



Universiteit
Leiden
The Netherlands

The role of autophagy during carbon starvation in *Aspergillus niger* Burggraaf, M.A.

Citation

Burggraaf, M. A. (2021, May 25). *The role of autophagy during carbon starvation in Aspergillus niger*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/3179455>

Version: Publisher's Version

License: [Licence agreement concerning inclusion of doctoral thesis in the Institutional Repository of the University of Leiden](#)

Downloaded from: <https://hdl.handle.net/1887/3179455>

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

Cover Page



Universiteit Leiden



The handle <https://hdl.handle.net/1887/3179455> holds various files of this Leiden University dissertation.

Author: Burggraaf, M.A.

Title: The role of autophagy during carbon starvation in *Aspergillus niger*

Issue Date: 2021-05-25

Samenvatting

Voor filamenteuze schimmels die leven op de restanten van dood plantaardig materiaal, zoals *Aspergillus niger*, is het niet ongewoon dat er tekorten optreden in de beschikbare koolstofbronnen die uit dat plantaardige materiaal kunnen worden vrijgemaakt. Om zulke omstandigheden te kunnen overleven, worden specifieke overlevingsstrategieën geïnduceerd. Een van de processen die tijdens koolstoflimitatie wordt geïnduceerd, is autofagie.

Autofagie is een intracellulair afbraakmechanisme waarbij cytosolische componenten worden afgebroken en gerecycled zodat de bouwstenen kunnen worden hergebruikt door de cel. Dit proces komt in veel organismen voor, ook in schimmels, waaronder in *A. niger*. Gedurende autofagie in *A. niger* worden cytosolische eiwitten en organellen opgenomen in blaasjes omgeven door een dubbele membraan om zo getransporteerd te kunnen worden naar de vacuole. Deze blaasjes worden autofagosomen genoemd. De buitenste membraan van het autofagosoom fuseert met de membraan van de vacuole, waarna een blaasje met een enkele membraan uitkomt binnenin de vacuole. Dit blaasje en de inhoud daarvan worden dan in de vacuole afgebroken en de afbraakproducten worden terug getransporteerd naar het cytosol, zodat ze kunnen worden hergebruikt. De eiwitten die betrokken zijn bij zowel de regulatie van autofagie als bij het proces zelf, worden autofagie-gerelateerde (Atg) eiwitten genoemd. Deze Atg eiwitten worden gecodeerd door *atg* genen. Het proces van autofagie en de genen die coderen voor Atg eiwitten worden sterk geïnduceerd door een gebrek aan koolstofbronnen in de omgeving, een omstandigheid waarin het recyclen van nutriënten van groot belang is voor het onderhouden van essentiële cellulaire functies, sporevorming en differentiatie. Naast autofagie zijn er verschillende andere mechanismes die bijdragen aan het overleven in condities van tekorten aan koolstofbronnen. Een overzicht van de complexe reacties op koolstofbrontekorten in *Aspergillus* soorten wordt gegeven in hoofdstuk 1 van dit proefschrift.

Naast dat autofagie belangrijk is voor het recyclen van nutriënten tijdens (koolstof) hongering, wordt verondersteld dat het betrokken is bij eiwitsecretie, pathogeniteit en afbraak van beschadigde eiwitten en organellen. In dit proefschrift zijn verschillende rollen van autofagie bestudeerd, zowel in nutriëntrijke als in nutriëntarme omstandigheden. Hiervoor zijn deletiemutanten gemaakt van een aantal autofagie-gerelateerde genen. In hoofdstuk 2 worden de effecten van deze deleties beschreven op zowel groei op plaat als in vloeibare culturen. Microscopisch onderzoek van reporterstammen heeft aangetoond dat de genen *atg1* en *atg8* essentieel zijn voor autofagie in *A. niger*, terwijl *atg17* dat niet is. Het uitschakelen van *atg1* of *atg8* in *A. niger* leidde tot effecten op het fenotype. Op plaat

werd een verminderde sporeproductie gezien voor deze mutanten en in bioreactorculturen was de maximale specifieke groeisnelheid voor deze stammen lager dan in de wild-type stam. Daarnaast werd de vorming van dunne, onvertakte hyfen en het daarbij behorende ontstaan van lege celcompartimenten in de autofagiemutanten versneld.

Transcriptoomanalyse op verschillende tijdstippen tijdens koolstofhongerig heeft aangetoond dat er in *A. niger* wild-type onderscheid te maken is tussen de vroege en de late respons op koolstofhongerig (zie hoofdstuk 1). Dit onderscheid werd ook teruggezien in de vergelijking tussen de *Δatg1* autofagie mutant en het wild-type (hoofdstuk 3). Vroeg in de post-exponentiële fase werden namelijk andere groepen van genen met een verschillend expressie niveau geïdentificeerd dan laat in de post-exponentiële fase. Een dag nadat de koolstofbron was uitgeput, kwamen genen gerelateerd aan DNA herstel en celdeling in de autofagiemutant hoger tot expressie dan in het wild-type. Nog later in de tijd (zes dagen nadat de koolstofbron uitgeput was) kwamen ribosomale genen en metabolische processen hoger tot expressie.

De rol van autofagie bij verschillende cellulaire processen werd verder onderzocht door te kijken naar de mogelijke betrokkenheid van autofagie bij het afbreken van misgevouwen eiwitten in het endoplasmatisch reticulum (ER) (hoofdstuk 4). Ongevouwen en misgevouwen eiwitten worden normaal gesproken afgebroken via de ER-associated degradation (ERAD) pathway, maar *A. niger* ERAD deletiemutanten zijn nauwelijks belemmerd in groei, zelfs niet als ER stress wordt geïnduceerd. Om te bestuderen of autofagie de rol van ERAD overneemt, werden mutanten gemaakt die zowel een deletie van een ERAD gen als van een autofagie gen hadden. Deze dubbelmutanten werden vergeleken met de enkele ERAD mutant. Er werden geen verschillen gevonden in groei en in de dubbelmutant was er geen sprake van meer ophoping van misgevouwen heterologe eiwitten in het ER. Daaruit blijkt dat autofagie in *A. niger* geen rol speelt als alternatief in de afbraak van misgevouwen eiwitten uit het ER bij afwezigheid van ERAD.

In hoofdstuk 5 van dit proefschrift is onderzocht of autofagie betrokken is bij onconventionele eiwitsecretie (UPS, unconventional protein secretion) in *A. niger*. Tijdens UPS worden secretore eiwitten onafhankelijk van de klassieke ER-Golgi route naar de celmembraan getransporteerd. De protease PepN is in *A. niger* geïdentificeerd als een eiwit dat tijdens koolstofhongerig gesecreteerd wordt via de niet-klassieke secretieroute. Onderzoek aan filtraten van *A. niger* autofagiemutanten toonde aan dat PepN ook aanwezig was in het secretoom van stammen waarin autofagie niet functioneert. Dit toont aan dat de secretie van PepN niet afhankelijk is van een werkend autofagieproces in *A. niger*.

Het onderzoek beschreven in dit proefschrift heeft nieuwe inzichten gegeven in de functies van autofagie in de schimmelbiologie. De rol van autofagie in *A. niger* blijkt complexer

dan verwacht en verschillend van de rol die het speelt in andere schimmelsoorten. Het uitschakelen van genen die essentieel zijn voor het autofagieproces in *A. niger* leidde tot duidelijke effecten op de groei en de ontwikkeling van dunne hyfen tijdens koolstofhonger, maar deze effecten waren gering in vergelijking met de resultaten zoals gevonden in unicellulaire schimmels en zoogdiercellen. Daarnaast toont ons onderzoek aan dat in *A. niger* autofagie en ERAD niet functioneel redundant zijn als het gaat om het afbreken van misgevouwen eiwitten en dat autofagie niet betrokken is bij de onconventionele secretie van PepN. Verder onderzoek is nodig om de functies van autofagie in *A. niger* te identificeren en interacties met andere processen te ontdekken.

