

DISS. ETH Nr. 18658

Roles of Debranching Enzymes in *Arabidopsis thaliana* Leaves During Starch Synthesis and Breakdown

A dissertation submitted to the

SWISS FEDERAL INSTITUTE OF TECHNOLOGY ZURICH

For the Degree of Doctor of Science

Presented by

Sebastian Streb

Master of Science from ETH Zurich, Switzerland

Born the 12th January 1979
in Nordhausen, Germany

Accepted on the recommendation of

Prof. Samuel C. Zeeman, examiner
Prof. Claudia Köhler, co-examiner
Prof. Andreas Blennow, co-examiner

2009

Summary

Starch is a widely used storage compound in plants. It is almost entirely composed of glucose units linked to form linear chains that are connected by branch points resulting in a tree-like structure. The polymer architecture enables the formation of large insoluble starch granules. Depending where the starch is made, it can be broadly classified into storage starch (non-photosynthetic tissues) and transient starch (photosynthetic tissue, made during the light). Both types of starch serve as an energy source during times where not photosynthesis is possible. Storage starch is remobilized during germination and sprouting, whereas transient starch is used during the night. In recent years it has become clear that the pathways and mechanisms of synthesis and breakdown of the two types of starch share many similarities but also exhibit significant differences.

I investigated the role of several enzymes involved in starch synthesis and breakdown, as well as their contribution to the final starch structure. First, I focused on the pathway by which starch is made in *Arabidopsis* chloroplasts. Recently, the widely accepted “classical” pathway was challenged and a controversial “alternative” pathway was postulated. A known, starch deficient mutant lacking plastidial phosphoglucosyltransferase (PGM1) required in the “classical”, but not in the “alternative” pathway for starch precursor synthesis was re-investigated. I tested the hypothesis in the “alternative” model that PGM1 is only required to scavenge breakdown products of continuous starch turnover back into starch during net synthesis. Using genetics, I blocked starch degradation in this mutant, but this did not result in restoration of starch levels. This contradicts the “alternative” model and makes it unlikely that this pathway is correct. However, the result that the *pgm1* mutant, previously named as starchfree, does contain small amounts of starch can also not be fully explained by the “classical” pathway, showing that gaps in our understanding remain.

The glycogen synthesized by mammals and other organism is similar to starch except that it is more highly-branched and soluble. Up to now it is not fully understood why starch forms insoluble granules whereas glycogen does not. It was proposed that the specific removal of branch points during starch synthesis is a mandatory step to allow the glucans to assume a granular structure. This reaction is catalyzed by a plant specific enzyme class (debranching enzymes; DBEs: ISA1/ISA2, ISA3, and LDA). Plants lacking ISA1/ISA2 synthesize large amounts of glycogen-like polymers (phytoglycogen) and some starch. Here, I tested if the removal of all DBEs leads exclusively to phytoglycogen production. Indeed, plants without DBEs synthesize only phytoglycogen. However, removing an additional enzyme (endo-amylase; AMY3) reverts the phenotype partially back to starch producing plants. This illustrates that the proposed model for the mandatory role of DBEs for starch synthesis is incorrect. Nevertheless, the data still show that ISA1/ISA2 is involved in starch synthesis, facilitating the crystallization process.

In the last Chapter, I investigated the role of ISA3 and LDA in starch breakdown and their interplay with AMY3. I show that these enzymes play a central role during remobilization of starch, demonstrated by the fact that plants lacking all three are greatly impaired in starch breakdown and severely retarded in growth.

Zusammenfassung

Stärke ist eine weitverbreitete Form in Pflanzen, um Kohlenhydrate zu speichern. Die Stärke besteht nahezu komplett aus Glukose-Einheiten, welche verbunden lineare Ketten bilden, welche wiederum durch Verzweigungspunkte verknüpft sind. Die resultierende Struktur ähnelt der schematischen Darstellung von Ästen und Zweigen eines Baumes. Diese Polymer-Architektur ermöglicht die Bildung von unlöslichen Stärkekörnern. Je nachdem an welchem Ort die Stärkeherstellung in der Pflanze geschieht, werden zwei Typen unterschieden: Speicherstärke wird in heterotrophen Amyloplasten hergestellt und Blattstärke wird in autotrophen Chloroplasten synthetisiert während der Photosynthese. Beide Typen dienen als Energiequelle, während Phasen wo keine Photosynthese möglich ist. Beispielsweise wird Speicherstärke mobilisiert während der Keimung, wohingegen Blattstärke gebraucht wird während der Nacht. In den vergangenen Jahren wurde es ersichtlich, dass die Stoffwechselwege und Mechanismen der Synthese sowie der Abbau beider Stärketypen viele Übereinstimmungen zeigen, jedoch auch einige entscheidende Unterschiede existieren.

In der vorliegenden Dissertation habe ich die Aufgabe verschiedener Enzyme untersucht, welche beteiligt sind bei der Stärke-Synthese und beim -Abbau. Weiter habe ich deren Auswirkung auf die Endstruktur der Stärke untersucht. Zu Beginn beschäftigte ich mich mit dem Stoffwechselweg, welcher zur Bildung von Stärke in *Arabidopsis* Chloroplasten führt. Kürzlich wurde der weitgehend akzeptierte „klassische“ Weg zur Stärkesynthese in Frage gestellt und ein kontroverser neuer Weg wurde propagiert. Eine bekannte Mutante, welcher das chloroplastische Enzym phosphoglucomutase (PGM1) fehlt, ist charakterisiert durch ihr Fehlen an Stärke. Dem „klassischen“ Weg folgend, ist PGM1 essentiell für die Synthese von Stärkevorläufermolekülen, wohingegen dieses Enzym im „alternativen“ Weg dafür nicht benötigt wird. In diesem wird PGM1 ausschliesslich für das ständige Rückführen von Stärkeabbauprodukten zurück in die Stärke während der Photosynthese benötigt. Unter Verwendung genetischer Methoden habe ich den Abbau der Stärke in der *pgm1* Mutante blockiert. Dies führte nicht zu dem für das „alternative“ Modell erwarteten Anstieg der Stärkemenge, was dem „alternativen“ Weg widerspricht und unwahrscheinlich macht, dass dieser Stoffwechselweg korrekt ist. Dennoch zeigen die Daten, dass *pgm1* Mutanten nicht stärkefrei sind, wie generell angenommen. Dieses Resultat ist nicht vollständig erklärbar mit dem „klassischen“ Weg, was wiederum illustriert, dass weiterhin Wissenslücken bestehen.

Glykogen ist hergestellt in Säugetieren und anderen Organismen und ist ähnlich aufgebaut wie Stärke - mit der Ausnahme, dass es höher verzweigt und löslich ist. Bis jetzt ist nicht vollständig erklärbar, warum Stärke unlösliche Körner formt und Glykogen nicht. Es wurde vorgeschlagen, dass das spezifische Entfernen von Verzweigungspunkten während der Synthese von Stärke ein zwingend nötiger Schritt ist, um die Bildung von Körnern zu ermöglichen. Diese Reaktion wird katalysiert von einer pflanzenspezifischen Enzymklasse (debranching enzymes; DBEs: ISA1/ISA2, ISA3, and LDA). Pflanzen welchen ISA1/ISA2 fehlt, synthetisieren grosse Mengen an Glykogen-ähnlichen Polymeren (Phytoglycogen) und wenig Stärke. Ich habe getestet, ob das Entfernen von allen DBEs zur ausschliesslichen Produktion von Phytoglycogen führt. In der Tat synthetisieren solche Pflanzen nur Phytoglycogen. Dennoch, das zusätzliche Entfernen eines weiteren Enzymes (endo-amylase; AMY3) kehrte den Phänotyp teilweise um in Pflanzen mit Stärke. Dies zeigt, dass das

vorgeschlagene Modell nicht richtig ist. Gleichwohl zeigten die Daten, dass ISA1/ISA2 involviert ist im Stimulieren des Kristallisationsprozesses der Stärke.

Im letzten Kapitel habe ich die Aufgaben von ISA3 und LDA während des Stärkeabbaus und deren Zusammenspiel mit AMY3 untersucht. Ich konnte aufzeigen, dass alle Enzyme eine zentrale Rolle während des Stärkeabbaus spielen. Beweis dafür ist der Umstand, dass Pflanzen, welchen alle drei Enzyme fehlen, gravierend beeinträchtigt sind in ihren Möglichkeiten Stärke abzubauen und folglich auch ihr Wachstum verlangsamen.