



Doctoral Thesis

## **The mevalonate pathway a monitoring approach in plants by systems biology tools**

**Author(s):**

Bhangu-Uhlmann, Andrea

**Publication Date:**

2011

**Permanent Link:**

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-006690303> →

**Rights / License:**

[In Copyright - Non-Commercial Use Permitted](#) →

This page was generated automatically upon download from the [ETH Zurich Research Collection](#). For more information please consult the [Terms of use](#).

DISS. ETH NO. 19481

**The Mevalonate Pathway:  
A monitoring approach in plants by systems biology tools**

A dissertation submitted to  
ETH ZURICH

for the degree of

Doctor of Sciences

presented by

**ANDREA BHANGU-UHLMANN**  
Dipl. Biol., Technische Universität München

born January 25, 1979  
in Rosenheim, Germany

accepted on the recommendation of

Prof. Dr. Wilhelm Grisse, examiner  
Prof. Dr. Samuel Zeeman, co-examiner  
Dr. Eva Vranová, co-examiner

2011

## Abstract

In plants, isoprenoid biosynthesis, which is a highly complex metabolic network, generates a wide array of diverse molecular compounds via parallel but compartmentally separated pathways. The cytosolic mevalonate (MVA) pathway, which comprises of enzymatic reactions from acetyl coenzyme A condensation through mevalonate diphosphate decarboxylation, and the plastidial methylerythritol phosphate pathway, both synthesize the isoprene building block isopentenyl diphosphate. So far, several ten thousands of isoprene derived molecules essential for key physiological functions are known. Though many isoprenoids are mechanistically identified and functionally characterized, their individual syntheses are controlled by a yet unknown regulatory network. The aim of the work presented here was to identify regulatory pathway sites. Therefore, the project was designed for a systems approach, which allowed quantitatively investigating systematic pathway perturbations imposed by classical plant gene disruption using T-DNA insertion mutants, assessing their implications on transcript, protein, and metabolite levels. To accomplish this goal, homozygous mutants and functional null alleles for the MVA pathway genes were systematically identified and characterized. Moreover, analytical methods were developed to employ large-scale high throughput platforms such as mass spectrometry and transcriptomics analysis. Using valid proteotypic peptides, proteins, particularly HMGR2, were unambiguously identified by multiple selected reaction monitoring. Further, highly sensitive state-of-the-art mass spectrometry enabled determination of cellular intermediate concentrations for wild type and mutants. By means of quantitative reverse-transcriptase PCR using sequence and insertion-site specific fluorescently-labeled hybridization probes, null alleles were validated owing to absent transcription resulting from homozygous gene disruption of the inserted T-DNA. For single-copy genes *HMGS* and *MK*, reduced levels of transcript were determined. Genome-wide transcriptome analyses could confirm these results employing tiling arrays comprising of evenly arranged probe sets as they also allow monitoring expression changes of non-coding features. Statistical analysis of the generated transcriptomics data resulted in several thousand differentially expressed genes. Among those genes, around 100 were changed at least two-fold over wild type. Using these most notably altered genes as input for subsequent correlation analysis, putative co-expression was computed from significant Pearson correlation coefficients. Based upon identified linkages between genes affected by the perturbed enzymes and the corresponding co-expressed genes, integration of the MVA pathway into the gene regulatory network of the cell is enabled. Besides, it provides in-depth information required for further investigations to experimentally validate presumed gene co-expression and subsequently construct a regulatory network with the MVA pathway.

## Zusammenfassung

Aufgrund ihrer ausgeprägten Zellkompartimentierung, die für die Energiegewinnung mittels Photosynthese aus dem Sonnenlicht notwendig ist, verfügen Pflanzen neben dem Kohlenstoff-, Protein- und Fettstoffwechsel umfassenden Primärmetabolismus über einen je nach Spezies stark variierenden Sekundären Pflanzenstoffwechsel. Basierend auf ihrer chemischen Struktur werden die meisten vorkommenden Sekundären Pflanzenstoffe den Gruppen der Alkaloide, Isoprenoide oder phenolischen Verbindungen zugeordnet. Die Klasse der Isoprenoide umfasst mehrere Zehntausende äusserst verschiedenartige Kohlenwasserstoff-, Alkohol-, Glycosid-, Ether-, Aldehyd-, Keton-, Carbonsäure- und Ester-Verbindungen. Durch ihre chemisch-strukturelle und damit einhergehende funktionelle Mannigfaltigkeit nehmen die Isoprenoide viele physiologisch bedeutsame Funktionen in der Pflanze wahr. Wie entsteht dieser vielfältige Reichtum an Isoprenoiden und wie erfolgt die entsprechende Regulierung ihre jeweiligen Synthesen? Die biochemische Synthese *per se* des Grundgerüsts, des sogenannten Isoprenbausteins, ist durch Entdeckung des Cholesterin, später belohnt mit dem Nobelpreis, bereits seit den 50er Jahren bekannt. Dies war die Geburtsstunde des Mevalonatsyntheseweges (MVA Syntheseweg), der initiiert durch Kondensation von drei Molekülen Acetylcoenzyme A in insgesamt sechs enzymkatalysierten Schritten in der Generierung des C<sub>5</sub>-Kohlenstoffgerüsts, des Isoprens Isopentenyl-diphosphat, gipfelt. Lange Zeit nahm man an, dass in Pflanzen alle Isoprenoide über den cytosolisch lokalisierten MVA Syntheseweg entstehen. Dass dem nicht so ist, ist der Entdeckung des parallel verlaufenden Methylerythritolphosphatsyntheseweges, der im Chloroplasten angesiedelt ist, zu verdanken, wodurch sich das regulatorische Netzwerk angesichts weiterer Verästelungen noch weiter komplexiert. Wenngleich bereits ein halbes Jahrhundert nach grundlegender chemischer Erforschung der Isoprensynthese vergangen ist, so ist die Frage nach ihrer Regulierung und damit die des MVA Syntheseweges fast gänzlich noch unbeantwortet und stellt somit die Ausgangssituation dieser hier vorliegenden Arbeit dar.

Durch klassisch-pflanzengenetische Verwendung von T-DNA Insertionen kombiniert mit Methoden der heutigen Molekularbiologie und Biochemie wurde angestrebt, für jeden enzymatischen Schritt Nullmutanten im Modellorganismus der Ackerschmalwand (*Arabidopsis thaliana*) zu identifizieren und zu charakterisieren. Um den MVA Syntheseweg unter einem ganzheitlichen Gesichtspunkt systembiologisch zu erfassen und quantitative Daten zu generieren, deren Integration im Zellkontext Aufschluss zur Regulierung der Isoprenoidbiosynthese geben soll, wurden darüberhinaus analytische Methoden zur Nutzung

moderner Hochdurchsatzplattformen wie die der Massenspektrometrie und der Transkriptomanalyse entwickelt und optimiert.

Nach erfolgter Mutantenidentifizierung wurden molekularbiologisch und phänotypisch charakterisierte homozygote Mutanten und Nullmutanten mittels quantitativer Analytik bezüglich ihrer lokalen und globalen Genexpression sowie hinsichtlich der Metabolitenanreicherung genauer untersucht. Um ausserdem eine Interrelation zwischen Gen, Transkript und Proteinexpression sowie die daraus resultierende katalytische Verstoffwechselung beschreiben zu können, wurde ein Methodenspektrum zur exakten Protein- und Metabolitenidentifizierung etabliert. Basierend auf quantitativ-hochauflösender Massenspektrometrie konnten daher sowohl Proteine mit vorab validierten proteotypischen Peptiden, wie erstmals nun erreicht für HMGR2, als auch Intermediate des Mevalonatweges eindeutig qualitativ beziehungsweise quantitativ bestimmt werden. Durch Verwendung sequenz- und insertionsspezifischer, fluoreszenter Hybridisierungsproben zur Quantifizierung der Gentranskription mittels quantitativer reverser Transkriptase-Polymerasekettenreaktion wurde die Menge an mRNA in den jeweiligen Mutanten relativ zum Wildtyp ermittelt. Nullmutanten wurden dadurch validiert, da für sie keine nachweisbare Menge an Gentranskription stattfand. In den homozygoten Mutanten der Gene für *HMGS* und *MK*, die in *A. thaliana* nur einfach vorkommen, wurden signifikant reduzierte Transkriptmengen bestimmt. Die Ergebnisse konnten auch durch nachfolgende genomweite Genexpressionsanalysen, die mit sogenannten genomspezischen Tilingarrays durchgeführt wurden, bestätigt werden. Durch die gleichmässig verteilte Anordnung der Hybridisierungsproben auf dieser Art von Arrays können nicht nur bekannte Gene bezüglich ihrer Expression bestimmt werden, sondern werden auch Veränderungen nicht-kodierender Merkmale gemessen. Nach Auswertung der statistischen Varianzanalyse wurden somit in den Mutanten des Mevalonatweges gegenüber dem Wildtyp zusammengefasst mehrere Tausend Gene als beträchtlich verändert nachgewiesen. Davon zeigen an die hundert Gene mindestens einen zweifachen Expressionsunterschied zwischen Mutante und Wildtype auf. Nachgeschaltete Korrelationsbestimmungen dieser am stärksten veränderten Gene auf globaler Transkriptionsebene ermöglichten die Identifizierung je nach Signifikanzmass wahrscheinlicher, ko-exprimierter Gene. Auf diese Weise wurden neue Netzwerk- und potentielle Interaktionspartner ausfindig gemacht und dadurch die Möglichkeit gegeben, stark korrelierte Gene experimentell gezielt weiter zu untersuchen, um den MVA Syntheseweg aufgrund dieser in einzelnen oder in mehreren Mutanten vom Wildtyp stark abweichenden Gene, in das genregulatorische Netzwerk der Zelle einzubetten.