

University of Groningen

The *hansenula polymorpha* pex23 family: overlooked proteins In organelle formation

Wu, Fei

DOI:
[10.33612/diss.157801525](https://doi.org/10.33612/diss.157801525)

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:
2021

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

Citation for published version (APA):

Wu, F. (2021). *The hansenula polymorpha pex23 family: overlooked proteins In organelle formation*. [Thesis fully internal (DIV), University of Groningen]. University of Groningen.
<https://doi.org/10.33612/diss.157801525>

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).

The publication may also be distributed here under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license. More information can be found on the University of Groningen website: <https://www.rug.nl/library/open-access/self-archiving-pure/taverne-amendment>.

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

Peroxisomen zijn organellen met een enkel membraan en geconserveerde functies in β -oxidatie van vetzuren en ontgiftiging van waterstofperoxide. In mensen veroorzaken peroxisome biogenese-defecten ernstige klinische hersenziekten en kunnen ze leiden tot de dood. Biogenese van peroxisomen is afhankelijk van peroxins, die gecodeerd worden door *PEX* genen. Tot nu toe zijn er 37 peroxins geïdentificeerd en de meeste daarvan zijn peroxisomale membraaneiwitten (PMPs) die betrokken zijn bij de import van matrix-eiwitten, de insertie van membraaneiwitten en de regulering van het aantal en de grootte van peroxisomen.

Peroxins van de Pex23 eiwitfamilie zijn gelokaliseerd op het endoplasmatisch reticulum (ER). Deze eiwitten bestaan alleen in schimmels en controleren het aantal en de grootte van peroxisomen (Yuan et al., 2016). Het aantal eiwitten die behoren tot de Pex23-familie verschilt per gistsoort. Tot nu toe werden verschillende functies voorgesteld voor eiwitten van deze familie. De *Saccharomyces cerevisiae* Pex23 familie-eiwitten Pex29, Pex30 en Pex31 komen samen met de endoplasmatisch reticulum (ER) reticulon-eiwitten Rtn1, Rtn2 en het reticulon-achtige eiwit Yop1 voor in een eiwitcomplex. Dit complex zit op ER-peroxisome contactplaatsen, EPCONs genaamd (David et al., 2013; Mast et al., 2016). De EPCONs reguleren *de novo* peroxisoomvorming vanuit het ER via regulering van biogenese van preperoxisomale blaasjes (PPV) (David et al., 2013; Joshi et al., 2016). Lipide druppels (LDs) worden geproduceerd in hetzelfde ER gebied waar ScPex30 lokaliseert. De afwezigheid van het *PEX30* gen beïnvloedt zowel de peroxisoom- als de LD-vorming, wat aangeeft dat dit gen betrokken is bij de biogenese van meer dan één organel.

Membraan contact sites (MCSs) zijn regio's waar twee organellaire membranen nauw met elkaar verbonden zijn. MCSs zijn betrokken bij vele processen, waaronder lipide- en Ca^{2+} -transport, organelle deling en positionering (Prinz et al., 2020). MCSs bevatten eiwitten met vier verschillende functies, namelijk structurele eiwitten, functionele eiwitten, sorteer/rekruterings-eiwitten en regulator-eiwitten. MCS-eiwitten kunnen meer dan één van deze functies vervullen (Scorrano et al., 2019).

De gist *Hansenula polymorpha* is een ideaal modelorganisme om peroxisomen en peroxisomale contactplaatsen te bestuderen. In *H. polymorpha* zijn peroxisomen niet nodig voor de groei van cellen op glucose. Als gevolg daarvan bevatten *H. polymorpha* cellen die op glucose groeien één enkel, klein peroxisoom. Functionele peroxisomen zijn echter essentieel voor de groei van cellen op methanol. Daarom bevatten methanol-gekweekte wild-type cellen meerdere, grote peroxisomen. Daarnaast kunnen mutante stammen die geen functionele peroxisomen hebben niet groeien op methanol als koolstofbron, maar groeien deze cellen normaal gesproken wel op glucose bevattende media.

Wanneer glucose-gekweekte cellen worden overgebracht naar methanol medium groeien de peroxisomen snel in omvang en nemen ze in aantal toe. Dit gaat gepaard met de opname van lipiden uit andere membranen, omdat gistperoxisomen niet in staat zijn om

membraanlipiden te synthetiseren. Peroxisomale MCSs zijn waarschijnlijk betrokken bij dit proces. Als dit klopt, wordt peroxisomale biogenese naar verwachting beïnvloed door mutaties in peroxisomale MCS eiwitten.

Het doel van dit proefschrift was om de rol van de *H. polymorpha* Pex23 familie-eiwitten in organelbiogenese beter te begrijpen.

Hoofdstuk I vat de huidige kennis over peroxisomen in gist samen. Het geeft een overzicht van de huidige kennis over peroxins die betrokken zijn bij het transport van matrix-eiwitten van het cytosol naar de peroxisomale matrix, het sorteren van peroxisomale membraan-eiwitten en de proliferatie van peroxisomen. Daarnaast worden andere eiwitten beschreven die niet gecodeerd zijn door *PEX*-genen, maar die een rol spelen bij het reguleren van de peroxisoomvorming en -grootte. Daarnaast wordt een overzicht gegeven van de al bekende peroxisomale MCS's, de huidige kennis over de eiwitsamenstelling van deze MCSs en hun functies in de peroxisomale biologie.

In **hoofdstuk II** hebben we alle vier de *H. polymorpha* Pex23 familie-eiwitten, namelijk Pex23, Pex24, Pex29 en Pex32, systematisch bestudeerd. We laten zien dat alle vier de Pex23 familie-eiwitten gelokaliseerd zijn op het ER. Twee ervan (Pex24, Pex32) hopen op bij de peroxisoom-ER contactplaatsen (ook wel EPCONS genoemd), terwijl de andere twee (Pex23 en Pex29) zich ook op andere gebieden van het ER bevinden.

Cellen van een *PEX29* deletiestam (*pex29*) vertoonden geen peroxisomaal fenotype, wat suggereert dat ofwel Pex29 een redundante functie heeft met de andere drie Pex23 familie-eiwitten bij het reguleren van peroxisoombiogenese, ofwel dat Pex29 geen bonafide peroxin is. In *pex23*, *pex24* of *pex32* cellen, daalde het aantal peroxisomen in combinatie met een toename van de peroxisoomgrootte, wat aangeeft dat deze drie eiwitten nodig zijn voor de proliferatie van peroxisomen. Analyse van de afstand tussen de ER-membraan en de peroxisomale membraan bij stammen zonder eiwitten van de Pex23-familie toonde aan dat deze afstand toenam bij het verwijderen van *PEX23*, *PEX24* of *PEX32*, maar niet *PEX29*. Dit betekent dat Pex23, Pex24 en Pex32 nodig zijn voor het associëren van peroxisomen met het ER. Om te testen of de waargenomen peroxisomale fenotypes in stammen zonder deze genen te wijten zijn aan de toename van de afstand tussen beide membranen, hebben we een kunstmatig tether-eiwit (ERPER) geïntroduceerd, dat bestaat uit het peroxisomaal membraaneiwit Pex14 en het ER tail anchored eiwit Ubc6. Peroxisomale defecten en het onvermogen van de cellen om te groeien op methanol werden grotendeels gecompenseerd in *pex24* en *pex32* cellen die ERPER bevatten, maar slechts licht verbeterd in *pex23::ERPER* cellen. Dit betekent dat een nauwe associatie tussen de ER en peroxisoom essentieel is voor het behoud van functionele peroxisomen in cellen die geen *PEX24* of *PEX32* bevatten. Ook resulteerde de introductie van het ERPER in een toename van het peroxisomale membraanoppervlak in *pex24* en *pex32* mutanten, wat suggereert dat EPCONS belangrijk zijn voor peroxisomale membraanexpansie. Bovendien zagen we dat het peroxisomale membraaneiwit Pex11 belangrijk is voor de vorming van Pex32-afhankelijke EPCONS. Bij het verwijderen van *PEX11* worden EPCONS verstoord,

wat gepaard gaat met een verandering in de verdeling van Pex32 over het ER. In wild-type cellen hoopt Pex32 zich meestal op één plek in de cel op, terwijl bij afwezigheid van Pex11 het eiwit op meerdere plaatsen in de ER aanwezig is. In wezen zijn vergelijkbare resultaten waargenomen bij een stam zonder PMP Pex34, een ander lid van de Pex11-eiwitfamilie. Net als in *pex11* cellen werden in *pex34* cellen EPCONS verstoord en ging de enkele Pex32-GFP spot verloren (**Hoofdstuk III**). Onze gegevens suggereren dat Pex11, Pex34 (aan de peroxisomale membraan) en Pex24 en Pex32 (aan het ER) nodig zijn voor de vorming van EPCONS. Waarschijnlijk zijn EPCONS betrokken bij het lipidetransport van het niet-vesiculaire membraan van de ER naar de peroxisomen.

ScPex30 speelt een rol in de regulering van de vorming van preperoxisomale vesicles (PPVs) vanaf het ER. We vonden geen verschil in het aantal en de morfologie van PPVs in *pex32*- en WT-cellen, wat aangeeft dat *H. polymorpha* Pex32 niet belangrijk is voor het reguleren van de PPV-vorming.

In **hoofdstuk III** hebben we de structuur en functie van *H. polymorpha* Pex32 verder onderzocht. HpPex32 heeft vier voorspelde transmembraandomeinen (TMs) aan de N-terminus en een DysF-motief aan de C-terminus (Wu et al., 2020). Co-localisatie analyse van verschillende Pex32-constructen toonde aan dat de TMs belangrijk zijn voor het sorteren van Pex32 naar het ER, terwijl het DysF-domein nodig is voor het concentreren van Pex32 op EPCONS. Bovendien is het DysF-domein op zichzelf in staat om te associëren met peroxisomen. Het verwijderen van het DysF-domein van Pex32 had geen invloed op de hoeveelheid peroxisomen en de grootte, wat aangeeft dat het N-terminale domein met de vier TMs voldoende is voor de Pex32-functie.

In *pex32*-cellen zijn de Pex11-niveaus drastisch verlaagd. Daarom zouden de peroxisomale defecten in *pex32* cellen (defect in EPCONS, minder en grotere peroxisomen) indirect kunnen worden veroorzaakt door de lage Pex11 niveaus. Waarschijnlijk is dit te wijten aan de afbraak van Pex11, omdat we niet in staat waren om verhoogde Pex11-niveaus in *pex32*-cellen te verkrijgen via overexpressie van *PEX11*.

Overexpressie van *PEX32* herstelde de peroxisomale defecten in *pex32*-cellen, maar niet in *pex11*- of *pex34*-cellen, wat betekent dat Pex32 een andere functie heeft dan Pex11 of Pex34. Op basis van deze gegevens stellen we voor dat Pex32, Pex11 en Pex34 allemaal nodig zijn voor het reguleren van de peroxisomale biogenese, terwijl deze drie eiwitten een rol spelen in verschillende moleculaire mechanismen.

In **hoofdstuk II** hebben we aangetoond dat *H. polymorpha* Pex23 en Pex29 op meerdere verschillende ER-domeinen lokaliseren, waaronder de nucleus-vacuole junctions (NVJs). Mogelijk zitten deze twee eiwitten op verschillende ERMCSs. Om dit verder te onderzoeken, analyseerden we de morfologie van andere celorganellen in mutanten die een eiwit van de Pex23 familie missen (**Hoofdstuk IV**). In *pex23*, *pex24*, *pex29* en *pex32* cellen werden vacuoles, LDs en mitochondriën bestudeerd door middel van fluorescentiemicroscopie van cellen die waren gekleurd met organel specifieke kleurstoffen. In cellen zonder Pex23 of Pex29 werden minder LDs waargenomen en de morfologie van het mitochondriaal

netwerk was afwijkend. Door middel van elektronenmicroscopie (EM) werd aangetoond dat er meer mitochondriële structuren in *pex23* en *pex29* cellen zijn. Ook in *pex23* en *pex29* cellen zijn mitochondriën meer geclusterd. Dit geeft aan dat het verwijderen van *PEX23* of *PEX29* een defect in de mitochondriële fusie kan veroorzaken. Gedetailleerde correlatieve licht- en elektronenmicroscopie studies gaven aan dat Pex23 zich niet specifiek op de ER-mitochondriën MCS ophoopte. In plaats daarvan accumuleerde het op NVJs. Bovendien waren in *pex23*-cellen mitochondria-ER-contactplaatsen en NVJs normaal aanwezig. Er is meer onderzoek nodig om de cellulaire functie van HpPex23 en HpPex29 te begrijpen.

Samenvattend beschrijf ik in mijn proefschrift onderzoek aan alle vier de *H. polymorpha* Pex23 familie-eiwitten. Op basis van eiwitlokalisatie en morfologische studies stel ik voor dat alle vier de eiwitten functioneren in MCSs met de ER (Tabel 1). Pex32 en Pex24 functioneren meer specifiek op ER-peroxisome MCSs (EPCONs) en zijn cruciaal voor peroxisoombiogenese, waarschijnlijk voor membraanlipidetransport van de ER naar peroxisomen. Pex23 en (overgeproduceerd) Pex24 hopen zich op op NVJs. De reden hiervoor en de functie van deze eiwitten in NVJs is nog onbekend. Pex29 is niet essentieel voor de peroxisomale biogenese, maar het verwijderen van *PEX29* leidt tot minder LDs en veranderde mitochondriële morfologie. Mogelijk is Pex29 geen echte peroxin. Ook de afwezigheid van Pex23 beïnvloedt LDs en mitochondriën, maar resulteert bovendien in abnormale peroxisoomvorming.

Tabel 1. *Hansenula polymorpha* Pex23 familie-eiwitten in de aangegeven MCSs.

Eiwitten	EPCONs	ER-Mito	ER-LD	NVJs
Pex23	√	√	√	√
Pex24	√			√
Pex29		√	√	
Pex32	√			

EPCONs: ER-peroxisoom contact sites, ER-Mito: ER-mitochondria contact site, ER-LD: ER-lipid droplets contact site, NVJs: Nucleus-vacuole MCSs.

Vooruitblik

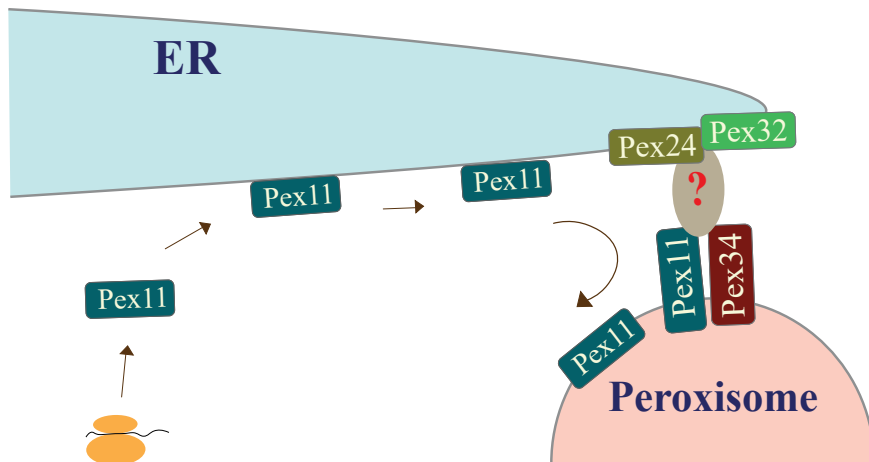
In hoofdstuk II stelden we voor dat Pex24 en Pex32 nodig zijn om peroxisomen aan het ER te associëren. We hebben nog niet aangetoond dat Pex24 en Pex32 functioneren als tethers, omdat de minimum criteria voor een bonafide MCS-tether onder meer bestaan uit i) een gedefinieerde locatie op een MCS, ii) structurele capaciteit om twee membranen te associëren en iii) een specifieke functionele activiteit (Eisenberg-Bord, Shai, Schuldiner, & Bohnert, 2016). We toonden aan dat *H. polymorpha* Pex24 en Pex32 lokaliseren op het ER-gebied waar peroxisomen nauw mee verbonden zijn (gedefinieerde locatie) en dat het peroxisomale fenotype van *pex24* en *pex32* cellen kan worden opgeheven door het introduceren van een kunstmatige ER-peroxisoom tether (functionele activiteit). Verdere structuur-functie analyses en eiwit-eiwit interactie studies zijn nodig om de vraag te

beantwoorden of Pex24 en Pex32 echte tethers zijn op ER-peroxisome contact sites in *H. polymorpha*.

Op basis van de gegevens uit hoofdstuk II en III concluderen we dat Pex11 en Pex34 nodig zijn voor de vorming van Pex32-afhankelijke EPCONS. Mogelijk is er een fysieke interactie tussen deze peroxisomale membraaneiwitten en Pex24 en Pex32 op het ER. Lokalisatiestudies van het DysF domein van Pex32, gefuseerd met GFP, toonden aan dat dit domein de capaciteit heeft om te associëren met peroxisomen.

De afwezigheid van Pex11 kon niet worden gecompenseerd door Pex32 overproductie en vice versa, wat erop wijst dat beide eiwitten een unieke functie hebben in de vorming en functie van EPCONS.

Hieronder presenteer ik een hypothetisch model dat de mogelijke functies van de verschillende EPCON-componenten die in dit proefschrift worden genoemd, beschrijft (Fig. 1).



Figuur 1. Hypothetisch model van de rol van Pex24 en Pex32 op ER-peroxisoom MCSs (EPCONS). Pex32 en Pex24 definiëren een ER-regio waar andere EPCON-eiwitten, waaronder de PMPs Pex11 en Pex34 en andere eiwitten (gemarkeerd met een vraagteken), zich ophopen en een MCS vormen. Pex11 en Pex34 kunnen (indirect) interactie aangaan met de DysF-domeinen van Pex24 en Pex32. Pex11 en Pex34 kunnen eerst sorteren naar het ER en worden vervolgens getransporteerd naar de peroxisomale membraan op de EPCONS.

Pex11 en Pex34 zijn cruciale PMPs die de groei en deling van peroxisomen reguleren. Pex32 en Pex24 definiëren een ER-gebied waar andere EPCON-componenten zich ophopen om de vorming van EPCONS te initiëren. Tot nu toe is het niet duidelijk hoe Pex11 en Pex34 naar de peroxisomale membraan worden getransporteerd: via een directe route of indirect via het ER. In *H. polymorpha pex3* cellen, die geen peroxisomen hebben, lokaliseert Pex11 tijdelijk op het ER en wordt het vervolgens afgebroken (Knoops et al., 2014). Dit suggereert dat Pex11 via het ER naar peroxisomen kan worden getransporteerd.

Mogelijk zijn EPCONS belangrijk voor dit eiwit transport proces in wild-type cellen. Echter, omdat in *pex3* cellen peroxisomen afwezig zijn, kunnen er geen EPCONS worden gevormd, wat kan leiden tot afbraak van Pex11 op het ER. In lijn met deze hypothese, is onze waarneming dat in *pex32*-cellen de Pex11-niveaus zeer laag zijn. Bovendien konden ook bij *PEX11* overexpressie geen normale Pex11-niveaus worden verkregen. Volgens een van de huidige modellen, worden PMPs eerst naar de ER getransporteerd, waarna ze met behulp van transport-vesicles het peroxisomale membraan bereiken. De voorgestelde route, waarin geen vesicles zijn betrokken, maar eiwit transport plaatsvindt van de ER naar peroxisomen op EPCONS, zou efficiënter en minder energieverwendend kunnen zijn. Verdere studies zijn nodig om deze hypothese te testen.

Referenties

- David, C., Koch, J., Oeljeklaus, S., Laernsack, A., Melchior, S., Wiese, S., Schummer, A., Erdmann, R., Warscheid, B. and Brocard, C.** (2013). A Combined Approach of Quantitative Interaction Proteomics and Live-cell Imaging Reveals a Regulatory Role for Endoplasmic Reticulum (ER) Reticulon Homology Proteins in Peroxisome Biogenesis. *Mol. Cell. Proteomics* **12**, 2408–2425. doi:10.1074/mcp.M112.017830
- Eisenberg-Bord, M., Shai, N., Schuldiner, M. and Bohnert, M.** (2016). A Tether Is a Tether Is a Tether: Tethering at Membrane Contact Sites. *Dev. Cell* **39**, 395–409. doi:10.1016/j.devcel.2016.10.022
- Joshi, A. S., Huang, X., Choudhary, V., Levine, T. P., Hu, J. and Prinz, W. A.** (2016). A family of membrane-shaping proteins at ER subdomains regulates pre-peroxisomal vesicle biogenesis. *J. Cell Biol.* **215**, 515–529. doi:10.1083/jcb.201602064
- Knoops, K., Manivannan, S., Capińska, M. N., Krikken, A. M., Kram, A. M., Veenhuis, M. and van der Klei, I. J.** (2014). Preperoxisomal vesicles can form in the absence of Pex3. *J. Cell Biol.* **204**, 659–668. doi:10.1083/jcb.201310148
- Mast, F. D., Jamakhandi, A., Saleem, R. A., Dilworth, D. J., Rogers, R. S., Rachubinski, R. A. and Aitchison, J. D.** (2016). Peroxins Pex30 and Pex29 dynamically associate with reticulons to regulate peroxisome biogenesis from the endoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem.* **291**, 15408–15427. doi:10.1074/jbc.M116.728154
- Prinz, W. A., Toulmay, A. and Balla, T.** (2020). The functional universe of membrane contact sites. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **21**, 7–24. doi:10.1038/s41580-019-0180-9
- Scorrano, L., De Matteis, M. A., Emr, S., Giordano, F., Hajnóczky, G., Kornmann, B., Lackner, L. L., Levine, T. P., Pellegrini, L., Reinisch, K. et al.** (2019). Coming together to define membrane contact sites. *Nat. Commun.* **10**, 1–11. doi:10.1038/s41467-019-09253-3
- Wu, F., de Boer, R., Krikken, A. M., Akşit, A., Bordin, N., Devos, D. P. and van der Klei, I. J.** (2020). Pex24 and Pex32 are required to tether peroxisomes to the ER for organelle biogenesis, positioning and segregation in yeast. *J. Cell Sci.* **133**, jcs246983. doi:10.1242/jcs.246983
- Yuan, W., Veenhuis, M. and van der Klei, I. J.** (2016). The birth of yeast peroxisomes. *Biochim. Biophys. Acta.* **1863**, 902–910. doi:10.1016/j.bbamer.2015.09.008

Curriculum vitae

Name: Fei WU

Date of Birth: September 17th, 1990

Place of Birth: Anhui, China

Education

2016.10 - 2021.02	University of Groningen Molecular Cell Biology, PhD
2013.09 - 2016.07	Ocean University of China Genetics, Master
2008.09 - 2012.07	Fuyang Normal University Biology Science, Bachelor

Publications

- Wu, F.**, et al., and van der Klei, I. J. (2020). Pex24 and Pex32 are required to tether peroxisomes to the ER for organelle biogenesis, positioning and segregation in yeast. *Journal of cell science*, 133(16), jcs246983. <https://doi.org/10.1242/jcs.246983>
- Wu, F.**, Zang, X., and et al., (2016). Molecular Cloning of cpcU and Heterodimeric Bilin Lyase Activity Analysis of CpcU and CpcS for Attachment of Phycocyanobilin to Cys-82 on the β -Subunit of Phycocyanin in *Arthrospira platensis* FACHB314. *Molecules* (Basel, Switzerland), 21(3), 357. <https://doi.org/10.3390/molecules21030357>