

DISS. ETH NO.

30379

**IDENTIFICATION AND ANALYSIS OF  
NEW STARCH METABOLIC MUTANTS IN ARABIDOPSIS THALIANA**

A thesis submitted to attain the degree of

DOCTOR OF SCIENCES

(Dr. sc. ETH Zurich)

presented by

**THERESA E. ILSE**

MSc., Martin-Luther University Halle Wittenberg,  
Halle (Saale)

born on 23.06.1992

accepted on the recommendation of

Prof. Samuel C. Zeeman

Prof. Kirsten Bomblies

Prof. Ian Tetlow

2024

## SUMMARY

Starch is the primary carbohydrate reserve in plants and an important source of nutrition for humans, which is synthesized and stored in the form of water-insoluble, semi-crystalline granules. Storage starch accumulates in the amyloplasts of seeds and tubers and plays an important role in long-term energy storage for the use in germination and early plant development. In addition, in chloroplasts of leaves, transitory starch is produced during the day using photoassimilates and is subsequently degraded at night to sustain metabolic processes when photosynthesis is not possible. Storage starch and transitory starch are similar in structure, but while storage starch granules display a wide range of shapes and sizes, transitory starch granules typically exhibit a consistent morphology across different species - they are usually lenticular in shape and measure a few micrometers in diameter. Although considerable progress has been made in understanding the biosynthesis and degradation of starch, the initial stages of starch granule formation, which influence granule number and morphology, remain less understood. In recent years, several proteins have been discovered that form a complex network of protein-protein interactions and are required for granule initiation. However, there may be alternative pathways involving other proteins at play. In addition, very little is known about the factors leading to the lenticular shape of granules.

In this study, I conducted a forward genetic screen to identify novel genetic factors that influence the size and shape of chloroplast granules. This screen used flow cytometry as a high-throughput method to analyze the starch granule morphologies from a mutagenized *Arabidopsis* plant population. In Chapter 1 of my thesis, I tested the applicability of flow cytometry to analyze the size and shape of starch granules in *Arabidopsis* leaves, along with the analysis of known starch metabolism mutants. My investigations showed that the known starch granule initiation proteins were the most influential factors, as mutants lacking any one of them displayed obvious alterations in granule morphology. However, several mutants of proteins involved in starch biosynthesis, crystallization, and degradation also consistently showed alterations in granule morphology, some of which had previously been overlooked. This demonstrated the sensitivity and robustness of flow cytometry to quantify even subtle granule differences. Using flow cytometry for my forward genetic screen allowed me to identify new alleles of almost all genes anticipated to be identified, providing new insights into the functions and importance of their protein domains. Importantly, I also discovered three mutants of genes, whose involvement in

starch morphogenesis was previously unknown.

Chapter 2 is dedicated to the analysis of one of these novel mutants, *psbw-2*. This mutant had a glycine-to-arginine conversion in the transmembrane region of PsbW, a protein integral to thylakoids and involved in photosystem II complex formation. The resulting PsbW<sup>G107R</sup> protein is still integral to the membranes, but its insertion causes severe distortion of the thylakoid membranes in a dosage-dependent manner. This was accompanied by the formation of numerous small, irregularly shaped granules in the chloroplasts - a phenotype strikingly different from that of the *psbw-1* knockout, which showed no alterations in membrane organization or granule formation. These data suggest that PsbW<sup>G107R</sup> has gained an aberrant function, with the presence of arginine in its transmembrane helix possibly leading to membrane distortion to accommodate the positive charge. It also supports emerging evidence that thylakoids control granule formation in multiple ways, providing a new perspective on how they help determine granule shape and number. Detailed analyses of the remaining two novel factors identified in my screen may further improve our understanding of the mechanisms controlling granule number and shape.

## ZUSAMMENFASSUNG

Stärke ist die primäre Kohlenhydratreserve in Pflanzen und eine wichtige Nahrungsquelle für den Menschen, die in Form von wasserunlöslichen, semi-kristallinen Körnern synthetisiert und gespeichert wird. Speicherstärke reichert sich in den Amyloplasten von Samen und Knollen an und spielt eine wichtige Rolle bei der langfristigen Energiespeicherung für die Keimung und die frühe Pflanzenentwicklung. Darüber hinaus wird in den Chloroplasten der Blätter tagsüber unter Verwendung von Photoassimilaten transitorische Stärke produziert, welche anschließend nachts, wenn Photosynthese nicht möglich ist, abgebaut wird, um Stoffwechselprozesse aufrechtzuerhalten. Speicherstärke und transitorische Stärke ähneln sich in ihrem Aufbau, doch während die Speicherstärkekörner je nach Pflanzenart eine große Vielfalt an Formen und Größen aufweisen, haben die transitorischen Stärkekörner in der Regel eine einheitliche Morphologie - sie sind in der Regel linsenförmig und haben einen Durchmesser von einigen Mikrometern. Im Verständnis von Biosynthese und Abbau der Stärkekörner wurden erhebliche Fortschritte erzielt, jedoch sind die ersten Schritte, die die Bildung, Anzahl und Morphologie der Körner beeinflussen nach wie vor relativ unbekannt. In den letzten Jahren wurden mehrere Proteine entdeckt, die ein komplexes Netzwerk von Protein-Protein-Interaktionen bilden und die für die Kornbildung erforderlich sind. Möglicherweise gibt es aber auch noch alternative Wege, an denen weitere Proteine beteiligt sind. Darüber hinaus ist sehr wenig über die Faktoren bekannt, die zur linsenförmigen Morphologie der Körner führen.

In dieser Studie führte ich einen "Forward Genetic Screen" durch, um neue genetische Faktoren zu identifizieren, die die Größe und Form der Stärkekörner in Chloroplasten beeinflussen. In diesem Screen wurde die Durchflusszytometrie als High-Throughput-Methode eingesetzt, um die Morphologie der Stärkekörner einer mutagenisierten Arabidopsis-Population zu analysieren. In Kapitel 1 meiner Dissertation testete ich die Eignung der Durchflusszytometrie für die Analyse von Größe und Form der Stärkekörner in Arabidopsis-Blättern, und untersuchte außerdem die Eigenschaften der Stärkekörner bekannter Mutanten des Stärkestoffwechsel. Meine Untersuchungen ergaben, dass die bekannten Proteine, die an der Initiierung von Stärkekörnern beteiligt sind, die einflussreichsten Faktoren sind, da Mutanten deutliche Veränderungen in der Morphologie der Körner aufwiesen, wenn eines dieser Proteine fehlte. Aber auch verschiedene Mutanten von Proteinen, die an der Biosynthese, der Kristallisation und dem Abbau von Stärke beteiligt sind, zeigten durchweg Veränderungen in der Morphologie der Körner, von denen einige

zuvor übersehen worden waren. Dies zeigt, wie sensitiv und zuverlässig die Durchflusszytometrie ist, um selbst subtile Unterschiede in der Form der Körner zu quantifizieren. Durch den Einsatz der Durchflusszytometrie in meinem genetischen Screen konnte ich neue Allele von fast allen bereits beschriebenen Genen identifizieren, was neue Erkenntnisse über die Aufgaben der codierten Proteine und die Funktionen ihrer Domänen lieferte. Wichtig ist, dass ich auch drei Mutanten von Genen entdeckte, deren Beteiligung an der Stärkemorphogenese bisher unbekannt war.

Im Kapitel 2 gehe ich näher auf die Analyse einer dieser neuen Mutanten, *psbw-2*, ein. Diese Mutante wies einen Austausch von Glycin zu Arginin in der Transmembrandomäne von PsbW auf, einem in die Thylakoide integrierten und an der Bildung des Photosystem-II-Komplexes beteiligten Protein. Das daraus resultierende PsbW<sup>G107R</sup>-Protein integriert immer noch in die Membran, aber sein Einbau führt zu einer starken dosisabhängigen Verformung der Thylakoidmembranen. Dies ging mit der Bildung zahlreicher kleiner, unregelmäßig geformter Körner in den Chloroplasten einher - ein Phänotyp, der sich deutlich von dem der *psbw-1*-Knockout Mutanten unterscheidet, welcher keine Veränderungen in der Membranorganisation oder der Bildung der Stärkekörner aufwies. Diese Daten deuten darauf hin, dass PsbW<sup>G107R</sup> eine abweichende Funktion hat, wobei das Vorhandensein eines Arginins in seiner Transmembranhelix möglicherweise zu einer Membranverformung führt. Dies unterstützt die Hypothese, dass Thylakoide die Bildung von Stärkekörnern auf vielfältige Weise steuern, was eine neue Perspektive aufweist, wie sie die Form und Anzahl von Körnern mitbestimmen. Detaillierte Analysen der beiden verbleibenden neuen Faktoren, die in meinem Screen identifiziert wurden, könnten unser Verständnis der Mechanismen, die Anzahl und Form der Körner steuern, weiter verbessern.