

Cover Page



Universiteit Leiden



The handle <http://hdl.handle.net/1887/26935> holds various files of this Leiden University dissertation

Author: Kwon, Min Jin

Title: Morphogenesis and protein production in *Aspergillus niger*

Issue Date: 2014-06-19

Samenvatting

In **Hoofdstuk 1** wordt een algemene introductie gegeven over de productie van enzymen en metabolieten door filamenteuze schimmels. In de introductie wordt speciale aandacht geschonken aan een aantal mogelijk mechanismen die kunnen verklaren waarom *A. niger* zo efficiënt is in het uitscheiden van eiwitten.

Hoofdstuk 2 beschrijft de systematische bestudering van de functies van alle GTPases van de Rho familie die in *A. niger* aanwezig zijn. Gebaseerd op het verlies van functie, hebben we hier laten zien dat de zes Rho GTPases (RacA, CftA, RhoA, RhoB, RhoC, RhoD) verschillende en overlappende functies bezitten gedurende de levenscyclus van *A. niger*. Alles bij elkaar genomen laat de data zien dat de individuele Rho GTPases op verschillende manieren bijdragen aan de groei en morfogenese in schimmels. RacA en CftA zorgen samen voor polariteit, waarbij in *A. niger* RacA de belangrijkste rol speelt. In *A. nidulans* zorgt juist de deletie van *cftA* voor een meer uitgesproken effect op de morfologie, vergeleken met de deletie van *racA*. De vergelijking tussen *A. niger* en *A. nidulans* toont aan dat de rolverdeling tussen CftA en RacA zelfs tussen nauw verwante schimmels kan verschillen.

In **Hoofdstuk 3** is de *racA* mutant onderworpen aan een meer gedetailleerde studie, om de impact van veranderde morfologie op de eiwitproductie en op het transcriptoom op te helderen. Tot onze verrassing was het fysiologische profiel, waaronder de maximale specifieke groeisnelheid en de specifieke eiwitproductie, nagenoeg hetzelfde ondanks de significante verschillen in morfologie. Door het volgen van exocytose (SncA-GFP) en endocytose (SlaB-YFP, AbpA-CFP) markers, in combinatie met een bepaling van de eiwitopbrengst, is aangetoond dat de toename in groeitips niet resulteerde in een toename van eiwitproductie. De analyse van het transcriptoom van drie morfologie mutanten (*ΔracA*, *ramosa-1* apicale vertakkingsmutanten; PglaA-RacAG18V, een apolair groeiende mutant, waar RacA gevangen is in de ‘aan-status’ door het muteren van het voorspelde GTP bindende en hydrolyse domein) toont aan dat verscheidene signaal- en metabolische routes anders tot expressie komen in deze morfologische mutanten. Met betrekking tot eiwitsecretie zou het interessant zijn om in de *ΔracA* stam een bepaald eiwit to overexpressie te brengen om het effect van hypervertakking op eiwitsecretie te kunnen bestuderen.

In **Hoofdstuk 4** hebben we transcriptoom analyses uitgevoerd door de *A. niger* wildtype stam te vergelijken met de glucoamylase overexpressie stam bij dezelfde groeisnelheid. Met behulp van GO-term verrijkingsanalyse zijn vier hogere-orde categorieën geïdentificeerd in de omhoog gereguleerde set van genen i) ER membraan translocatie, ii) eiwit glycosylering, iii) transport van blaasjes, iv) ion homeostase. Binnen deze genenset waren ongeveer 130 genen met een voorspelde functie betrokken bij het passeren van eiwitten door het ER, en in deze genenset waren target genen van de HacA transcriptiefactor, die de Unfolded Protein Response (UPR) medieert, bv. *bipA*, *clxA*, *prpA*, *tigA* and *pdiA*. Deze dataset werd vergeleken met andere datasets waarbij in *A. niger* UPR werd geïnduceerd, resulterend in een kernset van 40 genen die zeer belangrijk zijn voor het geïntensiveerde eiwit transport door de secretieroute. De consistente up-regulatie van een gen coderend voor de voorspelde acetyl-coenzym A (CoA) transporter suggereert een rol voor transiënte acetylering om te zorgen voor correcte vouwing van uitgescheiden eiwitten.

In **Hoofdstuk 5** hebben we een GFP-v-SNARE reporter stam gemaakt waarin het transport en de dynamiek van secretieblaasjes *in vivo* gevolgd kan worden, om zo het proces van eiwitsecretie in *A. niger* te kunnen bestuderen. De biologische rol van zeven secretie specifieke genen, waarvan bekend is dat ze functioneren in belangrijke aspecten van het eiwit secretie apparaat in *S. cerevisiae*, is geanalyseerd mbv de GFP-v-SNARE reporter stam. Dit onderzoek heeft aangetoond dat de organisatie van exocyst-gemedieerde blaasjestransport maar deels geconserveerd is in *S. cerevisiae* en *A. niger*, wat de basis is voor het begrijpen van de verschillen in de secretiemechanismen tussen de verschillende soorten.

In **Hoofdstuk 6** zijn de belangrijkste ontdekkingen, voortkomend uit het onderzoek beschreven in dit proefschrift, samengevat en uitgelicht, en interessante onderwerpen voor toekomstig onderzoek worden hier besproken.