

Functional characterization of Calvin-Benson cycle enzymes regulated by redox-based mechanisms

In photosynthetic organisms, carbon fixation occurs through the Calvin-Benson (CB) cycle, a set of metabolic reactions by which carbon atom in CO₂ is reduced to form sugars such as triose-phosphates. Several research efforts have been pursued to improve the carbon fixation efficiency in photosynthetic organisms (1,2), but all the genetic engineering solutions adopted up to now revealed limited success. In this research proposal, **we aim to develop an integrated protein characterization and design to examine and ameliorate the functional properties of fructose-1,6-bisphosphatase (FBPase) and sedoheptulose-1,7-bisphosphatase (SBPase)**, two CB cycle enzymes that have been reported as the main limiting steps for carbon fixation (3-6). This will be pursued at different levels, as detailed in the following tasks.

Task 1 – Study of the molecular details underlying the functioning and regulation of FBPase and SBPase in selected oxygenic phototrophs

We selected FBPase and SBPase from two photosynthetic model organisms such as the green alga *Chlamydomonas reinhardtii* and the cyanobacterium *Synechococcus sp.* PCC 11901. To examine their functional and regulatory characteristics, we will employ the following approaches:

- i. Expression of recombinant forms of FBPase and SBPase (WT) in *E. coli* and purification by chromatographic techniques. Expression vectors for algal enzymes are already available, while those coding for cyanobacterial proteins will be ordered as synthetic constructs.
- ii. Biochemical characterization of purified FBPase and SBPase aimed at determining kinetic parameters (V_{max} , K_m , and k_{cat}) and magnesium dependency using established enzymatic assay. Concomitantly, structural analysis (i.e., size-exclusion chromatography and circular dichroism spectroscopy) will be carried out to assess the native folding and structural organization.
- iii. Mass spectrometry analysis to identify cysteine (Cys) residues involved in the formation of regulatory disulfides. First, we will expose WT enzymes to reducing and oxidizing treatments and the fully activated (i.e., reduced) and inactivated (i.e., oxidized) forms will be evaluated by enzymatic assays. Subsequently, we will analyze by mass spectrometry both full proteins and trypsin-digested peptides. By comparing reduced and oxidized forms, it will be possible to identify which Cys are involved in regulation.
- iv. Generation of single and/or multiple Cys mutants and production of recombinant proteins. The redox sensitivity of Cys mutants will be investigated by determining the catalytic response to redox treatments. Cys mutants will be then characterized as previously described for WT enzymes. Altogether, these analyses will allow to confirm regulatory Cys and determine whether Cys mutations alters the kinetic properties and structural folding of enzymes.

Task 2 – Analysis of three-dimensional structures and catalytic-related structural elements of FBPase and SBPase

By using purified FBPase and SBPase, we aim to resolve three-dimensional structures in both reduced and oxidized forms, and set the basis for computational studies aimed at establishing the structural elements underlying substrate binding and reaction mechanism. To achieve these objectives, we will collaborate with the Department of Chemistry "G. Ciamician (Professors Simona Fermani and Matteo Calvaresi) and employ the following approaches:

- i) Reduced and oxidized enzymes will be subjected to crystallization trials using a robotized platform that allows to test multiple crystallization conditions thus increasing the successful rate. The crystallization data will be then collected and used to solve the 3D-structures, enabling comparison of the different redox forms (collaboration with Prof. Simona Fermani).
- ii) By using 3D-structures, we will carry out molecular dynamic simulations with modelled substrates to identify protein residues involved in the stabilization of substrates within active sites and to quantify the specific contribution of each residues to the binding (collaboration with Prof. Matteo Calvaresi). These analyses will allow to monitor the dynamic rearrangement underlying the binding of substrates, and possibly, provide a list of possible mutations to improve the catalytic mechanism.

Outcome: This research proposal will provide insights into the structural and functional properties together with redox-based regulatory mechanisms of FBPase and SBPase from two model photosynthetic organisms. These results are of great importance in the search for enzymes with improved regulatory and kinetic properties, so as to enhance the efficiency of carbon fixation.

Caratterizzazione funzionale degli enzimi del ciclo di Calvin-Benson regolati da meccanismi basati sul redox

Negli organismi fotosintetici, la fissazione del carbonio avviene attraverso il ciclo di Calvin-Benson (CB), un insieme di reazioni metaboliche attraverso le quali la CO₂ viene organicata a formare zuccheri come i trioso-fosfati. Diversi sforzi di ricerca sono stati perseguiti per migliorare l'efficienza di fissazione del carbonio negli organismi fotosintetici (1,2), ma tutte le soluzioni di ingegneria genetica adottate finora hanno avuto un successo limitato. In questa proposta di ricerca, **ci proponiamo di sviluppare una caratterizzazione e una progettazione integrata delle proteine per esaminare e migliorare le proprietà funzionali della fruttosio-1,6-bifosfato fosfatasi (FBPasi) e della sedoeptulosio-1,7- bifosfato fosfatasi (SBPasi)**, due enzimi del ciclo CB che sono stati segnalati come le principali tappe limitanti per la fissazione del carbonio (3-6). Questo obiettivo sarà perseguito a diversi livelli, come illustrato nei seguenti task.

Task 1 – Studio dei dettagli molecolari alla base del funzionamento e della regolazione di FBPasi e SBPasi in organismi fotosintetici

Abbiamo selezionato FBPasi e SBPasi di due organismi modello fotosintetici come l'alga verde *Chlamydomonas reinhardtii* e il cianobatterio *Synechococcus sp.* PCC 11901. Per esaminare le loro caratteristiche funzionali e regolatorie, impiegheremo i seguenti approcci:

- i. Espressione delle forme ricombinanti di FBPasi ed SBPasi (forme WT) in *E. coli* e purificazione mediante tecniche cromatografiche. I vettori di espressione per gli enzimi algali sono già disponibili, mentre quelli che codificano per le proteine cianobatteriche saranno ordinati come costrutti sintetici.
- ii. Caratterizzazione biochimica della FBPasi e della SBPasi purificate per determinare i parametri cinetici (V_{max} , K_m e k_{cat}) e la dipendenza dal magnesio utilizzando un saggio enzimatico consolidato. Parallelamente, verranno effettuate analisi strutturali (cromatografia a esclusione dimensionale e spettroscopia di dicroismo circolare) per valutare il folding nativo e l'organizzazione strutturale.

- iii. Analisi di spettrometria di massa per identificare i residui di cisteina (Cys) coinvolti nella formazione dei disolfuri regolativi. In primo luogo, esporremo gli enzimi WT a trattamenti riducenti e ossidanti e le forme completamente attivate (i.e., ridotte) e inattivate (i.e., ossidate) saranno valutate mediante saggi enzimatici. Successivamente, analizzeremo mediante spettrometria di massa sia le proteine intere sia i peptidi in seguito a digestione con specifiche proteasi (e.g., tripsina). Confrontando le forme ridotte e ossidate, sarà possibile identificare quali Cys siano coinvolte nella regolazione.
- iv. Generazione di mutanti Cys singoli e/o multipli e produzione di proteine ricombinanti. La sensibilità redox dei mutanti Cys sarà studiata determinando la risposta catalitica ai trattamenti redox. I mutanti Cys saranno poi caratterizzati come precedentemente descritto per gli enzimi WT. Nel complesso, queste analisi permetteranno di confermare le Cys regolative e di determinare se le mutazioni delle Cys alterano le proprietà cinetiche e la struttura degli enzimi.

Task 2 – Analisi delle strutture tridimensionali e degli elementi strutturali catalitici di FBPasi e SBPasi

Utilizzando FBPasi e SBPasi purificate, ci proponiamo di risolvere le strutture tridimensionali nella forma ridotta e ossidata e di porre le basi per studi computazionali volti a stabilire gli elementi strutturali alla base del legame con il substrato e del meccanismo di reazione. Per raggiungere questi obiettivi, collaboreremo con il Dipartimento di Chimica "G. Ciamician" (professori Simona Fermani e Matteo Calvaresi) e utilizzeremo i seguenti approcci:

- i) Gli enzimi ridotti e ossidati saranno sottoposti a prove di cristallizzazione utilizzando una piattaforma robotizzata che consente di testare più condizioni di cristallizzazione, aumentando così il tasso di successo. I dati di cristallizzazione saranno poi raccolti e utilizzati per risolvere le strutture 3D, consentendo di confrontare le diverse forme redox (collaborazione con la prof.ssa Simona Fermani).
- ii) Utilizzando strutture 3D, effettueremo delle simulazioni di dinamica molecolare con i substrati per identificare i residui proteici coinvolti nella stabilizzazione dei substrati all'interno dei siti attivi e per quantificare il contributo specifico di ciascun residuo al legame (collaborazione con il Prof. Matteo Calvaresi). Queste analisi permetteranno di monitorare il riarrangiamento dinamico alla base del legame dei substrati ed eventualmente di fornire una lista di possibili mutazioni per migliorare il meccanismo catalitico.

Outcome: Questa proposta di ricerca fornirà approfondimenti sulle proprietà strutturali e funzionali e sui meccanismi di regolazione basati sul redox della FBPasi e della SBPasi di due organismi fotosintetici modello. Questi risultati sono di grande importanza per lo sviluppo e l'identificazione di enzimi con proprietà regolative e cinetiche migliori, in modo da aumentare l'efficienza della fissazione del carbonio.

References

1. Andralojc, P. J., Carmo-Silva, E., Degen, G. E., and Parry, M. A. J. (2018) Increasing metabolic potential: C-fixation. *Essays in biochemistry* **62**, 109-118
2. Simkin, A. J., Lopez-Calcagno, P. E., and Raines, C. A. (2019) Feeding the world: improving photosynthetic efficiency for sustainable crop production. *J Exp Bot* **70**, 1119-1140
3. Driever, S. M., Simkin, A. J., Alotaibi, S., Fisk, S. J., Madgwick, P. J., Sparks, C. A., Jones, H. D., Lawson, T., Parry, M. A. J., and Raines, C. A. (2017) Increased SBPase activity improves

photosynthesis and grain yield in wheat grown in greenhouse conditions. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **372**

4. Lefebvre, S., Lawson, T., Zakhleniuk, O. V., Lloyd, J. C., Raines, C. A., and Fryer, M. (2005) Increased sedoheptulose-1,7-bisphosphatase activity in transgenic tobacco plants stimulates photosynthesis and growth from an early stage in development. *Plant Physiol* **138**, 451-460
5. Lopez-Calcano, P. E., Brown, K. L., Simkin, A. J., Fisk, S. J., Violet-Chabrand, S., Lawson, T., and Raines, C. A. (2020) Stimulating photosynthetic processes increases productivity and water-use efficiency in the field. *Nat Plants* **6**, 1054-1063
6. Simkin, A. J., McAusland, L., Headland, L. R., Lawson, T., and Raines, C. A. (2015) Multigene manipulation of photosynthetic carbon assimilation increases CO₂ fixation and biomass yield in tobacco. *J Exp Bot* **66**, 4075-4090