

6 ABSTRACT

Cytosolic pyruvate kinases have key function in carbohydrate breakdown, ATP-synthesis and supply of pyruvate to the TCA-cycle. By phylogenetic studies and localization of YFP-fusion proteins, we identified five cytosol-targeted PKs, out of 14 PK isogenes encoded by the *A. thaliana* genome. Transgenic lines carrying a *tasi*-construct against the transcript of the three isoforms cPK1, cPK2 and cPK3 are characterized by retarded shoot growth phenotype that becomes more severe under low-light conditions and enhanced root growth. HPLC analysis of leaf extracts revealed impact on primary metabolism, illustrated by enhanced amino acid biosynthesis, affected carbohydrate partitioning and an altered adenylate homeostasis. We observed an isoform-specific expression pattern, for the five cytosol-localized isoforms, dependent on tissue and developmental stages of the plant. Hereby two functional subclades of cPK genes were identified, one including *cPK1*, *cPK2* and *cPK3* that are regularly expressed in adult plants, and the other one involving *cPK4* and *cPK5* whose expression is induced under stress conditions only. Investigation of heterologously expressed and purified cPK enzymes revealed cPK proteins to be differently regulated by metabolites, e.g. citrate, F1,6BP and ATP. Furthermore, the determination of *in vitro* enzyme activities indicates regulatory properties of cPK subunit complexes consisting of cPK2/3 or cPK4/5 isoforms, respectively. Finally, our study suggests that regulation of carbohydrate flux through the glycolytic pathway is assessed by the five identified cPK isoforms that bear individual regulatory properties. We showed that control of cPK enzyme activity is modulated by distinct gene expression pattern, different responsiveness to allosteric effectors as well as enzyme subgroup association. Cytosolic PK appears to be essential for regulating metabolic priorities between carbohydrate flux into the TCA-cycle and branching biosynthetic pathways, thereby modulating shoot growth.

7 ZUSAMMENFASSUNG

Cytosolische Pyruvatkinasen tragen eine zentrale Funktion im Abbau von Kohlenhydraten. Sie katalysieren die Synthese von ATP im Cytosol und bewirken die Bereitstellung von Pyruvat für den Zitronensäurezyklus. Durch phylogenetische Studien und Lokalisierung von YFP-Fusionsproteinen, gelang es aus den 14 vom *Arabidopsis thaliana*-Genom kodierten PK-Isogenen, fünf im Cytosol lokalisierte PKs zu identifizieren. *Knockout*- sowie *Knockdown*-Linien mit reduzierter PK-Expression der drei Isogene *cPK1*, *cPK2* und *cPK3* weisen ein verringertes Sprosswachstum auf. Dieser Wachstumseffekt ist unter Schwachlichtbedingungen verstärkt. Gleichzeitig zeichnen sich die oben genannten Linien durch ein gesteigertes Wurzelwachstum aus. HPLC-Analysen von Blattextrakten weisen auf eine Veränderung des Primärmetabolismus hin, gekennzeichnet durch eine gesteigerte Biosynthese von Aminosäuren, sowie Anpassungen im Kohlenhydrat- und Adenylathaushalt. Für die fünf im Cytosol lokalisierten Isoformen konnten isoformspezifische Expressionsmuster nachgewiesen werden, deren Ausprägung in Abhängigkeit von dem Gewebe und dem Entwicklungsstadium der Pflanze stark variierte. Hierbei wurden zwei funktionelle Untergruppen der cPK-Gene identifiziert, wobei eine die regulär in adulten Pflanzen exprimierten Isoformen *cPK1*, *cPK2* und *cPK3* beinhaltet und die andere *cPK4* und *cPK5* einschließt, deren Expression nur unter Stressbedingungen induziert wird. Die Untersuchung heterolog exprimierter, aufgereinigter cPK-Enzyme zeigte, dass die Aktivität der Isoenzyme spezifisch durch Metaboliten, wie Citrat, Fruktose-1,6-Bisphosphat und ATP reguliert wird. Desweiteren lässt die Bestimmung von *in vitro* Enzymaktivitäten auf eine regulatorische Wirkung von Enzymkomplexen schließen, welche sich jeweils aus den Untereinheiten *cPK1* und *cPK2*, *cPK2* und *cPK3*, sowie *cPK4* und *cPK5* zusammensetzen. Zusammenfassend deutet die vorliegende Studie darauf hin, dass die fünf identifizierten cPK Isoformen, die sich durch individuelle regulatorische Charakteristika auszeichnen, den Kohlenstofffluss durch die Glykolyse modulieren können. Wir konnten verschiedene Mechanismen aufzeigen, welche Auswirkungen auf die PK Enzym-Aktivität in der Pflanze haben können, wie distinkte Genexpressionsmuster, individuelle Reaktionen gegenüber allosterischen Effektoren, sowie die Möglichkeit der Zusammenlagerung von Untereinheiten zu Enzymkomplexen. Cytosolische Pyruvatkinasen scheinen die Verteilung von Kohlenstoffgerüsten zwischen

dem Zitronensäurezyklus und angrenzender Biosynthesewege zu regulieren und hierdurch Einfluss auf das Sprosswachstum der Pflanze zu nehmen.