



Universiteit
Leiden
The Netherlands

Carbon starvation in the filamentous fungus *Aspergillus niger*

Nitsche, B.M.

Citation

Nitsche, B. M. (2012, October 23). *Carbon starvation in the filamentous fungus Aspergillus niger*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/20011>

Version: Not Applicable (or Unknown)

License: [Leiden University Non-exclusive license](#)

Downloaded from: <https://hdl.handle.net/1887/20011>

Note: To cite this publication please use the final published version (if applicable).

Cover Page



Universiteit Leiden



The handle <http://hdl.handle.net/1887/20011> holds various files of this Leiden University dissertation.

Author: Nitsche, Benjamin Manuel

Title: Carbon starvation in the filamentous fungus *Aspergillus niger*

Date: 2012-10-23

Samenvatting en discussie

In de industriële biotechnologie staat *Aspergillus niger* bekend als een veelzijdige celfabriek met een van nature hoge secretiecapaciteit (Pel *et al.*, 2007), waarvan vaak gebruik wordt gemaakt voor de productie van een breed spectrum aan organische zuren, enzymen en proteïnen. Om de productie te optimaliseren, zijn in de laatste decennia verschillende cellulaire activiteiten die de productieopbrengsten kunnen bepalen, zoals de ongevouwen eiwit respons en secretie van proteases, intensief bestudeerd (Peberdy, 1994; MacKenzie *et al.*, 2005; Jørgensen *et al.*, 2009; Mattern *et al.*, 1992; Braaksma *et al.*, 2009). Voor veel bioprocessen met schimmels wordt gebruik gemaakt van fed-batch culturen (Zustiak *et al.*, 2008), waarmee catabolische repressie wordt voorkomen door de hoeveelheid voedingsstoffen tijdens het productieproces te beperken. Voedingsstoflimitatie zet echter diverse catabolische processen in gang die een negatieve invloed kunnen hebben op productopbrengsten door bijvoorbeeld hydrolyse van het product of afname van het aandeel actieve biomassa door verlies van de integriteit van hyfen.

Omdat voedingsstoflimitatie levensbedreigend kan zijn, zijn er complexe reacties geëvolueerd die uiteindelijk tot zelfvermeerdering van de schimmel leiden. Door endogene recycling en extracellulaire hydrolyse worden tijdens koolstofhongerig bouwstenen en energie als brandstof voor de asexuele ontwikkeling (sporulatie) vrijgemaakt. Ondanks het negatieve effect op productopbrengsten is er tot nu toe geen omvangrijk onderzoek uitgevoerd om koolstofhongerig in de industrieel belangrijke schimmel *A. niger* te bestuderen. Om deze reden hebben wij uitgebreid onderzoek gedaan naar koolstofhongerig in *A. niger* tijdens submerse cultivering, volgens de methode zoals die in dit proefschrift wordt beschreven en die kan worden onderverdeeld in de volgende fasen: (I) Instellen van de software voor omics data analyse en interpretatie in hoofdstuk 2 en 3; (II) Cultivering van *A. niger* en generatie, analyse en interpretatie van data in hoofdstuk 4; (III) Onderzoek van een mogelijke route met sterke transcriptionele inductie tijdens koolstofhongerig met behulp van moleculair-genetische benaderingen in hoofdstuk 5.

Genoom-brede transcriptionele analyse heeft een groot potentieel om op systeemniveau inzicht te krijgen in cellulaire reacties, maar vereist wel objectieve, high-throughput statistische benaderingen voor data-analyse, interpretatie en uiteindelijk generatie van hypothesen. Vooral op universiteiten is de toepassing van open source software wenselijk en kan het worden beschouwd als voordelig, omdat het vrij verspreid en actief ontwikkeld wordt door deskundigen uit de wetenschappelijke gemeenschap zelf. Het is echter ook mogelijk dat het gebruik ervan minder intuïtief is door afhankelijkheid van een command-line-interface, zoals het geval is bij R/Bioconductor (R-Team, 2008; Gentleman *et al.*, 2004). Deze open source software werd gebruikt in dit proefschrift voor transcriptionele data-analyse. Om deze reden is hoofdstuk

2 bedoeld als een inleiding tot transcriptionele data-analyse met behulp van R/Bioconductor door middel van een stap-voor-stap handleiding. Daarin worden twee openbare transcriptionele datasets van *A. niger* geanalyseerd (Nitsche *et al.*, 2012b). De ervaring heeft geleerd dat deze aanpak geschikt is om biologen in contact te brengen met R/Bioconductor en ze zelfs in staat stelt hun eigen datasets te analyseren.

Na de eerste fase van data-analyse met inbegrip van de identificatie van differentieel tot expressie komende of co-expressie genensets moeten omics data biologisch worden geïnterpreteerd om bijvoorbeeld nieuwe hypothesen te genereren. Verrijkingsanalyse van functionele annotaties is een krachtige, high-throughput en onbevooroordeelde aanpak (B. H. J. v. d. Berg *et al.*, 2009). Tot de meest gebruikte functionele annotaties voor verrijkingsanalyse behoort de Gene Ontology (GO) annotatie (Ashburner *et al.*, 2000). In hoofdstuk 3 werd deze waardevolle bron voor functionele analyse van omics gegevens gegenereerd voor het genus *Aspergillus* door het mappen van de *A. nidulans* GO annotatie op alle *Aspergilli* met gepubliceerde genoom sequenties en het implementeren van de webapplicatie FetGOat (Fisher's exact test Gene Ontology annotation tool, <http://www.broadinstitute.org/fetgoat/index.html>) voor GO verrijkingsanalyse. Zowel de annotatie als FetGOat werden gebruikt in twee case studies waarin openbare datasets opnieuw geanalyseerd werden. Hierdoor zijn hun toepasbaarheid, gebruiksgemak en de mogelijkheid om nieuwe hypothesen te genereren gedemonstreerd (Nitsche *et al.*, 2011).

Na het instellen van de software voor omics data analyse zijn in hoofdstuk 4 genoom-brede transcriptionele profielen van submerse culturen met koolstofhongerig van *A. niger* bepaald, geanalyseerd en geïnterpreteerd. De experimentele opstelling omvatte submerse batch cultivering in een koolstoflimiterend minimaal medium met toepassing van bioreactortechnologie, waardoor een hoge mate van herhaalbaarheid, bewaking en beheersing van fysiologie en macromorfologie gewaarborgd was. De belangrijkste morfologische reacties op koolstofhongerig waren het ontstaan van lege hyfale compartimenten, secundaire (cryptische) groei van dunne, onvertakte hyfen en vervolgens vorming van ongeslachtelijke voortplantingsstructuren. Deze morfologische kenmerken suggereren dat secundaire groei en sporulatie tijdens koolstofhongerig mogelijk zijn door hergebruik van voedingsstoffen afkomstig van het legen van hyfale compartimenten. Microscopische analyse gaf geen aanwijzing voor hydrolytische verzwakking en fragmentatie van de celwand van de schimmel. De inhoud van lege compartimenten zou direct gerecycled kunnen zijn door naburige compartimenten via een endogene route of eerst in het cultuur medium zijn gelekt waar het vervolgens door groeiende hyfen opgenomen is.

Transcriptionele data-analyse toonde aan dat in de loop van koolstofhongerig circa 50% van de transcripten differentieel tot expressie komt. Het aantal hoog en laag gereguleerde ge-

nen was goed vergelijkbaar. Om belangrijke transcriptioneel geïnduceerde of gerepresseerde cellulaire processen te identificeren, werd GO annotatie verrijkingsanalyse voor hoog en laag gereguleerde genensets toegepast. De onderdrukte processen werden in de eerste plaats gerelateerd aan transcriptie, translatie en respiratie, wat de fysiologische adaptatie aan koolstofhonger en energieverlies weerspiegelt. Aan de andere kant omvatten de belangrijkste transcriptioneel geïnduceerde processen catabolische en reproductieve routes. Als zodanig waren autofagie en sporulatie de twee meest dominant geïnduceerde processen. Daarnaast heeft analyse gericht op carbohydrasen en proteasen sterke transcriptionele inductie van verschillende uitgescheiden en niet-uitgescheiden hydrolasen laten zien.

In gisten en filamenteuze schimmels zijn er tot nu toe meer dan 30 autofagie-gerelateerde genen geïdentificeerd (Kanki *et al.*, 2011; Xie *et al.*, 2007). Voor 23 daarvan zijn orthologe kandidaatgenen in *A. niger* geïdentificeerd en deze werden op één na allemaal transcriptioneel geïnduceerd tijdens de koolstofhonger. Deze gezamenlijke inductie van de autofagie route gaf aanleiding tot vragen over de rol van autofagie tijdens koolstofhonger. Beschermde autofagie tegen de vorming van lege hyfale compartimenten of induceert het dit proces? Is autofagie vereist voor effectieve verlenging van dunne hyfen in de tweede groeifase tijdens koolstofhonger of niet? Op zoek naar antwoorden werden drie genen (*atg1*, *atg8* en *atg17*), waarvan voorspeld werd dat ze essentieel zijn voor efficiënte autofagie (Tsukada *et al.*, 1993; Matsuura *et al.*, 1997; Cheong *et al.*, 2005; Kabeya *et al.*, 2005), verwijderd in de *A. niger* wild-type en fluorescerende reporterstammen. Fenotypische karakterisering van de gemuteerde stammen toonde aan dat *atg1* en *atg8* essentieel zijn voor een efficiënte autofagie in *A. niger*, terwijl de verwijdering van *atg17* weinig tot geen effect had. Analyse van de $\Delta atg1$ en $\Delta atg8$ mutanten tijdens submerse groei in koolstofgelimiteerde batch cultures heeft laten zien dat morfogenetische aanpassingen aan koolstofhonger, waaronder het verschijnen van lege hyfale compartimenten en secundaire groei van dunne onvertakte hyfen, worden versneld wanneer autofagie is aangetast. Verder werd aangetoond dat de door koolstofhonger geïnduceerde turnover van mitochondriën zowel in $\Delta atg1$ als in $\Delta atg8$ mutanten ernstig verstoord is. Dit suggereert dat autofagie door turnover van organellen tot vertraging van celdood tijdens koolstofhonger leidt, wat belangrijk is voor de fysiologische adaptatie. Er is verder onderzoek nodig om het effect van een aangetaste autofagie in *A. niger* op productopbrengsten te verhelderen. In *Penicillium chrysogenum* is bijvoorbeeld opgemerkt dat aantasting van autofagie de celdegeneratie vertraagt en tot verhoogde productie leidt (Bartoszewska *et al.*, 2011a).

Het bleek moeilijk te bepalen of lege hyfen lyseren, wat betekent dat hun inhoud in het cultuur medium lekt, of dat de inhoud van de lege compartimenten actief wordt geëvacueerd door naburige compartimenten en op deze manier endogeen gerecycleerd wordt. Hoewel uit de secretome gegevens bleek dat er tijdens koolstofhonger geen significante accumulatie was van

intracellulaire eiwitten in het cultuur medium, kon niet worden uitgesloten dat onmiddellijke hydrolyse van geëcte cytosolische eiwitten had plaatsgevonden. Desondanks toont het versneld ontstaan van lege compartimenten in de $\Delta atg1$ en $\Delta atg8$ mutanten aan dat endogene recycling van naburige compartimenten niet optreedt via autofagie.

Deze studie is het eerste onderzoek naar koolstofhonger in de schimmel *A. niger* op systeemniveau. Aangezien we slechts een enkele aanwijzing uit de transcriptionele data-analyse zijn gevolgd, bestaan er veel meer processen die nog moeten worden onderzocht. De gegenereerde dataset vormt een omvangrijk kader voor toekomstig onderzoek naar deze complexe cellulaire processen.

