

ZUR ALTERUNGSPHYSIOLOGIE  
DER ZIERWINDENBLUETE

Diss. Nr. 6568

ABHANDLUNG

zur Erlangung

des Titels eines Doktors der Technischen Wissenschaften

der

EIDGENOESSISCHEN TECHNISCHEN  
HOCHSCHULE ZUERICH

vorgelegt von

PETER SUCHOVSKY

Dipl. Ing.-Agr. ETH Zürich

geboren am 11. Mai 1942

von Steinmaur (Kt. Zürich)

Angenommen auf Antrag von

Prof. Dr. Ph. Matile, Referent

Prof. Dr. F. Ruch, Korreferent

1980

### 1.1. Zusammenfassung

In der kurzlebigen Blüte der Prunkwinde Ipomoea tricolor wurde der Proteinabbau im Verlauf der Alterung untersucht. Die Abbauraten des Proteins ist am Tag der Anthese zuerst klein und nimmt bei beginnender Einrollung der Blüte stark zu. In den proteinreichen Interkostalfeldern wird am Blühtag 39%, in den Leisten 31% und im Blütengrund überhaupt kein Protein mobilisiert. Am Nachblühtag erfolgt dagegen die Mobilisation im Blütengrund im Vergleich mit den anderen Teilen des Organs am weitgehendsten.

Gelelektrophoretische Analyse (SDS-Polyacrylamid) von sedimentierbaren (strukturegebundenen) sowie von löslichen Proteinen, deren Molekulargewichte zwischen 15 und 150 kDalt liegen zeigt, dass die verschiedenen Proteine eine sehr unterschiedliche Entwicklung durchlaufen. Die Mobilisation betrifft vor allem hochmolekulare Proteine.

Eine chymotrypsinartige Protease (Substrat: SUPHENI) und eine Carboxypeptidase (Substrat: BTNA) sowie die autolytische Aktivität (Substrat: endogenes Protein) steigen bereits am Ende der Knospenentwicklung zwischen Tag -3 und Tag -1 sehr stark an, lassen jedoch im Verlauf der Alterung keinen direkten Zusammenhang mit der Mobilisation des Proteins erkennen. Lediglich eine Endopeptidaseaktivität (Substrat: Hide Powder Azure) steigt in der Zeit der schnellsten Proteinmobilisation während der Alterung an.

Alle genannten Proteasen haben eine optimale Aktivität im sauren pH-Bereich (4 - 6).

Die Entwicklung der Endopeptidaseaktivität am Tag der Anthese in den verschiedenen Blütengeweben entspricht zumindest teilweise der Proteinmobilisation. Den schnellen Abbauraten des Proteins in den Interkostalfeldern (39%) entspricht eine Erhöhung der Endopeptidaseaktivität um 250%. In den

Leisten geht dem ca. 30%igem Abbau des Proteins eine Verdreifachung der Proteaseaktivität einher.

Der Anstieg der Endopeptidaseaktivität lässt sich in ausgeschnittenen Korollenscheiben durch Behandlung mit Cycloheximid (12 µg/ml) verhindern.

Die Mobilisation des Proteins sowie die Entwicklung der Endopeptidaseaktivität wird im Gegensatz zur Einrollung der Blüte durch Äthylen (10 ppm) nicht beeinflusst.

Etwa 30 - 35% der gesamten Endopeptidaseaktivität liegt in Homogenaten in vesikulärer Form vor. Entsprechende Präparate wurden mittels Gelfiltration (CL-4B Brögel) erhalten und die Latenz der Proteaseaktivität durch Einsatz von Triton-x-100 nachgewiesen.

Die Auftrennung der Endopeptidase auf 10%igen Polyacrylamidgel lassen drei Isoenzyme erkennen; ihre Aktivitäten entwickeln sich sehr unterschiedlich im Verlauf der Alterung.

An der autolytischen Aktivität scheint eine Serin Protease beteiligt zu sein. Die Aktivität ist auch durch Blockierung von -SH Gruppen teilweise hemmbar. Die Endopeptidase (Substrat: Hide Powder) nicht aber die Carboxypeptidase und chymotrypsinartige Protease ist mit serinspezifischem Inhibitor hemmbar.

Ein endogener niedermolekularer Inhibitor der Carboxypeptidaseaktivität kann durch Gelfiltration (Sephadex G-50) abgetrennt werden.

Gelelektrophoretische Analyse des Proteins (SDS-Polyacrylamid) vor und nach Abbau in vivo und in vitro (zwischen 16 h Tag 0 und 8.30 h Tag +1) führt zu sehr verschiedenen Proteinmustern; einzelne Proteine werden in vitro nicht abgebaut, verschwinden dagegen in vivo weitgehend.

Das Schlüsselenzym des Phenylpropanwegs, Phenylalanin-Ammonium Lyase (PAL), wurde charakterisiert und seine Aktivität während der Entwicklung mit der Anthocyan- bzw. der Polyphenolbildung in Beziehung gebracht. Die PAL-Aktivität erscheint in den Knospen vier Tage vor der Anthese, kurz vor dem ersten Auftreten des Anthocyans. Mit dem Abschluss der Synthese des Blütenfarbstoffs wird die Aktivität zurückgebildet und ist bis zum Blühtag vollständig verschwunden. Als weitere Enzymaktivität im Stoffwechsel des Anthocyans wurde die Glykosilierung von Anthocyanidin als UDP-Glucose-Pelargonidin-Glycosyl-Transferase mit einer neuen Methode gemessen und die Veränderung der Aktivität im Verlauf der Blütenentwicklung verfolgt.

## 1.2. Abstract

Protein degradation during the senescence of the ephemeral morning glory flower (Ipomoea tricolor) was studied. On the day of anthesis the rate of protein degradation is at first slow but increases markedly at the onset of wilting. In the protein-rich intercostal regions 39% of the protein was mobilized and in the ribs 31%. At the base of the flower no protein was mobilized. On the day after anthesis however, mobilisation at the base of the flower is much greater than in the other parts.

SDS-polyacrylamide gel electrophoresis revealed that the levels of various proteins, especially high molecular weight proteins, showed quite different patterns of development during senescence.

All proteases mentioned have an acid pH optimum (pH 4 - 6). Even before anthesis (between day -3 and day -1) a chymotrypsin-like protease (substrate: SUPHENI), a carboxypeptidase (substrate: BTNA) and autolytic activity increased greatly. These changes do not coincide with protein degradation. Only endopeptidase activity increases when the rate of protein degradation during senescence is at a maximum. The increase in endopeptidase activity in excised intercostal segments was inhibited by cycloheximide (12 µg/ml). In contrast to rolling up of the flower, protein degradation and endopeptidase activity are not affected by ethylene (10 ppm).

About 30 - 35% of total endopeptidase activity in homogenates is trapped in vesicles. Latency was demonstrated with Triton-x-100 treatment). Three isoenzymes of endopeptidase could be isolated by SDS-gel electrophoresis. The activities of these isoenzymes showed different patterns of development during senescence of the flower.

A serine protease seems to be involved in autolytic activity. This activity was partly inhibited by blocking of -SH groups (PMSF). Endopeptidase was also partly inhibited by PMSF but carboxypeptidase and the chymotrypsin-like protease were not inhibited. An endogenous low molecular weight inhibitor of carboxypeptidase was separated by gelfiltration.

Protein degradation in vivo and in vitro were compared by gel-electrophoresis, followed by densitometric analysis of samples taken at 16h day 0 and 8.30h day +1. The resulting patterns were quite different. Some proteins were degraded almost completely in vivo but were not degraded in vitro.

The key enzyme of the phenylpropane pathway Phenylalanin Ammonium-Lyase (PAL) was characterized, and its activity during development compared with anthocyanin and polyphenol synthesis. Four days before anthesis PAL activity appears in the bud shortly before the manifestation of anthocyanin. After synthesis of the flower pigment the activity declines and disappears completely by the day of anthesis. The activity of UDP-Glucose-Pelargonidin-Glycosyl Transferase, which is responsible for the glycosylation of anthocyanidin, was measured during flower development using a new method.