

DISS. ETH NO. 29510

***The origin, repair and effect of the metabolite damage product, fructose-1-phosphate,  
of the Calvin-Benson cycle in Arabidopsis thaliana***

A thesis submitted to attain the degree of

DOCTOR OF SCIENCES

(Dr. sc. ETH Zurich)

presented by

FLORIAN GALBIER

M.Sc. in Biology, University of Zurich

born on 27.11.1988

accepted on the recommendation of

Prof. Dr. Samuel C. Zeeman

Prof. Dr. Uwe Sauer

Dr. Yves Gibon

2023

## Abstract

The Calvin-Benson cycle (CBC) drives CO<sub>2</sub> fixation and is responsible for 90 % of the globally fixed carbon. Since its description in the 1950s, only few associated metabolite damage and repair (MD&R) pathways have been reported, totalling to a number much lower than those associated to other primary metabolic pathways, indicating that there is uncharted territory in the landscape of the CBC. My work confirms and details a recently described fructose-1-phosphate (F1P) producing metabolite damage pathway associated to the chloroplast fructose-1,6-bisphosphatase I (cpFBPaseI) and investigates the effects of F1P accumulation as well as the potential corresponding repair pathway.

In *Arabidopsis thaliana*, F1P was first identified as a metabolite that is increased in the cpFBPaseI mutant *fbp-2*, which is viable but grows poorly. The mutant's viability was hypothesised to be attributable to another CBC-associated sugar bisphosphatase, sedoheptulose-1,7-bisphosphatase (SBPase), exhibiting substrate promiscuity such as to form sufficient fructose-6-phosphate (F6P) from fructose-1,6-bisphosphate (F16BP). Substrate promiscuity of SBPase using F16BP reportedly also increases catalytic promiscuity, thereby enhancing F1P formation. My findings confirm substrate-, but not increased catalytic promiscuity of SBPase. I further report the first detailed kinetic parameters for *A. thaliana* cpFBPaseI and demonstrate the enzyme's catalytic promiscuity to produce F1P at a rate significantly lower than its canonical reaction of F6P formation. Although I also largely confirm the *fbp-2* mutant metabolite profile, advanced analyses suggest that the increased levels of F6P, but not F1P, in the mutant in fact arise from F16BP degradation during metabolite extraction.

I confirmed fructose to be the product of F1P metabolism *in planta*. However, an evaluation of three *A. thaliana* F1P phosphatase candidates, selected based on their homology to *Escherichia coli* F1P phosphatases, subcellular localisation and co-expression with cpFBPaseI was not successful in identifying the sought-after enzyme. By heterologous expression of Ketohexokinase (KHK) in yeast to achieve F1P accumulation to toxic levels, I established a system allowing to screen for F1P metabolising enzymes using *A. thaliana* cDNA libraries, which may help identify the *A. thaliana* F1P metabolising enzyme in the future. I also studied the effects of elevated F1P levels in *A. thaliana* by heterologous expression of KHK in the cytosol and the chloroplast. Despite increased levels of F1P in the transformed plants, I could not observe effects on CBC intermediates' levels, photosynthetic activity or plant growth.

In summary, F1P can result from metabolite damage by cpFBPaseI in the CBC and is metabolised to fructose by a yet-unknown phosphatase. F1P has no obvious negative effects

on plant metabolism and development, and the corresponding metabolite damage repair pathway most likely evolved to reduce metabolic drain of carbon and phosphate.

## Zusammenfassung

Die CO<sub>2</sub>-Fixierung wird durch den Calvin-Benson-Zyklus (CBZ) katalysiert, welcher für 90 % des weltweit fixierten Kohlenstoffs verantwortlich ist. Seit seiner Beschreibung in den 1950er Jahren wurden nur wenige mit dem CBZ assoziierte Metabolitenschädigungs- und -Reparaturwege (MS&R) beschrieben, deren Gesamtzahl verglichen mit MS&R-Wegen anderer primärer Stoffwechselwegen wesentlich geringer ausfällt. Dies deutet darauf hin, dass womöglich weitere, bis anhin unerforschte MS&R-Wege im CBZ existieren. In dieser Studie wird ein kürzlich beschriebener Fructose-1-Phosphat (F1P) produzierender Metabolitenschädigungsweg, der mit der chloroplastidiären Fructose-1,6-Bisphosphatase I (cpFBPaseI) assoziiert ist, bestätigt und detailliert erforscht. Zudem werden die Auswirkungen einer F1P Akkumulation sowie der potenzielle entsprechende Reparaturweg untersucht.

In *Arabidopsis thaliana* wurde F1P erstmals als erhöhter Metabolit in der lebensfähigen, aber schlecht wachsenden cpFBPaseI-Mutante *fbp-2* entdeckt. Die Lebensfähigkeit dieser Mutante wurde einer anderen CBZ-assoziierten Zucker-Bisphosphatase, der Sedoheptulose-1,7-Bisphosphatase (SBPase), zugeschrieben, welche via Substratpromiskuität genügend Fructose-6-Phosphat (F6P) aus Fructose-1,6-Bisphosphat (F16BP) herstellen könnte. Berichten zufolge führt die Substratpromiskuität der SBPase unter Verwendung von F16BP zu gleichzeitig erhöhter katalytischer Promiskuität und somit einer gesteigerten F1P-Bildungsrate. Ich konnte die Substrat-, nicht aber die erhöhte katalytische Promiskuität und Bildung von F1P der SBPase in meiner Studie bestätigen. Darüber hinaus präsentiere ich erstmals detaillierte kinetische Parameter der *A. thaliana* cpFBPaseI und bestätige, dass die katalytische Promiskuität des Enzyms F1P mit deutlich geringeren Raten bildet als das normale Produkt F6P. Obwohl ich das Metabolitenprofil der *fbp-2* Mutante weitgehend bestätigen konnte, deuten weitere Analysen darauf hin, dass die erhöhte F6P-, aber nicht F1P-Konzentration in der Mutante auf die Degradation von F16BP während der Extraktion zurückzuführen sind.

Ich konnte bestätigen, dass F1P in der Pflanze zu Fructose abgebaut wird. Eine Überprüfung von drei *A. thaliana* F1P-Phosphatase-Kandidaten, gewählt basierend auf ihrer Homologie zu *Escherichia coli* F1P-Phosphatasen, der Lokalisierung in Chloroplasten und der Koexpression mit cpFBPaseI ergab für keine F1P-Phosphatase-Aktivität. Durch die heterologe Expression der Kethexokinase (KHK) in Hefe und der damit erreichten Akkumulation toxischer Mengen von F1P entwickelte ich ein System zum Screening von *A. thaliana* cDNA Datenbanken, welches in Zukunft zur Identifizierung F1P-metabolisierender Enzyme benutzt werden kann. Ich habe zudem die Auswirkungen erhöhter F1P-Konzentrationen in *A. thaliana*, erreicht durch heterologe Expression von KHK im Cytosol und in Chloroplasten, untersucht. Obwohl die transformierten Pflanzen erhöhte F1P-Konzentrationen zeigten, konnte ich keine

Auswirkungen auf CBZ-Metabolitenkonzentrationen, die photosynthetische Aktivität oder das Pflanzenwachstum beobachten.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass F1P durch Metabolitenschaden der cpFBPase im CBC resultieren kann und durch eine noch unbekannte Phosphatase zu Fructose metabolisiert wird. F1P hat keine offensichtlichen negativen Auswirkungen auf den pflanzlichen Stoffwechsel und die Entwicklung, und der Reparaturweg hat sich höchstwahrscheinlich entwickelt, um den metabolischen Abfluss von Kohlenstoff und Phosphat zu reduzieren.