

DISS. ETH No. 9614

**ISOLATION, CHARACTERIZATION AND HETEROLOGOUS
EXPRESSION OF LIGNIN PEROXIDASE GENES OF THE WHITE-ROT
BASIDIOMYCETE *PHANEROCHAETE CHRYSOSPORIUM***

A dissertation submitted to the

SWISS FEDERAL INSTITUTE OF TECHNOLOGY ZUERICH
for the degree of
Doctor of Natural Sciences

presented by
ISABELLE SYLVIE WALTHER
Dipl. sc. biol. Université de Lausanne
born December 12, 1961
citizen of Chigny/Morges VD

accepted on the recommendation of
Prof. Dr. A. Fiechter, examiner
Prof. Dr. J.K.C. Knowles, co-examiner
Dr. J. Reiser, co-examiner

Zürich 1992

SUMMARY

The aims of this thesis were to isolate and characterize lignin peroxidase (*lpo*) genes of the white-rot basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*, and to investigate the expression of such genes in heterologous hosts.

First, a lignin peroxidase-related complementary DNA (cDNA) was isolated from a λ gt11-based library by means of lignin peroxidase specific antibodies. This cDNA, which was not full-length, was subsequently used to screen a λ ZAP library from which complete *lpo*-related cDNAs could be isolated. One of these was better characterized: it encodes a lignin peroxidase (LPO) isozyme which has, until yet, not been investigated genetically. The cDNA was sequenced and compared at the nucleotide and amino acid levels with other *lpo* sequences. The comparisons revealed that the isolated cDNA is very similar to the other *lpo* sequences (from 71% to 89% at the aa level). On the basis of its degree of homology to other *lpo* sequences, it could be concluded that the new cDNA belongs to the H8 subfamily and that it probably encodes the isozyme H7. Another cDNA was revealed to be similar to an already reported lignin peroxidase sequence encoding the isozyme H2.

The screening of a *P. chrysosporium* genomic library allowed the isolation a lignin peroxidase gene which encodes the major isozyme H8. The alignment of this gene with the corresponding cDNA revealed the presence of eight short introns ranging from 50 to 62 nucleotides. The 5' flanking region contains a typical TATA- and a putative CAAT-box-like elements. The comparison of this gene with the other reported *lpo* genes showed a high degree of homology (71 % to >99% at the aa level). The presence of *lpo*-related gene sequences in other white-rot fungi than *P. chrysosporium* was also investigated. Southern blot analysis demonstrated that the *lpo* genes often exist as multiple genes in several white-rot fungi.

The second part of this work was aimed at the heterologous expression of lignin peroxidase gene. *P. chrysosporium* LPOs are produced under limiting conditions during secondary metabolism. The expression of the *lpo* genes was shown to be regulated at the RNA level. In order to investigate the expression of a *lpo* gene promoter in heterologous hosts, a fusion of a *lpo* promoter fragment with the *E. coli* β -galactosidase gene was made. *Aspergillus*

nidulans, *Trichoderma reesei*, *Trichosporon cutaneum*, *Saccharomyces cerevisiae* and *Schizosaccharomyces pombe* were transformed with this fusion construct. The analysis of the transformants at the RNA level suggested that only *S. pombe* was able to recognize the *lpo* promoter under the conditions of the experiment. However the recognition was different than in *P. chrysosporium*.

For the heterologous expression of the lignin peroxidase gene, the isolated *lpo* cDNA and genomic sequences were subcloned into expression vectors specific for the filamentous fungi *A. nidulans* and *T. reesei*. The transforming plasmids were integrated into the host genome, specific RNA was present, but no LPO could be detected. One possible reason for this failure might be the problem of secretion. In fact, no haem protein are known to be secreted by these two organisms.

RESUME

Les buts de cette thèse étaient d'isoler et de caractériser les gènes de la lignine peroxydase du basidiomycète *Phanerochaete chrysosporium*, ainsi que d'essayer d'exprimer de tels gènes dans des organismes hétérologues.

Tout d'abord, un ADN complémentaire (ADNc) fut isolé à partir d'une banque grâce à des anticorps spécifiques. La séquence isolée, n'étant pas complète, fut utilisée ultérieurement pour l'isolation d'ADNc complets à partir d'une banque λ ZAP. Un des ADNc isolés fut caractérisé avec soin. Il code pour un isoenzyme de la lignine peroxydase n'ayant pas encore été étudié génétiquement. Cet ADNc fut séquencé et sa séquence fut comparée avec d'autres séquences de la lignine peroxydase au niveau des acides aminés et des nucléotides. Les comparaisons montrent qu'il est très semblable aux autres gènes de la lignine peroxydase (de 71% à 89% au niveau des aa). Si l'on se base sur le degré de similarité, ce nouvel ADNc peut être rangé dans la sous-famille de l'isoenzyme H8; il code probablement l'isoenzyme H7. Un autre ADNc fut aussi isolé; sa caractérisation montra qu'il correspond à un gène précédemment décrit, codant l'isoenzyme H2.

Afin d'obtenir un gène de la lignine peroxydase, une banque de gènes de *P. chrysosporium* fut criblée à l'aide d'un ADNc partiel et un gène codant l'abondant isoenzyme H8 fut isolé. L'alignement de ce gène avec l'ADNc lui correspondant révéla la présence de huit petits introns ayant de 50 à 62 nucléotides de longueur. La région 5' de ce gène contient un TATA-box typique ainsi qu'un probable CAAT-box. Un haut degré d'homologie entre ce gène et d'autres séquences de la lignine peroxydase fut démontré par comparaison (de 71% à >99% au niveau des aa). La présence de séquences parentes aux gènes de la lignine peroxydase dans d'autres champignons que *P. chrysosporium* fut aussi testée et une analyse de Southern blot démontra l'existence de multiples gènes de la lignine peroxydase dans différents champignons ligninolytiques.

La seconde partie de ce travail fut vouée à l'expression hétérologue d'une séquence de la lignine peroxydase. Dans *P. chrysosporium*, la lignine peroxydase est produite dans des conditions de limitation lors du métabolisme secondaire. Il fut prouvé que l'expression des gènes de la lignine peroxydase est réglée au niveau de l'ARN. Afin de pouvoir étudier leur expression dans des hôtes hétérologues, un fragment du promoteur de la lignine peroxydase fut fusionné au gène

de la β -galactosidase d'*E. coli*. *Aspergillus nidulans*, *Trichoderma reesei*, *Trichosporon cutaneum*, *Saccharomyces cerevisiae* et *Schizosaccharomyces pombe* furent transformés avec le plasmide résultant de la fusion. L'analyse de l'ARN des transformants obtenus montra que dans les conditions de l'expérience seul *S. pombe* était capable de reconnaître le promoteur de *P. chrysosporium*. Il faut néanmoins noter que la reconnaissance était différente de celle faite par *P. chrysosporium*.

Dans le but d'exprimer la lignine peroxydase de façon hétérologue, l'ADNc et le gène de la lignine peroxydase furent insérés dans des vecteurs d'expression spécifiques pour les deux champignons filamenteux *A. nidulans* et *T. reesei*. Les plasmides construits furent intégrés par transformation dans le génome des hôtes. Des ARNs spécifiques furent détectés, mais pas trace de la protéine. Une raison possible de cet échec est la complexité du processus de sécrétion. Il est à noter qu'aucun des organismes utilisés ne sécrète des protéines hémiques.

ZUSAMMENFASSUNG

Die vorliegende Arbeit gliedert sich in zwei Teile: im ersten Teil wurden Ligninperoxidasegene (*lpo*) des weisssäuligen Basidiomyceten *Phanerochaete chrysosporium* isoliert und charakterisiert, während der zweite Teil der Arbeit der heterologen Expression dieser Gene gewidmet ist.

In einer ersten Phase wurde eine Ligninperoxidase-cDNA-Sequenz mittels spezifischer Antikörpern aus einer *P. chrysosporium*-cDNA-Bank isoliert. Diese Sequenz, die wie sich herausstellte nicht vollständig war, wurde daraufhin als Probe für das Screening einer λ ZAP cDNA-Bank eingesetzt. Dies führte zur Isolation vollständiger cDNA-Sequenzen. Eine dieser Sequenzen, die für ein genetisch noch nicht untersuchtes Ligninperoxidase-Isoenzym kodiert, wurde in der Folge charakterisiert: Nach der Sequenzierung ergab ein Vergleich auf der Nukleotid- und Aminosäureebene eine hohe Homologie, von 71% bis 89% für Aminosäuren zu den bereits bekannten *lpo*-Sequenzen. Folglich könnte die neu bestimmte cDNA in der Subfamilie des Isoenzym H8 eingeordnet werden, wo sie wahrscheinlich für das Isoenzym H7 kodiert. Die Charakterisierung einer zweiten isolierten cDNA zeigte, dass es sich um eine bereits publizierte Sequenz handelte.

Um ein Ligninperoxidasegen zu isolieren, wurde eine *P. chrysosporium*-Genbank mittels der partiellen cDNA-Sequenz gescreent und ein für das H8 Hauptisoenzym kodierendes Gen isoliert. Der Vergleich des isolierten Gens mit der entsprechenden cDNA erlaubte die Bestimmung von acht kleinen Introns mit einer Länge von 50 bis 62 Nukleotiden. Die 5'-Region enthält eine typische TATA-box und eine vermutete CAAT-box. Die Vergleiche auf Nukleotid- und Aminosäureebene ergaben auch in diesem Fall hohe Homologiewerte (71% bis 99% für die Aminosäuren). Die Präsenz von mehreren *lpo*-verwandten Genen von verschiedenen ligninolytischen Pilzen wurde durch Southern blot-Analysen nachgewiesen.

Im zweiten Teil der Dissertation wurde die heterologe Expression des Ligninperoxidasegens untersucht. *P. chrysosporium* produziert Ligninperoxidasen unter limitierenden Bedingungen des Sekundär Metabolismus. Die Regulation der Ligninperoxidasegene findet auf der RNA-Ebene statt. Um die heterologe Expression des *lpo*-Promotors zu untersuchen, wurde ein Fragment dieses Promotors mit dem *E. coli*

β -Galactosidasegen fusioniert. *Aspergillus nidulans*, *Trichoderma reesei*, *Trichosporon cutaneum*, *Saccharomyces cerevisiae* und *Schizosaccharomyces pombe* wurden mit dem Fusionsplasmid transformiert. Die RNA-Analyse der Transformanten zeigte, dass unter diesen Experimentbedingungen nur *S. pombe* den *P. chrysosporium*-Promotor erkennen kann, allerdings unterschiedlich im Vergleich zu *P. chrysosporium*.

Die Subklonierung der cDNA und des Gens in für filamentöse Pilze spezifischen Vektoren ermöglichte die Untersuchung der heterologen Expression des Ligninperoxidasegens in *A. nidulans* und *T. reesei*. Die transformierenden Plasmide wurden in das Genom des Wirts integriert, spezifische RNA wurde nachgewiesen, nicht aber Protein. Ein möglicher Grund dieses Misserfolges könnte die Sekretion darstellen, da bekannt ist, dass von den beiden benutzten Organismen keine Hämproteine sekretiert werden.