

University of Groningen

## Origin and growth of peroxisomes in yeast

Yuan, Wei

**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:*

2016

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

*Citation for published version (APA):*

Yuan, W. (2016). *Origin and growth of peroxisomes in yeast: The molecular mechanism of peroxisome formation in yeast*. [Thesis fully internal (DIV), University of Groningen]. 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).

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

Onderzoek naar peroxisomen begon in de jaren vijftig van de vorige eeuw. Rhodin ontdekte in niercellen van de muis met behulp van elektronenmicroscopie structuren ter grootte van 0,1 - 1,0 micrometer die waren begrensd door een enkele membraan. Aanvankelijk werden ze microbodies genoemd (Rhodin et al., 1954). In de jaren zestig werd de naam microbodies vervangen door peroxisomen omdat deze organellen verschillende waterstofperoxide producerende oxidases bleken te bevatten.

Nu weten we dat peroxisomen in bijna alle eukaryote cellen voorkomen en dat ze verschillende metabole en niet-metabole functies hebben. De grootte, morfologie en functie van peroxisomen hangen af van het celtype. Bij de mens spelen peroxisomen een sleutelrol in de oxidatie van langketenige vetzuren en de biosynthese van plasmalogenen. Hierdoor leidt een defect in de biogenese van peroxisomen tot zeer ernstige erfelijke ziektes (Peroxisome Biogenesis Disorders (PBSs)), die soms letaal zijn. In kiemende oliezaden van planten zijn de enzymen die de beta-oxidatie van vetzuren katalyseren en de sleutelenzymen van de glyoxylaacyclus aanwezig in peroxisomen (glyoxysomen). In gist zijn peroxisomen essentieel voor het metabolisme van verschillende bijzondere koolstof- en stikstofbronnen zoals methanol, oliezuur, alkanen, primaire amines en purines. In filamenteuze schimmels zijn peroxisomen betrokken bij de ontwikkeling en differentiatie. Tevens spelen gespecialiseerde peroxisomen, Woronin lichaampjes, een structurele rol in het dichten van poriën in septa (Jedd, 2011).

De oorsprong van peroxisomen is nog steeds onderwerp van discussie. Ze kunnen worden gevormd door deling van reeds bestaande peroxisomen of *de novo* vanaf het

endoplasmatisch reticulum (ER). Verschillende eiwitten betrokken bij deling van peroxisomen zijn geïdentificeerd (bijv. Pex11, Dnm1 en Vps1). Het *de novo* model is gebaseerd op de aanname dat peroxisomale membranen afwezig zijn wanneer de genen die coderen voor Pex3 en Pex19 ontbreken.

Het *de novo* model stelt dat alle peroxisomale membraaneiwwitten (Peroxisomal Membrane Proteins, PMPs) in wild-type cellen eerst naar het ER worden getransporteerd. Vervolgens worden ze opgenomen in twee verschillen typen blaasjes (vesikels) die elk een deel van de peroxisomale eiwit import machinerie (translocon) bevatten. Volgens dit model zijn Pex3 en Pex19 nodig voor de vorming van deze vesikels. Uiteindelijk fuseren deze twee typen vesikels met elkaar met behulp van Pex1 en Pex6. Dit betekent dat cellen zonder Pex1 of Pex6 geen functioneel translocon kunnen assembleren omdat de benodigde componenten fysiek gescheiden zijn.

Het *de novo* model kwam recentelijk onder vuur te liggen door studies die aantoonde dat een subset van PMPs (Pex13, Pex14, Pex8) aanwezig is in preperoxisomale structuren in *Hansenula polymorpha pex3* cellen. Pex3 is derhalve niet essentieel voor de vorming van vesikels die Pex8, Pex13 en Pex14 bevatten. Recent onderzoek toonde ook aan dat Pex1 en Pex6 niet betrokken zijn bij de vesikel fusie, maar dat ze een rol spelen in import van peroxisomale matrixeiwwitten zoals oorspronkelijk was gepostuleerd.

Na de vorming van nieuwe peroxisomen door deling of *de novo* synthese rijpt het peroxisoom tot een volwassen organel. Groei van peroxisomen betekent dat niet alleen matrixeiwwitten maar ook membraanlipiden moeten worden geïmporteerd. Peroxisomen missen echter de machinerie voor biosynthese van membraanlipiden. Deze moleculen moeten daarom vanaf de plek in de cel waar ze worden gesynthetiseerd (vooral het ER) naar peroxisomen worden getransporteerd. Het niet-vesiculaire model impliceert dat lipide transport plaats kan

vinden op plekken waar de peroxisomale membraan in direct contact is met de ER membraan, op de zogenaamde membraan contact sites (MCSs). In het vesiculaire model zullen blaasjes afkomstig van het ER waarschijnlijk fuseren met reeds aanwezige peroxisomen en zo lipiden overbrengen.

Het doel van dit proefschrift is de oorsprong van peroxisomen en de moleculaire mechanismen van peroxisomale membraangroei te onderzoeken.

**Hoofdstuk 1** vat onze huidige kennis samen over de oorsprong van gist peroxisomen met nadruk op de fenotypes van verschillende peroxisoom-deficiënte mutanten. Het effect van de deletie van specifieke *PEX*-genen (genen die belangrijk zijn voor de vorming van peroxisomen) is namelijk niet altijd eenduidig. De verschillen in gepubliceerde onderzoeken zijn waarschijnlijk het gevolg van het gebruik van verschillende markereiwitten, experimentele procedures en organismen (modelsystemen). Dit heeft zijn weerslag in de sterk verschillende meningen over hoe peroxisomen worden gevormd: deling versus *de novo* synthese vanaf het ER.

Naast bovenstaande aspecten van peroxisoom biogenese wordt in hoofdstuk 1 tevens een overzicht van de moleculaire mechanismen die betrokken zijn bij de vorming van de peroxisomale membraan gegeven. Hierbij wordt zowel onze kennis over het transport van peroxisomale membraaneiwitten als membraanlipiden beschreven.

Het onderzoek dat beschreven is in **Hoofdstuk 2** laat zien dat *Saccharomyces cerevisiae pex3* cellen peroxisomale membraan vesikels bevatten, terwijl tot nu gedacht werd dat deze volledig afwezig waren in cellen van deze stam. In *S. cerevisiae* worden de vesikels niet afgebroken middels autofagie, zoals in *H. polymorpha* is waargenomen. Mogelijkerwijs komt dit doordat Pex3 nodig is voor autofagie van peroxisomen in *S. cerevisiae*. De vesikels in *S. cerevisiae pex3* cellen bevatten het peroxisomale membraaneiwit Pex14 en het

matrixeiwit Pex8. Dit duidt erop dat het huidige *de novo* peroxisoom biogenese model niet klopt. Dit model impliceert namelijk dat Pex8 en Pex14 accumuleren op het ER in *pex3* cellen. Vergeleken met de wild-type controle zijn de niveaus van Pex10, Pex11, Pex13 en Ant1 sterk gereduceerd in *pex3 atg1* cellen, mogelijk doordat het transport van deze PMPs naar het juiste membraan in de cel is verstoord. Fusie eiwitten van Pex10, Pex13 en Ant1 met het groene fluorescente eiwit GFP, waren niet meer detecteerbaar met fluorescentiemicroscopie, terwijl Pex11 op mitochondria werd gevonden. Om te testen of de vesikels in *S. cerevisiae pex3* kunnen uitgroeien tot peroxisomen, gebruikten we het auxine induceerbare degron-systeem om de niveaus van Pex3 te reguleren. Met behulp van time-lapse videos toonden we aan dat in cellen zonder Pex3 eiwit, Pex14-bevattende vesikels kunnen uitgroeien tot volwassen peroxisomen na reïntroductie van Pex3. Dit duidt erop dat in *S. cerevisiae pex3* cellen peroxisomen niet *de novo* worden gevormd vanaf het ER.

In **Hoofdstuk 3** tonen we aan dat Vps13 een belangrijke rol speelt in peroxisoom biogenese in cellen van *H. polymorpha pex11* en *pex23* mutanten. Cellen van *pex11*, *pex23* of *vps13* mutanten bevatten functionele peroxisomen terwijl ze in *pex11 vps13* en *pex23 vp13* dubbelmutanten ontbreken. Van Vps13 is bekend dat het twee membraan contact sites (MCSs) reguleert: de contact site tussen kern en vacuole (Nuclear Vacuole Junction (NVJ)) en tussen vacuole en mitochondria (vacuole and mitochondrial patch (vCLAMP)). Onze resultaten wijzen erop dat Vps13 wellicht ook een rol speelt in een MCS tussen de vacuole en het peroxisoom.

Gebaseerd op eerdere studies in *S. cerevisiae* stellen we voor dat *H. polymorpha Pex23* betrokken is bij de vorming van ER-peroxisoom contact sites (EPCONS). Fluorescentie microscopie studies wezen inderdaad uit dat Pex23 zich zowel op het ER als op peroxisomen bevindt, op plaatsen waar beiden

organellen dicht bij elkaar liggen. Waarschijnlijk heeft Pex11 ook een functie bij de vorming van de peroxisomale membraan. Onze hypothese is dat verschillende peroxisomale contact sites bestaan die nodig zijn voor groei van de peroxisomale membraan en elkaars functie kunnen overnemen. Dit verklaart waarom alleen een sterk effect op peroxisomen is te zien wanneer meer dan één MCS is uitgeschakeld, zoals bijvoorbeeld in *pex11 vps13* en *pex23 vps13* cellen.

Deze hypothese wordt ondersteund door gedetailleerde microscopische analyses waaruit blijkt dat *H. polymorpha pex11 vps13* vesikels bevat die een klein deel van de peroxisomale matrixeiwitten en alle geteste PMPs bevat (Pex3, Pex8, Pex10, Pex11, Pex14, Pmp47). Deze structuren zijn daarom waarschijnlijk kleine peroxisomen die matrix- en membraaneiwitten kunnen importeren maar die niet verder kunnen uitgroeien omdat de machinerie voor membraangroei niet goed werkt.

Daarnaast tonen we aan dat *pex11 vps13* en *pex23 vps13* cellen functionele peroxisomen kunnen maken met behulp van een eiwit dat kunstmatige ER-peroxisoom MCSs maakt (een ER-PER tether). Het lijkt er dus op dat in beide dubbelmutanten de EPCONS defect zijn, wat deels kan worden hersteld door de ER-PER tether. Tot slot laten we zien dat *S. cerevisiae pex11 vps13* cellen ook peroxisoom deficiënt zijn wat betekent dat het effect dat we zien in *H. polymorpha* is geconserveerd in verschillende gist soorten.

**In Hoofdstuk 4** vervolgen we ons onderzoek aan peroxisomale MCSs. We laten zien dat in *H. polymorpha* onder condities waarbij peroxisoom inductie wordt gerepresseerd (glucose) peroxisomen alleen met het ER zijn geassocieerd, terwijl na overschakelen op peroxisoom inducerende condities (methanol) de organellen in nauw contact staan met zowel de vacuole als het ER. Dit wijst erop dat vacuole en ER allebei belangrijk zijn voor de groei van de peroxisomale membraan.

Omdat Vps13 vCLAMP reguleert, onderzochten we ook de rol van de vCLAMP componenten Ypt7, Vam7 en Vps39 in peroxisoom biogenese. Het is opvallend dat deze eiwitten gedeeltelijk co-lokaliseren met peroxisomale merkers onder peroxisoom inducerende condities. Interessant is ook dat de afwezigheid van vCLAMP eiwitten of componenten van EPCONS (Pex11, Pex23) niet of nauwelijks resulteert in een peroxisomaal fenotype. Echter wanneer beide voorgestelde MCSs defect zijn (bijv. in *pex11 ypt7* of *pex23 ypt7* cellen), wordt een sterk defect in peroxisoom biogenese waargenomen, vergelijkbaar met wat we zagen in *pex11 vps13* en *pex23 vps13* cellen (Hoofdstuk 3).

Evenals in *pex11 vps13* cellen kan het defect in peroxisoom biogenese in *pex11 ypt7* cellen ook grotendeels worden gecompenseerd door de introductie van een kunstmatige ER-peroxisoom tether.

Het is belangrijk om te vermelden dat kleine peroxisomen nog steeds aanwezig zijn in *pex11* en *pex23* stammen die vCLAMP eiwitten missen. Dit betekent dat er nog steeds transport is van membraanlipiden naar peroxisomen. Mogelijkerwijs dragen mitochondriële MCSs bij aan het lipide transport of de vacuole en/of ER MCSs functioneren nog deels. Een andere verklaring is dat deze organellen lipiden ontvangen via vesikel-transport of dat zij *de novo* worden gevormd vanaf het ER. Meer onderzoek is nodig om deze belangrijke vragen op te lossen.

## Referenties

1. De Duve, C. A. B. P., Baudhuin, P. 1966. Peroxisomes (microbodies and related particles). *Physiological Reviews*, 46(2), 323-357.

2. De Duve, C. 1969. The peroxisome: a new cytoplasmic organelle. Proceedings of the Royal Society of London. *Series B, Biological sciences*, 173(1030), 71-83.
3. Jedd G. 2011. Fungal ev-devo; organelles and multicellular complexity. *Trends Cell Biol*, 21:12-19.