



Universiteit  
Leiden  
The Netherlands

## Metabolic changes in *Arabidopsis thaliana* plants overexpressing chalcone synthase

Dao, T.H.H.

### Citation

Dao, T. H. H. (2010, February 18). *Metabolic changes in Arabidopsis thaliana plants overexpressing chalcone synthase*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/14755>

Version: Corrected 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/1887/14755>

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

# Chapter 9

---

## Summary and general discussion

---

Plants metabolites are synthesized from intermediates of primary metabolism via often complex biosynthetic pathways. Flavonoids are a most interesting group of metabolite. They have an important function in the plant defense as well as in the nutritional value of the plant. Also they have a wide variety of pharmacological activities.

The biosynthesis of flavonoids is initiated by an enzymatic step catalysed by chalcone synthase (CHS) resulting in naringenin chalcone, the first intermediate of the flavonoid biosynthesis pathway. The pathway proceeds with several enzymatic steps to produce various classes of flavonoids, such as flavanones, dihydroflavonols, isoflavones and anthocyanins. Those compounds have been shown to function as e.g. flower pigments, UV protectants, phytoalexins, insect and herbivore protectants, allelochemicals, initiators of symbiotic interactions, regulators of auxin transport, and stimulators of pollen germination [Dixon and Paiva, 1995].

Down-regulation or over-expression of structural flavonoid genes in transgenic plants have shown to be useful tools to elucidate the function of flavonoid pathway genes. The aim of this thesis was overexpression of CHS in *Arabidopsis thaliana* and with that model to study the effect of the heterologous CHS in the plant. An overview about CHS, especially in pathogen resistance, is presented in **Chapter 2**. It shows clearly that CHS play a key role in the flavonoid biosynthesis pathway as well as in plant resistance. The cDNA encoding chalcone synthase from *Cannabis sativa* was introduced into *Arabidopsis thaliana* Col. 0 via *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation and twenty one transgenic *Arabidopsis* line (ACS 1 - 21) were obtained. Six of them were analyzed by RT-PCR and quantitative real-time PCR which indicated that the exogenous gene was successfully integrated into the genome and expressed in *Arabidopsis thaliana* plants. All six transgenic lines contain multi copy numbers of *CHS* gene (**Chapter 3**).

Immunoblot and enzyme activity assay were used (**Chapter 4**) to confirm the expression of CHS in the transgenic *Arabidopsis* plants. Five transformants were checked and it was found that CHS was expressed in all transformants. The activity level of endogenous *Arabidopsis* CHS in WT line was less than that of the transgenic *Arabidopsis* ACS 20 line, whereas CHS activity of transgenic line ACS 2 was similar to the WT line.

*Arabidopsis thaliana* Col.0 metabolites were investigated by use of NMR spectroscopy (**Chapter 5**). Methanol-*d*<sub>4</sub> was found as the best solvent for direct extraction for NMR analysis of phenolic compounds in *Arabidopsis*. Four flavonoids, kaempferol 3-*O*-glucopyranoside-7-*O*-rhamnopyranoside, kaempferol 3-*O*-rhamnosyl (1–2) glucoside-7-*O*-rhamnopyranoside, kaempferol 3,7-*O*-dirhamnopyranoside and quercetine 3-*O*-rhamnopyranoside were isolated and identified using reference compounds. Another twenty metabolites of *Arabidopsis thaliana* Col. 0 including amino acids, organic acids, sugars, phenylpropanoids, and flavonoids were identified as well in this study.

Changes of metabolome in transgenic *Arabidopsis* are presented in **Chapter 6**. By use of Nuclear Magnetic Resonance (NMR) and Multivariate Data Analysis the changes between the transgenic plants and controls are seen clearly in the PLS-DA plots. This analysis indicated that the level of sugars, flavonoids and phenylpropanoid compounds are higher in the CHS transgenic plants than control plants, which means that chalcone synthase overexpression affects plant secondary metabolism as well as primary metabolism.

Chalcone synthase is strongly stimulated by UV-A/blue light in plants [Chappell and Hahlbrock, 1984; Frohnmeier *et al.*, 1992]. The metabolome of *Arabidopsis thaliana* Col. 0 and CHS transgenic plants changes upon treatment with UV-A/blue light (**Chapter 7**). The investigation showed a high accumulation of flavonoids, phenylpropanoids, glucose, fructose, rhamnose, and organic acids in *A. thaliana* Col. 0 wild type whereas no significant change was observed in CHS transgenic plants after treatments with UV-A/blue light and the metabolites of UV-A/blue light treated *Arabidopsis thaliana* Col. 0 were similar to CHS transgenic *Arabidopsis*. That means CHS play a major role in UV-A/blue light stress.

**Chapter 8** describes the study of the metabolic alterations in BTH-treated *Arabidopsis thaliana* plants (above ground parts). PCA and PLS-DA show that glucose, glutamine,

## Summary and general discussion

---

inositol, malic acid, sucrose, and threonine as well as BTH and its degradation products contribute to the clear discrimination of the metabolome of BTH-treated *Arabidopsis* from control plants. However, there was no significant increase of phenolic metabolites observed, which are generally induced by other signaling molecules. In addition to these changes due to BTH-treatment, it was also found that the EtOH used as a solvent in this treatment may itself act as an inducer of the accumulation of flavonoids and phenylpropanoids.

Over-expression of heterologous genes involved in flavonoid biosynthesis pathway can be used in metabolic engineering strategies to overcome rate-limiting enzymatic steps in the pathway. In this way, the flux through already existing pathways of the host plant can be increased, which in case of CHS may lead to enhanced levels of specific flavonoids or even new flavonoids. This approach has been used to increase the flavonoid content of tomato fruit, in order to improve the food quality of this important crop [Verhoeven *et al.*, 2002].

Metabolomics aims at measuring all the metabolites in a cell or biological system and is now one of the core functional genomics tool. It provides a direct link between genome and phenome because metabolites are products of gene expression and components of the phenotype. Metabolomics provides an overview of the metabolic status and global biochemical events associated with a cellular or biological system. Metabolomics not only has direct relevance to fundamental biological studies, but also to areas such as genetic or infectious diseases, cancer biology, nutrition, plant metabolism, crop quality traits, microbial physiology, environmental biology, biotechnology, drug discovery, diagnostics, molecular markers and many more applied areas. Metabolome analysis involves separation, identification and quantitation of as many metabolites as possible from a cell or tissue system.

### **Conclusions**

This study has shown that it is possible to introduce the heterologous *CHS* gene in *Arabidopsis thaliana* and common multicopies of transgenes containing plants were obtained. By analysis of the change in metabolome of CHS transgenic plants, high expression transgenic lines can be identified by markers such as flavonoids and phenylpropanoids (this thesis). From the results it is also clear that UV-A/blue light

stress does not further increase the levels of these marker compounds in CHS transgenic *Arabidopsis* plants, whereas in wild type plants such a treatment results in increased levels of these compounds, in fact similar to that in the transgenic plants. Apparently there are certain physiological limitations in the accumulation of certain products.

After studying the link of genome to metabolome the conclusion is thus that we even have to go one step further to the phenome, in which things like energy, transport and storage, and in fact the logistics of biosynthetic pathways need to be considered.

---

## Samenvatting en algemene discussie

---

In planten worden metabolieten vaak gemaakt via complexe biosyntheseroutes van stoffen uit het primaire metabolisme. Flavonoïden zijn een zeer interessante groep van metabolieten. Zij hebben een belangrijke functie bij de afweer van planten en zijn voor ons ook belangrijk voor de voedingswaarde van de plant. Daarnaast hebben ze een grote variatie aan farmacologische activiteiten.

De biosynthese van flavonoïden begint altijd met een enzymatische stap gekatalyseerd door het enzym chalconsynthase (CHS) wat resulteert in de chalcon naringenine, de eerste intermediair van de flavonoïd biosyntheseroute. De biosyntheseroute gaat vervolgens verder via meerdere enzymatische stappen waarbij de verschillende klassen van flavonoïden, zoals dihydro flavonolen, isoflavonen en anthocyanen worden gevormd. Deze stoffen hebben in de plant verschillende functies zoals bloemkleurpigment, UV-bescherming, fytoalexine, bescherming tegen insecten en herbivoren, allelochemicaliën, initiatoren van symbiotische interacties, regulatoren van het auxine transport en stimulators van de kieming van pollen [Dixon en Paiva, 1995]. Het remmen of het stimuleren van de genexpressie van structurele genen welke betrokken zijn bij de flavonoïd biosynthese in transgene planten is een geschikte methode gebleken voor het onderzoek naar de functie van genen uit de flavonoïd biosyntheseroute. Het doel van dit promotieonderzoek was de overexpressie van CHS in *Arabidopsis thaliana* en om met dit model het effect van deze heterologe CHS in de plant te bestuderen. Een overzicht over CHS, met name in resistentie tegen pathogenen wordt gepresenteerd in **hoofdstuk 2**. Hieruit blijkt duidelijk dat CHS een sleutelrol speelt in de flavonoïd biosyntheseroute en in de resistentie van planten.

Het cDNA dat het chalconsynthase van *Cannabis sativa* codeert werd met behulp van *Agrobacterium tumefaciens* in *A. thaliana Col. 0* geïntroduceerd. Dit resulteerde in eenentwintig transgene *Arabidopsis* lijnen (ACS 1-21). Zes van deze lijnen zijn met behulp van RT-PCR en kwantitatieve real time PCR geanalyseerd en hieruit kon worden geconcludeerd dat het exogene gen succesvol in het genoom was geïntegreerd en in *A. thaliana* planten tot expressie werd gebracht. Alle zes de transgene lijnen

bevatten meerdere copïën van het *CHS* gen (**hoofdstuk 3**). Immunoblotten en enzym assays (**hoofdstuk 4**) zijn gebruikt om de expressie van CHS in de transgene *Arabidopsis* planten te bevestigen en om de enzymactiviteit te bepalen. Er zijn vijf transformanten per lijn onderzocht en dit toonde aan dat CHS in alle transgene planten tot expressie kwam. De enzymactiviteit van het endogene CHS van *Arabidopsis* in wildtype planten was lager dan dat van de transgene lijn ACS 20, terwijl de CHS activiteit van lijn ACS 2 vergelijkbaar was aan die van het wildtype.

De metabolieten van *Arabidopsis thaliana* Col. 0 werden onderzocht met behulp van NMR spectroscopie (**hoofdstuk 5**). Voor de NMR analyse van fenolische verbindingen was MeOD het meest geschikte oplosmiddel voor de directe extractie uit *Arabidopsis*. Vier flavonoïden, kaempferol 3-*O*-glucopyranoside-7-*O*-rhamnopyranoside, kaempferol 3-*O*-rhamnosyl (1,2) glucoside-7-*O*-rhamnopyranoside, kaempferol 3,7-*O*-dirhamnopyranoside en quercetine 3-*O*-rhamnopyranoside werden geïsoleerd en geïdentificeerd met behulp van referentie stoffen. Daarnaast zijn er bij dit onderzoek ongeveer twintig metabolieten uit *A. thaliana* geïdentificeerd, waaronder aminozuren, organische zuren, suikers, fenypropañoïden en flavonoïden.

De veranderingen in het metaboloom van de transgene *Arabidopsis* planten zijn beschreven in **hoofdstuk 6**. Na het gebruik van Nucleaire Magnetische Resonantie (NMR) in combinatie met Multivariate Data Analyse werden de verschillen tussen de transgene planten en de controle planten in de PLS-DA grafieken duidelijk zichtbaar. Deze analyse toonde aan dat de gehaltes van suikers, flavonoïden en fenypropañoïden in de CHS transgene planten ten opzichte van de controle planten hoger zijn. Dit betekent dat de overexpressie van chalconsynthase zowel het primaire als het secundaire metabolisme beïnvloed.

Chalconsynthase wordt in planten sterk gestimuleerd door UV-A/blauw licht [Chappell en Hahlbrock, 1984; Frohnmeier *et al.*, 1992]. Het metaboloom van *A. thaliana* Col. 0 en van CHS transgene planten verandert door behandeling van de planten met UV-A/blauw licht (**hoofdstuk 7**). Het onderzoek toonde na behandeling met UV-A/blauw licht in de *A. thaliana* Col. 0 een hoge accumulatie aan van flavonoïden, fenypropañoïden, glucose, fructose, rhamnose, en organische zuren terwijl er geen significante verschillen werden waargenomen in de CHS transgene planten na behandeling met UV-A/blauw licht. De metabolieten van UV-A/blauw licht behandelde

*A. thaliana* Col. 0 waren vergelijkbaar aan de CHS transgene *Arabidopsis*. Dit geeft aan dat CHS een belangrijke rol speelt in UV-A/blauw licht stress.

In **hoofdstuk 8** wordt het onderzoek beschreven naar de metabole veranderingen in BTH-behandelde *A. thaliana* planten (bovengrondse delen). De Principale Componenten Analyse en PLS-DA toonde aan dat glucose, glutamine, inositol, malonzuur, sucrose en threonine maar daarnaast ook BTH en zijn afbraakproducten, bijdragen aan het duidelijke verschil tussen het metabooloom van BTH behandelde *Arabidopsis* planten en controle *Arabidopsis* planten. Desondanks werd er geen significante toename aan fenolische metabolieten waargenomen welke doorgaans wel worden geïnduceerd door andere signaalstoffen. Naast de veranderingen veroorzaakt door de BTH-behandeling, werd duidelijk dat EtOH wat gebruikt werd als een oplosmiddel bij deze behandeling zelf ook de accumulatie van flavonoïden en fenylpropanoïden kan stimuleren.

Overexpressie van heterologe genen welke betrokken zijn bij de flavonoïdbiosyntheseroute kunnen worden gebruikt bij “**metabolic engineering strategies**” om snelheidsbeperkende enzymstappen te verhelpen. Op deze manier kan de flux door reeds bestaande biosyntheseroutes van de plant worden vergroot, wat in het geval van CHS kan resulteren in hogere gehalten aan specifieke flavonoïden of zelfs nieuwe flavonoïden. Deze manier van aanpak is gebruikt bij het verhogen van het flavonoïd gehalte van tomaten om op deze manier de voedselkwaliteit van dit belangrijke gewas te verhogen [Verhoeven *et al.*, 2002].

Metabolomics heeft als doel om alle metabolieten in een cel of biologisch systeem te meten en is nu een van de belangrijkste “functional genomics” instrumenten. Het verschaft een directe link tussen genoom en fenoom omdat metabolieten de producten zijn van genexpressie en componenten van het fenotype. Metabolomics verschaft een overzicht van de metabole status en de globale biochemische gebeurtenissen welke worden geassocieerd met een cellulair of biologisch systeem. Metabolomics is niet alleen direct relevant voor fundamenteel biologische studies, maar ook voor gebieden als genetische of infectie ziektes, biologie van kanker, voeding, het metabolisme van planten, behandelingen voor de kwaliteit van een gewas, microbiële fysiologie, milieu biologie, biotechnologie, ontdekking van geneesmiddelen, diagnostiek, moleculaire markers en op nog veel meer toegepaste gebieden. Metabooloomanalyse omvat de



scheiding, identificatie en kwantificatie van zoveel mogelijk metabolieten als mogelijk van een cel of een weefsel.

### **Conclusies**

Dit onderzoek heeft aangetoond dat het mogelijk is om een heteroloog *CHS* gen in *Arabidopsis thaliana* te introduceren en dat er daarbij normale planten werden verkregen waarbij er meerdere kopiën van het transgen aanwezig waren. Bij het analyseren van de metabole veranderingen in de *CHS* transgene planten kunnen transgene lijnen met een hoog expressie niveau geïdentificeerd worden met behulp van markers zoals flavonoïden en fenylpropanoïden (dit proefschrift). Van de verkregen resultaten is duidelijk dat UV-A/blauw licht stress de gehalten aan deze marker in *CHS* transgene *Arabidopsis* planten niet verder verhoogt, terwijl in wildtype planten eenzelfde behandeling wel resulteert in hogere gehalten aan deze stoffen, vergelijkbaar aan het gehalte van de *CHS* transgene planten. Waarschijnlijk zijn er bepaalde fysiologische limitaties in de accumulatie van bepaalde producten.

Na het bestuderen van de stap van genoom naar metabooloom moeten we concluderen dat we zelfs nog een stap verder moeten gaan, namelijk naar het fenoom, waar ook zaken als energie, transport en opslag, en in feite de logistiek van de biosyntheseroutes moeten worden betrokken.