



Universiteit  
Leiden  
The Netherlands

## Transcriptional control of pectin degrading enzymes in *Aspergillus niger* Niu, J.; Niu J.

### Citation

Niu, J. (2017, October 18). *Transcriptional control of pectin degrading enzymes in Aspergillus niger*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/54939>

Version: Not Applicable (or Unknown)

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

Downloaded from: <https://hdl.handle.net/1887/54939>

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

Cover Page



Universiteit Leiden



The handle <http://hdl.handle.net/1887/54939> holds various files of this Leiden University dissertation.

**Author:** Niu, J.

**Title:** Transcriptional control of pectin degrading enzymes in *Aspergillus niger*

**Issue Date:** 2017-10-18

**Summary**

**&**

**Samenvatting**

## Summary

*Aspergillus niger* is a saprotrophic filamentous fungus feeding on dead plant material in Nature. To be able to utilize the carbon from plant material, the first determined step is to break down the plant polysaccharides, which apart from storage carbohydrates like starch and inulin, are mainly present in the cell wall of plants. Plant cell walls consist of complex polysaccharides, such as cellulose, hemicellulose and pectin. *A. niger* can produce hydrolytic enzymes, such as cellulases, beta-glucosidases, and cellobiohydrolases to degrade cellulose. Similarly, xylanases, xylosidases, and arabinofuranosidases are produced to degrade hemicellulose, and pectin degrading enzymes, such as exo-polygalacturonases, pectin lyase and pectin esterases are produced to breakdown pectin. After degradation of these polymers into monosaccharides, these monosaccharides can then be taken up by the cell for intracellular utilization. Because of the attractive applications of the various hydrolytic enzymes, *A. niger* is frequently used as host for the industrial production of these enzymes. These enzymes find their application in various fields of the food, medical and textile industries. Based on its long history of safe use, *A. niger* enzymes have also acquired the so-called GRAS (generally regarded as safe) status. For these reasons high level production of enzymes in *A. niger* has obtained considerable scientific attention. Scientists have made much progress in improving enzyme production using a wide variety of approaches: such as screening for hyperproductive mutants, optimizing of production medium and optimizing culture conditions. From research related to the transcriptional regulation of plant cell wall degrading enzymes in the last 20 years it has become clear that the expression of the genes encoding these enzymes are tightly regulated in filamentous fungi, including *A. niger*. These genes are under the control of substrate specific transcriptional activators and only highly express in response to the presence of a particular substrate. The starch regulator AmyR and the xylan regulator XlnR, were the first regulators identified using classical techniques. With the rapid development of modern functional genomics approaches, several new transcription factors involved in plant biomass degradation were identified in Aspergilli in the last few years. These include InuR (inulin utilization), Clr-2/ClrB/ManR (cellulose and mannan) utilization; GalX/R (galactose utilization); AraR (arabinose utilization), RhaR (rhamnose utilization). However, at the beginning of the research described in this thesis, the transcription factors involved in pectin degradation were not identified.

Therefore, in this thesis I have focused on the identification of transcription factors responsible for pectin degradation and on subsequent studies regarding its specific regulatory

mechanisms. The main constituent of pectin is the monosaccharide D-galacturonic acid (GA), and GA is the predominant product released from pectin degradation. Elucidation of the mechanism underlying the regulation of genes encoding pectin degrading enzymes is expected to contribute to improve industrial production of pectinases.

In **Chapter 1**, I give an introduction of filamentous fungi with a focus on *A. niger*, as well as their industrial application. It describes the impact of advances in next-generation sequencing technologies for fungal genetics and genomics. A variety of functional genomics approaches have been developed with the rapid advances of several high throughput technologies. These approaches include (i) genetic linkage based methods in combination with next generation sequencing to characterize mutant genes from strains selected in forward genetic screens; (ii) efficient gene deletion approaches like split marker approaches combined with NHEJ mutants and CRISPR-Cas9-based genome modification approaches and overexpression method for studying gene function; (iii) Microarray and RNA-seq for surveying transcriptomics data; and (iv) CHIP-seq for identification of transcription factor binding sites. All these methods together provide useful perspectives to understand gene regulation. This chapter also describes the major polysaccharides starch, xylan and polygalacturonic acid of plant biomass and their substrate specific transcription factors and corresponding regulation mechanisms for the expression of genes involved in the degradation of these polysaccharides. **Chapter 2** describes a split marker approach in combination with NHEJ mutants for efficient targeted gene deletion. In **Chapter 3**, we constructed a set of isogenic auxotrophic strains by recycling *pyrG* marker. These auxotrophic strains can be used for constructing multiple gene deletion mutants to study more complex multi-gene families. In **Chapter 4**, we selected five galacturonic acid (GA) induced genes based on available genome-wide expression profiles to analyze the regulation of promoter activity of these genes *in vivo* by constructing promoter\_ *amdS* reporter strains. Using these strains, we show that induction and repression of GA-induced genes is differentially fine-tuned in response to inducing and repressing conditions. In **Chapter 5**, we identified the GA responsive transcription activator GaaR of *A. niger* by homology to BcGaaR of *Botrytis cinerea*. Targeted deletion of *gaaR* and transcriptomic profiling studies of  $\Delta$ *gaaR* showed that the *A. niger* GaaR ortholog is required for releasing and utilization of GA from pectin. In **Chapter 6**, we describe the use of one of the reporter strains containing Ppgax\_ *amdS* construct to screen inducer independent mutants that constitutively express pectinolytic enzymes. In **Chapter 6** full genome sequencing of five mutants out of totally 65 mutants showing constitutive pectinolytic activity revealed allelic mutations in one particular gene, we subsequently named

*gaaX*. Targeted deletion of *gaaX* in combination with RNA-seq analysis of  $\Delta$ *gaaX* showed that deletion of *gaaX* or mutations in *gaaX* cause constitutive expression of a large number of genes involved in releasing and utilization of GA. Chromosomal localization shows that *gaaX* is syntenous to *gaaR*, which encodes the transcription activator for GA utilization identified in **Chapter 5**. In **Chapter 6**, evidence is provided that GaaX is likely to act as a transcription repressor which inhibits GaaR activity under non-inducing conditions. The newly discovered GA-specific activator/repressor module involved in pectin degradation represents a new and unexpected, yet conserved mechanism for controlling transcription in filamentous fungi. In the last Chapter (**Chapter 7**) we summarize and discuss the major conclusions of this thesis and propose some future directions to study the proposed interactions between GaaX, GaaR, and the inducer to decipher further the regulatory mechanism of pectin degradation system in *A. niger*.

## Samenvatting

*Aspergillus niger* is een saprotrofe filamenteuze schimmel die zich van nature voedt met dood plantenmateriaal. Om de koolhydraten van het plantenmateriaal, welke, naast opslagkoolhydraten zoals zetmeel en inuline, vooral bestaan uit celwand koolhydraten, te kunnen gebruiken moeten deze polysacchariden allereerst worden afgebroken tot monomeren. De celwanden bestaan uit complexe polysacchariden zoals cellulose, hemicellulose en pectine. *A. niger* kan hydrolytische enzymen zoals cellulases, beta-glucosidasen en cellobiohydrolasen produceren voor de afbraak van cellulose. Op dezelfde manier worden xylanases, xylosidasen en arabinofuranosidasen geproduceerd om hemicellulose af te breken, en pectine afbrekende enzymen zoals exo-polygalacturonases, pectine lyase en pectine esterasen worden geproduceerd als *A. niger* op pectine wordt gekweekt. Wanneer deze polysacchariden zijn afgebroken tot monomeren kunnen ze door de cel worden opgenomen en intracellulair gebruikt. Vanwege de aantrekkelijke toepassingen van de verschillende hydrolytische enzymen wordt *A. niger* vaak gebruikt als gastheer voor de industriële productie van deze enzymen. De toepassingen van deze enzymen zijn te vinden in de medische, voedings- en textielindustrie. Gebaseerd op zijn lange geschiedenis van veilig gebruik heeft *A. niger* de GRAS (Generally Regarded As Safe) status verkregen.

De bovengenoemde aspecten hebben gezorgd voor veel wetenschappelijke aandacht voor het bereiken van hoge productieniveaus van enzymen in *A. niger*. Wetenschappers hebben veel vooruitgang geboekt met het verbeteren van enzymproductie, waarbij een breed scala aan methoden zijn gebruikt: het screenen van hyperproductieve mutanten, optimalisatie van productiemedium en van kweekcondities. Uit onderzoek van de laatste twintig jaar naar de transcriptionele regulatie van plantencelwand afbrekende enzymen is gebleken dat de expressie van de genen die coderen voor deze enzymen strikt wordt gereguleerd in filamenteuze schimmels, zoals *A. niger*. De genen staan onder controle van substraat specifieke transcriptionele activatoren en vertonen alleen hoge expressie in aanwezigheid van een specifiek substraat. De zetmeel regulator AmyR en de xyloaan regulator XlnR zijn de eerste regulatoren die zijn geïdentificeerd met behulp van klassieke methoden. Door de snelle ontwikkeling van moderne “functional genomics” methoden zijn de laatste jaren verschillende nieuwe, bij de afbraak van biomassa van planten betrokken, transcriptiefactoren geïdentificeerd in *Aspergillus* soorten. Dit zijn onder andere InuR (inuline afbraak), Clr-2/ClrB/ManR (cellulose en mannan), GalX/R (galactan), AraR (arabinan) en RhaR

(rhamnan). Echter, aan het begin van het onderzoek beschreven in dit proefschrift waren de transcriptiefactoren die betrokken zijn bij de afbraak van pectine nog niet geïdentificeerd.

In dit proefschrift heb ik me derhalve gericht op de identificatie van transcriptiefactoren die verantwoordelijk zijn voor de afbraak van pectine om vervolgens de specifieke regulerende mechanismen hiervan te bestuderen. Het hoofdbestanddeel van pectine is het suikerzuur D-galacturonzuur (GA), en na afbraak van pectine is GA dan ook het voornaamste afbraakproduct. De verwachting is dat het ophelderen van het mechanisme van regulatie van genen coderend voor pectine afbrekende enzymen zal bijdragen aan het verbeteren van de industriële productie van pectinases.

In **Hoofdstuk 1** geef ik een introductie over filamenteuze schimmels, met nadruk op de regulatie van enzym productie in *A. niger*, en hun industriële toepassingen. Het hoofdstuk beschrijft het effect van de ontwikkelingen in next-generation sequencing technieken op schimmel-genetica en genomics. Een verscheidenheid aan functional genomics methoden is ontwikkeld door de snelle vooruitgang van verschillende high throughput technologieën. Dit zijn o.a. (i) methoden gebaseerd op klassieke genetica gecombineerd met next-generation sequencing om mutante genen te karakteriseren van stammen die geselecteerd zijn in een zogn. forward genetic screen; (ii) efficiënte gen-deletie methoden, zoals de Split Marker methode gecombineerd met NHEJ mutanten en CRISPR-Cas9 gebaseerde genommodificaties, en over expressie methoden om daarmee de functie van genen te bestuderen; (iii) Micro-array en RNA-seq methoden om transcriptome analyse uit te voeren en (iv) CHIP-seq methodes voor het identificeren van de bindingsplaats van transcriptiefactoren op het DNA. Deze methoden samen zorgen voor een bruikbare aanpak om genregulatie te begrijpen. Dit hoofdstuk beschrijft ook de voornaamste polysacchariden van biomassa van planten, nl. zetmeel, xylan, en polygalacturonzuur, en hun substraat specifieke transcriptiefactoren en de corresponderende regulatie mechanismen voor de expressie van genen die betrokken zijn bij de afbraak van deze polysacchariden. **Hoofdstuk 2** beschrijft een Split Marker methode gecombineerd met NHEJ mutanten, voor het efficiënt maken van gerichte gen-deleties. In **Hoofdstuk 3** hebben we een set van isogene, auxotrofe stammen gemaakt door middel van het gebruik van de recycleerbare *pyrG* marker. Deze auxotrofe stammen kunnen gebruikt worden voor het maken van meervoudige gen-deleties voor het bestuderen van meer complexe multi-gen families. In **Hoofdstuk 4** worden, gebaseerd op beschikbare genom-brede gen-expressieprofielen, vijf genen geselecteerd die worden geïnduceerd op medium met galacturonzuur (GA), om de regulatie van de promoter activiteit



van deze genen *in vivo* te bestuderen d.m.v. het maken van stammen met de promoter *amdS* reporter. Met behulp van deze stammen tonen we aan dat de inductie en repressie van GA-geïnduceerde genen op verschillende wijze wordt verfijnd in reactie op inducerende en represserende condities. In **Hoofdstuk 5** hebben we de GA-reactieve transcriptionele activator GaaR geïdentificeerd d.m.v. homologie met de GA-transcriptie-activator BcGaaR uit *Botrytis cinerea*. Gerichte deletie van *gaaR* en transcriptomische profiling van een *gaaR* deletie stam (*ΔgaaR*) heeft aangetoond dat de GaaR ortholoog van *A. niger* noodzakelijk is voor het vrijkomen van GA vanuit pectine en het gebruik ervan. In **Hoofdstuk 6** beschrijven we het gebruik van de reporter stam die het *PpgaX-amdS* construct bevat, om te screenen voor inductie onafhankelijke mutanten die pectinolytische enzymen constitutief tot expressie brengen. Sequentie-analyse van het volledige genoom van vijf van totaal 65 van deze mutanten, onthulde mutante allelen van één enkel gen, dat we *gaaX* hebben genoemd. Gerichte deletie van *gaaX*, gecombineerd met RNA-seq analyse van een *gaaX* deletie stam, toonde aan dat deletie van *gaaX* (of mutaties in *gaaX*) constitutieve expressie veroorzaakt van een groot aantal genen die betrokken zijn bij het vrijmaken van GA uit pectine en het gebruiken van GA. Chromosomale localisatie toont aan dat *gaaX* gelegen is direct naast *gaaR*, dat codeert voor de transcriptionele activator voor het gebruik van GA, zoals beschreven in **Hoofdstuk 5**. In **Hoofdstuk 6** wordt experimenteel aannemelijk gemaakt dat GaaX werkt als een transcriptonele repressor, die GaaR activiteit onderdrukt tijdens niet-inducerende condities. Deze nieuw ontdekte GA-specifieke activator/repressor module, betrokken bij afbraak van pectine, vertegenwoordigt een nieuw en onverwacht, maar duidelijk geconserveerd, mechanisme om transcriptie te controleren in filamenteuze schimmels. In het laatste Hoofdstuk (**Hoofdstuk 7**) vatten we de belangrijkste conclusies van dit proefschrift samen en bediscussiëren deze. Ook stellen we enkele toekomstige onderzoeksrichtingen voor om de voorgestelde interacties tussen GaaX, GaaR en de inducer te bestuderen om zo de regulatie mechanismen van het pectine afbrekende systeem in *A. niger* verder te ontcijferen.