

Cover Page



Universiteit Leiden



The handle <http://hdl.handle.net/1887/22939> holds various files of this Leiden University dissertation.

Author: Franken, Adriana Cornelia Wilhelmina

Title: Heme biosynthesis and regulation in the filamentous fungus *Aspergillus niger*

Issue Date: 2013-12-17

Samenvatting

Het gebruik van hernieuwbare materialen anders dan uit voedingsbronnen, is een belangrijk onderzoeksgebied binnen de huidige industriële biotechnologie. Cellulose vormt één van de meest overvloedige hernieuwbare materialen en is aanwezig in allerlei biomassa afkomstig van planten. Echter, om de cellulose te gebruiken als grondstof, moet het gescheiden worden van lignine die cellulose en hemi-cellulose vezels verpakt. Dit proces vereist vandaag de dag nog steeds agressieve behandelingen, waarna de overgebleven lignine meestal wordt verbrand. Houtrot (witrot) schimmels produceren een reeks van enzymen zoals bv. peroxidases die kunnen bijdragen aan een meer milieuvriendelijke en milde verwijdering van lignine, waardoor deze lignine voor andere toepassingen gebruikt zou kunnen worden. Jammer genoeg produceren deze langzaam groeiende schimmels slechts beperkte hoeveelheden lignolytische enzymen, waardoor ze tot nu toe ongeschikt zijn voor industriële toepassingen. Lignolytische peroxidasen kunnen geproduceerd worden door *Aspergillus niger* en deze productie bleek verbeterd te kunnen worden door toevoeging van heem, wat een beperkend effect van deze co-factor in heterologe expressie suggereert. Dit resultaat werd ook waargenomen in andere *Aspergilli*. Helaas is toevoegen van heem onpraktisch en te duur om het economisch haalbaar te zijn in grootschalige productieprocessen. Het onderzoek beschreven in dit proefschrift, verkent heem biosynthese en de regulatie in *A. niger* met als uiteindelijk doel de hoeveelheid intracellulair heem beschikbaar voor peroxidase productie te verhogen.

Hoofdstuk 1 geeft een inleiding met betrekking tot het gebruik van cellulose en verwijderen van lignine door peroxidases en geeft inzicht in de moeilijkheden tijdens heterologe eiwitproductie zoals de beschikbaarheid van heem. Om de heem biosyntheseroute en knelpunten in *A. niger* identificeren, werd vervolgens een literatuurstudie verricht. De resultaten zijn beschreven in **hoofdstuk 2**, dat een globaal inzicht in de biosynthese route geeft en mogelijke knelpunten voor overproductie van peroxidasen. De biosynthese route is geconserveerd en is, op enkele uitzonderingen na, aanwezig in alle organismen. Organismen die geen (volledige) biosynthese route bevatten zijn heme auxotroof (bijvoorbeeld *Caenorhabditis elegans*) of gebruiken totaal geen ijzer meer, zoals bijvoorbeeld *Borrelia burgdorferi*, de bacterie die de ziekte van Lyme veroorzaakt bij mensen. Regulatie van heem biosynthese is echter veel minder geconserveerd dan de biosynthese route zelf. Echter, gemeenschappelijke factoren zoals feedback inhibitie en regulatie door heem, ijzer en zuurstof lijken betrokken bij de regulatie van de heem biosynthese route in de meeste organismen.

A. niger is een veel gebruikte schimmel binnen de biotechnologie vanwege het vermogen om grote hoeveelheden eiwitten te produceren. Daarom is het een interessant organisme voor de productie van lignolytische enzymen zoals peroxidasen en laccasen. Echter, een hoog niveau aan heterologe eiwitproductie is niet zomaar gegarandeerd zoals beschreven in **hoofdstuk 3**. Ondanks het gebruik van een expressievector gebaseerd op de sterke induceerbare glucoamylase promotor, is productie van de gewenste peroxidasen (nagenoeg) niet detecteerbaar. Als mogelijke oorzaak van de lage peroxidase productie hebben we in ons vervolg onderzoek heem biosynthese onderzocht in *A. niger*. Heem heeft een essentiële functie, maar accumulatie van heem of tussenproducten is ook toxisch en daardoor is een geraffineerde en complexe regulatie van heem biosynthese vereist. In **hoofdstuk 4** hebben we een aantal stoffen geanalyseerd die van invloed kunnen zijn op heem biosynthese. Niet onverwachts werd ijzer gevonden als een van de belangrijkste regulatoren, ook 5'-aminolevulinezuur (ALA) en mogelijk heem zelf reguleren heem biosynthese vooral via het controleren van *hemA* (coderend voor 5'-aminolevulinezuursynthase (ALAS)) expressie. Door deletie van *hemA* hebben we aangetoond dat heem essentieel is in *A. niger*. We laten zien dat heem biosynthese gekoppeld is aan het gebruik van nitraat door aan te tonen dat siroheem, dat, net zoals heem, ook gemaakt wordt uit hetzelfde tussenproduct uroporphyrinogeen III essentieel is voor normale groei. In tegenstelling tot *S. cerevisiae* is de betrokkenheid van siroheem in het zwavelmetabolisme niet waargenomen in *A. niger*, aangezien er geen methionine auxotrofie werd waargenomen in $\Delta hemA$. Door deletie van *hemF* en *hemH*, respectievelijk coderend voor coproporphyrinogeen III oxidase en ferrochelatase zoals beschreven in **hoofdstuk 5**, werd de mogelijkheid om exogeen heem te gebruiken voor cellulaire processen bevestigd. Onze experimenten toonden ook aan dat *A. niger* is in staat om intacte heem moleculen de cel in te transporteren. Door overexpressie van de drie geselecteerde heem biosynthetische genen (*hemA*, *hemF*, *hemH*) onder controle van de glucoamylase promotor bleek dat ferrochelatase (gecodeerd door *hemH*) een beperkende stap vormt voor heem overproductie. Alleen een *hemH* overexpressie stam resulteerde in enige overproductie van heem terwijl daarnaast ook accumulatie van het tussenproduct protoporphyrin IX (PPIX) werd waargenomen. Deze laatste bevinding geeft verder aan dat de beperking in de biosynthese route niet enkel wordt opgelost door overexpressie van *hemH* en dat (post)-translationele regulatie een cruciale rol kan spelen. Bovendien is *hemH* is niet het enige potentiële knelpunt om heem toename te bereiken. Overexpressie van *hemA* leidde tot accumulatie van uroporphyrinogeen III en coproporphyrinogeen III, waaruit blijkt dat de activiteit van coproporphyrinogeen III oxidase (gecodeerd door *hemF*) niet voldoende is om de toename in heem tussenproducten te verwerken die worden

gevormd door *hemA* overexpressie. Overexpressie van *hemF* bevestigde de beperking *hemH*, doordat PPIX concentraties in eerste instantie verhoogd waren. Na enige tijd is de PPIX concentratie weer genormaliseerd en werd bovendien een depletie van het porphyrine pool waargenomen, wat een toename in siroheme suggereert als een mechanisme om accumulatie van de latere heem tussenproducten te voorkomen.

In **hoofdstuk 6** is een andere invalshoek onderzocht om biosynthese van heem te verbeteren. Net als in veel andere organismen is ijzer een belangrijke component in de regulatie van de heem biosynthese in *A. niger* (**hoofdstuk 4**). De opname van ijzer wordt gecontroleerd door de wisselwerking tussen twee transcriptie factoren: HapX en SreA, zoals eerder aangetoond is in *A. nidulans* en *A. fumigatus*, en verstoring van dit evenwicht voor ijzeropname resulteerde in een toename in heem synthese. Een Δ *sreA* stam in *A. niger* had veel fenotypische overeenkomsten met de *A. fumigatus* Δ *sreA* stam. Analyse van de productie van siderophoren (ondersteund door genomanalyse) toonde aan dat deletie van *sreA* in *A. niger* wel een toename in siderophore synthese en verhoogde ijzeropname veroorzaakte, maar geen waarneembare toename in heem ondanks de verhoogde expressie van heem biosynthese genen en accumulatie van tussenproducten zoals eerder werd waargenomen in de *hemA* en *hemF* overexpressie stammen. Deze resultaten versterken de eerdere bevindingen in de limitatie van ferrochelatase voor overproductie van heem in *A. niger*.
