

Analysis of Starch Biosynthesis in *Arabidopsis thaliana* and a Heterologous System

Doctoral Thesis

Author(s):

Pfister, Barbara

Publication date:

2015

Permanent link:

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-010531527>

Rights / license:

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

DISS. ETH NO. 22976

**Analysis of Starch Biosynthesis in *Arabidopsis thaliana* and
a Heterologous System**

A thesis submitted to attain the degree of

DOCTOR OF SCIENCES of ETH ZURICH
(Dr. sc. ETH Zurich)

presented by

Barbara Pfister

Mag. rer. nat., Universität Wien

born on 16.04.1985

citizen of Austria

accepted on the recommendation of

Prof. Samuel C. Zeeman (examiner)

Prof. Markus Aebi (co-examiner)

Prof. Peter J. Roach (co-examiner)

2015

Summary

Starch is a semi-crystalline glucose polymer synthesized by plants. Due to its unique physico-chemical properties and its manifold fields of application, starch represents a coveted raw material for industry. Moreover, starch constitutes the major carbohydrate source in human nutrition. Both industrial applications and nutritional benefits depend on the exact structure of the used starch, i.e. the length and arrangement of glucose chains within the polymer, which in turn depend on the botanical source. It is hence of enormous significance to understand how plants synthesize starch and what influences its structure.

The aim of the present thesis was to investigate starch biosynthesis in the model plant *Arabidopsis thaliana* (thale cress). In the first project (Chapter 2), I generated and analyzed various mutant combinations deficient in two enzyme activities involved in starch biosynthesis – the starch synthases SS1, SS2 and/or SS3 and the isoamylase-type debranching enzyme ISA1/ISA2. This revealed that chain length determined by starch synthases is a factor of similar importance to branch point distribution – influenced by the debranching enzyme ISA1/ISA2 – during the synthesis of a crystallization-competent glucan. Not only could abnormally long chains restore formation of insoluble starch granules in the absence of ISA1/ISA2, abnormally short chains were also accompanied by the accumulation of water-soluble polysaccharides instead of starch – despite the presence of ISA1/ISA2. Surprisingly, ISA1/ISA2 isoamylase action was found to markedly reduce total glucan levels in a mutant with aberrantly short starch chains. This suggests that debranching by ISA1/ISA2 is normally balanced by progressive glucan crystallization – a regulation that becomes pointless if chains are too short for crystallization anyway.

In the second part of my thesis (Chapter 3), I completed a project in which ISA1/ISA2 was heterologously expressed in *Escherichia coli*. By quantifying the glucans produced by the combined action of ISA1/ISA2 and the endogenous glycogen-metabolic machinery of *E. coli*, I could show that also here ISA1/ISA2 acts in a degradative fashion, releasing linear chains from glycogen.

In the third part (Chapter 4), I investigated in detail whether it was possible to transfer starch biosynthesis to a heterologous system. Therefore, I expressed a series of starch-biosynthetic genes from *Arabidopsis* in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, including starch synthases, branching enzymes and the debranching enzyme ISA1/ISA2. This system was furthermore set up in a background purged of the glycogen-metabolic

pathway to reduce interference from endogenous enzymes. Enzyme combinations with ISA1/ISA2 produced high amounts of insoluble glucans that showed remarkable structural similarities to plant starch. Comparisons between glucan amounts and structure from the yeast lines with corresponding plant mutants indicated that the enzymes act similarly in yeast as in plants, i.e. that conclusions drawn from the heterologous yeast system can indeed be transferred to plants. The ease and speed of genetic manipulation of yeast compared with plants and the associated acceleration of the study of enzyme functions may open up a new era in the research of starch biosynthesis – not only of Arabidopsis but also of our staple starch crops.

Summary in German (Zusammenfassung)

Stärke ist ein von Pflanzen hergestelltes semikristallines Glukosepolymer. Aufgrund ihrer einzigartigen physikalisch-chemischen Eigenschaften und der daraus resultierenden vielfältigen Einsatzmöglichkeiten stellt Stärke ein für die Industrie gefragtes Rohmaterial dar. Stärke ist außerdem die wichtigste Kohlehydratquelle in unserer Ernährung. Sowohl ihre industrielle Anwendung als auch ihr Mehrwert in der Ernährung werden dabei von der exakten Struktur der verwendeten Stärke beeinflusst, das heißt von der Länge und Anordnung der Zuckerketten, welche wiederum von ihrem pflanzlichen Ursprung abhängen. Es ist deshalb von enormer Bedeutung, zu verstehen, wie Pflanzen Stärke synthetisieren und wie die unterschiedlichen Stärkestrukturen zustande kommen.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Stärkebiosynthese in der Modellpflanze *Arabidopsis thaliana* (Ackerschmalwand) zu untersuchen. Im ersten Projekt (Kapitel 2) habe ich verschiedene Mutanten untersucht, die in zwei Enzymaktivitäten der Stärkesynthese beeinträchtigt waren – den Stärkesynthasen SS1, SS2 und/oder SS3 und des Entzweigungsenzyms ISA1/ISA2. Dadurch konnte ich aufzeigen, dass die von Stärkesynthasen bestimmte Kettenlänge einen ähnlich wichtigen Faktor in der Herstellung eines kristallinen Glukans darstellt wie das Entfernen von Verzweigungen durch ISA1/ISA2. Zum einen konnten abnormal lange Ketten die Ausbildung von unlöslichen Stärkekörnern in der Abwesenheit von ISA1/ISA2 wiederherstellen, zum anderen gingen abnormal kurze Ketten mit der Anhäufung von wasserlöslichen Zuckerpolymeren anstelle von Stärke einher – der Anwesenheit von ISA1/ISA2 zum Trotz. In einer Mutante mit besonders kurzen Zuckerketten führte die Aktivität von ISA1/ISA2 überraschenderweise auch zu stark reduzierten Glukanmengen. Das deutet darauf hin, dass das Entfernen von Verzweigungen durch ISA1/ISA2 normalerweise durch die Kristallisation des Glukans begrenzt wird – eine Regulation, die ihre Wirkung verliert, wenn das Glukan aufgrund zu kurzer Ketten gar nicht kristallisieren kann.

Im zweiten Teil meiner Arbeit (Kapitel 3) schloss ich ein Projekt ab, in dem ISA1/ISA2 heterolog im Bakterium *Escherichia coli* exprimiert wurde. Anhand der Quantifizierung der Glukane, die ISA1/ISA2 gemeinsam mit endogenen Enzymen produzierte, konnte ich zeigen, dass dieses Enzym auch hier die Glukane abbaut, wobei es lineare Ketten freisetzt.

Im dritten Teil (Kapitel 4) erkundete ich im Detail, ob es möglich ist, Stärkebiosynthese als Ganzes auf ein heterologes System zu übertragen. Dazu exprimierte ich eine Reihe an

stärkesynthetisierenden Enzymen aus Arabidopsis in der Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae*. Um mögliche Interferenzen zu vermeiden, wurde dieses System außerdem in einem vom endogenen Glykogenmetabolismus bereinigten genetischen Hintergrund aufgesetzt. Enzymkombinationen mit ISA1/ISA2 produzierten hohe Mengen unlöslicher Glukane, die erstaunliche strukturelle Ähnlichkeiten zu Stärke aufwiesen. Vergleiche zwischen den in Hefe produzierten Glukanen mit jenen der entsprechenden Pflanzenmutanten deuteten weiters darauf hin, dass sich die Enzyme in Hefe ähnlich wie in Pflanzen verhalten. Das impliziert, dass die in diesem Hefesystem generierten Erkenntnisse durchaus auf Pflanzen übertragen werden können. Die Einfachheit und Geschwindigkeit, mit der Hefe genetisch manipuliert werden kann, und die damit einhergehende Beschleunigung im Studium von Enzymfunktionen könnten eine neue Ära in der Erforschung von Stärkebiosynthese einläuten – nicht nur in Bezug auf jene von Arabidopsis, sondern auch auf jene unserer Nutzpflanzen.