

University of Groningen

Peroxisome biogenesis and maintenance in yeast

Wroblewska, Justyna

DOI:
[10.33612/diss.113500905](https://doi.org/10.33612/diss.113500905)

IMPORTANT NOTE: You are advised to consult the publisher's version (publisher's PDF) if you wish to cite from it. Please check the document version below.

Document Version
Publisher's PDF, also known as Version of record

Publication date:
2020

[Link to publication in University of Groningen/UMCG research database](#)

Citation for published version (APA):
Wroblewska, J. (2020). *Peroxisome biogenesis and maintenance in yeast*. University of Groningen.
<https://doi.org/10.33612/diss.113500905>

Copyright

Other than for strictly personal use, it is not permitted to download or to forward/distribute the text or part of it without the consent of the author(s) and/or copyright holder(s), unless the work is under an open content license (like Creative Commons).

Take-down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

Downloaded from the University of Groningen/UMCG research database (Pure): <http://www.rug.nl/research/portal>. For technical reasons the number of authors shown on this cover page is limited to 10 maximum.

Samenvatting

Eukaryoten, bacteriën en archaea vertegenwoordigen de drie domainen van het leven. In tegenstelling tot bacteriën en archaea, bevatten cellen van eukaryote organismen compartimenten, de zogenaamde organellen. Organellen worden door membranen gescheiden van de rest van de cel. Hierdoor is het mogelijk ideale omstandigheden te creëren voor allerlei gespecialiseerde processen.

Eén klasse van organellen zijn de peroxisomen. Deze organellen hebben één membraan en een eiwit rijke matrix. Peroxisomen werden voor het eerst beschreven door Rhodin in 1954 [1]. De Duve heeft deze organellen vervolgens verder biochemisch gekarakteriseerd [2,3]. Inmiddels weten we veel over de functies die peroxisomen kunnen vervullen. De meest voorkomende functie is de afbraak van vetzuren (bèta-oxidatie) en het onschadelijk maken van het giftige waterstofperoxide, wat in peroxisomen als bijproduct wordt geproduceerd. Het goed functioneren van peroxisomen is heel erg belangrijk voor de mens. Dit blijkt onder anderen uit het feit dat erfelijke ziekten, die het gevolg zijn van niet goed gevormde peroxisomen, gekarakteriseerd worden door ernstige ziektebeelden. In deze patiënten bevinden zich mutaties in *PEX* genen. *PEX* genen coderen voor eiwitten (peroxins) die een sleutelrol spelen in de vorming van peroxisomen.

Gisten zijn uitstekende modelorganismen voor onderzoek naar de vorming van peroxisomen, aangezien peroxisomen niet essentieel zijn voor de levensvatbaarheid in deze organismen. Bovendien kunnen peroxisoomvorming en -afbraak makkelijk geïnduceerd worden in gisten door eenvoudige aanpassingen van de kweek omstandigheden.

Peroxisomen kunnen op twee verschillende manieren gevormd worden, namelijk door deling uit al bestaande peroxisomen en *de novo* vanuit een ander organel, het endoplasmatisch reticulum (ER). Er zijn aanwijzingen dat deling van peroxisomen de meest gebruikte vorm van peroxisoom vermeerdering is in normale (wild-type) gistcellen. Er zijn echter ook studies die suggereren dat *de novo* synthese het belangrijkste proces.

Hoofdstuk 1, de inleiding van dit proefschrift, vat de huidige kennis over peroxisoombiologie samen. De nadruk ligt hierbij op de stand van zaken in het onderzoek naar de mechanismen van peroxisoomdeling, *de novo* vorming, overerving en groei.

Hoofdstuk 2 beschrijft onderzoek naar pre-peroxisomale vesicles (PPVs), die door middel van gedetailleerde microscopische studies ontdekt werden in cellen van bakkersgist (*Saccharomyces cerevisiae*), waarin een belangrijk *PEX* gen, *PEX3*, ontbreekt (zogenaamde *pex3* cellen). Lange tijd werd aangenomen dat peroxisomale membraaneiwitten (peroxisomal membrane proteins, PMPs) naar peroxisomale membranen worden getransporteerd via het ER. Pex3 speelt volgens dit model een rol in de vorming van kleine blaasjes (vesicles) waarin zich de PMPs bevinden die afgesplitst worden van het ER. Als dit model klopt, zouden peroxisomale membranen compleet afwezig moeten zijn in *pex3* cellen. Bovendien zouden PMPs zich in deze cellen ophopen in het ER. Ons onderzoek liet echter zien dat *S. cerevisiae* cellen zonder Pex3 nog steeds peroxisomale membranen bevatten. In tegenstelling tot *pex3* cellen van de gist *Hansenula polymorpha* [4], zijn deze vesicles behoorlijk stabiel in *S. cerevisiae*. Geen van de 19 PMPs die we hebben geanalyseerd bleek zich op het ER te bevinden. Dit is niet in overeenstemming met het model waarin alle PMPs eerst naar het ER sorteren en in een Pex3 afhankelijk proces het ER weer verlaten. Een substantiële groep van de geteste PMPs bevond zich in membraanvesicles, waar zij correct werden geassembleerd tot functionele eiwitcomplexen. De overige PMPs bevonden zich in andere celorganellen of waren niet detecteerbaar. Dit suggereert dat deze PMPs afhankelijk zijn van Pex3 voor insertie in het peroxisomale membraan. Onze bevindingen trekken de huidige opvatting in twijfel dat Pex3 essentieel is voor het sorteren van alle nieuw gesynthetiseerde PMPs naar het peroxisomale membraan en wijzen op het bestaan van andere routes voor PMP-sortering. Dit suggereert dat er nog veel te ontdekken is om de moleculaire mechanismen van peroxisomale membraanvorming volledig te begrijpen.

In **Hoofdstuk 3** presenteren we onderzoek naar de vorming en eiwitsamenstelling van PPVs in *pex3* cellen. Geautomatiseerde methoden voor het kruisen, sporuleren en selectie van gist stammen werden gebruikt om twee collecties van gistmutanten te maken. De eerste collectie bestond uit *pex3* mutanten die het rood fluorescerende Pex14-mCherry produceren als marker van de PPVs, samen met eiwitten die getagd waren met een groen fluorescerend eiwit (GFP), die ongeveer 2000 eiwitten van het *S. cerevisiae* proteoom omvatten. Door middel van high throughput fluorescentiemicroscopie (HT-FM) werd de collectie geanalyseerd met als doel om te kijken welke GFP getagde eiwitten co-localiseren met Pex14-mCherry. Naast peroxins vonden we ook eiwitten waarvan bekend was dat ze een functie hebben in andere celorganellen. Dit suggereert dat peroxisomale vesicles mogelijk vanaf een ander cel organel ontstaan. Bij de tweede analyse werden gen deleties geïntroduceerd in de *pex3* stam met als doel te kijken of het fluorescentie patroon van Pex14-GFP zou veranderen. Analyse van deze collectie resulteerde niet in de identificatie van mutanten waarin Pex14-mCherry spots afwezig waren. Dit suggereert

dat de biogenese van PPVs een complex proces is waarbij de functie van meerder eiwitten is betrokken. Nadere analyse van de gist collecties wees uit dat niet alle stammen het correcte genotype hadden. Aan het eind van dit hoofdstuk hebben we deze en andere valkuilen van de gebruikte experimentele benaderingen beschreven.

Het onderzoek naar fysieke contacten tussen organellen is de laatste jaren zeer snel gevorderd. Hieruit is gebleken dat membraan contact sites (MCSs) veel voorkomen en belangrijk zijn voor de functie en vorming van celorganellen. In **Hoofdstuk 4** hebben we ons gericht op de functie van een vacuolair membraan eiwit, Vac8, welke werd gevonden in peroxisomale fracties die geïsoleerd werden uit *S. cerevisiae* [5] of *H. polymorpha* [6] cellen. Eerdere studies in *S. cerevisiae* hebben uitgewezen dat Vac6 nodig is voor overerving en fusie van vacuolen. ScVac8 is ook essentieel voor de vorming van MCSs die celkern-vacuole junctions (nucleus-vacuole junctions, NVJs) worden genoemd. Naast Vac8 is in bakkersgist ook het kernvelop eiwit Nvj1 belangrijk voor NVJs [7].

In silico analyse van het *H. polymorpha* genoom wees uit dat deze gist dezelfde NVJ-gerelateerde eiwitten bevat als bakkersgist, behalve Nvj1. Dit geeft aan dat de samenstelling van NVJs in verschillende gist soorten niet is geconserveerd. Volgens onze resultaten is HpVac8 essentieel voor NVJ-vorming in *H. polymorpha*, aangezien er geen nauwe contacten werden geobserveerd tussen de celkern en vacuole in de *vac8* mutant. We lieten ook zien dat, net als in *S. cerevisiae*, HpVac8 belangrijk is voor overerving van vacuolen. De afwezigheid van HpVac8 had echter geen effect op vacuole-vacuole fusie. Onze data suggereren dat HpVac8 waarschijnlijk niet betrokken is bij de functie of vorming van peroxisomen omdat zowel deletie als overexpressie van *VAC8* geen effect had op de hoeveelheid peroxisomen. De reden voor de aanwezigheid van Vac8 in peroxisomale fracties is daarom nog steeds onduidelijk.

Ondanks dat *de novo* peroxisoombiogenese een aantrekkelijk model is voor cellen die tijdelijk deze organellen niet hebben, is groei en deling waarschijnlijk de meest voorkomende vorm van peroxisoom vermenigvuldiging in normale gistcellen. In het laatste hoofdstuk van dit proefschrift (**Hoofdstuk 5**), hebben we ons gericht op de manieren waarop gistmutanten met een defect in deling en/of overerving peroxisomen verkrijgen. We beschrijven dat deling van peroxisomen in *H. polymorpha* kan plaatsvinden zonder een belangrijke component van de organeldelingsmachinerie, Pex11. Gedetailleerde live cell imaging (microscopie van levende cellen) wees uit dat in veel *pex11* mutantencellen nog steeds peroxisoomdeling plaatsvindt, gevolgd door overdracht van een klein peroxisoom naar knoppen van de moedercel. Alleen wanneer gelijktijdig deling en overerving is geblokkeerd, door deletie van zowel *PEX11* als *INP2*,

is er helemaal geen peroxisoom deling meer waarneembaar. Hierdoor ontbreken peroxisomen initieel in nieuwgevormde knoppen van cellen van *pex11 inp2* mutanten. Hoogstwaarschijnlijk worden in latere stadia van knopvorming *de novo* nieuwe peroxisomen gevormd. Als dat het geval is, dan is *de novo* biogenese een relatief langzaam proces vergeleken t.o.v. normale peroxisoom vorming door groei en deling van bestaande organellen.

Conclusies

Het onderzoek dat beschreven wordt in dit proefschrift heeft bijgedragen aan een nieuw model van peroxisoom biogenese waarin Pex3 niet cruciaal is voor de vorming van peroxisomale membranen. In de afwezigheid van Pex3 bevinden zich namelijk nog steeds peroxisomale membraan structuren in de cel. Deze kunnen echter niet matureren tot volwaardige peroxisomen.

Blijkbaar zijn er mechanismen voor de sortering van bepaalde PMPs die functioneren zonder Pex3. Het is belangrijk om deze mechanismen verder te onderzoeken. Meer gedetailleerde studies van stammen die gevonden zijn in de screens beschreven in dit proefschrift zou kunnen leiden tot de identificatie van eiwitten die een rol spelen in dit proces.

De uitkomsten van dit promotie onderzoek lieten verder zien dat knoppen van gistcellen met een sterk defect in peroxisoom deling en overerving, initieel geen detecteerbare peroxisomen bevatten. Waarschijnlijk vormen deze organellen *de novo* vormen. Een belangrijke vraag is of de PPVs die gevonden zijn in *pex3* mutantencellen ook in dit proces een rol spelen. Dit zou met gedetailleerde microscopische studies aan cellen van *pex11 inp2* mutanten gedaan kunnen worden.

Referenties:

1. Rhodin, J. Correlation of ultrastructural organization and function in normal and experimentally changed proximal tubule cells of the mouse kidney. PhD Thesis; Karolinska Institutet, Stockholm, Sweden; 1954.
2. De Duve, C., Baudhuin, P. Peroxisomes (microbodies and related particles). *P Physiol Rev.* 1966; 46: 323-57. doi: 10.1152/physrev.1966.46.2.323.
3. De Duve, C. The peroxisome: a new cytoplasmic organelle. *Proc R Soc Lond B Biol Sci.* 1969; 173: 71-83.
4. Knoops, K., Manivannan, S., Cepinska, M.N., Krikken, A.M., Kram, A.M., Veenhuis, M., et al. Preperoxisomal vesicles can form in the absence of Pex3. *J Cell Biol.* 2014; 204: 659–68. doi: 10.1083/jcb.201310148.
5. Marelli, M., Smith, J.J., Jung, S., Yi, E., Nesvizhskii, A.I., Christmas, R.H., et al. Quantitative mass spectrometry reveals a role for the GTPase Rho1p in actin organization on the peroxisome membrane. *J Cell Biol.* 2004;167: 1099–112. doi: 10.1083/jcb.200404119.
6. Singh, R. Identification of novel peroxisome functions in yeast. PhD Thesis; University of Groningen, The Netherlands; 2019.
7. Pan, X., Roberts, P., Chen, Y., Kvam, E., Shulga, N., Huang, K., et al. Nucleus-vacuole junctions in *Saccharomyces cerevisiae* are formed through the direct interaction of Vac8p with Nvj1p. *Mol Biol Cell.* 2000; 11: 2445–57. doi: 10.1091/mbc.11.7.2445.
8. Liu, X., Ma, C., Subramani, S. Recent advances in peroxisomal matrix protein import. *Curr Opin Cell Biol.* 2012; 24: 484–489. doi: 10.1016/j.ceb.2012.05.003.

