

University of Groningen

Identification of novel peroxisome functions in yeast

Singh, Ritika

DOI:
[10.33612/diss.99106402](https://doi.org/10.33612/diss.99106402)

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:
2019

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

Citation for published version (APA):
Singh, R. (2019). *Identification of novel peroxisome functions in yeast*. [Thesis fully internal (DIV), University of Groningen]. University of Groningen. <https://doi.org/10.33612/diss.99106402>

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

Eukaryote cellen worden gekenmerkt door de aanwezigheid van verschillende membraangebonden compartimenten, genaamd organellen. Elk organel heeft zijn eigen karakteristieken. Het peroxisoom is één van deze cellulaire organellen en heeft een grote verscheidenheid aan metabole en niet-metabole functies, afhankelijk van de vereisten van de cel. Twee van de meest geconserveerde functies van peroxisomen zijn bèta-oxidatie van vetzuren en metabolisme van reactieve zuurstofcomponenten (reactive oxygen species, ROS) zoals waterstofperoxide. Samen met mitochondria dragen peroxisomen ook bij aan de productie van intracellulaire ROS. Tot nu toe zijn er twee mechanismen beschreven voor peroxisoombiogenese: groei en deling van al bestaande peroxisomen en *de novo* formatie vanaf het endoplasmatisch reticulum (ER). Voor groei van peroxisomen is correcte insertie van eiwitten en lipiden in membranen nodig en correcte translocatie van matrixeiwitten. In mensen leiden defecten in peroxisoomfunctie of -vorming tot ziekten die gepaard gaan met ernstige klinische symptomen, vaak met dodelijke gevolgen. Onjuist functioneren van peroxisomen draagt ook bij aan veroudering en ouderdomsgerelateerde ziekten. Vandaar dat de interesse in peroxisoombiologie de afgelopen jaren significant is toegenomen. In gist zijn peroxisomen niet essentieel, waardoor het een goed modelorganisme is om peroxisomen te bestuderen.

Het onderzoek beschreven in dit proefschrift richt zich op de identificatie en karakterisering van nieuwe peroxisomale eiwitten en functies in gist.

Hoofdstuk 1 geeft een overzicht van de huidige kennis over peroxisomen. De nadruk ligt vooral op peroxisoomfunctie en processen die nodig zijn voor redox-regulatie en proliferatie in gist.

Hoofdstuk 2 beschrijft ons onderzoek naar de identificatie van nieuwe stress-gerelateerde eiwitten in peroxisomen van de gist *Hansenula polymorpha*. Door middel van massa spectrometrische analyse van peroxisomale fracties van cellen die zijn blootgesteld aan ethanol-stress, hebben we 6 nieuwe potentiële peroxisomale peroxiredoxins geïdentificeerd. Twee van deze mogelijke peroxiredoxins, genaamd C8BNF3 en C8BNF4, bevatten een mogelijk peroxisomaal targeting signaal (PTS1). Peroxiredoxins zijn thiol-specifieke eiwitten die belangrijk zijn voor bescherming tegen oxidatieve stress. Bij gebrek hieraan hoopt ROS zich op. Analyse door middel van fluorescentiemicroscopie van constructen gefuseerd aan groen fluorescent eiwit (green fluorescent protein, GFP) liet zien dat C8BNF3 een mitochondrieel eiwit is, ondanks de aanwezigheid van een peroxisoom sorterings signaal in het eiwit (PTS1), terwijl C8BNF4 gedeeltelijk gelokaliseerd is in peroxisomen in cellen gekweekt op een medium met glucose. In cellen die gekweekt waren op medium met methanol, daarentegen, is het laatste eiwit niet gelokaliseerd in deze organellen. Met behulp van een *H. polymorpha* C8BNF4 deletiestam, genaamd *c8bnf4*, ontdekten we dat de afwezigheid van dit eiwit niet leidt tot een verandering in gevoeligheid voor de geteste stresscondities. Mogelijk heeft dit te maken met overtolligheid ("redundancy"), aangezien onderzoek met de gist *Saccharomyces cerevisiae* uit heeft gewezen dat alleen mutanten die meerdere peroxiredoxins misten gevoeliger waren voor ROS stress, terwijl dit niet het geval was wanneer slechts een enkele peroxiredoxin afwezig was¹.

Naast hun rol in oxidatieve stress, zijn peroxisomen waarschijnlijk ook belangrijk voor andere stress condities. Gist peroxisomen bevatten namelijk ook enzymen die worden geïnduceerd wanneer cellen aan andere stresscondities worden blootgesteld. Glycerol phosphate dehydrogenase (Gpd1) en nicotinamidase (Pnc1) zijn twee stress-gerelateerde eiwitten in *S. cerevisiae*, waarvan is beschreven dat ze onder normale groeicondities naar peroxisomen worden gesorteerd, maar mislokalisieren naar het cytosol en de celkern wanneer cellen blootgesteld worden aan osmotische stress. Daarnaast lieten eerdere onderzoeken in *S. cerevisiae* zien dat import van Gpd1 en Pnc1 afhankelijk is van de receptor van het peroxisomaal targeting signaal 2 (PTS2), Pex7^{2,3}. Gpd1 bevat inderdaad een PTS2, Pnc1 daarentegen mist een PTS. In **Hoofdstuk 3** laten we zien dat Pnc1 een fysieke interactie aangaat met Gpd1, waardoor het kan meeliften naar de peroxisomale matrix ('piggybacking'). Met behulp van Western blotting toonden we aan dat beide eiwitten niet in een vaste ratio voorkomen in de cel en daarom waarschijnlijk geen stabiel complex met een vaste stoichiometrie vormen. Onze pogingen om een stabiele fysieke interactie tussen beide eiwitten aan te tonen met behulp van meerdere verschillende *in vitro* benaderingen waren niet succesvol. Dit kan betekenen dat de interactie tussen deze twee eiwitten kortstondig is of dat aanvullende factoren, zoals post-translationele modificaties of andere eiwitten, mogelijk nodig zijn voor deze interactie. Hoewel Pnc1 en Gpd1 een tijdelijk complex kunnen vormen, is de stabiliteit van het ene eiwit niet afhankelijk van de afwezigheid van de ander. Dit suggereert dat de fysieke interactie tussen beide eiwitten voornamelijk een rol speelt in eiwit sortering.

Resultaten uit eerdere onderzoeken lieten zien dat de hoeveelheid Gpd1 en Pnc1 groter wordt wanneer cellen worden blootgesteld aan osmotische stress, wat gepaard gaat met mislokalisatie van Gpd1 naar het cytosol. Er is gespeculeerd dat de mislokalisatie gereguleerd wordt door verminderde fosforylering van twee serine-residuen naast de PTS2 van Gpd1, wat de affiniteit voor de PTS2 receptor Pex7 zou verminderen³. Met behulp van kwantitatieve fluorescentiemicroscopie hebben we de peroxisomale en cytosolische Gpd1 en Pnc1 niveaus vóór en na blootstelling van cellen aan verschillende stresscondities bestudeerd. Dit liet zien dat onder normale groeicondities beide eiwitten vooral gelokaliseerd waren in peroxisomen. Onder stresscondities daarentegen, gingen de niveaus van beide eiwitten omhoog in zowel het cytosol als in peroxisomen. Deze observatie spreekt het model dat Gpd1 her-lokalisceert van peroxisomen naar het cytosol na blootstelling aan stress tegen. Sterker nog, wanneer een niet-stressgerelateerd peroxisomaal PTS2 eiwit (thiolase) onder controle van de Gpd1 promotor werd geproduceerd onder stresscondities, zagen wij een soortgelijk verdeling. Dit suggereert dat de aanwezigheid van cytosolisch Gpd1 en Pnc1, zowel onder normale als stresscondities, gerelateerd is aan de inefficiëntie van de PTS2 importmachinerie en niet gereguleerd wordt door osmotische stress.

Schade veroorzaakt door hoge temperaturen ('heat stress') kan worden gecompenseerd door zogeheten heat shock eiwitten, zoals Hsp70 eiwitten. *S. cerevisiae* Sym1 (staat voor "stress-inducible yeast Mpv17", oftewel stress-induceerbare gist Mpv17) is een heat shock eiwit noodzakelijk voor ethanolmetabolisme⁴. Het humane MPV17 gen codeert een klein hydrofoob eiwit dat zich in de binnenste mitochondriale membraan bevindt. Een mutatie in dit gen veroorzaakt hepatocerebrale mtDNA depletie syndroom (MDS)⁵. Het MPV17 eiwit maakt deel

uit van de PXMP2 familie van integrale membraaneiwitten. PXMP2 is een peroxisomaal eiwit wat functioneert als niet-selectief kanaal voor de passage van kleine opgeloste stoffen door het peroxisomale membraan^{6,7}. De PXMP2 eiwitfamilie bevat onder andere het Woronin body (WB) eiwit Wsc in *Neurospora crassa*, het humane peroxisomale membraaneiwit Pxmp2, het binnenste mitochondriale membraaneiwit Sym1 in *S. cerevisiae* en zijn zoogdierhomoloog MPV17. De WB is een zeer gespecialiseerd peroxisoom, wat de septale poren afsluit wanneer hyfen in 'filamentous' Ascomycetes beschadigd raken, om zo te voorkomen dat cytoplasma wegloopt⁸.

Om meer inzichten over deze eiwitfamilie te verkrijgen, bestudeerden we de PXMP2 eiwitfamilie in *H. polymorpha*. In **Hoofdstuk 4** laten we zien dat één van de PXMP2 eiwitten, die wij Pex37 hebben genoemd, peroxisomaal is in *H. polymorpha*. Eerdere onderzoeken duiden erop dat eiwitten van de PXMP2 familie niet alleen een rol spelen in transport van opgeloste stoffen, maar ook een functie kunnen vervullen in processen gerelateerd aan het vormgeven van membranen en de positionering van organellen. We bekeken eerst de groei van de *H. polymorpha pex37* deletiemutant op verschillende koolstof- en stikstofbronnen die worden afgebroken door peroxisomale enzymen. We ontdekten dat er geen duidelijk groeidefekt was op enig getest medium, wat suggereert dat Pex37 geen essentiële rol vervult in transport over het peroxisomale membraan van stoffen die benodigd zijn voor hun afbraak.

Deletie van *PEX37* had geen effect op peroxisoombiogenese of -proliferatie in cellen gekweekt onder peroxisoom-inducerende condities (methanol), echter, een peroxisomaal fenotype was zichtbaar bij groei onder peroxisoom-onderdrukkende condities (glucose medium). Niet-delende *H. polymorpha* wild-type (WT) cellen bevatten een enkel peroxisoom, terwijl in delende WT-cellen zowel in de moeder- als dochtercel één peroxisoom is te vinden. Voor juiste peroxisoomsegregatie moeten peroxisomen delen tijdens knopvorming van gist, een proces waarbij Dnm1 en Pex11 nodig zijn^{9,10}. Voor retentie van één van de organellen in de moedercel is Inp1 nodig, terwijl het motoreiwit Myo2 zich hecht aan peroxisomen via interactie met het integrale peroxisomale membraaneiwit Inp2, en hen via het actinecytoskelet naar de knop voert¹¹⁻¹³. Interessant genoeg worden in *pex37* cellen gekweekt op glucose de peroxisomen vaak gedistribueerd naar de knop, waarbij de moedercel geen peroxisomen meer bevat. In andere cellen bleven de peroxisomen in de moedercel tijdens knopvorming, wat resulteert in een knop zonder peroxisoom. Onze data wijzen erop dat Pex37 nodig is voor een juiste vermenigvuldiging en segregatie van peroxisomen in cellen gekweekt op glucose, maar niet in cellen gekweekt op methanol. Verder onderzoek, zoals identificatie van bindingspartners van Pex37 kan mogelijk de details van een dergelijk reguleringsmechanisme onthullen en zal helpen om het onderliggende moleculaire mechanisme te achterhalen.

Tenslotte hebben we laten zien dat het humane PXMP2 een vergelijkbare rol kan spelen als gist Pex37 door middel van complementatie van het gist *pex37* fenotype door expressie van humaan PXMP2. Van zoogdier PXMP2 wordt aangenomen dat het een niet-selectieve porie in het peroxisomale membraan vormt. Ons onderzoek heeft uitgewezen dat *H. polymorpha* Pex37 waarschijnlijk niet een belangrijke functie vervult in het transport van stoffen over het peroxisomale membraan.

Gedetailleerde proteomische analyses van gezuiverde peroxisomal fracties leidden tot de identificatie van het eiwit Vac8 in zowel *S. cerevisiae*¹⁴ als *H. polymorpha* (Hoofdstuk 2). Vanwege een mogelijke rol in peroxisoom biogenese onderzochten we de rol van HpVac8 (Hoofdstuk 5). Net als de functie van Inp2 in peroxisoomtransport naar gistknoppen, is Vac8 nodig voor overerving van vacuoles in *S. cerevisiae*. Vac8 interacteert met Myo2 via Vac17 (vacuole-related protein 17) en dit complex is verantwoordelijk voor transport van vacuoles naar de knop in zich ontwikkelende dochtercellen¹⁵. Vac8 speelt ook een rol in vacuole-vacuole fusie en is een belangrijke component van celkern-vacuole contacten (nucleus-vacuole junctions, NVJs) in *S. cerevisiae*.

Recentelijk is een nieuwe peroxisoom-vacuole contact site gevonden, die wordt gevormd onder omstandigheden van snelle peroxisoom-expansie in *H. polymorpha*¹⁶. We toonden aan dat HpVac8 nabij deze peroxisoom-vacuole contacten lokaliseert, maar daarentegen niet aanwezig is in deze contacten. Onze data wijzen erop dat HpVac8 hoogstwaarschijnlijk geen rol speelt in peroxisoombiologie, aangezien deletie en overproductie van Vac8 geen effect hadden op de hoeveelheid peroxisomen. Het blijft daarom onduidelijk waarom HpVac8 en ScVac8 gevonden zijn in gist peroxisomale fracties.

In Hoofdstuk 5 bestudeerden we ook de rol van HpVac8 in vorming van NVJs, overerving van vacuoles en fusie van vacuoles in *H. polymorpha*. *In silico* analyse van het *H. polymorpha* genoom om homologen van *S. cerevisiae* NVJ-eiwitten te vinden, identificeerde alle homologen van NVJ-gerelateerde eiwitten behalve Nvj1, een eiwit essentieel voor NVJ-vorming in *S. cerevisiae*. Dit impliceert dat de samenstelling van NVJs niet geconserveerd is. Daarnaast laten we zien dat HpVac8 noodzakelijk is voor vorming van NVJs, aangezien er geen nauw contact tussen celkern en vacuole meer gedetecteerd kon worden in afwezigheid van Vac8. Bovendien leidde de afwezigheid van HpVac8 tot een defect in overerving van vacuoles. In tegenstelling tot ScVac8 had deletie van HpVac8 geen effect op vacuole-vacuole fusie, wat aanduidt dat het geen rol speelt in dit proces in *H. polymorpha*.

Vooruitzichten/Perspectieven

Ondanks de enorme vooruitgang in de identificatie van genen/eiwitten en het definiëren van moleculaire mechanismen die een rol spelen in peroxisoombiogenese en -functie, bestaan er nog steeds een groot hiaten in onze kennis over hoe peroxisomen bijdragen aan cellulair redoxmetabolisme en veroudering. De ontdekking van proximale doelen van peroxisomale oxidatieve stress, en ook de moleculaire mechanismen die onderliggen hoe cellulaire stress peroxisoomfunctie beïnvloedt, zouden een meer samenhangend begrip van de onderliggende mechanismen gerelateerd aan peroxisomen en oxidatieve stress geven. De identificatie van een nieuw peroxisomaal peroxisoom peroxiredoxin, zoals beschreven in dit proefschrift, ondersteunt de opvatting dat de atlas van peroxisoomfuncties nog steeds niet compleet is. Kwantitatieve massaspectrometrische analyse van peroxisomale fracties geïsoleerd uit cellen blootgesteld aan stress en onbehandelde controles, zou kunnen leiden tot verdere informatie over eiwitten gerelateerd aan peroxisomale stress. Daarnaast zal het gebruik van meer gevoelige

proteomische benaderingen bijdragen aan de identificatie van nog niet gekarakteriseerde peroxisomale eiwitten, en dit zal deuren openen om nieuwe stress-gerelateerde functies te begrijpen. Dit zal, op zijn beurt, kunnen leiden tot nieuwe therapieën om veroudering en ouderdomsgerelateerde ziekten te voorkomen.

Ondanks onze uitgebreide kennis over peroxisomale sorteringssignalen blijft het sorteringsmechanisme van bepaalde peroxisomale eiwitten onduidelijk. Nieuwe voorbeelden van 'piggyback' import (Hoofdstuk 3,¹⁷) en nieuwe PTS-receptoren^{18,19} worden nog steeds gevonden. Verder zijn sommige peroxisomale eiwitten tevens gelokaliseerd op andere subcellulaire compartimenten (bijv. de Dnm1-afhankelijke organel delingsmachinerie). Het mechanisme dat hun distributie over verschillende organellen reguleert, wordt nog niet goed begrepen en vereist nadere opheldering. Dergelijke studies zullen belangrijke onderzoeksperspectieven openen om nieuwe peroxisomale functies te onderzoeken en identificeren.

References

1. Wong C-M, Siu K-L & Jin D-Y (2004) Peroxiredoxin-null Yeast Cells Are Hypersensitive to Oxidative Stress and Are Genomically Unstable. *J. Biol. Chem.* **279**, 23207–23213.
2. Anderson RM, Bitterman KJ, Wood JG, Medvedik O & Sinclair DA (2003) Nicotinamide and PNC1 govern lifespan extension by calorie restriction in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature* **423**, 181–185.
3. Jung S, Marelli M, Rachubinski RA, Goodlett DR & Aitchison JD (2010) Dynamic Changes in the Subcellular Distribution of Gpd1p in Response to Cell Stress. *J Biol Chem* **285**, 6739–6749.
4. Trott A & Morano KA (2004) SYM1 Is the Stress-Induced *Saccharomyces cerevisiae* Ortholog of the Mammalian Kidney Disease Gene Mpv17 and Is Required for Ethanol Metabolism and Tolerance during Heat Shock. *Eukaryot Cell* **3**, 620–631.
5. Spinazzola A, Viscomi C, Fernandez-Vizarra E, Carrara F, D'Adamo P, Calvo S, Marsano RM, Donnini C, Weiher H, Strisciuglio P, Parini R, Sarzi E, Chan A, DiMauro S, Rötig A, Gasparini P, Ferrero I, Mootha VK, Tiranti V & Zeviani M (2006) MPV17 encodes an inner mitochondrial membrane protein and is mutated in infantile hepatic mitochondrial DNA depletion. *Nat. Genet.* **38**, 570–575.
6. Rokka A, Antonenkov VD, Soininen R, Immonen HL, Pirilä PL, Bergmann U, Sormunen RT, Weckström M, Benz R & Hiltunen JK (2009) Pxmp2 is a channel-forming protein in Mammalian peroxisomal membrane. *PLoS ONE* **4**, e5090.
7. Antonenkov VD & Hiltunen JK (2012) Transfer of metabolites across the peroxisomal membrane. *Biochim. Biophys. Acta* **1822**, 1374–1386.
8. Jedd G & Chua NH (2000) A new self-assembled peroxisomal vesicle required for efficient resealing of the plasma membrane. *Nat. Cell Biol.* **2**, 226–231.
9. Nagotu S, Saraya R, Otzen M, Veenhuis M & van der Klei IJ (2008) Peroxisome proliferation in *Hansenula polymorpha* requires Dnm1p which mediates fission but not de novo formation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* **1783**, 760–769.
10. Krikken AM, Veenhuis M & van der Klei IJ (2009) *Hansenula polymorpha* pex11 cells are affected in peroxisome retention. *FEBS Journal* **276**, 1429–1439.
11. Fagarasanu M, Fagarasanu A, Tam YYC, Aitchison JD & Rachubinski RA (2005) Inp1p is a peroxisomal membrane protein required for peroxisome inheritance in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Cell Biol.* **169**, 765–775.
12. Saraya R, Cepińska MN, Kiel JAKW, Veenhuis M & der Klei IJ van (2010) A conserved function for Inp2 in peroxisome inheritance. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* **1803**, 617–622.
13. Munck JM, Motley AM, Nuttall JM & Hettema EH (2009) A dual function for Pex3p in peroxisome formation and inheritance. *J Cell Biol* **187**, 463–471.
14. Marelli M, Smith JJ, Jung S, Yi E, Nesvizhskii AI, Christmas RH, Saleem RA, Tam YYC, Fagarasanu A, Goodlett DR, Aebersold R, Rachubinski RA & Aitchison JD (2004) Quantitative mass spectrometry reveals a role for the GTPase Rho1p in actin organization on the peroxisome membrane. *J Cell Biol* **167**, 1099–1112.
15. Tang F, Kauffman EJ, Novak JL, Nau JJ, Catlett NL & Weisman LS (2003) Regulated degradation of a class V myosin receptor directs movement of the yeast vacuole. *Nature* **422**, 87–92.
16. Wu H, de Boer R, Krikken AM, Akşit A, Yuan W & van der Klei IJ (2018) Peroxisome development in yeast is associated with the formation of Pex3-dependent peroxisome-vacuole contact sites. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*.
17. Effelsberg D, Cruz-Zaragoza LD, Tonillo J, Schliebs W & Erdmann R (2015) Role of Pex21p for Piggyback Import of Gpd1p and Pnc1p into Peroxisomes of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **290**, 25333–25342.
18. Effelsberg D, Cruz-Zaragoza LD, Schliebs W & Erdmann R (2016) Pex9p is a new yeast peroxisomal import receptor for PTS1-containing proteins. *J Cell Sci* **129**, 4057–4066.

19. Yifrach E, Chuartzman SG, Dahan N, Maskit S, Zada L, Weill U, Yofe I, Olender T, Schuldiner M & Zalckvar E (2016) Characterization of proteome dynamics during growth in oleate reveals a new peroxisome-targeting receptor. *J Cell Sci* **129**, 4067–4075.

