

University of Groningen

Peroxisomes in yeast ageing

Kumar, Sanjeev

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:

2015

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

Citation for published version (APA):

Kumar, S. (2015). *Peroxisomes in yeast ageing*. University of Groningen.

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

De ontwikkeling van membraangebonden compartimenten, organellen, kenmerkt de evolutie van eukaryoten uit prokaryoten. Eukaryoten functioneren efficiënter doordat verschillende cytosolische functies zijn ondergebracht in organellen met elk een eigen structuur en functie. In tegenstelling tot wat men eerder dacht blijkt uit recent onderzoek dat organellen in nauw contact met elkaar functioneren.

Peroxisomen zijn opmerkelijke organellen die hun functie kunnen aanpassen aan de behoefte van de cel. In peroxisomen vinden we bijvoorbeeld enzymen voor de β -oxidatie van vetzuren, de glyoxylaatcyclus, plasmalogensynthese, fotorespiratie en purine biosynthese. En deze lijst is nog niet compleet. Samen met mitochondriën zijn peroxisomen de belangrijkste producenten van intracellulaire zuurstofradicalen (ROS). Tot slot is uit verschillende studies van de laatste jaren ook naar voren gekomen dat peroxisomen belangrijk zijn bij celveroudering.

De gemiddelde leeftijd van de mens is de afgelopen jaren toegenomen en dit leidt ook tot meer ouderdom-gerelateerde ziektes. Om dit laatste zoveel mogelijk te voorkomen is een goed begrip nodig van de moleculaire mechanismen die ten grondslag liggen aan het verouderingsproces. Onderzoek aan eenvoudige kortlevende organismen heeft veel bijgedragen aan onze kennis over dit proces. Zo is gist is een veelgebruikt modelsysteem voor onderzoek naar veroudering. De meeste metabole routes die een rol spelen bij levensduur zijn ontdekt in dit organisme.

In gist onderscheiden we replicatieve en chronologische veroudering. De replicatieve levensduur wordt bepaald door het aantal dochtercellen die een moedercel kan produceren en dient daarom als modelsysteem voor delende cellen in hogere eukaryoten. De chronologische levensduur is de tijd die gistcellen kunnen overleven in een niet-delende staat, wat model staat voor niet-delende cellen in hogere eukaryoten. Conventionele methoden voor onderzoek aan gist waren beschrijvend maar met de recente introductie van onderzoek op systeem niveau wordt gist een steeds interessanter model voor studies naar veroudering. Het onderzoek beschreven in dit proefschrift spitst zich toe op de twee typen veroudering in gist en op de rol van peroxisomen in dit proces.

Hoofdstuk 1 vat onze huidige kennis over peroxisomen samen met nadruk op processen die een rol spelen bij kwaliteitscontrole van deze organellen. Daarnaast beschrijven we wat op dit moment bekend is over de rol van peroxisomen bij veroudering in gist.

In **Hoofdstuk 2** onderzochten we de verschillen tussen peroxisomen in cellen van de gist *Saccharomyces cerevisiae*. We bepaalden de leeftijd van eiwitten door gebruik te maken van de verschillende maturatietijden van twee fluorescente eiwitten. Een fusie-eiwit met DsRed1, een rood fluorescent eiwit met een maturatietijd van circa 11 uur, en sfGFP, een groen fluorescent eiwit met een maturatietijd van ongeveer 10 minuten, werd voorzien van een peroxisomaal sorteringssignaal,

waardoor dit eiwit naar peroxisomen werd getransporteerd. Uit de gemeten ratio's van fluorescentie intensiteiten van DsRed1/sfGFP van individuele peroxisomen bleek dat, binnen één cel, peroxisomen met zowel jonge als oude eiwitten aanwezig zijn. Peroxisomen met relatief oude matrixeiwitten importeren nieuwe matrixeiwitten minder goed. Dit komt waarschijnlijk doordat oude organellen minder Pex14 bevatten, een onderdeel van het importcomplex. Interessant is dat peroxisomen met relatief jonge matrixeiwitten nieuwe matrixeiwitten efficiënter importeren. Dit is consistent met de voorkeur voor nieuw gesynthetiseerd Pex14 juist naar deze organellen te getransporteerd te worden. Selectief transport van peroxisomale membraaneiwitten (PMPs) naar jonge organellen bleek geen algemeen fenomeen omdat een ander PMP, Pex3, naar alle peroxisomen wordt getarget, ongeacht de leeftijd van de matrixeiwitten.

Peroxisomen met een relatief oude inhoud worden selectief behouden door de moedercel, terwijl jonge organellen bij voorkeur naar de nieuwe knop worden getransporteerd in delende gistcellen. Inp1 en Inp2 spelen een belangrijke rol bij deze asymmetrische overerving in gist. Inp1, dat organellen in de moedercel verankert, is geconcentreerd op de oudere peroxisomen in de moedercel. Inp2, dat de migratie van organellen naar de knop faciliteert, is juist verrijkt op jonge peroxisomen. Interessant is dat de strakke asymmetrie in de overerving van peroxisomen tijdens de volledige replicatieve levensduur van een moedercel in stand blijft. Tot slot heeft ons onderzoek uitgewezen dat peroxisomen belangrijk zijn tijdens replicatieve veroudering in gist, ook wanneer de gisten groeien op glucose. Dit in tegenstelling tot wat altijd werd aangenomen.

Nicotinamidase, Pnc1, zou een rol spelen bij replicatieve veroudering van *S. cerevisiae*. In **Hoofdstuk 3** analyseerden we het sorteringsmechanisme van Pnc1 naar peroxisomen en de rol hiervan bij de replicatieve levensduur van gist. We tonen aan dat Pnc1 een fysieke interactie aangaat met Gpd1 dat een peroxisomaal targetingsignaal-2 bevat (PTS2). Via deze interactie kan Pnc1 via Gpd1 meeliften het peroxisoom in (piggybacking). M.b.v. Western blotting toonden we aan dat beide eiwitten niet in een vaste ratio in de cel aanwezig zijn en daarom waarschijnlijk geen stabiel complex met een vaste stoichiometrie vormen. Hoewel deze eiwitten een complex vormen zagen we dat de stabiliteit van de afzonderlijke eiwitten niet verandert als het andere eiwit ontbreekt. Waarschijnlijk is de interactie puur gericht op targeting.

Resultaat uit eerder onderzoek suggereert dat nieuw gesynthetiseerd Gpd1 onder stresscondities in het cytosol blijft. Met kwantitatieve fluorescentiemicroscopie analyseerden we de hoeveelheid peroxisomaal en cytosolisch Gpd1 en Pnc1 voor en na het blootstellen van de cel aan verschillende stresscondities. Hieruit bleek dat zónder stress beide eiwitten peroxisomaal zijn. Na blootstelling van de cellen

aan stress ging de concentratie van beide eiwitten omhoog en werden Gpd1 en Pnc1 zichtbaar in het cytosol. Echter, ook de niveaus van peroxisomaal Gpd1 en Pnc1 namen toe. Een vergelijkbaar verdelingspatroon was zichtbaar voor een niet-stressgerelateerd peroxisomaal eiwit (thiolase) wanneer het tot expressie kwam onder de GPD1 promotor. Het verschijnen van cytosolisch Gpd1 en Pnc1 zou het gevolg kunnen zijn van een inefficiënte PTS2 importmachinerie.

Eerder onderzoek wees ook uit dat Pnc1 de nicotinamide niveaus in de kern verlaagt en daardoor Sir2 activeert dat een positief effect heeft op replicatieve veroudering. We volgden afzonderlijke gistcellen tijdens een aantal celdelingen in een microfluidic chip. Hieruit bleek dat tijdens replicatieve veroudering Pnc1 zich nooit in de kern concentreert. Toen we Pnc1 exclusief naar peroxisomen targetten door een PTS1 (-SKL.COOH) aan de C-terminus te koppelen zagen we, in vergelijking met wild-type controles, nog steeds geen verkorting van de replicatieve levensduur. Een functie voor Pnc1 in de kern in de replicatieve levensduur werd door ons onderzoek niet bevestigd.

In **Hoofdstuk 4** analyseerden we de rol van het metabolisme van peroxisomen bij veroudering in gist. Hiervoor gebruikten we *Hansenula polymorpha*, een gist die kan groeien op verschillende koolstof- en stikstofbronnen die worden gemetaboliseerd in peroxisomen. We ontdekten dat, vergeleken met groei op glucose, cellen langer leefden op media met methanol en ethanol als koolstofbron. In tegenstelling tot groei op glucose zijn voor het metabolisme van methanol of ethanol peroxisomale enzymen vereist. We zagen ook een positief effect bij het gebruik van D-alanine of methylamine als stikstofbron, in tegenstelling tot het veelgebruikte ammoniumsulfaat. Ook voor het metabolisme van deze stikstofbronnen zijn peroxisomale enzymen nodig. Verder onderzoek toonde aan dat de langere levensduur op methylamine als stikstofbron verband hield met de oxidatie van deze verbinding tot formaldehyde door het peroxisomale enzym amine oxidase. Verdere oxidatie van formaldehyde naar CO₂ genereert twee moleculen NADH die extra energie opleveren voor de cel tijdens de stationaire fase. Dit geeft aan dat extra energie tijdens de stationaire fase een positief effect heeft op de chronologische levensduur. Bij onderzoek aan veroudering van cellen in niet-delende cultures is het daarom belangrijk dat de energiestatus van de cel wordt meegenomen in de analyse.

In **Hoofdstuk 5** onderzochten we de rol van de Fis1/Dnm1 delingsmachinerie, betrokken bij deling van zowel mitochondriën als peroxisomen. We keken met name naar de rol van peroxisoomdeling tijdens de chronologische levensduur van gist. Eerst bevestigden we dat deling van mitochondriën en peroxisomen in $\Delta fis1\Delta vps1$ cellen volledig geblokkeerd is en dat deze cellen een langere chronologische levensduur hebben. Vervolgens blokkeerden we alleen de deling van mitochondriën door de introductie van een Fis1-Pex15 fusie-eiwit dat alle Fis1 selectief naar peroxisomen

sorteert. Hier zagen we geen verlenging van de chronologische levensduur en we concluderen daaruit dat het blokkeren van mitochondriële deling geen invloed heeft op de chronologische levensduur. Deletie van FIS1 in cellen zonder peroxisomen (Δ pex3) leidde ook niet tot verlenging van de chronologische levensduur van gist. Dit bevestigt onze conclusie dat het positieve effect van een Fis1/Dnm1 deletie op de levensduur in gist gerelateerd is aan een defect in de deling van peroxisomen en niet van mitochondriën.

