

6. Nov. 1989

Diss. ETH

Diss. ETH No. 8860

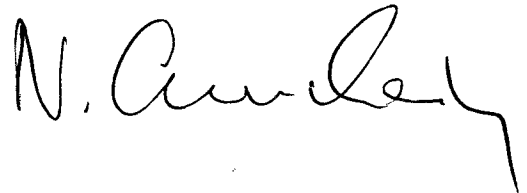
Lipidmetabolismus in seneszenten Gerstenblättern

Abhandlung
zur Erlangung des Titels eines
Doktors der Naturwissenschaften
der

Eidgenössischen Technischen Hochschule Zürich

vorgelegt von
Hans Gut
dipl. ing. agr. ETH
geboren am 23. August 1958
von Mauensee (LU)

angenommen auf Antrag von:
Prof. Dr. N. Amrhein, Referent
Prof. Dr. Ph. Matile, Korreferent



1989



CAVE

Zusammenfassung

Das Ziel dieser Arbeit war es, Erkenntnisse über den Abbau von Carotinoiden und Membranlipiden in seneszenten Blattspreiten von Gräsern zu erlangen.

Methodische Voraussetzungen dafür waren auf HPLC basierende Trennmethoden, die es erlaubten ohne grossen Aufwand einen Lipid- oder Pigmentextrakt in seine wichtigsten Komponenten aufzutrennen und diese gleichzeitig durch die Messung ihrer Absorption zu quantifizieren.

Die Untersuchung des Carotinoidmetabolismus in der Wiesenschwingel-Mutante Bf993 zeigte, dass zusätzlich zum verzögerten Abbau der intrinsischen Thylakoidproteine, der CHL und der plastidären Lipide auch der Abbau der Carotinoide gestört ist. Dies führte zur Hypothese, dass in Bf993 eine reduzierte oder nicht vorhandene "Galaktolipase-Aktivität" dafür verantwortlich war, dass die normalerweise freigesetzten Fettsäuren nicht zur Solubilisierung der Pigment-Protein-Komplexe beitragen können und somit der Abbau dieser Membranbestandteile ebenfalls gestört ist.

Die lipolytischen Eigenschaften in vollentwickelten und seneszenten Gerstenblättern unterschieden sich aber ebensowenig wie die zwischen der Wiesenschwingel-Mutante Bf993 und dem Wildtyp Rossa. Die zusätzliche Charakterisierung der lipolytischen Aktivität in Gerstenblättern zeigte, dass die Eigenschaften dieser Aktivität denen von unspezifischen Acylhydrolasen vergleichbar war. Ausserdem schien die Aktivität nicht in den Chloroplasten lokalisiert zu sein, weshalb sie als mögliche Verantwortliche für den in der Seneszenz stattfindenden Abbau der Galaktolipide kaum mehr in Frage kam.

Hinweis für einen anderen möglichen Abbauweg der plastidären Galaktolipide war ein deutlicher Anstieg des PC-Gehalts im Verlauf der Seneszenz. Dieser beruhte vor allem auf dem steilen Anstieg des 18:3/18:3 PC-Gehalts zurückzuführen und führte im Verlauf der Seneszenz zu einer Angleichung des Fettsäuremusters des PC an das der Galaktolipide, was mit einem Acyltransfer von den Galaktolipiden zum PC erklärt wurde. Dieser Transfer schien aufgrund von Lokalisationsexperimenten, die eine grobe Vorstellung über die subzelluläre Verteilung einzelner PC des gleichen Acylmusters erlaubten, von einem Export der 18:3/18:3 PC in extraplastidäre Kompartimente begleitet zu sein. Zusammenfassend gesehen würde ein solcher Abbauweg auf eine Umkehrung des Biosynthesewegs für "eukaryontische" Galaktolipide hinauslaufen.

Mit der Untersuchung des Gaswechsels von seneszenten Gerstenblattsegmenten konnte gezeigt werden, dass das weitere Schicksal der über PC aus dem Chloroplasten exportierten Acylreste möglicherweise der Abbau über β -Oxidation und Glyoxylatzyklus ist. Ein starker Aktivitätsanstieg der Isozitrattyase- und Malatsynthase-Aktivität, der beiden Leitenzyme des Glyoxylatzyklus, unterstützte diese Hypothese. Obwohl ein endgültiger Beweis für den Abbauweg der

Fettsäuren aus plastidären Membranlipiden über PC, β -Oxidation, Glyoxylatzyklus und möglicherweise Glukoneogenese mittels radioaktiver Markierung nicht erbracht wurde, sprechen vor allem die tiefen Respirationsquotienten für die Präsenz eines solchen Abbauwegs in seneszenten Gerstenblättern.

Summary

It was the aim of this work to investigate pathways of degradation of thylakoidal lipids including carotenoids in senescent leaves of barley and meadow fescue. For this purpose HPLC based separation methods allowing identification as well as quantitation through the integration of absorption at 205 or 430 nm of lipids present in leaf extracts have been developed. The analysis of carotenoids in senescent leaves of *Festuca pratensis* revealed that the yellow pigments are broken down at about the same rate as the chlorophylls. In leaves of a non-yellowing genotype, Bf993, both types of pigments are retained about equally. Since in this genotype the disappearance of glycerolipids is somewhat delayed compared with the wild-type Rossa, it appears that the gene Sid which is responsible for the non-yellowing character of Bf993 affects all classes of lipids present in the thylakoidal pigment-protein complexes. The previous identification of a linolenic acid-dependent oxidative bleaching of chlorophyll associated with the photosystems I and II has led to the hypothesis that the degradation of chlorophyll *in vivo* is a consequence of the production of free fatty acids from thylakoidal galactolipids. It was attempted therefore to demonstrate the existence of senescence-related galactolipase activity in leaves of barley and meadow-fescue. The non-yellowing genotype of *Festuca pratensis* was employed for eventually identifying a galactolipase decisive for chlorophyll degradation. However, in a considerable number of methodological approaches it has not been possible to achieve positive results with regard to senescence-specific galactolipolytic activities. In leaves of *Hordeum vulgare* as well as of *Festuca pratensis* dark-induced senescence is characterized by the rapid loss of the galactolipids MGDG and DGDG. Free linolenic acid, the predominant acyl residue, is not accumulated during the period of galactolipid breakdown. This period is, however, characterized by the transitory increase of phosphatidylcholine content, in particular of the 18:3/18:3 molecular species of PC. These changes of the lipid pattern suggest that in the senescent chloroplast galactolipids are converted to diacylglycerols which, in turn, are phosphocholinated to PC. Preliminary data on the subcellular distribution of PC suggest that the 18:3/18:3 PC produced during senescence is exported from the chloroplasts to cytoplasmic membranes. Thus the proposed pathway of galactolipid breakdown represents the reversal of their biosynthetic pathway. In senescent barley leaves the sharp decline of galactolipids coincides with a marked decrease of the respiratory quotient. The lowest value recorded, 0.63, is considerably lower than theoretical values for the complete respiration of galactolipids. It was hypothesized that β -oxidation of fatty acids in conjugation with gluconeogenesis may be responsible for this phenomenon. Indeed, two key enzymes of the glyoxylic acid cycle, malate-synthetase and isocitrate-lyase appear to be induced in senescent barley leaves. Since all the enzymes of β -oxidation are known to be active in leaf peroxisomes it was concluded that the acyl residues of PC exported from senescent chloroplasts are metabolized in a form of peroxisome which is typical for senescing mesophyll cells. These *peroxy-glyoxysomes* may play an important role in the reuse of carbon and energy which during leaf development the plants invest into thylakoidal galactolipids.