

DISS. ETH NO. 27510

**STARTING FROM SCRATCH: NEW INSIGHTS INTO THE BIOGENESIS
OF STARCH GRANULES**

A thesis submitted to attain the degree of
DOCTOR OF SCIENCES of ETH ZURICH
(Dr. sc. ETH Zurich)

presented by

MELANIE R. ABT

Biology MSc ETH

born on 14.10.1990

citizen of Binningen, BL, Switzerland

accepted on the recommendation of

Prof. Samuel C. Zeeman
Prof. Markus Aebi
Prof. Felix Kessler

2021

Summary

With the domestication of crops, starch has experienced a stellar career from plant storage carbohydrate to major energy provider of humans and livestock and key raw material for various industrial purposes. Plants produce starch as semi-crystalline granules in specialized organelles, either for long-term storage in the case of storage starches, or for daily consumption in the case of transitory starch. Transitory starch granules form during the day from a tightly controlled share of photoassimilates directly inside chloroplasts, and are degraded during the dark phase of the diurnal cycle to sustain energy and carbon backbone provision when photosynthesis is inactive.

Much is known about the complex biosynthetic machinery producing the two components of starch, amylopectin and amylose, involving the concerted actions of starch synthases, branching enzymes, and debranching enzymes. However, comparatively little is known about the very first steps of starch granule formation, which determine the numbers and morphologies of starch granules that form inside individual plastids. This aspect of starch metabolism, generically named starch granule initiation, has recently experienced a surge of interest resulting in the discovery of several involved proteins. I contributed to the advancement of this field by the characterization of SS5, a protein sharing similarities to the major determinant of starch granule initiation in *Arabidopsis*, SS4. Unlike SS4, SS5 is a non-canonical starch synthase-like protein that lacks measurable enzymatic activity. Nevertheless, the protein influences starch granule initiation, since *ss5* mutant plants produce lower numbers of granules in their chloroplasts than the wild type. Interestingly, SS5 shares further similarities with SS4, as both proteins appear to dimerize and interact physically with another mediator of starch granule initiation, MYOSIN-RESEMBLING CHLOROPLAST PROTEIN. These findings are described in detail in the third chapter of this thesis.

The study of starch granule initiation can be challenging and time consuming, and the mechanisms underlying the pathway are complex, multi-layered, and subject to numerous influencing factors. I thus dedicated another part of my work to the establishment and validation of an alternative model system that allowed me to observe the formation of starch granules in a simplified setting, with a reduced number of confounding variables. Key to this system is the de-etiolation process, a biological program that gives rise to functional chloroplasts from precursor organelles, etioplasts. This allowed me to observe the initiation of starch granules upon the very first perception of light. In the future, this approach may become a valuable input helping us to dissect the molecular roles of the increasing number of starch granule initiation

proteins, thereby providing clear-cut insight into the mechanisms giving rise to starch granules. Since the biochemical properties of starch are also dependent on granule size- and shape distributions, a detailed understanding of how these parameters are regulated will likely fuel future biotechnological approaches aiming to improve the properties of starch crops.

Zusammenfassung

Mit der Domestikation der stärkehaltigen Nutzpflanzen hat sich Stärke zugleich von einem Pflanzen-Reservestoff zu einem Hauptenergielieferant der menschlichen Ernährung sowie wichtigen Ressource für diverse industrielle Applikationen gemausert. Pflanzen produzieren Stärke in Form von semi-kristallinen Körnern in spezialisierten Organellen, entweder für die Langzeitspeicherung im Falle von Speicherstärke, oder für den täglichen Konsum im Falle von Blattstärke. Stärkekörner entwickeln sich während des Tages in den Blättern aus Substraten, die aus dem photosynthetischen Calvinzyklus abgezweigt werden, und zwar direkt vor Ort: in den Chloroplasten. Dort werden die Körner in der darauffolgenden Nacht auch zugleich wieder abgebaut, um Energie sowie organische Moleküle für den Erhalt des Metabolismus zur Verfügung zu stellen.

Die enzymatischen Schritte, die zur Synthese der Stärkebestandteile Amylopektin und Amylose erforderlich sind, werden durch die koordinierte Arbeit von Stärkesynthasen, Stärkeverzweigungsenzymen, sowie Stärkeentzweigungsenzymen vollbracht. Diese Schritte sind generell gut erforscht und verstanden. Weniger gut verstanden sind die Prozesse, die die Anzahl und Morphologie der produzierten Stärkekörner bestimmen. Diese Prozesse werden unter dem generischen Begriff Stärkekorn-Initiierung zusammengefasst und haben in letzter Zeit grosses Interesse geweckt. Dies führte zur Entdeckung und Beschreibung zahlreicher Proteine, die augenscheinlich an der Initiierung von Stärkekörnern beteiligt sind. Durch die Erforschung von SS5, einem Protein mit Ähnlichkeiten zu dem Hauptregulator der Stärkekorninitiierung SS4, habe ich zu diesem aktiven Forschungsfeld beigetragen. Im Gegensatz zu SS4 ist SS5 sehr wahrscheinlich katalytisch nicht aktiv. Dennoch beeinflusst SS5, wie viele Stärkekörner sich in Arabidopsis Chloroplasten bilden, da *ss5* Mutanten eine reduzierte Anzahl von Körnern aufweisen. Das Protein ist deshalb Teil der Stärkekorn-Initiierungsmaschinerie. Ich zeigte zudem, dass SS5, wie SS4, Homo-Dimere bildet, und mit einem weiteren Stärkeinitierungsprotein interagiert. Meine Ergebnisse zu diesem Projekt sind detailliert in Kapitel 3 dieser Arbeit beschrieben.

Die Erforschung der Stärkekorninitiierung ist bisweilen schwierig und langwierig. Die molekularen Mechanismen, die dem Prozess unterliegen, sind sehr komplex, vielschichtig, und von vielen Faktoren abhängig. Ich habe mich deshalb in einem weiteren Teil meiner Arbeit der Etablierung und Validierung eines alternativen Modellsystems gewidmet. Dieses System basiert auf dem De-Etiolierungsprozess, einem biologischen Programm, welches die Entwicklung funktioneller Chloroplasten aus nicht-photosynthetischen Vorläuferorganellen ermöglicht. Dadurch erlaubt uns dieses System zugleich, die Initiierung und darauffolgende

Entwicklung von Stärkekörnern unter vereinfachten Umständen, mit weniger verkomplizierenden Einflussfaktoren und in der allerersten Lichtphase zu beobachten. Dieses System könnte die Erforschung der Stärkekorninitiierung zukünftig massgeblich unterstützen. Da die biochemischen Eigenschaften von Stärke auch von der Körnergrösse sowie -Form beeinflusst werden, könnte ein detailliertes Verständnis der Faktoren, welche diese Parameter regulieren, auch zukünftige biotechnologische Ansätze befeuern.