# Samenvatting voor het brede publiek

Onze lichaamscellen moeten hun «afval» hergebruiken om gezond te blijven, goed te functioneren en zich aan te passen om te overleven. Autofagie is een recyclingproces dat cellen helpt hun beschadigde, schadelijke of onnodige onderdelen af te breken en te hergebruiken. Om ongewenst materiaal te isoleren, vormen cellen membraanachtige

«zakjes», genaamd autofagosomen. Zodra het «afval» verpakt is, fuseren de autofagosomen met lysosomen en leveren hun inhoud af in deze zure organellen. Lysosomen zijn het spijsverteringsstelsel van de cel, die ongewenst materiaal als eiwitten, suikers en vetten enzymatisch afbreken tot fundamentele «bouwstenen». Deze worden vervolgens als brandstof gebruikt, of gerecycled tot nieuwe celonderdelen. Wanneer autofagie niet goed werkt, hoopt ongewenst materiaal zich op, wat diverse ziekten kan veroorzaken, zoals neurodegeneratieve ziekten en kanker.

Dit proefschrift onderzoekt hoe de vorming van autofagosomen wordt gereguleerd. We bestudeerden de rol van specifieke motoreiwitten, dynaminen, bij het transporteren van een belangrijk autofagie-eiwit, Atg9. Ook identificeerden we autofagie-regulerende enzymen die betrokken zijn bij het toevoegen of verwijderen van een speciale moleculaire tag, ubiquitine, aan eiwitten. Verder onderzochten we hoe het afbreken van specifieke eiwitten via autofagie belangrijk is om de celstofwisseling aan te passen bij veranderingen in voedingsniveaus. Hiertoe ontwikkelden we een nieuw experimenteel hulpmiddel, dat eiwitten die op een bepaald moment door autofagie zijn afgebroken te identificeren in bakkersgist. We vonden eiwitten, waaronder metabolische enzymen, die in dit modelorganisme mogelijk specifiek afgebroken worden om zich aan te passen aan stikstofschaarste.

Onze bevindingen verbeteren ons begrip van de regulering van autofagie, en haar rol in metabolische aanpassingen.

# Samenvatting

Autofagie is een evolutionair behouden biologisch degradatieproces in eukaryotische cellen, dat cytoplasmatische elementen afbreekt in lysosomen, de afbrekende organellen van de cel, waarna de resulterende afbraakproducten worden hergebruikt. Dit proces voorziet essentiële metabolieten voor energieproductie, en levert bouwstoffen voor de biosynthese van nieuwe moleculen. Hierdoor zorgt autofagie ervoor dat cellen cellulaire homeostase handhaven, en het hoofd kunnen bieden aan voedingstekorten en andere stressfactoren. Bovendien fungeert autofagie als beschermingsmechanisme, door constitutief schadelijke (bijv. intracellulaire pathogenen), mogelijk schadelijke (bijv. beschadigde mitochondriën of eiwitaggregaten) en onnodige (bijv. door celdifferentiatie of metabole adaptaties onstane) cytoplasmatische materialen op te ruimen. Gezien de centrale rol van autofagie in de gezondheid van de cel, is het geen verrassing dat ontregelingen in de autofagie gelinkt zijn aan een verscheidenheid aan ziekten in de mens, zoals neurodegeneratieve aandoeniningen, auto-immuunziekten en kanker. Ondanks het belang van autofagie is er nog veel onduidelijk over hoe het proces, met al haar fysiologische functies in cellen en organismen, precies gereguleerd is.

In dit proefschrift worden de mechanismen en functies van autofagie onderzocht, wat nieuwe inzichten oplevert die het potentieel van targeten van autofagie voor therapeutische doeleinden belichten. Het hoofdkenmerk van autofagie is de *de novo* vorming van blaasjes met een dubbel membraan, autofagosomen genaamd, die ongewenst cytoplasmatisch materiaal, dat is gemarkeerd voor afbraak, opnemen. Vervolgens smelten de autofagosomen samen met lysosomen, waar ze hun inhoud afleveren in de hydrolytische omgeving van deze organellen. Autofagosoombiogenese wordt geregeld door autofagie-gerelateerde (Atg) eiwitten. Een grotendeels onbeantwoorde kernvraag in autofagie is hoe Atg9, een transmembraan lipide scramblase en het organisatorische middelpunt van de autofagiemachinerie, getransporteerd wordt naar de plaats van de autofagosoombiogenese.

In **Hoofdstuk 6** bestudeerden we het Atg9-transport tijdens autofagie in de gistsoort *Saccharomyces cerevisiae*, een belangrijk eukaryotisch modelorganisme voor het bestuderen van autofagie. Onze bevindingen lieten zien dat de dynamine Vps1 betrokken is bij Atg9- transport. We ontdekten dat Vps1 interageert met Atg9 en nodig is voor de levering van Atg9 op plekken waar autophagosomen worden gevormd, en dat dit afhankelijk is van GTPase-activiteit. Ten slotte toonden we ook aan dat specifieke Vps1-puntmutaties die met mensenziekten als microcytaire anemie en de ziekte van Charcot-Marie-Tooth verband houden, autofagie en het transport van Atg9 verstoren. Deze bevindingen suggereren dat een defect in autofagie kan bijdragen aan de pathofysiologie van deze aandoeningen.

Ubiquitinatie en deubiquitinatie van Atg-eiwitten door respectievelijk ubiquitineligasen (E3’s) en deubiquitinerende enzymen (DUB’s) zijn belangrijke signalen voor de precieze regulering van autofagische activiteit, zowel door proteasoom- bemiddelde afbraakmechanismen als niet-afbraakgerichte mechanismen (**Hoofdstuk 1**). Hoewel talrijke E3’s en DUB’s geïdentificeerd zijn als belangrijke regulatoren van autofagie, zeker in zoogdiercellen, is onze kennis over hoe autofagie nauwkeurig wordt afgestemd door deze posttranslationele modificatie nog niet volledig.

In **Hoofdstuk 3** hebben we *S. cerevisiae* uitgebreid gescreend ten einde de modulatoren van bulkautofagie te identificeren. We richtten ons op het identificeren van modulatoren die autofagie reguleren via ubiquitinatie en deubiquitinatie van eiwitten. Met behulp van *synthetic genetic array* technologie genereerden we een collectie giststammen waarin een autofagiereporter tot uiting kwam, waarmee we de autofagische flux konden kwantificeren via een enzymatische test, in een serie deletie- of conditionele mutanten, die alle E3’s en DUB’s omvatten die in het genoom van gist worden gecodeerd. We hebben twee hits gevalideerd als *bona fide* genen die nodig zijn voor de voortgang van autofagie: de E3 Bre1 en de DUB Ubp3. Verder identificeerden we de specifieke stappen in autofagie die beïnvloed worden door hun verlies van hun functie. Uit onze resultaten blijkt dat Bre1 een rol speelt bij het reguleren van de vacuolaire afbraak van autofagosomale ladingen, terwijl Ubp3 belangrijk is voor het in stand houden van autofagie door de frequentie van autofagosoomvorming te reguleren.

Autofagie kan ook selectief zijn, waarbij specifieke substraten, zoals bepaalde eiwitten en organellen, waaronder lipidedruppeltjes (LD’s), via een proces dat lipofagie wordt genoemd, worden herkend.

**Hoofdstuk 2** is een overzicht van de biogenese en functie van LD, de mechanismen van selectieve afbraak van LD door autofagie en hoe de ontregeling van deze processen betrokken is bij de pathofysiologie van niet-alcoholische steatohepatitis (NASH), een bepaald type niet-alcoholische leverziekte (NAFLD). Overtuigende literatuur bevestigt dat het verbeteren van de lipofagische activiteit in de lever een veelbelovende therapeutische strategie biedt om de symptomen van NAFLD te verlichten en de progressie ervan naar NASH te voorkomen.

Een van de belangrijke functies van autofagie is het handhaven van de metabolische homeostase. Autofagie mobiliseert tijdens voedingstekorten verschillende cellulaire energie- en voedingsvoorraden als alternatieve bronnen voor basismetabolieten, wat het een cruciaal proces voor de aanpassing en overleving van cellen maakt. De bijdrage van autofagie aan de regulering van de stofwisseling reikt echter verder dan het herverdelen van metabolieten. Nieuw bewijs suggereert dat selectieve autofagie ook rechtstreeks het celmetabolisme reguleert door specifiek belangrijke metabolische enzymen en regulatoren af te breken, en op die manier cellulaire metabolische netwerken actief te herprogrammeren (**Hoofdstuk 1**). Deze kennis is echter grotendeels anekdotisch en de globale bijdrage van selectieve autofagie aan cellulaire metabolische herprogrammering blijft grotendeels een onbekend terrein.

In **Hoofdstuk 5** hebben we een profiel gemaakt van de inhoud van autofagosomen na autofagie-inductie door stikstofgebrek in *S. cerevisiae*. Ons doel was om te onderzoeken wat de bijdrage is van selectieve autofagie aan de algehele metabolische herprogrammering die nodig is voor de aanpassing aan stikstofschaarste in dit modelorganisme. Gist heeft slechts één Atg8-eiwit, dat direct of indirect alle selectieve autofagosomale ladingen

A

bindt. Daarom gebruikten we in onze proteomische benaderingen Atg8 als lokeiwit om autofagosomale ladingen te identificeren. Hiertoe hebben we in **Hoofdstuk 4** een tijd-specifieke APEX2-gebaseerde nabijheidsafhankelijke *labeling assay* ontwikkeld voor *S. cerevisiae*, die het mogelijk maakt om via proteomics aangrenzende eiwitten te ontdekken op een bepaald tijdstip, wat nieuwe mogelijkheden biedt voor kinetische studies in dit modelorganisme. In **Hoofdstuk 5** hebben we zowel deze nieuwe methodologie als een standaard immunoprecipitatie proteomics benadering gebruikt om autofagosomale ladingen te identificeren. We beschreven complementaire proteomische datasets, welke de eiwit-eiwitinteracties (PPI’s) en PPI-netwerken omvatten die betrokken zijn bij cellulaire metabolische aanpassingen door selectieve autofagie, veroorzaakt door stikstofgebrek in *S. cerevisiae*. Bovendien identificeerden we potentiële autofagosoomladingen, waaronder metabolische enzymen en regulatoren, evenals cellulaire processen die mogelijk omlaag worden gereguleerd om zich aan te passen aan stikstofschaarste. Onze data doen vermoeden dat selectieve autofagie een rol kan spelen bij deze metabolische herprogrammering in gist. Het valideren en karakteriseren van de potentiële autofagosomale ladingen is echter essentieel om te begrijpen hoe deze geïdentificeerde ladingen bijdragen aan metabolische aanpassingen naar aanleiding van veranderingen in de voeding.

## Slotopmerkingen

Onze bevindingen hebben geleid tot meer inzicht in de complexe relatie tussen autofagie, de regulatie van autofagie en metabolische aanpassingen. Dit is echter pas het begin van een lange weg van onderzoeken, gericht op het verkrijgen van meer inzicht in dit belangrijke cellulaire proces (**Hoofdstuk 7**). Gezien de sleutelrol van autofagie in verschillende pathofysiologische processen, zou een beter begrip van de regulatie en het fysiologische belang van autofagie de basis kunnen zijn voor de ontwikkeling van nieuwe therapeutische interventies.