANOVA mit dem Posthoc-Test nach Tukey's. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichungen aus $n = 3$ bzw. $n = 6$. ns = nicht signifikant, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,005$ 87
- Abbildung 28 Sphingomyelin erhöht den autophagischen Flux unter Autophagie-induzierenden Bedingungen in den KO-Zelllinien auf ein vergleichbares Niveau zum unbehandelten wt ohne Sphingomyelin. Statistische Auswertung der in Abbildung 27 gezeigten Immunoblots von MAP1LC3B für EBSS mit Normierung auf HeLa wt DMSO über eine *one way* ANOVA mit dem Posthoc-Test nach Tukey's. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichungen aus $n = 3$ bzw. $n = 6$. ns = nicht signifikant, * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,005$ 88
- Abbildung 29 Isolation autophagischer Vesikel mittels eines Fluorophor-gekoppelten Lipides. Immunoblots von MAP1LC3B, SOD1 und Tubulin. Geladen wurden je $5 \cdot 10^6$ autophagische Vesikel (AV) im Vergleich zum Gesamtzelllysat (GL) aus ohne und PE behandelten Zellen. Die dargestellten Immunoblots sind repräsentativ für $n = 5$ 90
- Abbildung 30 Isolate autophagischer Vesikel aus HeLa WT und KO-Zelllinien. Immunoblots von SQSTM1, Tubulin, SOD1 und MAP1LC3B von Gesamtzelllysat (GL) aus HeLa WT und autophagische Vesikeln (AV) aus HeLa WT-Zellen, ATG9A KO- und ATG2A/B KO-Zellen behandelt mit 2 μ M Bafilomycin A₁ für 2 h. Es wurden je $2 \cdot 10^6$ autophagische Vesikel pro Probe geladen. Die dargestellten Immunoblots sind repräsentativ für $n = 3$ 91
- Abbildung 31 Lipide sind in die nicht-autophagosomalen MAP1LC3B-positive Strukturen in den ATG9A KO-Zellen integriert (A) Immunoblots von MAP1LC3B, SOD1 und Tubulin. Es wurden Gesamtzelllysate (GL) und $2 \cdot 10^6$ autophagische Vesikel (AV) aus ATG9A KO-Zellen ohne und mit PE-Behandlung geladen. Die dargestellten Immunoblots sind repräsentativ für drei voneinander unabhängige Versuche. Repräsentativ für $n = 4$. (B, C) Immunocytochemische Färbungen von PC (B) und PE (C), jeweils in Grün dargestellt, zur Untersuchung der Kolokalisation mit MAP1LC3B (Rot) in ATG9A KO-Zellen. Die Zellkerne sind in Blau dargestellt. Maßstäbe = 20 und 2 μ m. Die dargestellten Aufnahmen sind repräsentativ für je $n = 3$ 93
- Abbildung 32 Optimierungen des Isolationsprotokoll (A) Immunoblots für SQSTM1 und MAP1LC3B mit Gesamtzelllysat und $5 \cdot 10^6$ autophagischen Vesikeln isoliert mit allGABARAPs. Die geladenen Proben stammten aus Zellen, die entweder nicht, 30 min oder 60 min mit 1 μ M Bafilomycin A₁ behandelt wurden. Die Präzipitate der autophagischen Vesikel wurden in Urea-CHAPS-Puffer resuspendiert. Repräsentativ für $n = 3$. (B) Immunoblots für SQSTM1 und MAP1LC3B mit Gesamtzelllysat und $5 \cdot 10^6$ autophagischen Vesikeln isoliert mit allGABARAPs.

Die geladenen Proben stammten aus Zellen, die nicht oder 1 h mit 1 μ M Bafilomycin A₁ behandelt wurden. Die autophagischen Vesikel wurden entweder nach Schmitt et al oder nach Wessel und Flügge präzipitiert und die Präzipitate entweder in Urea-CHAPS-Puffer oder in DTT-Puffer gelöst und geladen. Repräsentativ für n = 8. M = Proteinleiter. 95

Abbildung 33 Lysosomen wurden erfolgreich in der Durchflusszytometrie isoliert Immunoblots für Mannose-6-Phosphat-Rezeptor (M6PR), LAMP2 und LAMP1, Tubulin, Cathepsin D (CTSD) und SOD1 mit Gesamtzelllysat und je 2 und 3*10⁶ lysosomalen Vesikeln. Die dargestellten Immunoblots sind repräsentativ für n = 3. 97

Abbildung 34 Relative Verteilung RNA-bindender Proteine innerhalb der identifizierten Autophagiesubstrate Kreisdiagramm der relativen Verteilung der Gene des Proteoms aus basalen Bedingungen, gemessen in autophagischen Vesikeln. Es wurde anhand der Bindungsfähigkeit an diverse RNA-Typen differenziert. Klassische RBPs binden RNA für deren Funktionalität, nicht-klassische RBPs werden von RNA für deren Funktionalität gebunden. Für den Abgleich wurde die RBP2GO-Datenbank des DKFZ genutzt (Caudron-Herger *et al*, 2021) 99

Abbildung 35 Nachweis von RNA-bindenden Proteinen und diversen RNA-Spezies in Autophagosomen (A) Immunoblots von Telomerase, SQSTM1, Tubulin, GAPDH, MAP1LC3B und SRP9 von Gesamtzelllysat und 5*10⁶ Autophagosomen. Die dargestellten Immunoblots sind repräsentativ für n = 5. (B) Agarosegele von 18 S und 28 S rRNA, 7SL, TER sowie der mRNA von *SQSTM1*, *MAP1LC3B*, *ATG16L1* und *RPL19* aus RNA-Extrakten von Gesamtzelllysat und Autophagosomen. Es wurden je zwischen 250 und 500 ng RNA für die RT-Reaktion eingesetzt. Die Agarosegele wurden teilweise von technischen Assistenten angefertigt. Die dargestellten RT-PCR-Ergebnisse sind repräsentativ für n = 12. 102

Abbildung 36 Initiierungsmechanismen der Abschnürung ATG9A-positiver Vesikel (basale Bedingungen) ATG9A wird von der SRC-Kinase phosphoryliert. Dies verstärkt die Bindung an Interaktionspartner und erleichtert die Abschnürung ATG9A-positiver Vesikel. Auch unabhängig von SRC-Kinase bildet sich eine kleine Population ATG9A-positiver Vesikel. Die Vesikel, die mit phosphoryliertem ATG9A dekoriert sind, transferieren zwischen Post-Golgi-Kompartimenten und Phagophore, die sie mit Lipiden versorgen. (Autophagie-Induktion) ATG9A wird zusätzlich von ULK1 phosphoryliert in Abhängigkeit der Phosphorylierung der SRC-Kinase. Die Vesikelabschnürung wird weiter unterstützt und so vergrößert sich die Population ATG9A-positiver Vesikel. Die wachsende Phagophore kann mit mehr Lipiden versorgt werden und mehr ATG9A-positive Vesikel können als Keim für Phagophoren genutzt werden. (Sphingomyelin-Behandlung) Die Abschnürung ATG9A-positiver Vesikel wird abhängig von der SRC-Kinase vermittelten Phosphorylierung und unabhängig von ULK1 verstärkt. Eine Hypothese ist, dass sich SM-reiche Domänen im TGN und auf ATG9A-positiven Vesikeln bilden bzw. dass SM-reiche Membranen auf ATG9A-positiven Vesikeln angereichert werden. 112

Abbildung 37 Fusion von Autophagosom und Lysosom Schematisch dargestellt ist die Fusion von Autophagosom und Lysosom. An die Membran reifer Autophagosomen lagern sich Fusionsvermittelnde Proteine wie STX17 an. An der Lysosomenmembran lokalisiert VAMP8.

Zusammen mit SNAP29 vermitteln die SNARE-Proteine die Fusion von Autophagosom und Lysosom in Zusammenarbeit mit LAMP2 und GABARAP. 121

Abbildung 38 RNA als autophagischer Cargo Schematische Darstellung der möglichen Transportwege von RNA in das Lysosom. RNA wird über die Interaktion mit MAP1LC3B ins Autophagosom aufgenommen, RNaphagie genannt. RNA-Moleküle werden indirekt über die Ribophagie und Granulophagie im Autophagosom eingeschlossen. RNA wird auch über die RNautophagie direkt ins Lysosom transferiert über die Interaktion mit LAMP2C und SIDT2. Dies ist ein mit der CMA verwandter Prozess. Schlussendlich wird die RNA im Lysosom von sauren Nukleasen abgebaut. 124

6.3 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 Familie der humanen ATG8-Proteine..... 6

Tabelle 2 Kulturmedium 24

Tabelle 3 Elektroporationspuffer in PBS 25

Tabelle 4 3x SDS-Lysispuffer in MilliQ-Wasser 27

Tabelle 5 4x Ladepuffer in MilliQ-H₂O..... 28

Tabelle 6 BisTris-Puffer für Gelelektrophorese 28

Tabelle 7 Zusammensetzung der BisTris-Gele 29

Tabelle 8 10x TBS..... 30

Tabelle 9 Entwicklerlösung A 30

Tabelle 10 Entwicklerlösung B 30

Tabelle 11 Entwicklerlösung C 30

Tabelle 12 Urea-Puffer 36

Tabelle 13 2x DTT-Ladepuffer in MilliQ-H₂O 36

Tabelle 14 Eindeckmedium in PBS 37

Tabelle 15 zytosolischer Lysispuffer 38

Tabelle 16 lysosomaler Lysispuffer 38

Tabelle 17 Reaktionspuffer 38

Tabelle 18 Proteasomlysispuffer 39

Tabelle 19 Assaypuffer..... 39

Tabelle 20 Reaktionsansatz RNase-Verdau 40

Tabelle 21 Reaktionsansatz DNase-Verdau 41

Tabelle 22 Reaktionsansatz reverse Transkription 42

Tabelle 23 Reaktionsansatz Polymerasekettenreaktion 42

Tabelle 24 PCR-Programm für den Nachweis spezifischer RNAs in autophagischen Vesikeln 42

Tabelle 25 50x TAE-Puffer 43

Tabelle 26 Allgemeine Gerätschaften 45

Tabelle 27 Gerätschaften Molekularbiologie 45

Tabelle 28 Gerätschaften Proteinbiochemie 46

Tabelle 29 Gerätschaften Zellkultur 46

Tabelle 30 Chemikalien	46
Tabelle 31 Kits und Größenstandards.....	49
Tabelle 32 Enzyme	49
Tabelle 33 Farbstoffe.....	49
Tabelle 34 primäre Antikörper für Durchflusszytometrie	50
Tabelle 35 sekundäre Antikörper für Durchflusszytometrie	50
Tabelle 36 primäre Antikörper für Immunoblotting	50
Tabelle 37 sekundäre Antikörper für Immunoblotting.....	51
Tabelle 38 primäre Antikörper für Immunofluoreszenzfärbungen	51
Tabelle 39 sekundäre Antikörper für Immunofluoreszenzfärbungen	51
Tabelle 40 Bakterienstämme	52
Tabelle 41 humane Zelllinien.....	52
Tabelle 42 PCR-Primer	52
Tabelle 43 Plasmide	53
Tabelle 44 RT-Primer	53
Tabelle 45 siRNA-Sequenzen	53
Tabelle 46 Elektronische Datenverarbeitungs- (EDV)-Programme	53
Tabelle 47 Online-Werkzeuge	54
Tabelle 48 Verteilung der RBP-Gene in den Proteomdaten	99
Tabelle 49 Detektierte GO-Termini der klassischen RBPs	100

6.4 Publikationen

- Juli 2023 Schmitt D, Bozkurt S, Henning-Domres P, Huesmann H, Eimer S, Bindila L, Behrends C, Boyle E, Wilfling F, Tascher G, Münch C, Behl C, Kern A. FACS-mediated isolation of native autophagic vesicles. *Autophagy*. 2023 Jul;19(7):2146-2147. doi: 10.1080/15548627.2022.2151188. Epub 2022 Nov 29. PMID: 36416088; PMCID: PMC10283435.
- Oktober 2022 Schmitt D, Bozkurt S, Henning-Domres P, Huesmann H, Eimer S, Bindila L, Behrends C, Boyle E, Wilfling F, Tascher G, Münch C, Behl C, Kern A. Lipid and protein content profiling of isolated native autophagic vesicles. *EMBO Rep*. 2022 Dec 6;23(12):e53065. doi: 10.15252/embr.202153065. Epub 2022 Oct 10. PMID: 36215690; PMCID: PMC9724672.

6.5 Posterpräsentationen

- Oktober 2022 3rd Frankfurt Conference on Quality Control in Life Processes; Frankfurt a.M., Deutschland
- Juni/Juli 2022 Integrating the molecular, mechanistic and physiological diversity of autophagy; EMBO Workshop; Eger, Ungarn
- September 2021 Molecular and functional characterization of selective autophagy; SFB1177 Retreat; Cavtat, Croatia

6.6 Danksagung

Nachdem es nun endlich geschafft und die Dissertation fertig geschrieben ist, möchte ich mich an dieser Stelle bei allen bedanken, die mich auf diesem Weg begleitet und ertragen haben.

Mein herzlicher Dank gilt _____ für die Möglichkeit, meine Dissertation an seinem Institut in einem so spannenden Forschungsfeld anfertigen zu können. Vielen Dank für die Möglichkeit, sich mit dem Feld der Autophagie bekannt machen zu können und schlussendlich auch für die Durchsicht und Bewertung meiner Arbeit.

Vor allem möchte ich mich bei _____ bedanken, der mich in seine Gruppe aufgenommen und mich auf diese Reise geschickt hat. Durch dich habe ich viele Eindrücke, vor allem über den SFB, von weiteren Aspekten der Autophagieforschung erhalten und habe sowohl wissenschaftlich als auch persönlich viel gelernt.

Ich bedanke mich auch bei der Gemeinschaft des SFB1177, dessen DoktorandInnen und PostDocs ich näher kennenlernen durfte. Es war so erleichternd und hilfreich, sich auszutauschen über persönliche und wissenschaftliche Belange.

Ich möchte mich weiter bei der gesamten _____ und bei der _____ für eine unvergessliche Zeit und für die viele Unterstützung, Motivation und den guten Zuspruch bedanken, die ich von vielen von euch erfahren habe. Meine Zeit an diesem Institut hat mich viel über mich selbst und darüber gelehrt, was mir wirklich wichtig ist und was ich von einer Arbeitsgruppe erwarte. Ich möchte mich für die späten Stunden im Büro mit Sekt und Bier bedanken, für die „3-Engel-für-das-Labor“-Momente, für viel Lachen in der Zellkultur und für den „Pascale’schen Filter“, den ich wohl nie wieder loswerde. Für viele Ohrwürmer, Gesangseinlagen und YouTube-Empfehlungen, für Pausen auf der Wiese mit Schneemännern oder mit den Füßen im Pool. Für Versteckspiele unter Mikroskopen, in Dunkelkammern und im Wurmraum. Für unermüdliches Zuhören, wenn alles zu viel wurde, und für so viel wissenschaftlichen Austausch über Ideen, Probleme und Lösungsansätze. Danke für die unvergessliche Dame im Flugzeug, bei der wir uns nicht sicher waren, ob sie echt war oder eine Heimsuchung. Für die verrückten Spanier, die einen aufgrund der nationalen Historie attackieren, obwohl die eigene auch ziemlich düster ist. Und zuletzt für die unverbesserliche Theorie darüber, wie man ein PI wird und ob man dafür wirklich seine Druckerkenntnisse aufgeben möchte und sogar muss.

Zu guter Letzt danke ich meiner Familie. Die letzten Jahre waren in vielerlei Hinsicht herausfordernd und ihr wart mein Fels in der Brandung, mein Licht in der Dunkelheit und die Freude in meinem Herzen. Ohne euch wäre diese Promotion nicht möglich gewesen und ich wäre nicht so weit gekommen. Ich verspreche, die nächsten Jahre werden anders herausfordernd. Ihr seid mein Ein und Alles.

6.7 Lebenslauf

