

Pflanzliche Fettsäure-Elongasen als Wirkort von Herbiziden

In a u g u r a l - D i s s e r t a t i o n
zur
Erlangung des Doktorgrades der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Heinrich-Heine Universität Düsseldorf

vorgelegt von
Sandra Trenkamp
aus Lohne

Düsseldorf
2003

Referent: Prof. Dr. W. Martin

Korreferent: Prof. Dr. P. Westhoff

Tag der mündlichen Prüfung: 27.01.2004

1	Einleitung	1
1.1	Der Einsatz von Herbiziden in der Landwirtschaft	1
1.2	Chloracetanilide, Oxyacetamide und andere Wirkstoffe der HRAC-Klassen K ₃ und N	3
1.3	Sehr langkettige Fettsäuren (VLCFAs) und ihre Bedeutung für Pflanzen	5
1.4	Fettsäureelongasen	6
1.5	<i>fiddlehead</i> und andere Organfusionsmutanten	8
1.6	Biosynthese von VLCFAs	10
1.7	Zielsetzung der Arbeit	13
2	Material und Methoden	15
2.1	Abkürzungen	15
2.2	Nukleinsäuren	16
2.2.1	Plasmide	16
2.2.2	Oligonukleotide	16
2.3	Bakterien- und Hefestämme	18
2.4	Pflanzenmaterial und Anzucht	18
2.5	Medien	18
2.5.1	Bakterienmedien	18
2.5.2	Hefemedien	19
2.6	Chemikalien und Enzyme	20
2.6.1	Chemikalien	20
2.6.2	Enzyme	20
2.7	Klonierungen und Plasmidkonstruktionen	20
2.8	Methoden der Präparation und Analyse von Nuklein- und Ribonukleinsäuren	22
2.8.1	Gesamt-RNA-Isolierung	22
2.8.2	cDNA-Synthese	22
2.8.3	PCR	22
2.8.4	Reinigung von Nukleinsäuren	23
2.8.5	Direkte Klonierung von PCR-Produkten	23

2.8.6	Enzymatische Modifikationen	24
2.8.7	Plasmid-DNA Präparation	24
2.8.8	Gelelektrophoretische Trennung von Nukleinsäuren	25
2.8.9	DNA-Sequenzanalyse	25
2.9	Transformation von <i>E. coli</i>	25
2.10	Proteinexpression in <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	25
2.10.1	Herstellung von Träger-DNA	25
2.10.2	Herstellung kompetenter Hefezellen	25
2.10.3	Transformation kompetenter Hefezellen	26
2.10.4	Expressionskulturen von <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	26
2.10.5	Zellaufschluss im analytischen Maßstab	27
2.10.6	Hefemikrosomen/Solubilisierung	27
2.10.7	Plasmid-Minipräparation aus <i>S. cerevisiae</i>	28
2.11	Allgemeine Methoden zur Präparation und Analytik von Proteinen	28
2.11.1	Aufreinigung von 6x Histidin markiertem Protein über Ni-NTA-Agarose	28
2.11.2	Bestimmung der Proteinkonzentration	28
2.11.3	Gelelektrophoretische Trennung von Proteinen	29
2.11.4	Coomassie-Färbung von Proteingelen	29
2.11.5	Western –Blot	29
2.11.6	Immunofärbung eines Western-Blots	30
2.12	Fettsäureanalytik	31
2.13	Bestimmung der Elongase-Aktivität	31
3	Ergebnisse	33
3.1	Klonierung und Expression von Fettsäureelongasen aus <i>Arabidopsis thaliana</i>	33
3.1.1	Zeitabhängigkeit der Expression	36
3.2	Bestimmung der Aktivität der klonierten Elongasen mittels GC/MS	36
3.3	Sequenzanalyse	39
3.4	Untersuchungen zur Substratspezifität	41
3.4.1	Fütterung transgener Hefezellen mit verschiedenen Fettsäuren	41
3.4.2	Koexpression von <i>FAE1</i> und <i>FDH</i>	42
3.5	Untersuchungen zum Wirkmechanismus von K ₃ und N Herbiziden	42

3.5.1	Einfluss von K ₃ und N Herbiziden auf in Hefe exprimierte Elongasen	42
3.5.2	Einfluss der Herbizide auf Hefewachstum und endogene VLCFA-Biosynthese	44
3.5.3	Konzentrationsabhängigkeit der Hemmung	45
3.5.4	Bestimmung von pI ₅₀ -Werten und Dosis-Wirkungskurven	46
3.6	VLCFA-Analyse von <i>Arabidopsis</i> Wildtyp, <i>fiddlehead</i> -Mutante und Flufenacet behandelten Pflanzen	48
3.7	Untersuchungen der Organfusionsmutante <i>adhesion of calyx edges</i> (<i>ace</i> , <i>hothead</i>)	54
3.7.1	Expression des <i>ACE</i> -Gens in <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	58
3.8	Entwicklung eines <i>in vitro</i> Assays zur Aktivitätsbestimmung von <i>FAEI</i>	58
3.8.1	Solubilisierung von <i>FAEI</i>	59
3.8.2	Aufreinigung von <i>FAEI</i> mittels Ni-NTA-Affinitätschromatographie	60
3.8.3	Testprinzip zur Aktivitätsbestimmung der aufgereinigten <i>FAEI</i>	61
3.8.4	Zeitabhängigkeit der <i>FAEI</i> -Reaktion	62
3.8.5	Bestimmung des K _m -Wertes	63
4	Diskussion	66
4.1	Expression von Fettsäureelongasen aus <i>Arabidopsis thaliana</i> in <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	67
4.2	Wirkmechanismus von K ₃ und N Herbiziden	73
4.3	VLCFA-Analyse von <i>Arabidopsis</i> Wildtyp, <i>fiddlehead</i> -Mutante und Flufenacet behandelten Pflanzen	75
4.4	Zusammenhang von VLCFA-Mutanten und der Wirkung von K ₃ und N Herbiziden	77
4.5	VLCFA-Analyse von <i>Arabidopsis</i> Wildtyp und <i>ace</i> -Mutante	79
4.6	Assayentwicklung zur <i>in vitro</i> Aktivitätsbestimmung von <i>FAEI</i>	81
4.6.1	Überlegungen zu einem Elongaseassay: Prinzip und Voraussetzungen	81
4.6.2	<i>in vitro</i> Aktivitätsbestimmung von <i>FAEI</i>	82
5	Zusammenfassung	84
6	Literatur	86

1 Einleitung

1.1 Der Einsatz von Herbiziden in der Landwirtschaft

Pflanzenschutzmittel sind seit mehr als 60 Jahren ein wesentlicher Bestandteil der modernen Landwirtschaft. Ihr Einsatz zielt darauf ab, den Kulturpflanzen ein weitgehend ungestörtes Wachstum zu ermöglichen. Sie verhelfen zu bedeutenden Ertragserhöhungen und sichern den wachsenden Nahrungsbedarf bei zunehmender Weltbevölkerung. Kulturpflanzen sind einer Vielzahl von Umwelteinflüssen, wie Trockenheit, Kälte, Hitze, Hagel oder schädlicher Strahlung ausgesetzt. Zusätzlich zu diesen abiotischen Faktoren können Schädlinge wie Insekten, Pilze und Unkräuter ihren Ertrag sowie ihre Qualität beeinträchtigen. Im Jahr 2001 beliefen sich die weltweiten Ausgaben für Pestizide auf mehr als 25,7 Milliarden Euro. Etwa die Hälfte dieser Summe entfiel auf Herbizide. Unkräuter konkurrieren mit den Kulturpflanzen um die Wachstumsfaktoren Wasser, Nährstoffe und Licht. Unkräuter können zusätzliche Schäden verursachen, indem sie eine Nahrungsgrundlage für Pathogene bilden, den maschinellen Erntevorgang erschweren und zu erheblichen Kostenerhöhungen für die Reinigung des Ernteguts führen. Ohne Unkrautkontrolle können die Ernteerträge bis zum totalen Ausfall verringert werden. Ziel der agrochemischen Industrie ist es, die Belastung von Mensch und Umwelt durch Herbizide möglichst zu minimieren. Eine gute Voraussetzung für die Entwicklung neuer selektiver und effektiver Herbizide ist die Identifizierung der entsprechenden molekularen Wirkorte – der sogenannten Targets .

Bei der industriellen Suche nach neuen herbiziden Wirkstoffen wurde bis vor wenigen Jahren die gesamte Pflanze, die eine komplette Targetbibliothek darstellt, als Testsystem verwendet. Da jedoch die Ansprüche an neue Herbizide hinsichtlich ihrer Umweltverträglichkeit, Selektivität und Effektivität stetig wachsen, wird der Anteil an neuen wirksamen Verbindungen, die es bis zur Marktreife schaffen, immer geringer (Berg *et al.*, 1999). Deshalb war es notwendig, neue Testverfahren zu entwickeln, um den Aufwand und damit die Kosten für ein neues Produkt zu minimieren. Im Hochdurchsatz- bzw. Ultrahochdurchsatzscreening (HTS/UHTS) werden chemische Verbindungen unter Verwendung geringster Mengen (< 1 mg gegenüber > 100 mg für Gewächshausversuche) *in vitro* direkt am Targetenzym auf ihre inhibierende Wirkung getestet. Bis zu 100.000 Verbindungen pro Tag können so geprüft werden. Voraussetzung dafür ist jedoch die Bereitstellung eines Testsystems, eines sogenannten Assays, mit dem sich die Aktivität des betreffenden Enzyms und damit der Einfluss der Prüfsubstanz auf diese bestimmen lässt.

Am Anfang steht dabei die Auswahl eines molekularen Targets. Hierbei sind vor allem Enzyme interessant, die in für die Pflanze essentiellen Stoffwechselwegen aktiv und möglichst pflanzenspezifisch sind, um potentielle Nebenwirkungen auf Mensch und Tier zu minimieren. Die Validierung dieser Targets erfolgt z. B. durch „knock out“-Mutanten, in denen das entsprechende Gen durch Mutagenese oder posttranskriptionales Silencing ausgeschaltet wird. Abb. 1.1 zeigt die Verteilung der unterschiedlichen Wirkorte der angewendeten Herbizide für das Jahr 2001 (Klaus Tietjen, nicht veröffentlichte persönliche Mitteilung).

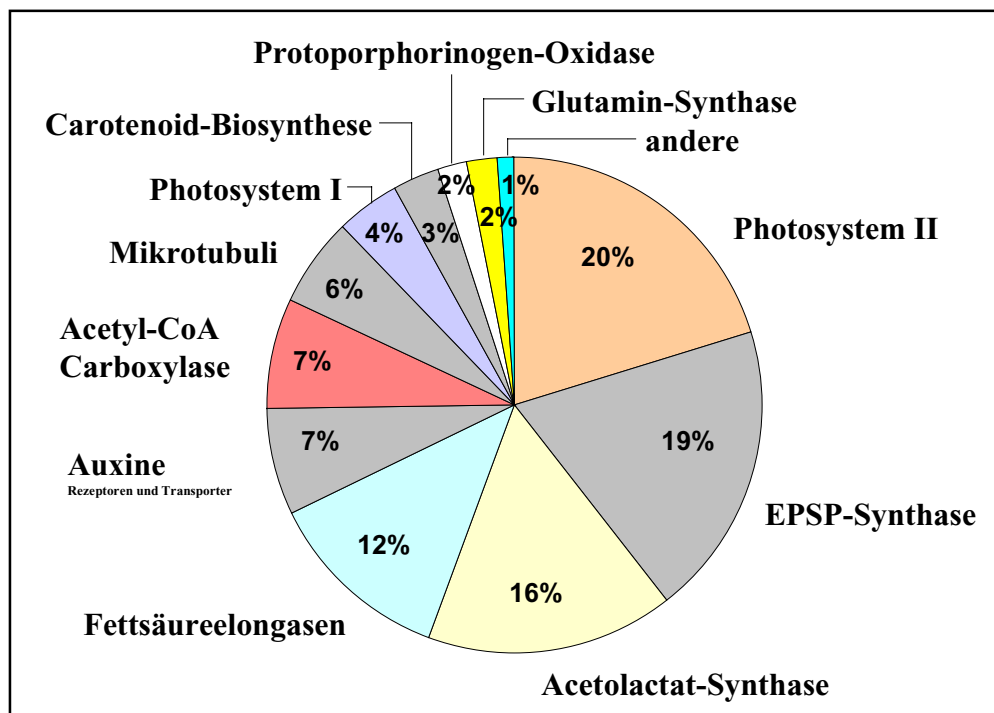


Abb. 1.1: Marktanteile der verschiedenen Wirkorte kommerziell erhältlicher Herbizide für das Jahr 2001 (Klaus Tietjen, nicht veröffentlichte persönliche Mitteilung).

Die Tatsache, dass viele herbizide Produkte, darunter die vier meistverkauften Wirkstoffe Glyphosat, Metolachlor, Atrazin und Paraquat, seit 25 oder mehr Jahren auf dem Markt sind, führt zu der Vermutung, dass ein großes Potenzial für die Entwicklung innovativer Produkte im agrochemischen Markt steckt (Ward & Bernasconi, 1999). Viele der immer noch kommerziell erhältlichen Produkte belasten Mensch und Umwelt durch ihre Nebenwirkungen. Ein weiteres Argument für ein großes Entwicklungspotenzial ist das geringe Targetspektrum der bisher verwendeten herbiziden Wirkstoffe. Unter der Annahme, dass von den ca. 30.000 funktionellen Genen einer Pflanze schätzungsweise 3.000-6.000 Gene mögliche Targets darstellen (Berg *et al.*, 1999), ist mit den bisher rund ein Dutzend verschiedenen Wirkmechanismen, auf denen die angewendeten Herbizide basieren (Abb. 1.1), nur ein kleiner Teil des theoretisch Möglichen erschlossen. Die Brauchbarkeit der

eingeführten Herbizide sinkt zudem aufgrund der Entwicklung von Resistenzen durch deren wiederholte Anwendung.

1.2 Chloracetanilide, Oxyacetamide und andere Wirkstoffe der HRAC-Klassen K₃ und N

Das sogenannte Herbicide Resistance Action Committee (HRAC, <http://plantprotection.org/hrac/>) teilt herbizide Wirkstoffe nach ihren Wirkorten, Wirkmechanismen („modes of action“), Ähnlichkeiten induzierter Symptome oder chemischen Klassen ein. Die Wirkorte fast aller kommerziell erhältlichen Herbizide sind bekannt. Die primären Targets für zwei der wichtigsten Klassen, K₃ und N, sind jedoch bis heute nicht eindeutig identifiziert. Die Herbizide dieser Klassen wurden lediglich anhand der Ähnlichkeiten ihrer induzierten physiologischen Symptome gruppiert. Die Strukturen einiger Vertreter dieser Klassen sind in Abb. 1.2 dargestellt. K₃ Herbizide sind als Inhibitoren der Synthese sehr langkettiger Fettsäuren (Very Long Chain Fatty Acids, VLCFAs), bzw. nach einer älteren Definition als Inhibitoren der Zellteilung beschrieben. Wirkstoffe der Klasse N gelten nach HRAC-Definition als Inhibitoren der Lipid-Synthese. In Abb. 1.1 sind diese Klassen vorläufig unter dem Target Fettsäureelongasen zusammengefasst.

Chloracetamide und Chloracetanilide, herbizide Wirkstoffe der HRAC-Gruppe K₃, werden seit fast 50 Jahren zur Bekämpfung von Gräsern und einigen dikotylen Unkräutern im Pflanzenschutz eingesetzt, ohne dass deren molekulares Target bekannt ist (Hamm, 1974). Die ersten Handelspräparate im Bereich der Chloracetamide, Allidochlor, Propachlor, Alachlor und Butachlor, wurden von der Firma Monsanto auf den Markt gebracht. Chloracetamide und Chloracetanilide werden als Bodenherbizide meist vor dem Auflaufen, in seltenen Fällen auch nach dem Auflaufen der Kultur angewendet. Die Aufnahme erfolgt vornehmlich über die Wurzeln und den keimenden Spross. Durch ihre Anwendung wird die frühe Entwicklung der Pflanzen gehemmt, die morphologischen Wirkungen sind als Verkrümmungen, Stauchungen und Verdrehungen an jungen Blättern erkennbar (Fuerst, 1987, Hock *et al.*, 1995). In den Jahren 1997/1998 machten Chloracetamide bis zu 50 % der eingesetzten Herbizide in Getreide in den USA aus. Trotz ihrer weit verbreiteten Anwendung konnten bislang keine ernsten Resistenzprobleme mit Chloracetamiden in Getreide- und Sojafeldern beobachtet werden (Böger & Matthes, 2002). Ein Handelspräparat aus der Stoffklasse der Oxyacetamide, ebenfalls Herbizide der Klasse K₃, ist Mefenacet. Es ist gegen Gräser, insbesondere Hühnerhirsen wie *Echinochloa crus galli* und *Echinochloa oryzincola*

wirksam und wurde 1995 auf ca. 60 % der Reisfläche Japans angewendet (Hock *et al.*, 1995). Thiolcarbamate, Wirkstoffe der HRAC-Klasse N, werden hauptsächlich über die unterirdischen Sprosssteile von Gräsern aufgenommen. Sie hemmen sowohl die Keimung als auch das anschließende Sprosswachstum. Thiolcarbamate werden in Reis, Getreide, Mais und Zuckerrüben zur Gräserbekämpfung eingesetzt. Triallate wird beispielsweise zur Bekämpfung von Flughafer in Getreide wie Weizen und Gerste in Europa und Kanada verwendet. Dikotyle Pflanzen zeigen bei den in der Landwirtschaft angewendeten Dosierungen keine ausreichende Empfindlichkeit gegenüber Thiolcarbamaten (Hock *et al.*, 1995).

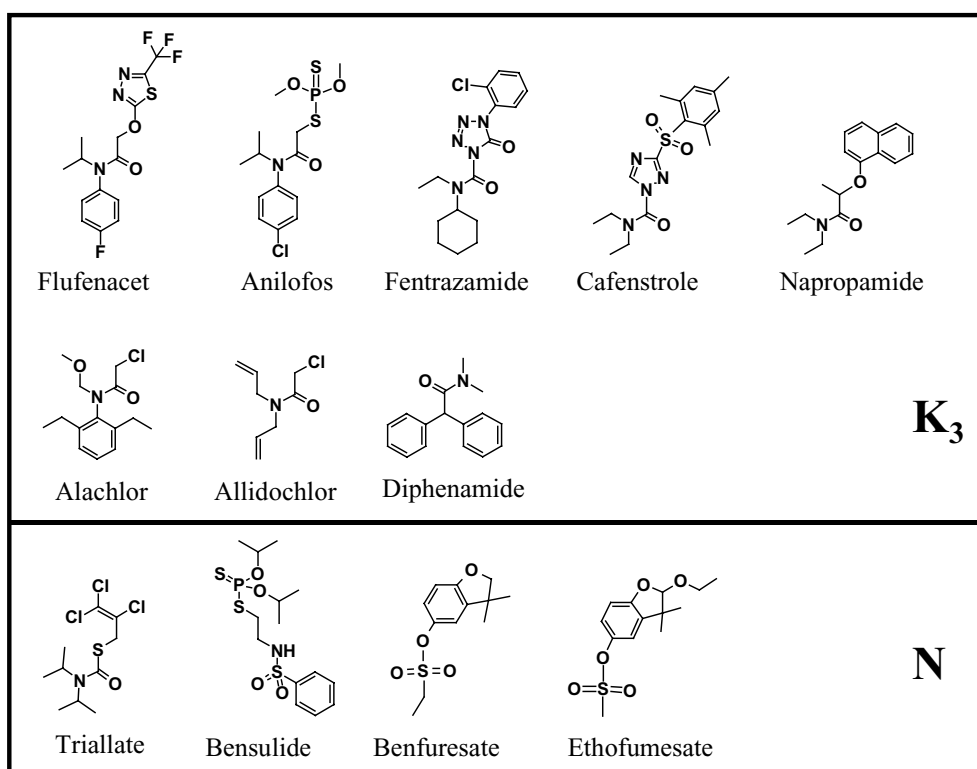


Abb. 1.2: Herbizide der HRAC-Klassen K₃ und N.

Strukturformeln einiger ausgewählter Verbindungen der Herbizidklassen K₃ und N.

Seit vielen Jahren wird die Wirkweise von K₃ und N Herbiziden untersucht. Böger *et al.* (2000) konnten nachweisen, dass die Behandlung mit einigen dieser herbiziden Wirkstoffe in betroffenen Pflanzen und Algen zur Hemmung der Biosynthese von sehr langkettigen Fettsäuren führt. Kürzlich konnte Böger zeigen, dass die in der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* exprimierte Elongase *FAE1* durch das Herbizid Metazachlor gehemmt wird (2003). Bei Bayer Cropscience wurde ein weiterer Hinweis auf die VLCFA-Elongation als Target gefunden. Lechelt-Kunze *et al.* (2003) zeigten, dass die Behandlung mono- und dikotyler Pflanzen mit einigen Herbiziden, die repräsentativ für die Klassen K₃ und N sind, zu phänotypischen Symptomen führt, die stark dem Phänotyp der *Arabidopsis*-Mutante

fiddlehead (fdh) mit einem Defekt in einem putativen VLCFA-Synthese-Gen (Yephremov *et al.*, 1999; Pruitt *et al.*, 2000) ähneln (s. 1.5).

1.3 Sehr langkettige Fettsäuren (VLCFAs) und ihre Bedeutung für Pflanzen

VLCFA-Elongasen sind membranständige Enzyme. Sie katalysieren dort die Synthese von sehr langkettigen Fettsäuren. Das sind laut Definition Fettsäuren mit einer Kettenlänge von über 18, also 20 bis 30 oder mehr C-Atomen. In Pflanzen erfolgt ihre Synthese hauptsächlich in epidermalen Zellen. VLCFAs dienen dort der Bildung von Bestandteilen der Kutikula, wie Kutin, Suberin, epikutikulärem Wachs und anderen Wachsen, die in den Kutin- und Suberinschichten eingelagert sind (Post-Beittenmiller, 1996). Die Kutikula ist eine der primären Zellwand epidermaler Zellen aufgelagerte lipophile Schicht aus Kutin und Wachs (Abb. 1.4), die für die Pflanze essentielle Funktionen erfüllt, indem sie die Diffusion von Wasser und gelösten Stoffen kontrolliert. Sie bietet Schutz vor zu grossem Wasserverlust und somit vor Austrocknung, Schutz vor Schädlingen und reflektiert schädliche Strahlung (Post-Beittenmiller, 1996, Bird & Gray, 2003). Kutin ist ein dreidimensionales Polymer aus veresterten langkettigen Fettsäuren, Hydroxy- und Epoxyfettsäuren und verwandten Verbindungen und Glycerin (Mariani & Wolters-Arts, 2000). Kutin dient als Träger der eingelagerten Wachsfilme, die den Durchtritt hydrophiler Stoffe blockieren. Zusätzlich sind der Kutikula Wachskristalle aufgelagert, die man als epikutikuläres Wachs bezeichnet. Wachs besteht aus einer komplexen Mischung von Alkanen, Alkoholen, Aldehyden, Ketonen und Estern, die allesamt aus langkettigen Fettsäuren abgeleitet sind (Kunst & Samuels, 2003).

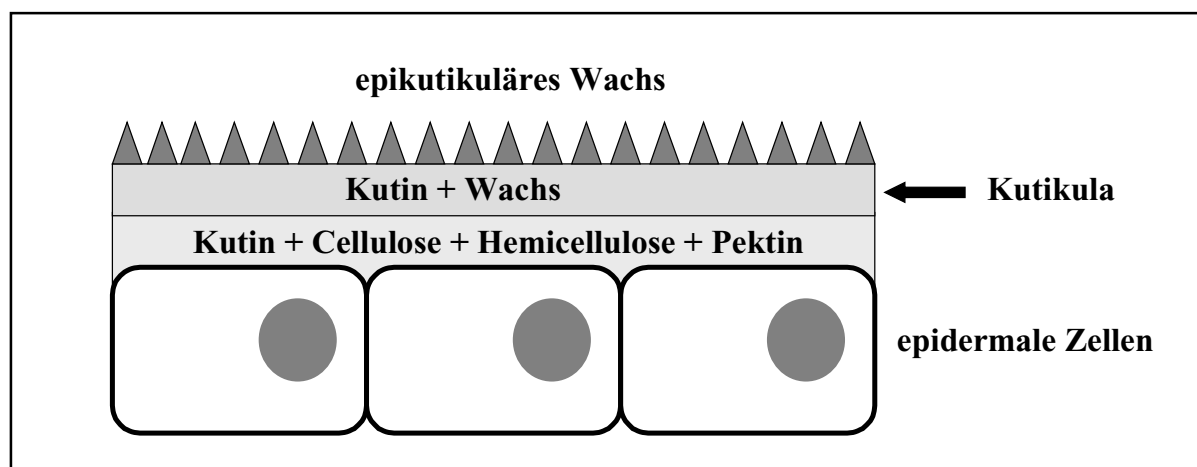


Abb. 1.4: Vereinfacht dargestellter Aufbau der Kutikula.

VLCFAs sind ebenfalls essentielle Bestandteile von Wachsen in der Tryphinschicht (auch Pollenkitt genannt) von Pollen (Mariani *et al.*, 2000). Sie sind für eine korrekte Pollen-Narbe-Erkennung und Befruchtung nötig (Preuss *et al.*, 1993).

Darüber hinaus sind VLCFAs Precursor für andere Wachskomponenten wie Alkane, primäre und sekundäre Alkohole, Aldehyde, Ketone, Acylester usw. In den meisten Pflanzen gibt es zwei prinzipielle Wachsbiosynthesewege (Kunst *et al.*, 2003). Primäre Alkohole und Wachsester werden über den Acyl-Reduktionsweg gebildet, Aldehyde, Alkane, sekundäre Alkohole und Ketone über den Decarbonylierungsweg.

VLCFAs akkumulieren außerdem als Speicherlipide in Samen, wo sie in Triacylglyceride oder Wachsester eingebaut werden (Harwood, 1980). In Pflanzen wie in allen Eukaryoten werden VLCFAs zudem bei der Sphingolipid-Synthese benötigt, speziell für die Synthese von Ceramiden als Bestandteilen von zellulären Membranen (Lynch, 1993), in *Arabidopsis* sind VLCFAs jedoch eher ein geringer Bestandteil von Ceramiden (Uemura *et al.*, 1995).

1.4 Fettsäureelongasen

Dass die Funktionen von VLCFAs wie unter 1.4 beschrieben vielfältig und essentiell sind, äußert sich auch in den Phänotypen der bisher bekannten Fettsäureelongase-Mutanten. Die meisten VLCFA-Elongase-Gene aus *Arabidopsis* wurden jeweils über die entsprechende Mutante identifiziert. Die einzelnen Enzyme unterscheiden sich dabei durch die verschiedenen Gewebe, in denen sie zu unterschiedlichen Zeitpunkten der pflanzlichen Entwicklung exprimiert werden, und ihre unterschiedlichen Substrate und Produkte. *Arabidopsis FAE1* wird in Samen exprimiert und verlängert dort gesättigte und ungesättigte Fettsäuren bis zu einer Kettenlänge von 20 bis 22 C-Atomen. Aufgrund der samenspezifischen Expression von *FAE1*, die nicht essentiell für das Pflanzenwachstum ist, unterscheidet sich der *fae1*-Phänotyp nicht von dem des Wildtyps (James & Dooner, 1990; Kunst *et al.*, 1992; James *et al.*, 1995; Millar & Kunst, 1997). *kcs1*-Mutanten haben im Vergleich zum Wildtyp dünnere Stängel und reagieren empfindlicher auf Trockenheit (Todd *et al.*, 1999). *KCS1* katalysiert die Elongation gesättigter Fettsäuren bis zu einer Kettenlänge von 26-30 C-Atomen für die Wachs-Biosynthese und wird dabei hauptsächlich in Stängeln, Blüten, Kotyledonen und Wurzeln exprimiert. *KCS2* verlängert gesättigte und ungesättigte Fettsäuren bis zu einer Länge von 20-24 C-Atomen. Expressionsorte von *KCS2* sind

ausschließlich sehr junge, sich entwickelnde Blätter und Antheren (Clemens & Kunst, 2001). *CUT1* katalysiert vermutlich die Elongation gesättigter Fettsäuren ab einer Kettenlänge von 24 C-Atomen für die Wachsbiosynthese, die Expression erfolgt in epidermalen Zellen von Stängeln und Schoten (Millar *et al.*, 1999; Kunst *et al.*, 2000). *cut1* Kosuppressions-Pflanzen fehlen die kompletten epikutikulären Wachse der Stängel und Schoten, zudem sind sie konditionell männlich steril (Millar *et al.*, 1999). Es ist jedoch möglich, dass dieser Phänotyp aus der Suppression zweier Gene hervorgeht, da das *CER60*-Gen eine sehr hohe Homologie zu *CUT1* aufweist und somit ebenfalls supprimiert sein könnte (Fiebig *et al.*, 2000). Heterozygote *fiddlehead*-Mutanten weisen Fusionen verschiedener Organe und eine reduzierte Anzahl von Trichomen auf (Lolle *et al.*, 1992), *hic*-Mutanten zeigen eine veränderte Stomatadichte bei erhöhten CO₂-Konzentrationen (Gray *et al.*, 2000). Die von *FDH* und *HIC* katalysierten Reaktionen sind bisher nicht bekannt. Charakterisierte VLCFA-Elongasen aus anderen Pflanzen sind *FAE1* aus *Brassica napus* (Han *et al.*, 2001), *KCS3* aus *Lesquerella fendleri* (Moon *et al.*, 2001), *KCS* aus *Simmondsia chinensis* (Lassner *et al.*, 1996), *ZmKCS1* aus *Zea mays* (Wienand *et al.*, 2000) und *FAE2* aus dem Moos *Marchantia polymorpha* (Kajikawa *et al.*, 2003).

Im *Arabidopsis thaliana*-Genom ist eine große Familie von insgesamt 21 Fettsäureelongase-ähnlichen Genen identifiziert worden (Lechelt-Kunze *et al.*, 2003; Kunst *et al.*, 2003). Auch diese überraschend hohe Anzahl von Elongasen zeigt, dass VLCFAs wichtige Funktionen für die Pflanze erfüllen. Ihre Vielfalt ist vermutlich darauf zurückzuführen, dass verschiedene Elongasen unterschiedliche Substrate in unterschiedlichen Geweben in verschiedenen Entwicklungsstadien der Pflanze verlängern. Einzelne Elongasen unterscheiden sich somit vermutlich in ihrer Substratspezifität bezüglich der Kettenlänge und des Sättigungsgrades der Fettsäuren, in dem Gewebe und dem Entwicklungsstadium, in dem sie aktiv sind. In Tabelle 1.1 sind diesbezügliche Daten, soweit sie bekannt sind, für bisher bekannte Fettsäureelongasen aus *Arabidopsis* wiedergegeben. Die hier beschriebenen Mutationen und ihre phytotoxischen Konsequenzen zeigen das sehr breite Spektrum der Angriffspunkte durch eine Hemmung der VLCFA-Elongation, eine gute Voraussetzung für ein Target.

Tab. 1.1: Bisher charakterisierte Fettsäureelongasen aus *Arabidopsis*, ihre jeweils katalysierte Reaktion, der Expressionsort und die physiologische Funktion der entstandenen Produkte.

<i>Elongase</i>	<i>katalysierte Reaktion</i>	<i>Expressionsort</i>	<i>physiologische Funktion</i>
<i>FAE1</i>	C18:0, C18:1 → C20, C22	Samen	Speicherlipide
<i>KCS1</i>	C18:0, C18:1 → C26-C30	Stängel, Blüte, Wurzeln, Keimblätter	Wachs
<i>KCS2</i>	C16, C18:0, C18:1 → C20-C24	sehr junge Blätter, Antheren	
<i>CUT1</i>	C24 → C26-C30?	Stängel, Schoten	Wachs
<i>HIC</i>		Blätter (Schließzellen)	Regulation der Stomatadichte
<i>FDH</i>		Epidermis (Meristem)	

Sequenzanalysen mit dem Programm BLAST (Altschul *et al.*, 1990) haben gezeigt, dass FAE-artige Elongasen absolut pflanzenspezifisch sind (Lechelt-Kunze *et al.*, 2003). Dies ist eine sehr gute Voraussetzung für ein herbizides Target im Hinblick auf Nebenwirkungen auf Mensch und Umwelt. In Tieren und Pilzen sind es ELO-typische Elongasen, die die Fettsäure-Verlängerung katalysieren (Toke & Martin, 1996; Oh *et al.*, 1997; Dittrich *et al.*, 1998; Parker-Barnes *et al.*, 2000; Schneiter *et al.*, 2000; Moon *et al.*, 2001; Roessler *et al.*, 2003). Deren Sequenzen zeigen keinerlei Homologien zu den pflanzenspezifischen FAE-Elongasen. Pflanzen besitzen ebenfalls ELO-Elongasen, über diese ist jedoch sehr wenig bekannt (Zank *et al.*, 2002, Lechelt-Kunze *et al.*, 2003); VLCFAs aus diesem Biosyntheseweg werden hier vermutlich, wie auch in anderen Eukaryoten, für die Synthese von Sphingolipiden verwendet.

1.5 *fiddlehead* und andere Organfusionsmutanten

1992 wurde eine *Arabidopsis*-Mutante charakterisiert, bei der Fusionen verschiedener Organe, hauptsächlich Fusionen von Blütenorganen, auftreten (Lolle *et al.*, 1992). Generell sind fast alle Organe in der Lage, miteinander zu fusionieren, die Häufigkeit ist dabei abhängig von ihrer Nähe bzw. ihrem Kontakt. Aufgrund der Ähnlichkeit der Form ihrer fusionierten Blüten mit einem Geigenkopf trägt die Mutante den Namen *fiddlehead* (Abb. 1.3). Die Fusionen betreffen ausschließlich epidermale Zellen. Diese haften an ihren periklinalen Zellwänden aneinander. Eine Fusion der Cytoplasmen der betroffenen Zellen findet nicht statt. Obwohl

die epidermalen Zellen in ihren antiklinalen Wänden Plasmodesmata ausbilden, kommt es nicht zu deren Ausbildung zwischen den periklinalen Wänden fusionierter Zellen. Außerdem ist die Zahl der Trichome bei *fdh*-Mutanten stark reduziert.

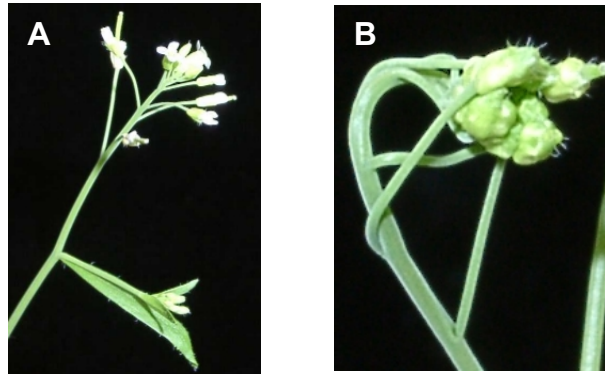


Abb. 1.3: Blüten einer 28 d alten Arabidopsis Wildtyp Pflanze (A) und fiddlehead-Mutante (B)

1999 ist es zwei Arbeitsgruppen fast gleichzeitig gelungen, das für die Mutation verantwortliche Gen zu charakterisieren (Yephremov *et al.*, 1999; Pruitt *et al.*, 2000). Es handelt sich hierbei um eine Gensequenz, die hohe Ähnlichkeit zu Fettsäure-Elongase-Genen aufweist. *FDH* hat übereinstimmend mit den phänotypischen Merkmalen der Mutante eine hohe Expressionsrate in Blüten, relativ geringe bzw. kaum nachweisbare Expression in Blättern und Wurzeln. *FDH*-Transkripte befinden sich in der L1-Schicht von vegetativem und Blütenmeristem, in der daraus hervorgehenden Epidermis, sowie in Trichomen. Aufgrund der Schwierigkeiten, die mit der Solubilisierung und Aufreinigung membranständiger Enzyme verbunden sind, ist eine biochemische Charakterisierung von *FDH* bislang jedoch nicht gelungen, Substrate und Produkte dieses Enzyms sind nicht bekannt.

Außer *fiddlehead* gibt es mindestens 12 weitere *Arabidopsis* Organfusionsmutanten (Krolikowski *et al.*, 2003). *lacerata*-Mutanten (*lcr*) weisen hauptsächlich Fusionen von Rosettenblättern auf, Fusionen der Blütenorgane treten seltener auf. Das *LCR*-Gen kodiert eine Cytochrom P450 Monooxygenase, die die ω -Hydroxylierung von Fettsäuren mit einer Kettenlänge von 12-18 C-Atomen katalysiert (Wellesen *et al.*, 2001). Organfusionen treten bei *hothead*-Mutanten (auch *ace* für *adhesion of calyx edges* genannt) hauptsächlich während der Blütenentwicklung, weniger während des vegetativen Wachstums auf (Lolle *et al.*, 1998). Wie die Mehrzahl von Organfusionsmutanten zeigen auch *hth*-Mutanten eine erhöhte Permeabilität der Kutikula sowie Pollen Hydratation und Keimung von Wildtyp-Pollen auf nicht-reproduktiven Pflanzenorganen (Lolle *et al.*, 1997 und 1998; Krolikowski *et al.*, 2003).

Dass diese Merkmale vermutlich auf veränderte Eigenschaften der Kutikula zurückzuführen sind, zeigt die Expression einer Kutinase aus *Fusarium solani* in *Arabidopsis thaliana* (Sieber *et al.*, 2000). Transgene Pflanzen weisen die gleichen typischen Merkmale von Organfusionsmutanten auf.

Es existieren zwei verschiedene Hypothesen zur Erklärung des Auftretens von Organfusionen. Pruitt *et al.* (2000) gehen davon aus, dass in *fiddlehead*-Mutanten eine Veränderung der Permeabilität der Kutikula dazu führt, dass kleine wasserlösliche Signalmoleküle zwischen den einzelnen Organen ausgetauscht werden können, was die Fusion dieser Organe zur Folge hat (Sinha, 2000). Yephremov *et al.* (1999) dagegen argumentieren, dass, wäre dies der Fall, es bei den vielen bekannten Wachs-Biosynthesemutanten (McNevin *et al.*, 1993; Jenks *et al.*, 1996; Rashotte *et al.*, 2001) öfter zu Organfusionsmutanten kommen müsse. Sie schlagen vor, dass aufgrund nicht auspolymerisierter Bestandteile der Kutikula die epidermalen Zellen der Mutante an ihrer Oberfläche kleine Moleküle besitzen, die in Wildtyp-Zellen nicht exponiert sind. Sie spekulieren weiterhin, dass es sich dabei um Adhäsionsmoleküle ähnlich denen der extrazellulären Matrix von tierischen Zellen handeln könnte. Trotz dieser verschiedenen Theorien stimmen beide Gruppen jedoch in dem Punkt überein, dass der Organfusionsphänotyp auf eine Veränderung der Zusammensetzung der Kutikula zurückzuführen ist.

1.6 Biosynthese von VLCFAs

In Pflanzen findet die *de novo* Fettsäuresynthese im Chloroplasten-Stroma statt (Abb. 1.5). Hier katalysieren 3 verschiedene Fettsäuresynthasen (KASI-KASIII) die Verlängerung von Acetyl-CoA zu Fettsäuren mit einer Kettenlänge von 16-18 C-Atomen (Kreße, 1999). Die wachsende Kette ist dabei an ACP (Acyl Carrier Protein) gebunden.

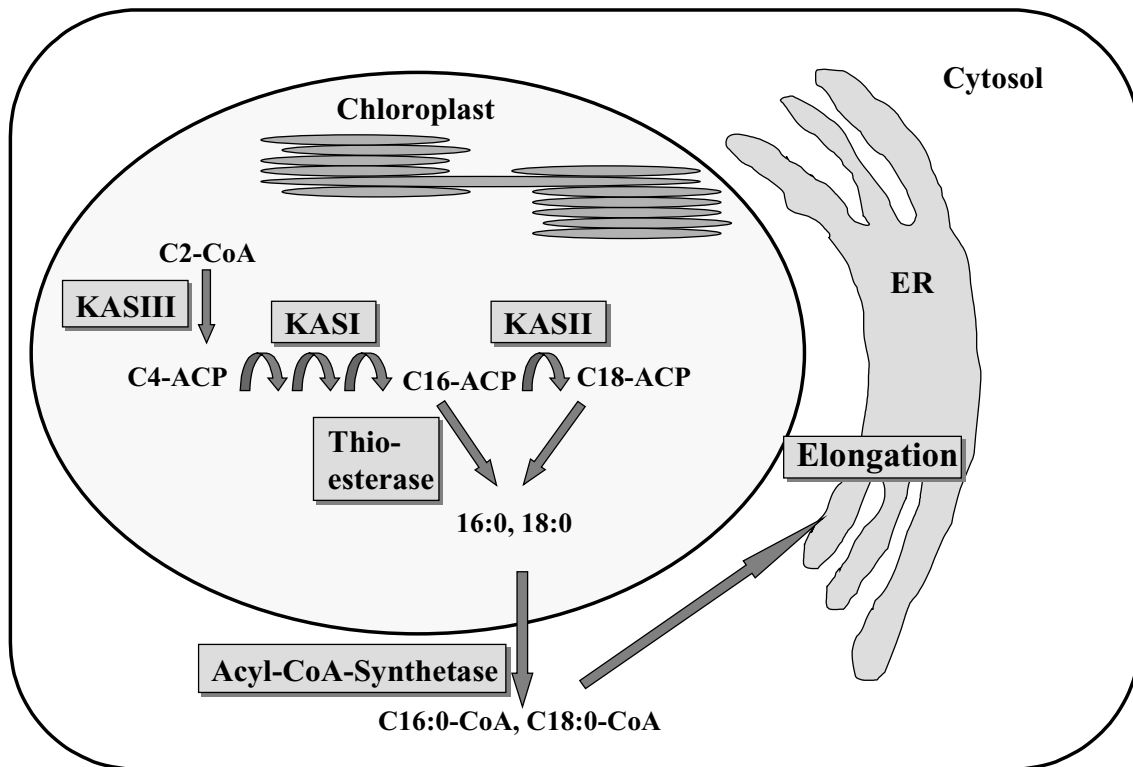


Abb. 1.5: Schematische Darstellung der Fettsäuresynthese innerhalb der Pflanzenzelle.

Der erste Schritt der Fettsäuresynthese besteht in der Übertragung des Acylrestes von Acetyl-CoA auf ein Cystein-SH der 3-Oxoacyl-Synthase-Komponente und des Malonylrestes von Malonyl-CoA auf die zentrale SH-Gruppe der ACP-Komponente des Multienzymkomplexes (Abb. 1.6). Es folgt die Kondensation von Acetyl-ACP mit Malonyl-ACP zu Acetoacetyl-ACP unter gleichzeitiger Decarboxylierung. Dieser Schritt ist irreversibel. Der nächste Schritt besteht in der Reduktion zu β -Hydroxyacyl-ACP unter Verwendung von NADPH, worauf eine Dehydratation zu einem 2,3-ungesättigten Zwischenprodukt (trans-Enoyl-ACP) folgt, das von der Enoyl-Reduktase nochmals reduziert wird, damit aus Acetyl-CoA ein um zwei C-Atome verlängertes Butyryl-ACP entsteht. Dies kann in eine neue Verlängerungsrunde eingespeist werden. Auch bei diesem letzten Reaktionsschritt dient NADPH als Reduktans. Sobald die Verlängerung bis zur Ziellänge beendet ist, spaltet eine Thioesterase das ACP ab, und es entsteht die freie Fettsäure. Beim Austritt aus dem Chloroplasten wird sie von einer Acyl-CoA-Synthetase mit CoA verestert. Die Acyl-CoAs können dann in der Membran des endoplasmatischen Retikulums mit Hilfe der VLCFAEs weiter verlängert werden.

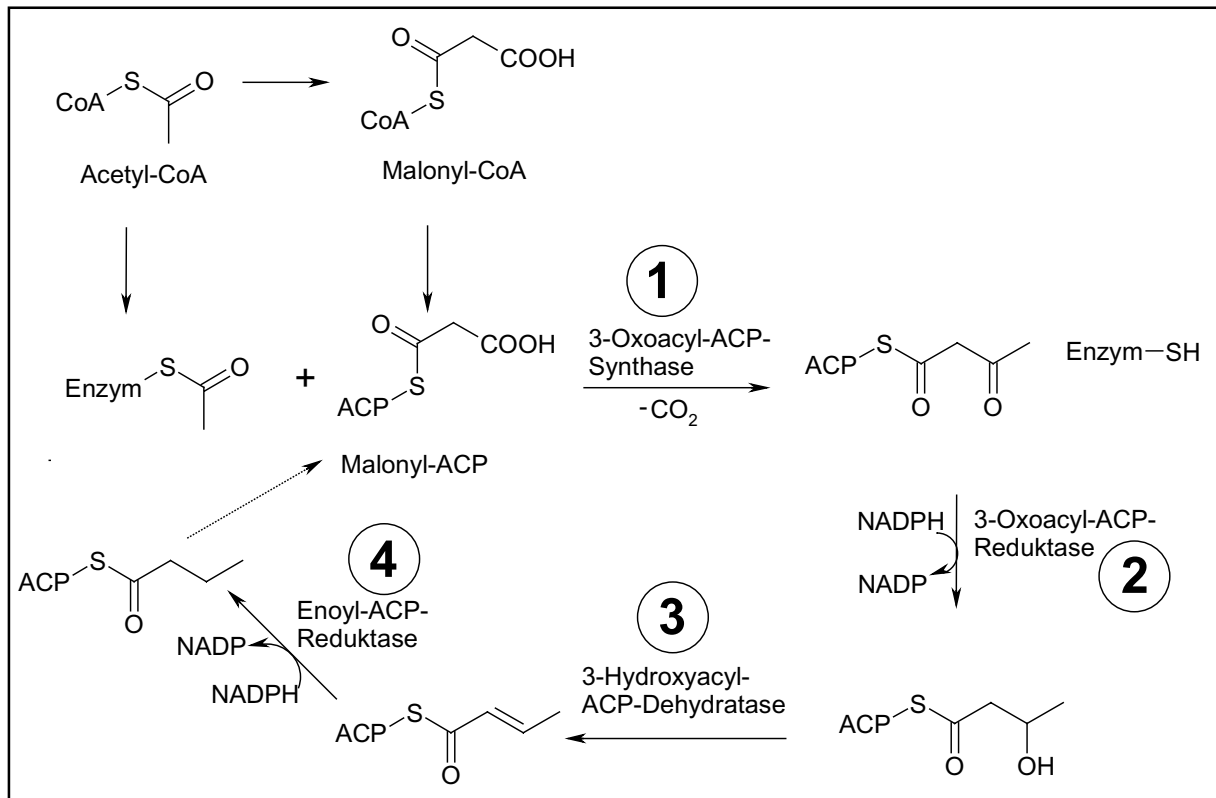


Abb. 1.6: Reaktionsablauf der Fettsäuresynthese. Die einzelnen Reaktionsschritte der Kettenverlängerung sind durch die fortlaufenden Nummern charakterisiert. **1:** Kondensation, **2:** Reduktion, **3:** Dehydratation, **4:** Reduktion

Der Ablauf der Fettsäureelongation entspricht vermutlich im Wesentlichen dem der *de novo* Synthese. Kovalent an Coenzym A gebundene gesättigte oder ungesättigte Fettsäuren mit einer Kettenlänge von 18 C-Atomen kondensieren unter Abspaltung von CO_2 mit Malonyl-CoA zu β -Ketoacyl-CoA, das in den drei folgenden Reaktionen analog zur *de novo* Synthese reduziert, dehydriert und nochmal reduziert wird, bis das um zwei C-Atome verlängerte Acyl-CoA entsteht, das somit eine Kettenlänge von 20 C-Atomen hat (Abb. 1.6). Dieses kann dann den Zyklus erneut durchlaufen (Fehling & Mukherjee, 1991). Die von den Fettsäureelongasen katalysierte Kondensationsreaktion ist hierbei wie bei der *de novo* Fettsäuresynthese der limitierende Schritt. Und die Kondensation ist auch der Schritt, der von den sogenannten Elongasen katalysiert wird (Millar & Kunst, 1997). Die Enzyme, die die drei Folgereaktionen katalysieren, werden wahrscheinlich überall in der Pflanze exprimiert.

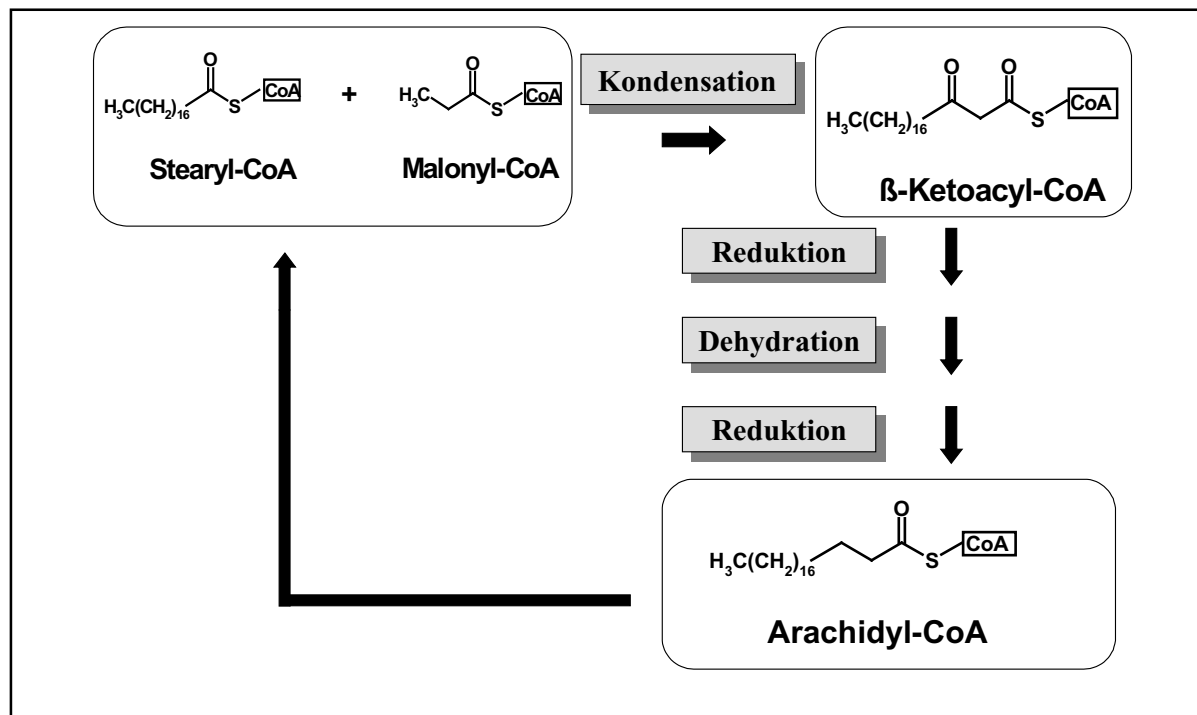


Abb. 1.7: Schematische Abbildung der Schritte der kompletten Fettsäureelongation.

1.7 Zielsetzung der Arbeit

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, den noch immer unbekannten Wirkmechanismus der seit vielen Jahrzehnten im Pflanzenschutz eingesetzten herbiziden Wirkstoffklassen K₃ und N, zu denen Chloracetanilide, Oxyacetamide und Thiolcarbamate gehören, aufzuklären. Aufgrund der Arbeiten von Böger *et al.* (2000 & 2003) und Lechelt-Kunze *et al.* (2003) ist anzunehmen, dass die Wirkung dieser Herbizide auf die Hemmung der Synthese sehr langkettiger Fettsäuren zurückzuführen ist. Obwohl einiges auf den ersten Schritt innerhalb der VLCFA-Biosynthese, der Kondensation von Acyl-CoA mit Malonyl-CoA, als Target hindeutet, konnte bis heute nicht eindeutig gezeigt werden, welche der vier Aktivitäten der VLCFA-Elongation tatsächlich durch K₃ und N Herbizide gehemmt wird. Um diese Frage eindeutig beantworten zu können, wurde das Problem von unterschiedlichen Seiten beleuchtet.

Zum einen sollten verschiedene VLCFA-Elongasen, insbesondere *FIDDLEHEAD*, kloniert und in der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* exprimiert werden. Da die Solubilisierung und Aufreinigung von membrangebundenen Enzymen schwierig ist und im Fall der Fettsäureelongasen zudem Substrate und Produkte ebenfalls unlöslich sind, sollte die Wirkung von K₃ und N Herbiziden auf die jeweilige Elongase zunächst an transgenen Hefezellen untersucht werden. Dabei sollte die Fettsäurezusammensetzung von Zellen, die mit und ohne Herbizid inkubiert wurden, mittels Gaschromatographie/Massenspektrometrie überprüft werden.

Der zweite Ansatz beschäftigt sich mit der Fettsäurezusammensetzung von *Arabidopsis thaliana* Wildtyp-Pflanzen, *fiddlehead*-Mutanten und herbizidbehandelten Pflanzen. Es war zu untersuchen, ob sich die VLCFA-Profile von *fiddlehead*-Mutanten und Pflanzen, die zuvor mit Flufenacet behandelt wurden, ähneln und ob im Vergleich mit dem Wildtyp bestimmte Fettsäuren, die Substrate oder Produkte des mutierten bzw. gehemmten Enzyms darstellen, entweder akkumulieren oder fehlen.

Da VLCFA-Elongasen interessante herbizide Targets darstellen, wäre es wünschenswert, in einem Hochdurchsatz-Screening nach weiteren Inhibitorklassen zu forschen. Hierfür ist die Bereitstellung des entsprechenden Enzyms und eines geeigneten Testsystems notwendig. Deshalb sollte versucht werden, eine der exprimierten VLCFA-Elongasen aufzureinigen und zur Bestimmung ihrer Aktivität einen in großem Maßstab durchführbaren Assay zu entwickeln.

2 Material und Methoden

2.1 Abkürzungen

BCA	Bicinchoninic acid
bp	Basenpaare
cDNA	copy DNA
CoA	Coenzym A
CPM	7-Diethylamino-3-(4'-maleimidylphenyl)-4-methylcoumarin
Da	Dalton
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	desoxyribonucleic acid (Desoxyribonukleinsäure)
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	2'-Desoxyribonukleosid-5'-triphosphat
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EPSP	5-Enolpyrovylshikimat-3-phosphat
FAD	Flavinyladenindinukleotid
FAME	Fatty acid methylester
His	Histidin
HTS	High Troughput Sreening
kb	Kilobasen
MOPS	3-Morpholinopropansulfonsäure
nt	Nukleotide
PCR	polymerase chain reaction (Polymerasekettenreaktion)
RNA	ribonucleic acid (Ribonukleinsäure)
RNase	Ribonuklease
RT	Raumtemperatur
SAP	Shrimp Alkaline Phosphatase
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TE	Tris-EDTA
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
VLCFA	Very long chain fatty acid
YNB	Yeast Nitrogen Base

2.2 Nukleinsäuren

2.2.1 Plasmide

pCR[®]-Blunt II-TOPO[®] (Invitrogen): Dieser Vektor wurde zur direkten Klonierung von PCR-Produkten mittels Topoisomerase I verwendet. Er besitzt ein Kanamycin- und ein Zeocin-Resistenzgen.

pYES2/CT (Invitrogen): Dieser Vektor wurde zur Expression der *Arabidopsis*-Gene in der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* verwendet. Er bietet die Möglichkeit einer C-terminalen Fusion mit dem V5 Epitop, das zur spezifischen Färbung des exprimierten Fusionsproteins mit Antikörpern verwendet werden kann, und einem 6x His-Tag, der ebenfalls zur Detektion mittels Antikörpern, aber auch zur Aufreinigung des rekombinanten Proteins über Affinitätschromatographie dienen kann. Als Selektionsmarker zur Transformation von *E. coli* besitzt dieser Vektor das Ampicillin-Resistenzgen, zur Selektion der transformierten Hefen das URA3-Gen als Auxotrophiemarker. pYES2/CT ist ein sogenanntes „high copy plasmid“, das in einer Kopienzahl von 10-40 pro Zelle vorliegt.

pYES3/CT (Invitrogen): Dieser Vektor unterscheidet sich von dem pYES2/CT-Vektor nur durch den Selektionsmarker für die Hefe (TRP1 für pYES3/CT) und wurde verwendet, um zwei Gene gleichzeitig in einem Klon zu exprimieren.

2.2.2 Oligonukleotide

Oligonukleotide für sämtliche PCR-Reaktionen wurden von der Firma Sigma-ARK in lyophilisierter Form bezogen. Sie wurden zu einer Konzentration von 100 µM in H₂O dest. gelöst und zur Aufbewahrung bei –20 °C gelagert. Die in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide sind in folgender Tabelle dargestellt.

Tab. 2.1: Oligonukleotide zur Amplifikation von Genen bzw. Genfragmenten mittels PCR. Restriktionsschnittstellen sind unterstrichen, Translationsstartcodons fettgedruckt.

Bezeichnung	Sequenz (5'→3')	Gen	Schnittstelle
cutaspf	<u>GGTACC</u> AT GCCTCAGGCAC	CUT1	<i>Asp</i> 718 I
cutxbar	<u>TCTAGAG</u> AGTTTGACAACCTCG	CUT1	<i>Xba</i> I
kcsaspf	<u>GGTACC</u> AT GGATCGAGAGAGATTAACG	KCS1	<i>Asp</i> 718 I
kcsxhor	<u>CTCGAG</u> TTGCACAACCTTAACC	KCS1	<i>Xho</i> I
fae3aspf	<u>GGTACC</u> AT GGATGTAGAGC	At2g26640	<i>Asp</i> 718 I
fae3xbar	<u>TCTAGAG</u> ATTGTGGAGACC	At2g26640	<i>Xba</i> I

2 Material und Methoden

fae4aspf	<u>GGTACC</u> ATGAGCCATAACC	At5g43760	<i>Asp</i> 718 I
fae4xbar	<u>TCTAGAC</u> GACGATGTAATGG	At5g43760	<i>Xba</i> I
fae5aspf	<u>GGTACC</u> ATGGACGGTGCCGGAG	At1g19440	<i>Asp</i> 718 I
fae5ecor	<u>GAATTC</u> AATAACTTAAAGTTACCGGATAC	At1g19440	<i>Eco</i> RI
fae6aspf	<u>GGATCC</u> ATGGAAGCTGCTAATG	At2g16280	<i>Asp</i> 718 I
fae6xbar	<u>TCTAGAGA</u> AGTCGAGCTTAACC	At2g16280	<i>Xba</i> I
fae7aspf	<u>GGTACC</u> ATGGATGCTAATGG	KCS2	<i>Asp</i> 718 I
fae7xhor	<u>CTCGAGA</u> AAGATCGATCTTAACC	KCS2	<i>Xho</i> I
fae8aspf	<u>GGTACC</u> ATGGTTTTCTTCAAG	At2g15090	<i>Asp</i> 718 I
fae8xhor	<u>CTCGAGA</u> AATATCAATCTCAACC	At2g15090	<i>Xho</i> I
fae9aspf	<u>GGTACC</u> ATGGAAAAAGAGGCAAC	At3g52160	<i>Asp</i> 718 I
fae9xhor	<u>CTCGAGG</u> AGATTCCATGGGTTG	At3g52160	<i>Xho</i> I
fae10aspf	<u>GGTACC</u> ATGAATCAAACGATAC	At5g49070	<i>Asp</i> 718 I
fae10xbar	<u>TCTAGAGC</u> CTGGTCTGATATTTG	At5g49070	<i>Xba</i> I
fae11aspf	<u>GGTACC</u> ATGGAATCGAGCTTTC	At1g71160	<i>Asp</i> 718 I
fae11xbar	<u>TCTAGA</u> AGAAAGAAGCTCTGTCTTC	At1g71160	<i>Xba</i> I
fae12aspf	<u>GGTACC</u> ATGGATCTTCTCTTTC	At2g28630	<i>Asp</i> 718 I
fae12xbar	<u>TCTAGAC</u> ATGAAAGCGTCAGG	At2g28630	<i>Xba</i> I
fae13aspf	<u>GGTACC</u> ATGGAGCTCTTCTCAC	At5g04530	<i>Asp</i> 718 I
fae13xbar	<u>TCTAGA</u> ATCAACACGAACGAAGD	At5g04530	<i>Xba</i> I
fae14aspf	<u>GGTACC</u> ATGGATCTTCTTGTATGC	At1g07720	<i>Asp</i> 718 I
fae14xbar	<u>TCTAGAC</u> ATAAATCCTTCGGGCATC	At1g07720	<i>Xba</i> I
fae15aspf	<u>GGTACC</u> ATGTTCAATGCAATGG	At3g10280	<i>Asp</i> 718 I
fae15xbar	<u>TCTAGAG</u> GTCACTGAACTGGATAC	At3g10280	<i>Xba</i> I
fae16aspf	<u>GGTACC</u> ATGAATGAGAATCAC	At1g04220	<i>Asp</i> 718 I
fae16xbar	<u>TCTAGAT</u> CGAGATTCCGAGG	At1g04220	<i>Xba</i> I
fae17aspf	<u>GGTACC</u> ATGTCTGATTTCTCG	CER60	<i>Asp</i> 718 I
fae17xbar	<u>TCTAGAT</u> AGTTTAACAACTTCAGG	CER60	<i>Xba</i> I
fae18aspf	<u>GGTACC</u> ATGGATTACCCCATGAAG	At4g34250	<i>Asp</i> 718 I
fae18xhor	<u>CTCGAG</u> CTCTTTTAAATCTATATCGATC	At4g34250	<i>Xho</i> I
hicfullf	AT <u>GGTACC</u> ATGTTCAATGCAATGGC	HIC	<i>Asp</i> 718 I
hicfullhisr	ATT <u>TCTAGAG</u> GTCACTGAACTGGATAC	HIC	<i>Xba</i> I
fidffull	TATAG <u>GTACC</u> ATGGGTAGATCCAACG	FDH	<i>Asp</i> 718 I
fidfot	TATAG <u>GTACC</u> ATGTCTCGTCCTCGC	FDH	<i>Asp</i> 718 I
fidrstop	TAT <u>TCTAGAT</u> TAGAGAGGCACAGGGTAA	FDH	<i>Xba</i> I
fidrhis	TAT <u>TCTAGAG</u> AGAGGCACAGGGTAA	FDH	<i>Xba</i> I
faeullf	AT <u>GGTACC</u> ATGACGTCCGTTAACGTCC	FAE1	<i>Asp</i> 718 I
faeotf	<u>GGTACC</u> ATGCGTTCTGTTTATCTCGTTGAC	FAE1	<i>Asp</i> 718 I
faeullxhor	TACT <u>CGAGG</u> GACCGACCGTTTTGGAC	FAE1	<i>Xho</i> I

2.3 Bakterien- und Hefestämme

***E. coli* XL 10-Gold[®]** (Stratagene): Tet^R (*mcrA*) 183 (*mcrCB-hsdSMR-mrr*) 173 *endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac* Hte [F' *proAB lacI^f* Z M15 Tn10 (Tet^R) Amy Cam^R]*. Dieser Stamm wurde zur Klonierung der *Arabidopsis*-Gene in die pYES-Vektoren (s. 2.2.1) verwendet.

***E.coli* TOP10** (Invitrogen): F⁻ *mcrA* (*mrr-hsdRMS-mcrBC*) Φ 80*lacZ* M15 *lacX74 deoR recA1 araD139 (ara-leu)7697 galU galK rpsL* (Str^R) *endA1 nupG*. Der Stamm wurde standardmäßig für die Transformation von PCR-Produkten im pCR[®]-Blunt II-TOPO[®]-Vektor benutzt.

***S. cerevisiae* INVSc1** (Invitrogen): *his3 Δ 1/his3 Δ 1 leu2/leu2 trp1-289/trp1-289 ura3-52/ura3-52*. Zur heterologen Expression der *Arabidopsis*-Gene wurde der Hefestamm INVSc1 verwendet. INVSc1 ist ein diploider Stamm, der auxotroph für Histidin, Leucin, Tryptophan und Uracil ist.

2.4 Pflanzenmaterial und Anzucht

Arabidopsis thaliana (L) Heynhoe cv Columbia (Col-0) der Firma Lehle Seeds (Texas, USA) und Transposon-induzierte *Arabidopsis fiddlehead*-Mutanten (Samen wurden freundlicherweise von A. Yephremov, MPI für Züchtungsforschung, Köln, zur Verfügung gestellt) wurden im Gewächshaus bei 22 °C und maximal 15000 Lux kultiviert.

2.5 Medien

2.5.1 Bakterienmedien

LB-Medium wurde zur Anzucht von *E. coli* bei 37 °C verwendet.

Bacto-Trypton	10 g/l
Hefeextrakt	5 g/l
NaCl	5 g/l
pH 7,5	

Für die Herstellung von Agarplatten wurden 15 g/l Agar zugegeben. Nach Bedarf wurden nach dem Autoklavieren folgende sterilfiltrierte Antibiotika zugefügt:

Tab. 2.2: Antibiotikakonzentrationen

<i>Antibiotikum</i>	<i>Endkonzentration</i>
Blasticidin	100 µg/ml
Carbenicillin	100 µg/ml
Kanamycin	30 µg/ml

SOC-Medium wurde zur Regeneration der *E. coli*-Zellen nach dem Hitzeschock während der Transformation verwendet.

Trypton	2 %
Hefeextrakt	0,5 %
NaCl	10 mM
KCl	2,5 mM
MgCl ₂	10 mM
MgSO ₄	10 mM
Glucose	20 mM

2.5.2 Hefemedien

SC-Minimalmedium wurde für die selektive Anzucht transgener *S. cerevisiae*-Zellen verwendet.

Yeast Nitrogen Base 6,7 g/l

Yeast Synthetic Dropout Medium Supplements Without Uracil (Tryptophan) 1,92 g/l

Glukose 2 %

Das oben beschriebene Medium dient der Anzucht transgener Hefezellen. Für die Herstellung von Medium zur Induktion der Proteinexpression in diesen Zellen werden statt Glukose 2 % Galaktose und 1 % Raffinose verwendet. Für die Herstellung von Agarplatten werden 20 g/l Agar zugegeben.

YPAD-Medium ist ein Hefevollmedium und wurde für die Herstellung kompetenter Hefezellen verwendet.

Hefeextrakt	10 g/l
Pepton	20 g/l
Glukose	20 g/l
Adenin	40 mg/l

2.6 Chemikalien und Enzyme

2.6.1 Chemikalien

Soweit nicht anders angegeben wurden alle Chemikalien bei den Firmen Sigma oder Merck bezogen.

Agar	Difco
Agarose	Biozym
Coomassie Brilliant Blue	LKB
CPM	Molecular Probes
di-Natriumhydrogenphosphat-12-hydrat	Riedel-de-Haen
Heptan	Fluka
Kanamycin	Serva
Natrium-di-hydrogenphosphat	Riedel-de-Haen
Natriumdodecylsulfat	Serva
PEG 1000	Aldrich
Rinderserumalbumin (BSA)	Fluka
Salzsäure 37 %	Riedel-de-Haen
Triton X 100	Serva

2.6.2 Enzyme

Pfu Turbo [®] DNA Polymerase	Stratagene
Quick T4 DNA Ligase (Quick Ligation Kit)	New England Biolabs
Restriktionsendonukleasen	Roche
Shrimp alkaline posphatase	USB

2.7 Klonierungen und Plasmidkonstruktionen

Anhand der bekannten Sequenz der Elongase *FAE1* (James *et al.*, 1995) wurde mit Hilfe des Programmes BLAST (Altschul *et al.*, 1990) in der TIGR (The Institute for Genomic Research) *Arabidopsis thaliana* Datenbank (<http://www.tigr.org/tdb/e2k1/ath1/ath1.shtml>) nach weiteren Elongasen gesucht. Zusammen mit *FAE1* und *FIDDLEHEAD* wurden insgesamt 21 Sequenzen mit hoher Homologie (E-Wert: $2,2e^{-152}$ – $8,8e^{-71}$) gefunden, die putative bzw. bereits charakterisierte Elongasen darstellen. Sie sind in der Tabelle 2.3 aufgelistet:

Tab. 2.3: Putative und charakterisierte Elongasen aus *Arabidopsis thaliana*.

<i>A. thaliana</i> Chromosom Lokus*	Name
At1g68530	CUT1/CER6
At2g26250	FDH
At2g46720	HIC
At1g01120	KCS1
At4g34520	FAE1
At2g26640	
At5g43760	
At1g19440	
At2g16280	
At4g34510	KCS2
At2g15090	
At3g52160	
At5g49070	
At1g71160	
At2g28630	
At5g04530	
At1g07720	
At3g10280	
At1g04220	
At1g25450	CER60
At4g34250	CUT1

*Release 4.0 der *Arabidopsis* Genom Annotation TIGR Datenbank

(<http://www.tigr.org/tdb/e2k1/ath1/ath1.shtml>)

Zur Klonierung der 21 Elongasen wurden diese jeweils mit den entsprechenden Oligonukleotiden (s. Tab. 2.1) aus einer *Arabidopsis thaliana* cDNA (s. 2.8.2) mittels PCR (s. 2.8.3) amplifiziert und in den pCR[®]-Blunt II-TOPO[®]-Vektor (s. 2.8.5) subkloniert. Durch die Wahl der Oligonukleotide wurden die jeweiligen Restriktionsschnittstellen eingefügt. Anschließend wurden die Gene mit den entsprechenden Restriktionsendonukleasen aus dem TOPO-Vektor geschnitten, mittels Gelextraktion (2.8.4) aufgereinigt und in den mit den gleichen Enzymen geschnittenen und dephosphorylierten Hefe-Expressionsvektor pYES2/CT (bzw. pYES3/CT) ligiert (s. 2.8.6.2). Alle Gene wurden mit einer C-terminalen Fusion mit einem 6x Histidin-Tag, der eine spätere Immunodetektion und Aufreinigung des exprimierten Proteins ermöglicht, kloniert. Das *FIDDLEHEAD*-Gen wurde mit den Oligonukleotiden fidffull und fidrstop zusätzlich ohne His-Tag kloniert.

Mit dem Programm DAS (Cserzo *et al.*, 1997, <http://www.sbc.su.se/~miklos/DAS/>) wurde die Lage der Transmembrandomänen von *FAE1* und *FIDDLEHEAD* abgeschätzt, um die beiden Proteine verkürzt um die jeweiligen Transmembrandomänen eventuell in löslicher Form zu exprimieren. Dazu wurden die Oligonukleotide faeotf und faefullxhor für *FAE1* und fidfot und fidrhis für *FIDDLEHEAD* konstruiert. *FAE1* wurde damit N-terminal um 76 Aminosäuren verkürzt exprimiert, wobei statt dessen am N-Terminus ein Methionin-, Arginin- und Serinrest eingefügt wurden, *FIDDLEHEAD* wurde um 115 Aminosäuren reduziert, hier wurde am N-Terminus ein Methioninrest als Translationsstart eingefügt.

2.8 Methoden der Präparation und Analyse von Nuklein- und Ribonukleinsäuren

2.8.1 Gesamt-RNA-Isolierung

Die Isolierung der gesamt-RNA aus 4 Wochen alten *Arabidopsis thaliana*-Pflanzen erfolgte mit dem *RNeasy Plant Mini Kit* der Firma Qiagen gemäß den Herstellerangaben. Hierbei wird das Pflanzenmaterial zunächst in einem Guanidin-Isothiocyanat enthaltenden Puffer, der sofort RNasen inaktiviert, lysiert und homogenisiert. Zur Bindung der RNA wird eine Silika-Gel Membran eingesetzt. RNA-Stränge ab einer Gesamtlänge größer als 200 nt werden bei dieser Prozedur isoliert.

2.8.2 cDNA-Synthese

Die zu klonierenden *Arabidopsis*-Gene wurden zunächst von einem cDNA-Einzelstrang amplifiziert. Die Synthese der cDNA aus aufgereinigter RNA erfolgte mit dem *First-Strand cDNA Synthesis Kit* der Firma Amersham Pharmacia Biotech nach Herstellerangaben. Die Erststrangsynthese wird dabei von der Moloney Murine Leukemia Virus (M-MuLV) reversen Transkriptase unter Verwendung eines Thymin-Oligonukleotids (Not I-d(T)₁₈) katalysiert. Die entstandenen RNA:cDNA Doppelstränge wurden direkt für die Amplifikation mittels PCR verwendet.

2.8.3 PCR

Mit dem Verfahren der PCR (Saiki *et al.* 1988) ist es möglich, geringste Mengen bestimmter Nukleotidsequenzen enzymatisch zu amplifizieren. Die Vorgänge bei der PCR ähneln dem Reaktionsablauf der natürlichen Replikation. Dabei synthetisiert eine hitzestabile DNA-

Polymerase von einem synthetischen Oligonukleotid (Primer) aus einen neuen Strang an einer einzelsträngigen DNA-Matrize. Durch die Wahl eines gegenläufig orientierten Primerpaares kann gezielt die DNA-Sequenz zwischen den beiden Primern vervielfältigt werden.

Zur Amplifikation der Arabidopsis-Gene aus den während der cDNA-Synthese produzierten RNA:cDNA Doppelsträngen wurde die Pfu Turbo DNA Polymerase der Firma Stratagene gemäß den Herstellerangaben verwendet. Primer wurden in einer Endkonzentration von 4 µM eingesetzt, pro PCR-Ansatz wurden 100 ng cDNA verwendet. Die PCR wurde mit folgendem Temperaturprogramm im Mastercycler Gradient der Firma Eppendorf durchgeführt, wobei die Anlagerungstemperatur der Primer mit dem Programm Oligo Calculator (<http://www.microbiology.adelaide.edu.au/learn/oligcalc.htm>) berechnet wurde:

Denaturierung	95 °C für 60 s	} 30 Zyklen
Denaturierung	95 °C für 15 s	
Anlagerung	50-65 °C für 30 s	
Synthese	72 °C für 60 s pro kb	
Auffüllreaktionen	72 °C für 10 min	

2.8.4 Reinigung von Nukleinsäuren

Die Reinigung und Aufkonzentration von Nukleinsäuren erfolgte entweder durch Ethanolfällung (Sambrook *et al.* 1989) oder mit Hilfe des *QIAquick PCR Purification Kit* der Firma Qiagen. Prinzip dieses Systems ist die Adsorption der DNA an eine Silika-Gel Membran in Gegenwart hoher Salzkonzentrationen, während Verunreinigungen die Säule passieren. Zur Extraktion von DNA aus Agarose-Gelen wurde das *NucleoSpin® Extract 2 in 1 Kit* der Firma Macherey-Nagel verwendet. DNA-Moleküle werden dabei ebenfalls in Gegenwart hoher Salzkonzentration an eine Silika-Membran gebunden. Verunreinigungen wie Agarose, Ethidiumbromid etc. werden während der Waschschrte entfernt.

2.8.5 Direkte Klonierung von PCR-Produkten

Für die direkte Klonierung von PCR-Produkten wurde der pCR®-Blunt II-TOPO-Vektor der Firma Invitrogen verwendet. Dieser kommerziell erhältliche Vektor wird linearisiert geliefert mit einer kovalent an seine 3'-Enden gebundenen Topoisomerase I aus dem *Vaccinia* Virus. Diese Topoisomerase I besitzt eine zusätzliche Ligaseaktivität, die es ermöglicht, PCR-

Produkte innerhalb von 5 min bei Raumtemperatur mit dem pCR[®]-Blunt II-TOPO-Vektor zu ligieren. Zusätzlich erlaubt dieser Vektor die direkte Selektion rekombinanter Klone durch die Ligation in das für *E. coli* letale *ccdB*-Gen (Bernard *et al.*, 1994). Zellen, die den nicht-rekombinanten Vektor enthalten, sterben somit ab. Die Anwendung erfolgte nach den Herstellerangaben.

2.8.6 Enzymatische Modifikationen

2.8.6.1 Restriktionsspaltung

Die jeweilige Restriktionsspaltung wurde nach Herstellerangaben mit dem passenden Puffer angesetzt. Eine Unit Enzym schneidet 1 µg DNA im korrekten Puffer bei optimaler Temperatur (meist 37 °C) innerhalb von 60 min. Die meisten Restriktionsendonukleasen können nach der Spaltung durch eine Erhitzung des Ansatzes für 20 min auf 65 °C inaktiviert werden.

2.8.6.2 Ligation

Um die zu klonierende DNA mit dem gewünschten Vektor zu verknüpfen, wurde das *Quick Ligation Kit* der Firma NEB gemäß den Herstellerangaben verwendet. Die aus mit dem Bakteriophagen T4 infizierten *E. coli*-Zellen gewonnene T4 Ligase katalysiert die Bildung von Phosphodiesterbindungen zwischen benachbarten 3'-Hydroxy- und 5'-Phosphat-Enden doppelsträngiger DNA unter ATP-Hydrolyse (Weiss *et al.* 1968).

2.8.6.3 Dephosphorylierung

Die Dephosphorylierung wurde mit Hilfe des von der Firma USB vertriebenen Enzyms *shrimp alkaline phosphatase* (SAP) aus der Garnele *P. borealis* nach Herstellerangaben durchgeführt.

2.8.7 Plasmid-DNA Präparation

Für die Isolierung und Aufreinigung von Plasmid-DNA aus *E. coli*-Zellen wurde das *NucleoSpin® Plasmid Kit* der Firma Macherey-Nagel verwendet. Das System basiert auf dem Verfahren der alkalischen Lyse (Birnboim *et al.*, 1979) von Bakterien mit anschließender Bindung der DNA an eine Silika-Membran.

2.8.8 Gelelektrophoretische Trennung von Nukleinsäuren

Für die Elektrophorese von DNA wurden in dieser Arbeit 0,8 %ige (w/v) Agarosegele verwendet. Hiermit lassen sich lineare DNA-Fragmente von ca. 0,5-10 kb Länge auftrennen (Sambrook *et al.*, 1989). Das Gel wurde dazu in eine Elektrophoresekammer mit TAE-Puffer (1 l 50-fache Stammlösung: 242 g Tris base, 57,1 ml Eisessig, 100 ml 0,5 M EDTA, pH 8) gegeben, die DNA-Lösung in die Taschen pipettiert und eine Spannung von 100-200 V je nach Gelgröße angelegt. Die Färbung der DNA erfolgte für ca. 20 min in einem Ethidiumbromid-Färbebad (1,25 µg/ml). Anschließend wurden die DNA-Banden unter UV-Licht sichtbar gemacht und mit der Geldokumentationsanlage fotografiert.

2.8.9 DNA-Sequenzanalyse

Die Sequenzierung von Expressionskonstrukten wurde von der Firma GATC durchgeführt.

2.9 Transformation von *E. coli*

Für die Transformation wurden kommerziell erhältliche kompetente *E. coli*-Zellen der Firmen Invitrogen (Stamm TOP10) und Stratagene (SoloPack® Gold competent cells) verwendet. Die Transformation erfolgte jeweils nach Angaben des Herstellers.

2.10 Proteinexpression in *Saccharomyces cerevisiae*

2.10.1 Herstellung von Träger-DNA

Für die Transformation von Hefezellen wurde zusätzlich zu der zu transformierenden DNA Lachshoden-DNA als Träger-DNA dazugegeben. Dies steigert die Transformationseffizienz um ein Vielfaches. Dazu wurde hochmolekulare DNA aus Lachshoden (Sigma) in TE-Puffer (10 mM Tris-HCl pH 7,5; 1 mM EDTA pH 8,0) zu einer Konzentration von 10 mg/ml über Nacht bei 4 °C gelöst. Die Größe der Fragmente wurde auf einem Agarosegel überprüft. Zur weiteren Verwendung sollte die Fragmentgröße im Bereich zwischen 1 und 15 kb mit einem Durchschnitt von 7 kb liegen. Zur Zerkleinerung kann die DNA mittels Ultraschall für 6 mal 5 s behandelt werden.

2.10.2 Herstellung kompetenter Hefezellen

Die Herstellung kompetenter Hefezellen und die anschließende Transformation erfolgten nach der Methode von Dohmen *et al.* (1991). 10 ml YPAD-Medium wurden mit dem zu transformierenden Stamm angeimpft und über Nacht bei 27-30 °C im Schüttler inkubiert. Mit

dieser Kultur wurden 200 ml YPAD-Medium zu einer OD_{600} von 0,1 angeimpft (1 - 1,5 ml Kultur) und bis zu einer OD_{600} von 1 bei 30 °C im Schüttler inkubiert. Die Zellen wurden dann bei 1800x g in der Untertischzentrifuge für 5 min abzentrifugiert. Das Pellet wurde in 2 ml Lösung A (10 mM Bicine, pH 8,35 (das Einstellen des pH-Wertes erfolgt mit 1N KOH), 1 M Sorbitol, 3% Ethylenglycol) resuspendiert und zu 200 µl in sterile Reaktionsgefäße aliquotiert. Die kompetenten Zellen wurden bis zur ersten Transformation mindestens 12 h bei – 80 °C gelagert und so mehrere Monate aufbewahrt.

2.10.3 Transformation kompetenter Hefezellen

Vor der Transformation wurde die Träger-DNA (s. 3.3.1) für 10 min bei 95 °C denaturiert und anschließend bis zur Zugabe auf Eis gelagert. Die kompetenten bei – 80 °C aufbewahrten Hefezellen wurden auf Eis gestellt und zügig erst 50 µg Träger-DNA (5 µl einer 10 mg/ml Stammlösung) und dann 1 – 4 µg Plasmid-DNA auf die gefrorenen Zellen pipettiert. Es folgte eine Inkubation für 30 – 60 s bei 37 °C im Schüttelthermostat, danach wurden kurz 15 µl 100 mM $CaCl_2$ hinzupipettiert und der Ansatz wurde weitere 2 – 3 min geschüttelt. Nach Zugabe von 75 µl 100 mM $CaCl_2$ und 1 ml Lösung B (200 mM Bicine, pH 8,35 (das Einstellen des pH-Wertes erfolgt mit 1 N KOH), 40 % PEG 1000) wurde das Reaktionsgefäß vorsichtig 2 – 3 x invertiert und bei 30 °C 1 h inkubiert. Anschließend wurden die Zellen 1 min bei 800x g in einer Mikrozentrifuge pelletiert, mit 500 µl Lösung C (10 mM Bicine, pH 8,35 (das Einstellen des pH-Wertes erfolgt mit 1 N KOH), 150 mM NaCl) gewaschen und das Pellet in 200 µl Lösung C resuspendiert. Der gesamte Ansatz wurde auf Selektivmedium für den entsprechenden Hefestamm ausplattiert und für 2 – 3 Tage bei 30 °C inkubiert.

2.10.4 Expressionskulturen von *Saccharomyces cerevisiae*

50 ml SC-Minimalmedium mit 2 % Glukose wurden mit einer Einzelkolonie INVSc1 mit dem gewünschten Konstrukt angeimpft. Über Nacht wurden die Zellen dann bei 30 °C im Schüttelschrank inkubiert. Die OD_{600} der Übernachtskulturen wurde bestimmt und daraus das Volumen der Kultur ermittelt, mit dem 50 ml Induktionsmedium (SC-Medium mit 2 % Galaktose) zu einer OD_{600} von 0,4 angeimpft werden müssen. Die bestimmte Menge der Übernachtskultur wurde in ein steriles Gefäß überführt und bei 1500x g für 5 min bei Raumtemperatur pelletiert. Die Zellen wurden dann in 50 ml SC-Induktionsmedium resuspendiert und bei 30 °C über Nacht im Schüttelschrank inkubiert.

2.10.5 Zellaufschluss im analytischen Maßstab

Um transformierte Hefezellen auf die Expression des gewünschten Proteins hin mittels Western Blot zu überprüfen, wurde das folgende Protokoll zum Zellaufschluss verwendet.

5 ml Expressionskultur (s. 3.3.4) wurden 5 min bei 1500x g abzentrifugiert und je einmal mit 500 µl Wasser und Breaking Buffer (50 mM Natriumphosphat, pH 7,4, 1 mM EDTA, 5 % Glycerin, vor Gebrauch wurde Fungal/ Yeast Protease Inhibitor Cocktail (Sigma) zugegeben) gewaschen. Das Pellet wurde dann in 500 µl Breaking Buffer aufgenommen. Anschließend wurden 1 g Glasperlen (Ø 0,4-0,6 mm, Braun Biotech) zugegeben. Jeder Ansatz wurde zehnmal abwechselnd für 1 min gevortext und für 1 min auf Eis inkubiert. Es folgte eine Zentrifugation bei maximaler Geschwindigkeit und 4 °C für 10 min. Der Überstand wurde dann in ein steriles Gefäß überführt und per SDS-Gel und anschließendem Western Blot analysiert. Die abzentrifugierten Zelltrümmer wurden in 500 µl Denaturierungspuffer (100 mM Tris- HCl, 2 % SDS, 8 M Harnstoff) aufgenommen und ebenfalls über ein SDS-Gel mit anschließendem Western Blot analysiert.

2.10.6 Hefemikrosomen/Solubilisierung

Die Isolation von Hefemikrosomen wurde nach einem modifizierten Protokoll von Ghanevati und Jaworski (2001) durchgeführt. 400 ml Hefekultur wurden für 5 min bei 3500x g pelletiert und einmal mit je 50 ml Isolationspuffer (80 mM Hepes-KOH, pH 7,2, 5 mM EGTA, 5 mM EDTA, 10 mM KCl, 320 mM Saccharose, 2 mM Ascorbinsäure) gewaschen. Das Pellet wurde anschließend in 25 ml Isolationspuffer aufgenommen und mit 50 g Glasperlen (Ø 0,4-0,6 mm, Braun Biotech) je 10 x ca. 1 min mit dem Zellzerstörer aufgeschlossen. Alternativ erfolgte der Aufschluss in drei Durchgängen mit der French Press. Die groben Zelltrümmer wurden für 10 min bei 1000 g abgetrennt. Der Überstand wurde weiter für 60 min bei 100000x g in der Ultrazentrifuge zentrifugiert, das Pellet stellt die Mikrosomenfraktion dar und wurde in 2,5 ml Isolationspuffer mit 20 % Glycerin gelöst. Zur Aufbewahrung können die Mikrosomen in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei – 80 °C gelagert werden.

Zur Solubilisierung des exprimierten Proteins wurden die Mikrosomen in 2,5 ml Solubilisierungspuffer (50 mM Natriumphosphat, pH 7,2, 5 % Glycerin, 320 mM NaCl, 0,5-2 % Triton X-100) aufgenommen und durch Sonifizieren (3 x 15 s mit je 1 min Pause bei 20 % Intensität) oder 1-2-stündiges Rühren bei 4 °C gelöst.

2.10.7 Plasmid-Minipräparation aus *S. cerevisiae*

Eine Hefekolonie mit einem Durchmesser von ca. 3 mm wurde in 200 µl Lysispuffer (100 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl, pH 8,0, 1 mM EDTA, 1 % SDS, 2 % Triton X-100) resuspendiert. Ein etwa gleiches Volumen Glasperlen (Ø 0,4-0,6 mm, Braun Biotech) und 200 µl Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (24:23:1) wurden zugegeben und der gesamte Ansatz für 2 min gevortext. Die Phasen wurden dann 5 min bei 13000 rpm in einer Mikrozentrifuge getrennt. 90 µl der oberen wässrigen Phase wurden mit Ethanol gefällt, das Pellet mit 70 % Ethanol gewaschen und anschließend in 20 µl H₂O aufgenommen. 5 µl Plasmid-DNA wurden für die anschließende Transformation von *E. coli* eingesetzt.

2.11 Allgemeine Methoden zur Präparation und Analytik von Proteinen

2.11.1 Aufreinigung von 6x Histidin markiertem Protein über Ni-NTA-Agarose

Die Aufreinigung von 6x Histidin markiertem Enzym erfolgte über eine „Immobilized-metal affinity chromatography“ (IMAC, Porath *et al.* 1975). Hierbei wird jeweils ein zweiwertiges Nickel-Ion von beispielsweise Nitrilotriessigsäure (NTA) als Chelat immobilisiert (Hochuli *et al.* 1989), wobei vier der sechs Liganden-Bindungsstellen von der Nitrilotriessigsäure besetzt werden. Die übrigen zwei dienen zur Interaktion mit dem 6x Histidin-Rest des markierten Proteins.

2,5 ml solubilisiertes Protein wurden mit 500 µl Ni-NTA-Agarose (Qiagen) für 1 h bei 4 °C unter leichtem Schütteln inkubiert und der Ansatz anschließend in eine Poly-Prep[®]-Säule (Bio-Rad) überführt. Das Säulenmaterial wurde zweimal mit jeweils 1,5 ml Waschpuffer (50 mM Natriumphosphat, pH 7,2, 320 mM NaCl, 0,5 % Triton X-100, 5 % Glycerin, 20 mM Imidazol) gewaschen. Die Elution erfolgte in zwei Schritten mit jeweils 500 µl Elutionspuffer (50 mM Natriumphosphat, pH 7,2, 320 mM NaCl, 0,5 % Triton X-100, 5 % Glycerin, 250 mM Imidazol).

2.11.2 Bestimmung der Proteinkonzentration

2.11.2.1 Proteinbestimmung nach Bradford

Die Bestimmung der Konzentration von gelösten Proteinen erfolgt standardmäßig nach der Methode von Bradford (1976) mit der Protein-Assay-Lösung der Firma Bio-Rad. Die Absorption der Ansätze wurde bei 595 nm gegen eine Referenz ohne Protein gemessen. Die

Proteinmenge wurde anhand einer mit unterschiedlichen BSA Konzentrationen erstellten Eichgerade ermittelt.

2.11.2.2 Proteinbestimmung mittels BCA-Test

Um die Konzentration von Proteinen in Lösungen mit Detergenzien zu bestimmen, wurde der gegenüber Detergenzien unempfindliche BCA-Test (Smith *et al.*, 1985) der Firma Pierce nach Herstellerangaben verwendet. Die Proteinmenge wurde auch hier anhand einer Eichgeraden, die mit BSA unterschiedlicher definierter Konzentrationen erstellt wurde, ermittelt.

2.11.3 Gelelektrophoretische Trennung von Proteinen

Die Trennung von Proteinen in einem SDS-Polyacrylamidgel erfolgte mit dem *NuPAGE*-System der Firma Invitrogen.

65 µl Proteinlösung (10-15 µg Protein) wurden mit 25 µl *4x NuPAGE LDS Sample Buffer* und 10 µl 0,5 M DTT vermischt und der Ansatz für 10 min auf 70 °C erhitzt.

Die *NuPAGE* 4-12 % Bis-Tris-Gele wurden den Herstellerangaben gemäß vorbereitet. Dazu wurde der ins Gel eingesetzte Kamm herausgezogen und der Klebestreifen an der Unterseite entfernt. Die Taschen wurden mit 1x Laufpuffer (20x Stammlösung: 1 M MOPS, 1 M Tris base 69,3 mM SDS, 20,5 mM EDTA) gespült. Anschließend wurden die Gele in die dazugehörige XCell *SureLock*[®] Kammer eingesetzt und diese mit Laufpuffer gefüllt. Die Geltaschen wurden mit ca. 15-30 µl Probe (je nach Taschengröße) beladen. Die Auftrennung erfolgte bei 200 V für ca. 50 min.

2.11.4 Coomassie-Färbung von Proteingelen

SDS-Gele wurden zur Färbung der aufgetrennten Proteine für ca. 40 min in Coomassie-Lösung (0,1 % Coomassie Brilliant Blue, 10 % Eisessig) geschwenkt. Anschließend wurden sie durch Schwenken in Entfärbelösung (10 % Eisessig, 20 % Ethanol), die mehrfach ausgewechselt wurde, entfärbt.

2.11.5 Western –Blot

Das Western-Blotting ist ein Verfahren, mit dem elektrophoretisch aufgetrennte Proteine durch Anlegen einer Spannung aus dem Gel auf eine Membran transferiert und immobilisiert werden (Towbin *et al.*, 1979). Hier können die Proteine mit ihren spezifischen

Bindungseigenschaften über Antikörper direkt nachgewiesen werden. In dieser Arbeit wird das sogenannte Wet-Blot-Verfahren in Form des *NuPAGE®-Western-Systems* von Invitrogen angewendet.

Für ein Gel wurden vier *Blotting-Pads* und eine Nitrocellulose-Membran mit zwei Filterpapieren kurz in Transferpuffer äquilibriert, so dass die *Blotting-Pads* vollständig mit Transferpuffer getränkt waren und keine Luftblasen mehr enthielten. Anschließend wurde das Blotting-Sandwich wie folgt aufgebaut:

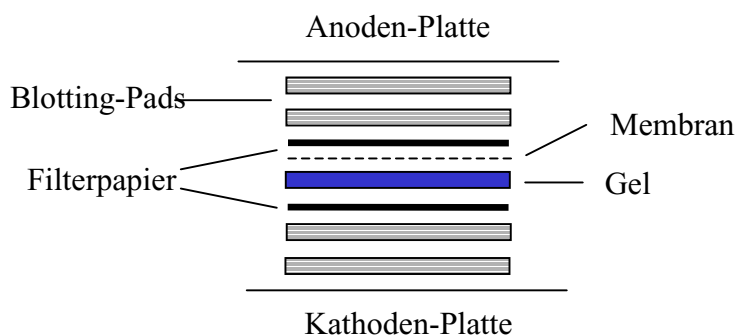


Abb. 2.1: Aufbau des Western Blot Sandwiches.

Um einen luftblasenfreien Zusammenbau in das *NuPAGE® Blot Modul* zu gewährleisten, wurden nach der oberen Lage Filterpapier eventuelle Luftblasen durch vorsichtiges Rollen mit einem angefeuchteten Glasstab entfernt.

Die Proteine wurden dann für 90 min bei 35 V und einer erwarteten Stromstärke von ca. 150 mA zu Beginn des Transfers und ca. 110 mA am Ende auf die Membran transferiert.

2.11.6 Immunofärbung eines Western-Blots

Die Nitrocellulose-Membran mit den übertragenen Proteinen (Invitrogen) wurde zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen 1 h oder über Nacht in Blocking-Puffer (10 mM Tris-HCl, pH 7,5, 150 mM NaCl, 3% (w/v) BSA) geschwenkt. Anschließend wurde der erste Antikörper (anti-Penta-HIS Maus IgG₁, MAb, Qiagen) in Blocking-Puffer zu einer Konzentration von 0,2 µg/ml gelöst und für 1 h oder über Nacht an die Membran gebunden. Es folgten drei Waschschrte, die Membran wurde zweimal 10 min in TTT- (20 mM Tris-HCl, pH 7,5, 500 mM NaCl, 0,05% (v/v) Tween® 20, 0,2% Triton® X-100) und 10 min in TBS-Puffer (10 mM Tris-HCl, pH 7,5, 150 mM NaCl) geschwenkt. Der zweite Antikörper (anti-Maus IgG aus Kaninchen, Alkalische Phosphatase konjugiert, Sigma) wurde den

Angaben des Herstellers entsprechend verdünnt (1 : 30000) und für 1 h an den ersten Antikörper gebunden. Anschließend wurde 4 x 10 min mit TTT-Puffer gewaschen. Die Färbung der Membran erfolgte durch Zugabe des Substrates für die Alkalische Phosphatase, das entstehende BCIP bildet mit NBT ein unlösliches, blaues Produkt. Dazu wurde eine SIGMA FAST™ BCIP/NBT Buffered Substrate Tablet in 10 ml H₂O gelöst und die Membran bis zum gewünschten Färbegrad in dieser Lösung geschwenkt. Abschließend wurde die Membran einige Male mit H₂O gewaschen und zwischen Whatman-Papier getrocknet.

2.12 Fettsäureanalytik

Um die Fettsäurezusammensetzung von Zellen mittels Gaschromatographie/Massenspektrometrie zu analysieren, wurden die Fettsäuren nach einer modifizierten Methode von Browse *et al.* (1986) zunächst in den entsprechenden Methylester umgewandelt und dann aus dem biologischen Material extrahiert. Dazu wurden 30 mg lyophilisiertes Pflanzenmaterial bzw. 50 mg lyophilisierte Hefezellen in einem Glasröhrchen mit Schraubverschluss mit 1 ml methanolischer HCl (Supelco) mit 5 % (v/v) 2,2-Dimethoxypropan versetzt. Die Röhrchen wurden anschließend mit Argon gespült, fest verschlossen und 1 h bei 80 °C inkubiert. Nach dem Abkühlen der Probe wurden 0,3 ml Heptan und 1 ml 0,9 % NaCl zugegeben. Die Fettsäuremethylester wurden dann durch Schütteln für 10 min extrahiert. Um die Phasen zu trennen, folgte eine Zentrifugation bei 800x g für 5 min. Die Heptanphase wurde direkt mittels GC/MS analysiert. Der verwendete Gaschromatograph HP 5890 GC (HP 7673 MSD) der Firma Hewlett-Packard wurde mit einer 0,2 mm Methylsilikon-Säule und Helium als Trägergas betrieben. Folgendes Temperaturprogramm wurde verwendet: 1 min 50 °C, 12 °C/min, 5 min 320 °C, Injektortemperatur: 250 °C.

2.13 Bestimmung der Elongase-Aktivität

Die Aktivität der Elongase wurde über den bei der Kondensation von Malonyl-CoA und Oleoyl-CoA entstehenden freien Coenzym A-Rest bestimmt (Abb. 2.1). Freies Coenzym A reagiert mit 7-Diethylamino-3-(4'-maleimidylphenyl)-4-methylcoumarin (CPM) zu einer fluoreszierenden Verbindung, die bei einer Excitationswellenlänge von 355 nm und einer Emissionswellenlänge von 460 nm gemessen werden kann. Die von der Elongase katalysierte Kondensation wurde in einem 25 µl Ansatz mit folgender Zusammensetzung gemessen:

10-200 ng/µl FAE1

40 mM NaHPO₄, pH 7,2

50 μM Acyl-CoA (Oleoyl-CoA)

50 μM Malonyl-CoA

Der Ansatz wurde bei 30 °C inkubiert und anschließend mit 25 μl einer 100 μM CPM-Lösung in DMSO gestoppt. Zur Reaktion des CPM mit dem während der Kondensation entstandenen CoA wurde der Ansatz für weitere 30 min bei 30 °C inkubiert. Die Fluoreszenzmessung erfolgte bei einer Absorptionswellenlänge von 355 nm und einer Emissionswellenlänge von 460 nm.

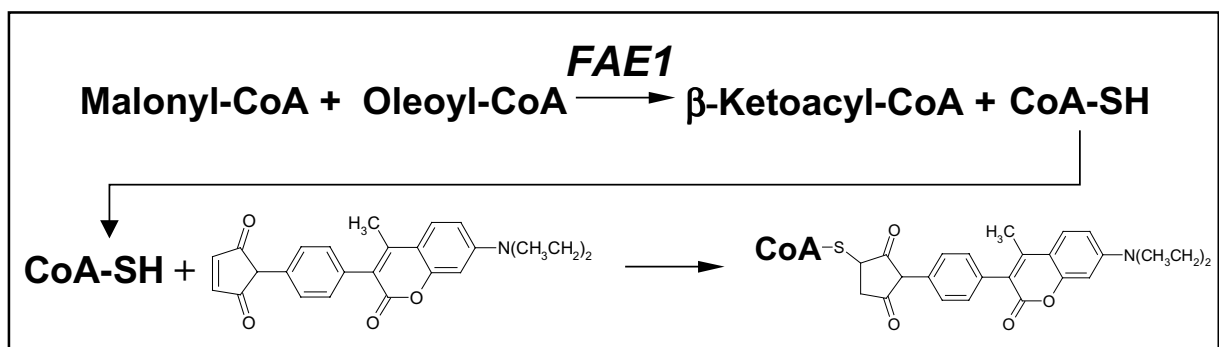


Abb. 2.2: Assayprinzip zum Nachweis der Aktivität von Fettsäureelongasen

Bei der Kondensation von Malonyl-CoA mit Oleoyl-CoA frei werdendes Coenzym A reagiert mit CPM zu einer Verbindung, die durch Fluoreszenzmessung nachgewiesen werden kann.

3 Ergebnisse

Um den Wirkmechanismus von Chloracetaniliden, Oxyacetamiden und anderen herbiziden Wirkstoffen der Klassen K₃ und N (vgl. 1.2) aufzuklären, wurden zwei unterschiedliche Strategien verfolgt. Zum einen wurden verschiedene Fettsäure-Elongasen aus *Arabidopsis thaliana*, die putative Targets dieser Substanzklassen darstellen, kloniert und in der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* exprimiert. Transgene Zellen, die eine Aktivität der exprimierten Elongase dadurch zeigten, dass sie VLCFAs akkumulierten, wurden unter normalen Bedingungen und unter Zugabe verschiedener Herbizide inkubiert. Im Anschluss wurden die gesamten Fettsäuren dieser Hefen als Fettsäuremethylester (FAMES) extrahiert und mittels GC/MS analysiert. Die FAME-Profile der Hefezellen mit und ohne Hemmstoffinkubation wurden miteinander verglichen. Bei Hemmung der VLCFA-Synthese sollten diese in den transgenen Zellen nicht mehr oder nur in geringerem Maße gebildet werden.

Die zweite Strategie befasst sich mit der *fiddlehead Arabidopsis*-Mutante. Wildtyp-Pflanze, Mutante und mit dem Herbizid Flufenacet vor Entwicklung der Blüten behandelte Wildtyp-Pflanzen wurden unter gleichen Bedingungen angezogen, nach 28 d die gesamten Fettsäuren der jeweiligen Blüten als Methylester extrahiert, mittels GC/MS analysiert und deren Zusammensetzungen in den unterschiedlichen Pflanzen verglichen.

Da Fettsäureelongasen absolut pflanzenspezifisch sind und die Hemmung ihrer Aktivität zu letalen Schädigungen der betroffenen Pflanzen führt (Preuss *et al.*, 1993; Todd *et al.*, 1999; s. auch 1.4), wäre es sehr interessant, im Hochdurchsatzscreening nach neuen Hemmstoffklassen forschen zu können mit dem Ziel, eventuell noch effektivere Herbizide zu entwickeln. Hierzu ist es notwendig, das betreffende Enzym in einem funktionellen Assay zur Verfügung zu stellen. Zu diesem Zweck wurde am Beispiel der Elongase *FAEI* versucht, diese aus der Membran zu solubilisieren, aufzureinigen und einen *in vitro* Assay zur Bestimmung der Aktivität von *FAEI* zu entwickeln.

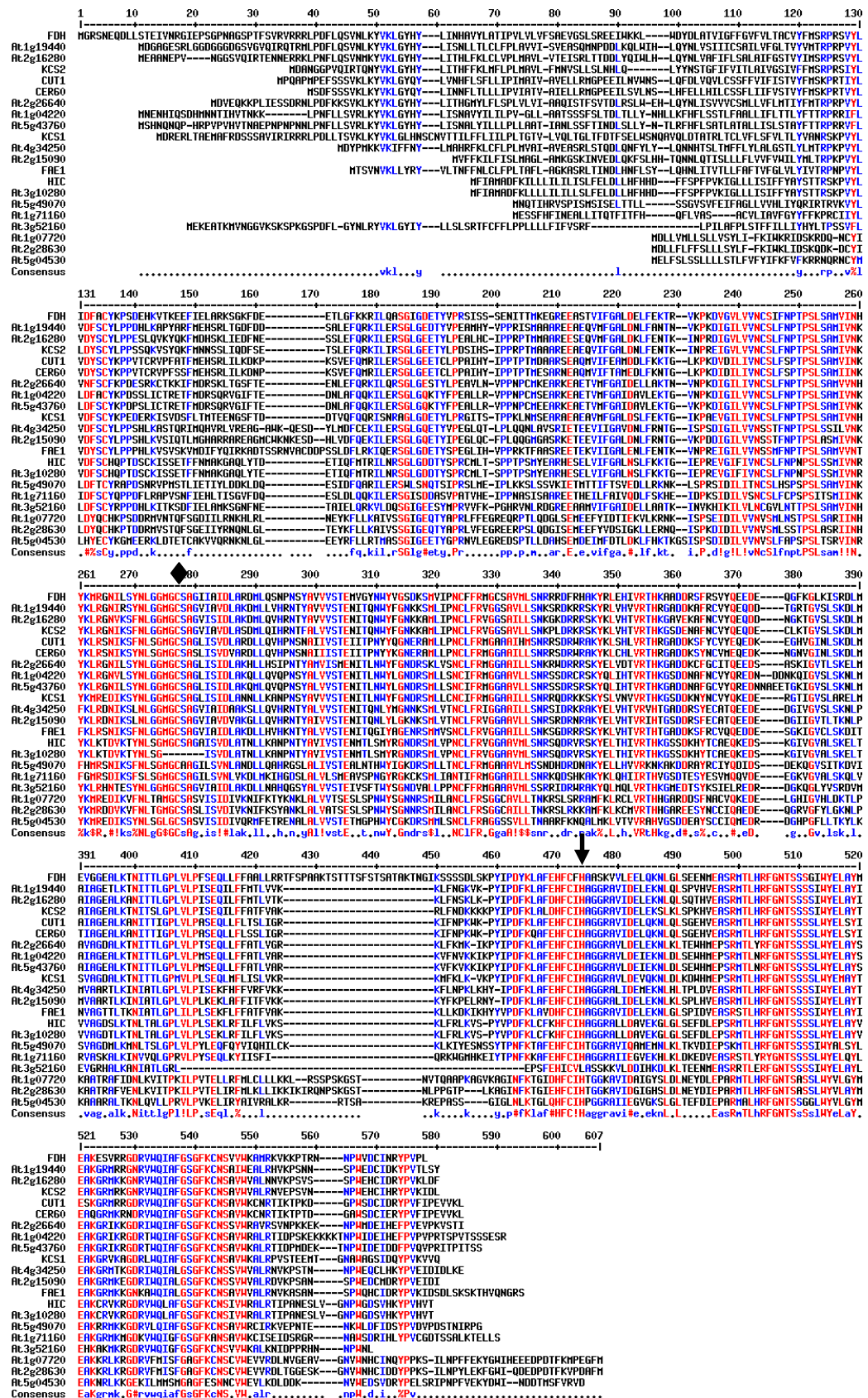
3.1 Klonierung und Expression von Fettsäureelongasen aus *Arabidopsis thaliana*

Um die Wirkung von K₃ und N Herbiziden auf möglichst viele ihrer putativen Targets untersuchen zu können, wurde versucht, zusätzliche zu den bisher bekannten Fettsäure-Elongase-Aktivitäten aus *Arabidopsis thaliana* zu finden. Zu diesem Zweck wurde anhand

der Aminosäuresequenz von *FAEI* mit dem Programm BLASTP (Altschul *et al.*, 1990) eine Suche nach homologen Proteinen in der *Arabidopsis* TIGR Datenbank (<http://www.tigr.org/tdb/e2k1/ath1/ath1.shtml>) durchgeführt. In Übereinstimmung mit früheren Publikationen (Lechelt-Kunze *et al.*, 2003; Kunst *et al.*, 2003) wurden insgesamt 20 Proteine mit hoher Homologie gefunden, unter ihnen die hinsichtlich ihrer Substrate, Produkte und Expressionsorte bereits gut charakterisierten Elongasen *CUT1* (Millar *et al.*, 1999; Kunst *et al.*, 2000), *KCS1* (Todd *et al.*, 1999) und *KCS2* (Kunst & Clemens, 2001). Ein Alignment dieser Elongasen mit dem Programm Multalign (Corpet, 1988, <http://prodes.toulouse.inra.fr/multalin/multalin.html>) ist in Abb. 3.1 dargestellt. Die Aminosäuresequenzen weisen besonders im mittleren und C-terminalen Bereich hohe Ähnlichkeiten auf, wohingegen der N-terminale Bereich weniger konserviert ist.

Alle 21 Elongase-Gene konnten mittels PCR unter Verwendung von cDNA aus Blättern und Blüten unter den in 2.8.3 genannten Bedingungen amplifiziert werden. Die PCR-Produkte wurden zunächst in den pCR[®]-Blunt II-TOPO[®] subkloniert, mit den entsprechenden Restriktionsendonukleasen aus diesem Vektor geschnitten und anschließend in den pYES2/CT Vektor (Invitrogen) ligiert (s. 2.8.6.2). Unter der Kontrolle des induzierbaren *Gall* Promotors wurden sie dann in dem *Saccharomyces cerevisiae* Stamm INVSc1 exprimiert (s. 2.10.4). Um die Expression der einzelnen Elongasen durch eine spezifische Färbung mit Antikörpern (s. 2.11.6) überprüfen zu können und eine einfache Aufreinigung der exprimierten Elongasen zu ermöglichen, wurde C-terminal jeweils eine für sechs Histidinreste kodierende Sequenz, ein sogenannter His-Tag, eingefügt. *FDH* wurde zusätzlich ohne Histidinreste exprimiert, um eventuell störende Effekte der Reste auf die Aktivität des Enzyms auszuschließen. Außerdem wurden *FDH* und *FAEI* ohne putative Transmembrandomänen mit dem Ziel der verbesserten Löslichkeit exprimiert. Die Gene *At2g26640*, *At2g16280*, *At3g52160* und *At1g71160* konnten auch nach mehreren Versuchen nicht kloniert werden und wurden deshalb nicht weiter untersucht. Für alle anderen Konstrukte konnte der Nachweis der Expression mittels Immunodetektion erbracht werden (Ergebnis nicht dargestellt). Die Menge des exprimierten Proteins war in allen Fällen so gering, dass sie durch Coomassie-Färbung der auf einem SDS-Gel aufgetrennten Gesamtproteine (s. 2.11.4 und 2.11.3) der transgenen Hefezellen allein nicht erkennbar war. Alle detektierten Proteine, auch die Konstrukte ohne putative Transmembrandomänen, befanden sich nach Aufschluss der Hefezellen und anschließender Zentrifugation bei 16100x g für 15 min (s. 2.10.5) in der unlöslichen Fraktion.

3 Ergebnisse



3.1.1 Zeitabhängigkeit der Expression

Um die optimalen Bedingungen für die Expression der Elongasen zu ermitteln, wurde an zwei Beispielen, nämlich der Expression von *FDH* und *FAE1*, zunächst die Zeitabhängigkeit der Menge des exprimierten Proteins bestimmt. Dazu wurden zu verschiedenen Zeitpunkten (0-25 h) nach der Induktion der Kulturen durch Galaktose (s. 2.10.4) Proben entnommen und anschließend das exprimierte Protein mittels Immunodetektion im Western-Blot (s. 2.11.5) nachgewiesen (Abb. 3.2). Hierbei konnte gezeigt werden, dass sich die Kinetiken der Expression von *FDH* und *FAE1* stark ähneln. Nach ca. 3-4 h Induktion konnte in beiden Fällen erstmals exprimiertes Protein nachgewiesen werden. Die Menge nahm stetig zu, bis bei 6,5 h im Falle von *FAE1* bzw. 15 h bei *FDH* das Maximum erreicht wurde. Dieser Wert blieb für die nächsten Stunden konstant. Erst ab einer Induktionszeit von 22-24 h nahm die Menge an exprimiertem Protein wieder leicht ab. Aufgrund dieser Werte wurde die Induktionszeit für folgende Versuche auf 16-19 h festgelegt.

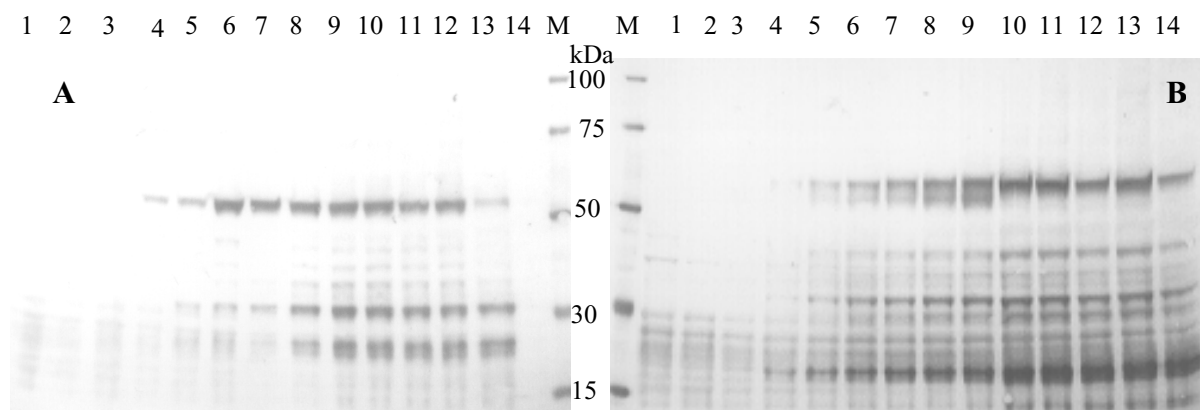


Abb. 3.2: Western-Blot-Analyse der Zeitabhängigkeit der Expression von *FAE1* (A) und *FDH* (B).
(A): Spuren: 1-5: 1-5 h Induktion, 6: 6,5 h Induktion, 7: 7,5 h Induktion, 8: 9 h Induktion, 9: 14 h Induktion, 10: 16 h Induktion, 11: 19 h Induktion, 12: 21 h Induktion, 13: 25 h Induktion, 14: 0 h Induktion, M: 6xHis Protein Ladder (Qiagen)
(B): Spuren: M: 6xHis Protein Ladder (Qiagen) 1: 0 h Induktion, 2: 1 h Induktion, 3-9: 3-9 h Induktion, 10-11: 15-16 h Induktion, 12: 18 h Induktion, 13: 20 h Induktion, 14: 22 h Induktion
 Pro Spur wurden 10 µg Protein aufgetragen.

3.2 Bestimmung der Aktivität der klonierten Elongasen mittels GC/MS

Zur Überprüfung der Aktivität der in *Saccharomyces cerevisiae* exprimierten Elongasen wurde die Fettsäurezusammensetzung der Hefezellen mittels GC/MS (s. 2.12) analysiert. Es ist zu erwarten, dass sich das Fettsäureprofil von Zellen, die eine aktive Elongase exprimieren, im Vergleich zu Kontrollzellen mit dem leeren Vektor hin zu länger-kettigen Fettsäuren verschiebt.

Nach Induktion der Expression mit Galaktose für 16-19 h (s. 3.2) wurde die Elongase-Aktivität durch die Analyse der FAMES der Zellen (s. 2.12) bestimmt. Kontrollzellen, die den leeren pYES2-Vektor enthalten, zeigten die für Hefe typische Zusammensetzung der isolierten Fettsäuren (Abb. 3.3 (A)). Gesättigte und ungesättigte Fettsäuren mit einer Kettenlänge von 16 und 18 C-Atomen stellen den quantitativ größten Teil der gesamten Fettsäuren dar. Mit der Ausnahme von C26-Säure, die Bestandteil von Sphingolipiden in Hefe ist, konnten keine längerkettigen Fettsäuren beobachtet werden.

Bei sechs der 17 exprimierten Elongasen traten zusätzlich zu den endogenen Fettsäuren der untransformierten Hefe sehr langkettige Fettsäuren mit Kettenlängen von 20 bis 30 C-Atomen auf. Die entsprechenden Gaschromatogramme sind in Abb. 3.3 dargestellt. Abb. 3.3 (A) zeigt eine vollständige Analyse aus Kontrollzellen extrahierter FAMES. Der markierte Ausschnitt stellt den Bereich dar, in dem VLCFAs von der GC-Säule eluieren. Dieser Ausschnitt der Chromatogramme der transgenen Zellen ist jeweils in den Abbildungen in 3.3 (B) wiedergegeben, der restliche Bereich zeigte sich jeweils unverändert. Drei der gezeigten Elongase-Aktivitäten konnten auf die bereits charakterisierten Elongasen *FAE1*, *KCS1* und *KCS2* zurückgeführt werden. Alle drei Gene sind bereits in Hefe exprimiert worden (Millar & Kunst, 1997, Todd *et al.*, 1999, Clemens & Kunst, 2001). Die drei weiteren Aktivitäten wurden durch die Gene *At5g43760*, *At1g04220* und *At1g25450* kodiert, die in der Datenbank als putative Elongasen mit bisher unbekannter Funktion annotiert sind. Letzteres

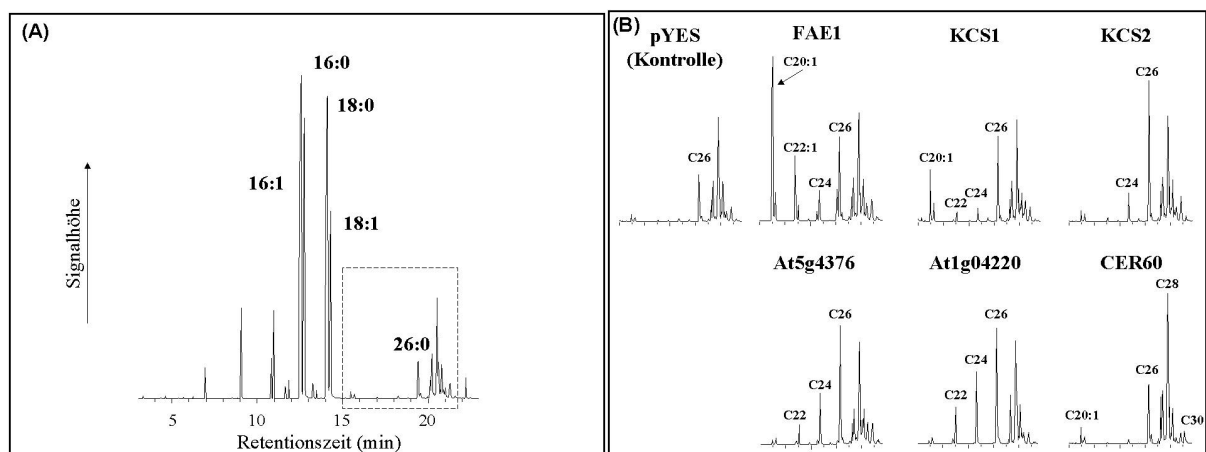


Abb. 3.3: Gaschromatographische Analyse der FAMES der Hefezellen mit funktionell exprimierten Elongasen.

(A): Vollständiges Gaschromatogramm einer Analyse von gesamten Fettsäuremethylestern aus *Saccharomyces* transformiert mit dem leeren Vektor als Kontrolle. Der markierte Bereich stellt den Ausschnitt aus dem Chromatogramm dar, der in B gezeigt ist.

(B): Die Abbildung zeigt die relevanten Ausschnitte aus den Gaschromatogrammen der transgenen Hefen mit funktionell exprimierten Elongasen. Die Ausschnitte zeigen den Bereich des Chromatogramms, in dem VLCFAs mit einer Kettenlänge ab 20 C-Atomen bis zu 30 C-Atomen zu finden sind.

Gen wurde bereits von Fiebig *et al.* (2000) als *CER60* beschrieben und basierend auf der hohen Sequenzhomologie zu *CUT1* der VLCFA-Biosynthese zugeordnet. Zellen, die mit dem *FAE1*-Konstrukt ohne Transmembrandomänen transformiert wurden, zeigten ebenfalls eine Anhäufung von VLCFAs, die Aktivität des Enzyms war jedoch im Vergleich zu der des Konstruktes in voller Länge viel geringer, was sich in der Menge der gebildeten VLCFAs äußerte.

In Zellen, die das *FDH*-Konstrukt in voller Länge enthielten, konnte keine bedeutende Akkumulation von VLCFAs beobachtet werden. In Zellen, die *FDH* ohne His-Tag exprimieren, wurde eine geringe, gerade noch signifikante Menge C20:1-Säure akkumuliert. Dies läßt u. a. die Vermutung zu, dass *FDH* zwar eine sehr geringe Aktivität mit den endogenen Fettsäuren von *Saccharomyces* zeigt, das eigentliche Substrat jedoch nicht zur Verfügung steht.

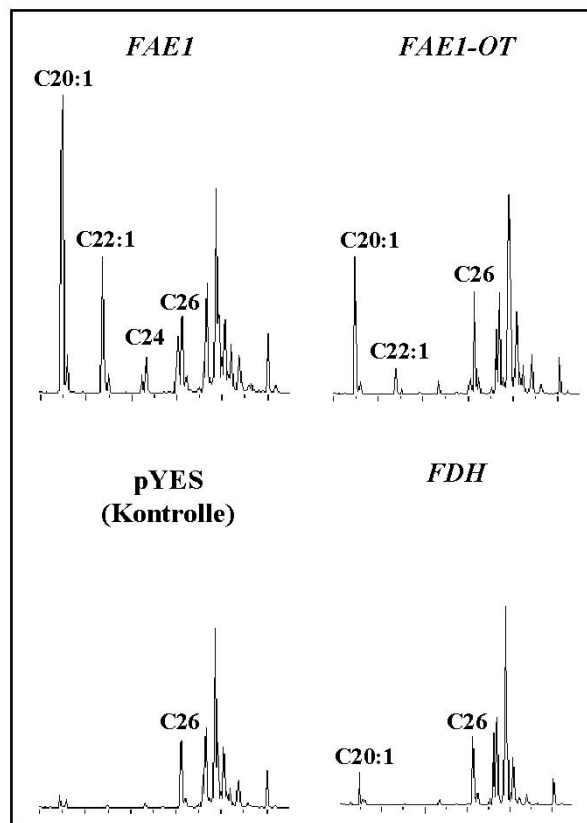


Abb. 3.4: Gaschromatographische Analysen der FAMES transgener Hefezellen mit Bereich der VLCFAs aus den Gaschromatogrammen der FAME-Analysen von Hefezellen mit dem *FAE1*-Konstrukt, dem *FAE1*-Konstrukt ohne putative Transmembrandomänen (*FAE1-OT*), Kontrollzellen mit dem leeren Vektor und Zellen mit dem *FDH*-Konstrukt.

Wie in Tabelle 3.1 zusammengefasst zeigten die transgenen Hefen, die die bereits charakterisierten Elongasen *FAE1*, *KCS1* und *KCS2* exprimierten, die in früheren

Publikationen beschriebenen Elongationsprodukte (James & Dooner, 1990; Kunst *et al.* 1992; James *et al.* 1995; Millar & Kunst, 1997, Todd *et al.*, 1999, Kunst & Clemens, 2001). Geringfügige Abweichungen der hier aufgeführten Produkte von den bisher gezeigten Aktivitäten, wie die zusätzlichen Peaks für C24- und C26-Säure bei *FAE1*, sind vermutlich auf die Verwendung unterschiedlicher Hefestämme zurückzuführen. Zellen mit dem *At5g43760*-Konstrukt zeigten eine Anhäufung von gesättigten Fettsäuren mit Kettenlängen von 22 bis 26 C-Atomen. Das gleiche Resultat wurde mit Hefezellen erhalten, die *At1g04220* exprimieren. Expression von *CER60* führte zu einer Anhäufung von gesättigten C26-, C28- und C30-Fettsäuren. Zusätzlich konnte eine kleine Menge einfach ungesättigte C20-Fettsäure beobachtet werden. Diese Ergebnisse zeigen, dass *At5g43760*, *At1g04220* und *At1g25450* (*CER60*) funktionell in *Saccharomyces* exprimiert werden und verantwortlich für die VLCFA-Elongation sind, indem sie mit der Dehydratase und den zwei Reduktasen des Hefe-Elongasekomplexes zusammenarbeiten. Sie sind in der Lage, endogene *Saccharomyces*-Fettsäuren mit Kettenlängen von 16 oder 18 C-Atomen oder 26 C-Atomen als Substrate zu verwenden und zu den oben genannten Produkten zu verlängern.

Tab. 3.1: Ergebnis der Expression der aufgeführten Elongasen in der Hefe *S. cerevisiae*.

Elongase	Produkte der katalysierten Reaktion
<i>At1g01120</i> (<i>KCSI</i>)	C20:1/C20, C22, C24, C26
<i>At4g34520</i> (<i>FAE1</i>)	<u>C20:1/C20</u> , <u>C22:1/C22</u> , C24:1/ <u>C24</u> , C26
<i>At5g43760</i>	C22, C24, C26
<i>At4g34510</i> (<i>KCS2</i>)	C24, C26
<i>At1g04220</i>	C22, C24, C26
<i>At1g25450</i> (<i>CER60</i>)	C20:1, C26, C28, C30

Anhand der Fettsäurezusammensetzung der transgenen Hefe wurden die Produkte der jeweiligen Elongase ermittelt.

3.3 Sequenzanalyse

Wie bereits unter 3.1 erwähnt, befinden sich alle exprimierten Elongasen nach Zellaufschluss und anschließender Zentrifugation zur Abtrennung von nicht aufgeschlossenen Zellen und Zelltrümmern in der Pelletfraktion. Um herauszufinden, ob die drei bisher nicht charakterisierten Elongasen *At5g43760*, *At1g04220* und *CER60* Transmembrandomänen besitzen, wie bereits anhand der Sequenzen von *FAE1* und *CUT1* gezeigt werden konnte (Millar *et al.*, 1999), wurden ihre Aminosäuresequenzen mit dem „DAS transmembrane prediction server“ (Cserzo *et al.*, 1997, <http://www.sbc.su.se/~miklos/DAS/>) analysiert. Abb.

3.5 zeigt die Hydrophobizitätsprofile von *At5g43760*, *At1g04220* und *CER60*. Am N-Terminus jeder Sequenz befinden sich jeweils zwei Bereiche mit hoher Hydrophobizität, die weit über dem strikten Grenzwert für eine Transmembrandomäne liegen. Aufgrund dieser Ergebnisse kann davon ausgegangen werden, dass alle drei Proteine wenigstens zwei Transmembrandomänen besitzen. Die Hydrophobizitätsprofile weisen nicht nur untereinander eine sehr hohe Ähnlichkeit auf, sondern auch im Vergleich mit den Profilen von *FAEI* und *CUT1* (Millar *et al.*, 1999). Die Transmembrandomänen liegen laut dieser Vorhersage für *At5g43760* im Bereich der Aminosäuren 53-67 und 92-103, bei *At1g04220* von 46-60 und 85-100 und bei *CER60* von 26-40 und 62-79.

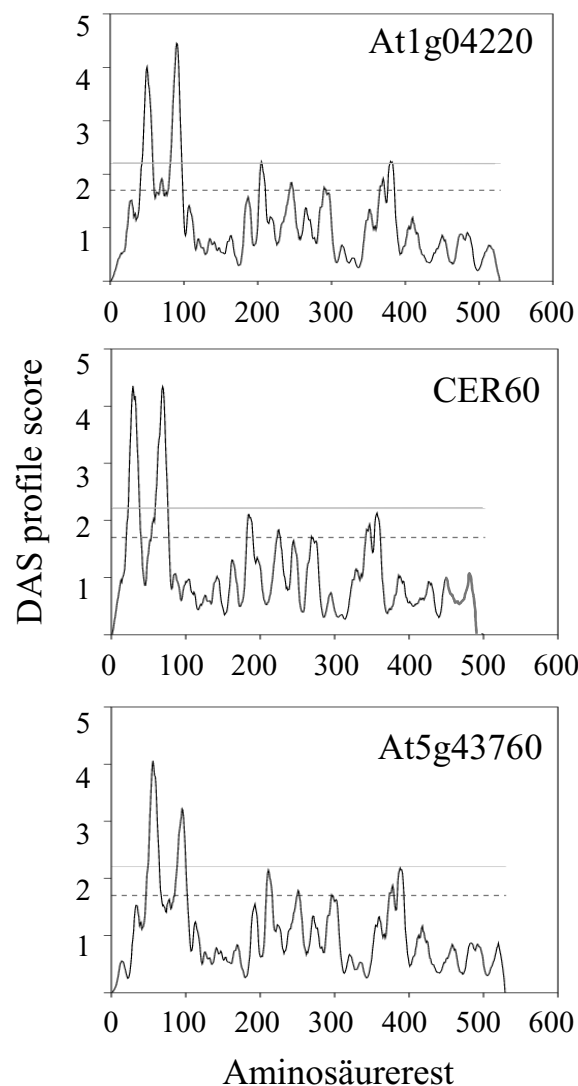


Abb. 3.5: Polaritätsdiagramme der neu charakterisierten Elongasen

Dargestellt sind die Polaritäten der einzelnen Aminosäuresequenzen von *At1g04220*, *CER60* und *At5g43760*. Die gestrichelte Line stellt den losen Grenzwert für eine Transmembrandomäne bei einem „DAS score“ von 1,7 dar, die durchgezogene den strikten bei einem „DAS score“ von 2,2 (Cserzo *et al.*, 1997).

3.4 Untersuchungen zur Substratspezifität

3.4.1 Fütterung transgener Hefezellen mit verschiedenen Fettsäuren

Da der verwendete Hefestamm INVSc1 nur ein begrenztes Spektrum an unterschiedlichen Fettsäuren als Substrate für die exprimierten Elongasen besitzt (s. Abb. 3.3 (A)), wurde versucht, dieses Spektrum durch Zugabe kommerziell erhältlicher Fettsäuren zum Medium zu erweitern (Sperling *et al.*, 2000; Zank *et al.*, 2000). Bei dieser Strategie wurde davon ausgegangen, dass die Fettsäuren von den Zellen aufgenommen und mit einem CoA-Rest verestert werden können. Die Fettsäuren wurden jeweils in einer 5 %igen Lösung von Tergitol (Sigma) vorgelöst und anschließend in einer Konzentration von 500 μM 15 h vor Ernte der Zellen zum Medium gegeben. Es konnte für *FAE1* exprimierende Hefezellen gezeigt werden, dass zugegebene C18:2-Säure zu C20:2- und C22:2-Säure verlängert wird. Zugabe von C18:3-Säure führt zur Akkumulation von C20:3-Säure in *FAE1* transgenen Zellen. Ebenfalls zeigten Zellen mit dem *At5g43760*-Konstrukt eine Aktivität mit C18:2-Säure. Die Ergebnisse aller Versuche mit zugefütterten Fettsäuren sind in Tabelle 3.2 aufgeführt. Im Fall von *FDH* führte dieser Ansatz jedoch nicht zum Erfolg, keine der zugegebenen Fettsäuren wurde verlängert.

Tab. 3.2: Ergebnisse der Fütterung transgener Hefezellen mit verschiedenen Fettsäuren.

<i>Elongase</i>	<i>zugegebene Fettsäuren</i>	<i>entstandene Produkte</i>
<i>FAE1</i>	C18:2	C20:2, C22:2
	C18:3	C20:3
<i>KCS2</i>	C18:2	-
	C18:3	-
<i>At5g43760</i>	C18:2	C20:2, C22:2
	C18:3	-
<i>FDH</i>	C20:0-C30:0	-
	C20:1-C26:1	-
	C18:3	-
	C20:4	-
	C18:1-12OH	-
	C16-Disäure	-
	C26	-
<i>CUT1</i>	C26	-
	C28	-

Die aufgeführten Fettsäuren wurden jeweils in einer Konzentration von 500 μM 15 h vor Ernte der Zellen zu den transgenen Hefezellen in Medium gegeben.

3.4.2 Koexpression von *FAE1* und *FDH*

Um sicherzustellen, dass eine Reihe von Fettsäuren in einer für die Elongase *FDH* verwendbaren Form vorliegen (s. 4.1), wurden in einem weiteren Ansatz *FAE1* und *FDH* in *Saccharomyces* koexprimiert. Dazu wurde *FAE1* in den Expressionsvektor pYES3/CT (Invitrogen) kloniert. Transgene Hefezellen mit dem *FDH*-Gen in dem pYES2/CT-Vektor wurden nach dem Protokoll von Dohmen *et al.* (1991) für die Aufnahme von Fremd-DNA kompetent gemacht und mit dem *FAE1*-Gen im pYES3/CT-Vektor transformiert. Diese doppelt transformierten Hefezellen wurden anschließend auf Minimalmedium ohne Uracil und Tryptophan ausplattiert und erhaltene Kolonien im gleichen Medium induziert. Eine FAME-Analyse der so erhaltenen Zellen mittels GC/MS zeigte jedoch keinen Unterschied zu der Analyse von Zellen, die nur das *FAE1*-Konstrukt enthielten. Die von *FAE1* produzierten Fettsäuren konnten also von *FDH* nicht als Substrat verwendet werden.

3.5 Untersuchungen zum Wirkmechanismus von K₃ und N Herbiziden

3.5.1 Einfluss von K₃ und N Herbiziden auf in Hefe exprimierte Elongasen

Um die Vermutung zu überprüfen, dass die Elongaseaktivität das Target von Herbiziden der HRAC-Klassen K₃ und N darstellt und somit deren Wirkmechanismus aufzuklären, wurden die sechs transgenen Hefestämme, in denen VLCFAs akkumulierten, in Gegenwart der in Abb. 1.2 dargestellten herbiziden Wirkstoffe inkubiert. Diese lagen jeweils in einer Endkonzentration von 100 µM im Medium vor.

Die Fettsäurezusammensetzung von mit Hemmstoff inkubierten transgenen Hefestämmen wurde anschließend mit der von Zellen, die ohne Hemmstoff inkubiert wurden, verglichen. Im Fall einer Inhibition der Elongation konnte keine Akkumulation von sehr langkettigen Fettsäuren mehr beobachtet werden. Die Ergebnisse sind in Tab. 3.3 zusammengefasst. Es zeigte sich, dass jede der untersuchten Elongaseaktivitäten durch verschiedene Wirkstoffe gehemmt werden konnte. Bei der verwendeten Konzentration von 100 µM war die Hemmung in allen Fällen vollständig mit Ausnahme der Hemmung von *CER60* mit Triallate. Umgekehrt wirkte ein Hemmstoff immer gleichzeitig auf mehrere Elongasen. Im Fall von Flufenacet und Cafenstrole wurde sogar jede in dieser Arbeit getestete Elongase gehemmt. Durch die Tatsache, dass ein Wirkstoff jedoch nicht immer jede der gemessenen Elongaseaktivitäten hemmt, konnte damit erstmals bewiesen werden, dass die von den Elongasen katalysierte Kondensationsreaktion die Aktivität der VLCFA-Elongation

ist, die durch K₃ und N Herbizide gehemmt wird. Die drei Folgereaktionen Reduktion, Dehydration und Reduktion werden also durch diese Wirkstoffe nicht beeinflusst. Wäre dieses der Fall, würde man für ein Herbizid entweder eine Wirkung auf alle getesteten Elongasen oder überhaupt keine Wirkung beobachten. Interessanterweise konnte nur mit einem der N Herbizide eine relativ schwache Hemmung nachgewiesen werden. Die drei anderen zeigten keine inhibierende Wirkung auf die hier getesteten VLCFA-Elongasen.

Lechelt-Kunze *et al.* (2003) konnten nach Behandlung von *Arabidopsis* und anderen Pflanzen mit allen in dieser Arbeit verwendeten K₃ und N Herbiziden einen Phänotyp ähnlich dem von *fiddlehead*-Mutanten (Lolle *et al.*, 1992; Yephremov *et al.*, 1999; Pruitt *et al.*, 2000) beobachten. Sie führten diese Beobachtung auf die Hemmung der putativen VLCFA-Elongase *FDH* zurück. Welche der in dieser Arbeit verwendeten Herbizide unter den gegebenen Bedingungen bei *Arabidopsis* Pflanzen den *fiddlehead*-Phänotyp induzieren, ist in Tab. 3.3 in der letzten Spalte gezeigt. Es ist zu bedenken, dass es sich hierbei um die Induktion des Phänotyps unter bestimmten Bedingungen handelt, also eine Momentaufnahme bei festgelegter Behandlungsart darstellt. Es ist gut möglich, dass die Herbizide, die hier keinen *fiddlehead*-Phänotyp induzierten, unter anderen Bedingungen (Anzucht, angewendete Konzentration, Behandlungshäufigkeit) diese Wirkung zeigen würden.

Tab. 3.3: Hemmversuche von K₃ und N Herbiziden an verschiedenen, in *Saccharomyces cerevisiae* exprimierten Elongasen.

HRAC-Klasse	Inhibitor	FAE1	KCS1	KCS2	CER60	At5g43760	At1g04220	<i>fiddlehead</i> Phänotyp
K ₃	Alachlor	-	+	+	+	+	-	-
K ₃	Allidochlor	+	+	+	+	+	+	-
K ₃	Anilofos	-	+	+	+	+	+	-
K ₃	Cafenstrole	+	+	+	+	+	+	+
K ₃	Diphenamide	-	-	-	-	-	-	-
K ₃	Fentrazamide	-	+	+	-	+	-	+
K ₃	Flufenacet	+	+	+	+	+	+	+
K ₃	Napropamide	-	-	-	-	-	-	-
N	Benfuresate	-	-	-	-	-	-	+
N	Bensulide	-	-	-	-	-	-	-
N	Ethofumesate	-	-	-	-	-	-	+
N	Triallate	-	-	-	(+)	-	-	-

Hemmung der VLCFA Elongation mit dem jeweiligen Inhibitor bei einer Konzentration von 100 µM wird durch ein „+“ angezeigt. In allen Fällen außer der Hemmung von *CER60* mit Triallate war die Hemmung bei dieser Konzentration vollständig. Die letzte Spalte zeigt, ob nach Behandlung von *Arabidopsis thaliana* mit dem entsprechenden Herbizid ein *fiddlehead*-Phänotyp beobachtet werden konnte (Lechelt-Kunze *et al.*, 2003).

3.5.2 Einfluss der Herbizide auf Hefewachstum und endogene VLCFA-Biosynthese

Um zu untersuchen, ob die Inkubation der Hefezellen mit den entsprechenden Wirkstoffen einen Einfluss auf das Wachstum der Zellen hat, wurde nach Zugabe der Hemmstoffe die optische Dichte der Kulturen kontrolliert. Da sich keine Änderungen zu Kulturen ohne Wirkstoff feststellen ließen, kann davon ausgegangen werden, dass das Wachstum der Hefezellen durch die Zugabe der Hemmstoffe nicht gestört oder gar inhibiert wurde. Dieses Ergebnis steht mit der Tatsache im Einklang, dass bei Bayer CropScience nie eine fungizide Wirkung der hier eingesetzten Herbizide im Screening gefunden wurde (Klaus Tietjen, persönliche Mitteilung). Ebenfalls wurde die Fettsäurezusammensetzung von untransformierten Hefen nach Herbizidzugabe kontrolliert, um einen Einfluss der Herbizide auf die endogene Fettsäuresynthese zu überprüfen. Es stellte sich heraus, dass weder die Fettsäuresynthese noch die Bildung von endogenen VLCFAs durch die hefeeigenen ELO-Gene (Toke & Martin, 1996; Oh *et al.*, 1997; Roessler *et al.*, 2003) inhibiert wurde, da das endogene Niveau von C26 Fettsäure in untransformierten Zellen durch Herbizidzugabe nicht verändert wurde.

3.5.3 Konzentrationsabhängigkeit der Hemmung

Um die Konzentrationsabhängigkeit der Hemmung der jeweiligen Elongase durch die unterschiedlichen Wirkstoffe festzustellen, wurden Kulturen der transgenen Hefen angesetzt und nach der Induktion der Expression der entsprechende Inhibitor in verschiedenen Konzentration zugegeben. Anschließend wurden die FAMES der einzelnen Proben extrahiert und mittels GC/MS analysiert. Erniedrigt man ausgehend von der anfänglich eingesetzten Konzentration von 100 μM schrittweise die Konzentration des Inhibitors, erhält man eine Abhängigkeit der Hemmung von der Wirkstoffkonzentration. Für das Beispiel der Hemmung von *FAE1* mit Flufenacet ist dies in Abb. 3.6 dargestellt. Bis zu einer Konzentration von $7,8 \cdot 10^{-8}$ M konnte eine Hemmung der Aktivität beobachtet werden. Erst bei einer Flufenacet-Konzentration von $3,9 \cdot 10^{-8}$ M fand gar keine Hemmung der *FAE1*-Aktivität mehr statt.

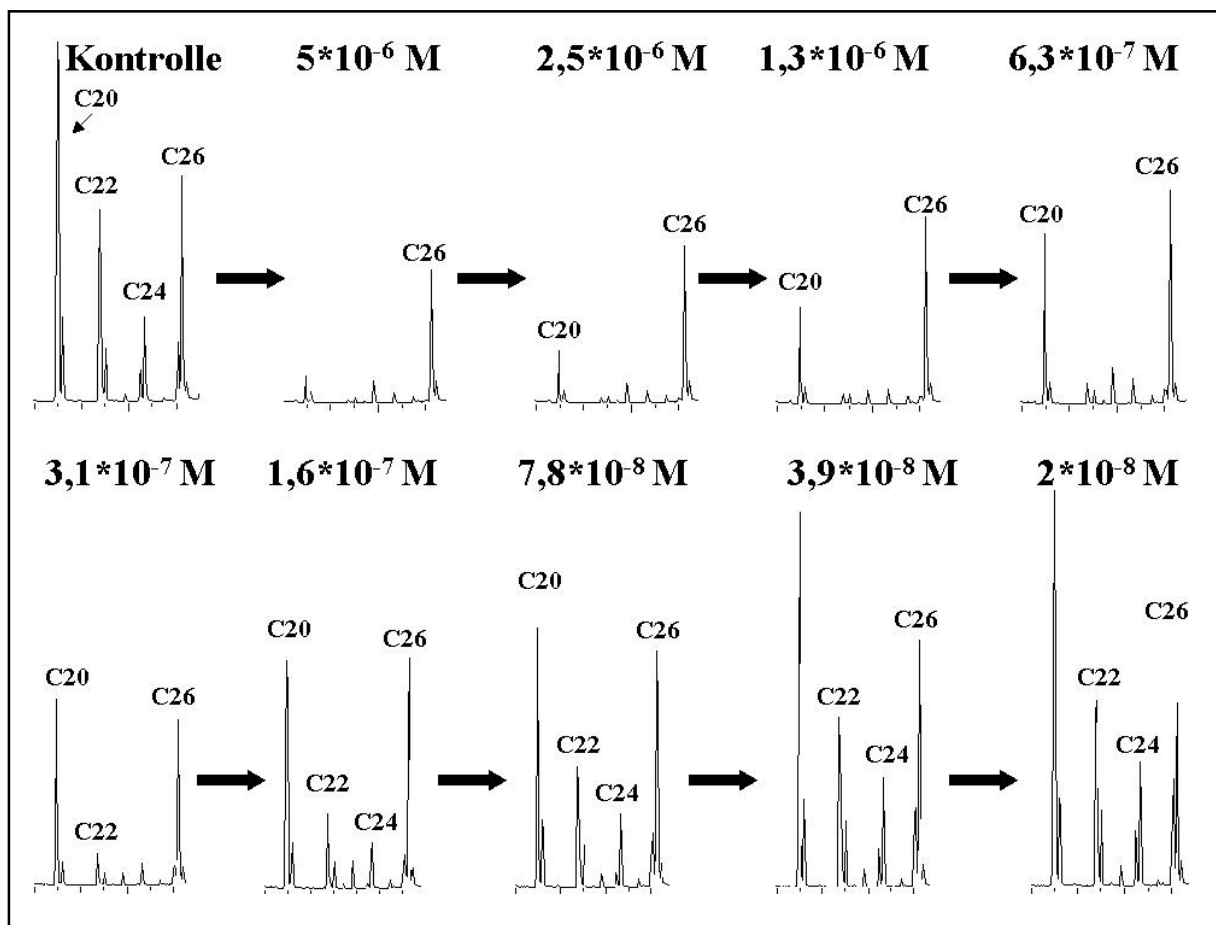


Abb. 3.6: Abhängigkeit der Hemmung von der Wirkstoffkonzentration

Dargestellt ist der VLCFA-Bereich der gaschromatografischen Analysen (vgl. Abb. 3.3) von Hefezellen, die *FAE1* exprimieren gehemmt mit den angegebenen Konzentrationen Flufenacet. Als Kontrolle dienen Zellen ohne Flufenacetzugabe.

Anhand dieses Ergebnisses wurde über die Flächengröße des C24-Säure-Peaks für die beschriebene Hemmung eine Dosis-Wirkungskurve bestimmt. Sie ist in Abb. 3.7 dargestellt. Die Fläche der einzelnen C24-Peaks wurde jeweils auf die Fläche des C16:1-Peaks des

gleichen Chromatogramms normiert, um probenaufarbeitungsbedingte Schwankungen auszugleichen.

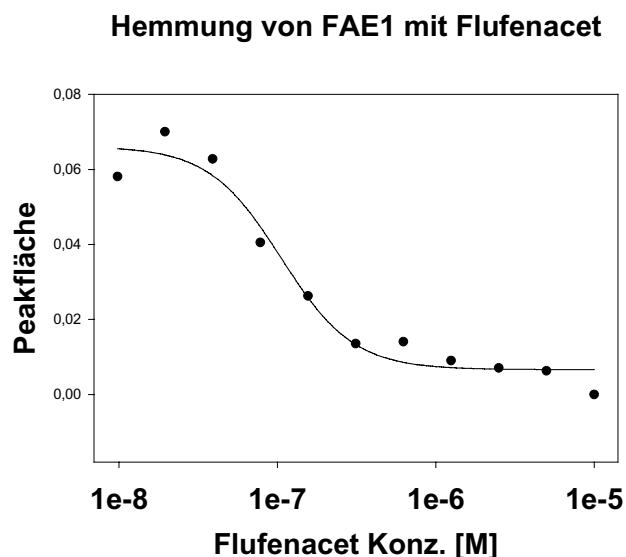


Abb. 3.7: Dosis-Wirkungskurve der Hemmung von *FAE1* mit Flufenacet.

Die Fläche des Peaks für C24-Säure wurde in jedem Chromatogramm durch die Peakfläche von C16:1 normiert.

3.5.4 Bestimmung von pI_{50} -Werten und Dosis-Wirkungskurven

Als pI_{50} -Wert wird der negative dekadische Logarithmus der Konzentration eines Wirkstoffes bezeichnet, die benötigt wird, um eine halbmaximale Hemmung zu erzeugen. Um anhand der unterschiedlichen Peakflächen aus den erhaltenen Chromatogrammen eine Hemmkurve mit dem dazugehörigen pI_{50} -Wert zu bestimmen, wurde zunächst am Beispiel der Hemmung von *FAE1* mit Allidochlor geprüft, ob jede einzelne Elongation für jede Kettenlänge gleich stark gehemmt ist. Hierzu wurden die vier verschiedenen Peaks ausgewählt, die die Fettsäuren mit Kettenlängen von 20, 22, 24 und 26 C-Atomen darstellen. Jede Peakfläche aus jedem Chromatogramm wurde auf die Peakfläche des C16:1-Säure-Peaks des gleichen Chromatogramms normiert, um unterschiedliche Ausbeuten der verschiedenen Extraktionen auszugleichen. Für jeden der vier ausgewählten Peaks wurde die entsprechende Dosis-Wirkungskurve erstellt und daraus mit Hilfe des Statistikprogrammes Sigma-Plot der pI_{50} -Wert ermittelt. Das Ergebnis ist in Abb. 3.8 gezeigt. Der pI_{50} -Wert war in allen vier Bestimmungen annähernd gleich. Das bedeutet, dass jeder Elongationsschritt in gleichem Maße gehemmt wird und somit jede VLCFA innerhalb eines Chromatogramms zur Berechnung des pI_{50} -Wertes über die entsprechende Peakfläche verwendet werden kann.

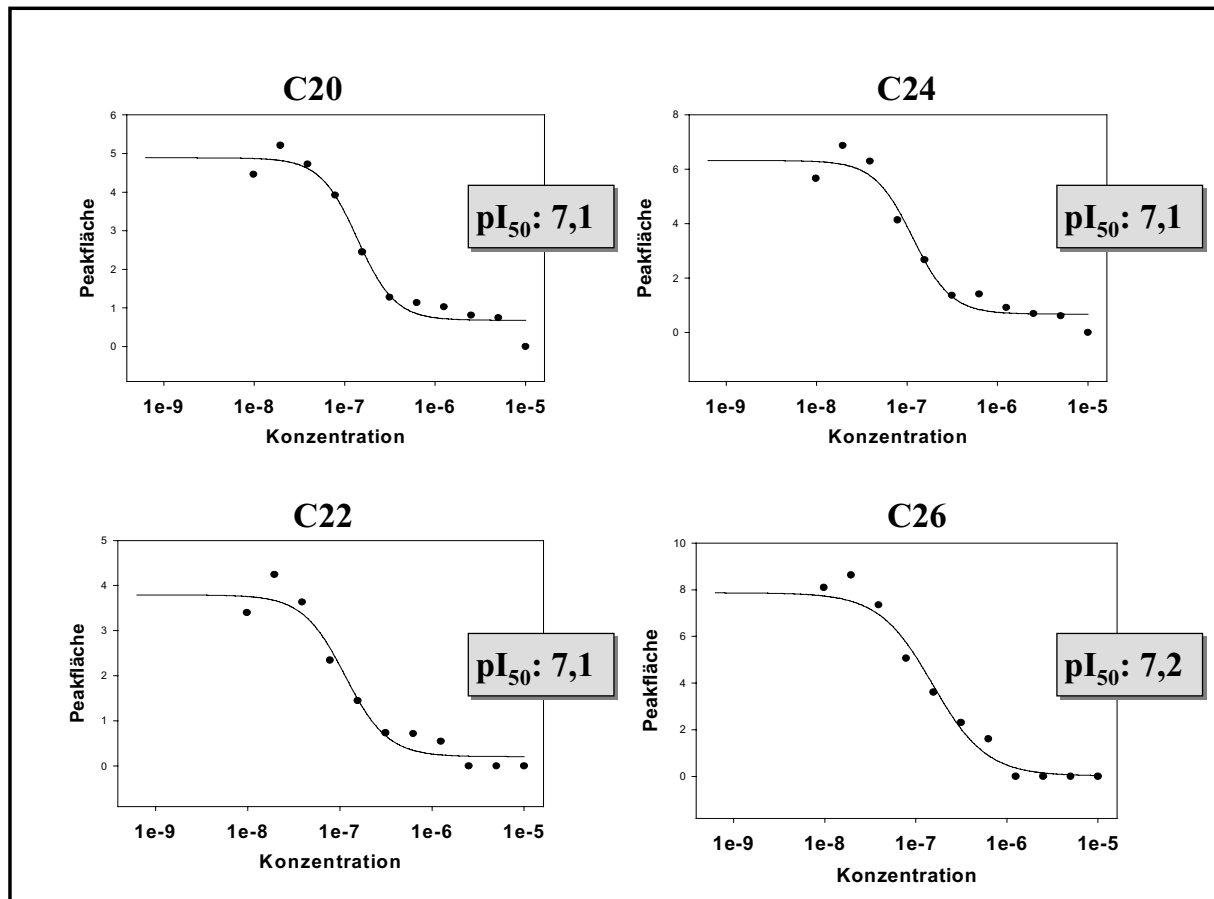


Abb. 3.8: Dosis-Wirkungskurven der Hemmung von FAE1 mit Allidochlor.

Die vier Dosis-Wirkungskurven, die anhand der unterschiedlichen Hemmungen für den jeweiligen Elongationsschritt ermittelt wurden, zeigen, dass die pI_{50} -Werte der Hemmungen eines jeden Elongationsschrittes übereinstimmen.

Als weitere Beispiele wurden die Hemmkurven und dazugehörigen pI_{50} -Werte der Hemmungen von FAE1 und At5g43760 mit Allidochlor, Cafenstrole und Flufenacet bestimmt. Die Ergebnisse sind in Abb. 3.9 und Tabelle 3.4 zusammengefasst.

Tab. 3.4: pI_{50} -Werte von Allidochlor, Cafenstrole und Flufenacet

	Allidochlor	Cafenstrole	Flufenacet
FAE1	7,1	6,7	7
At5g43760	5,7	6,4	-

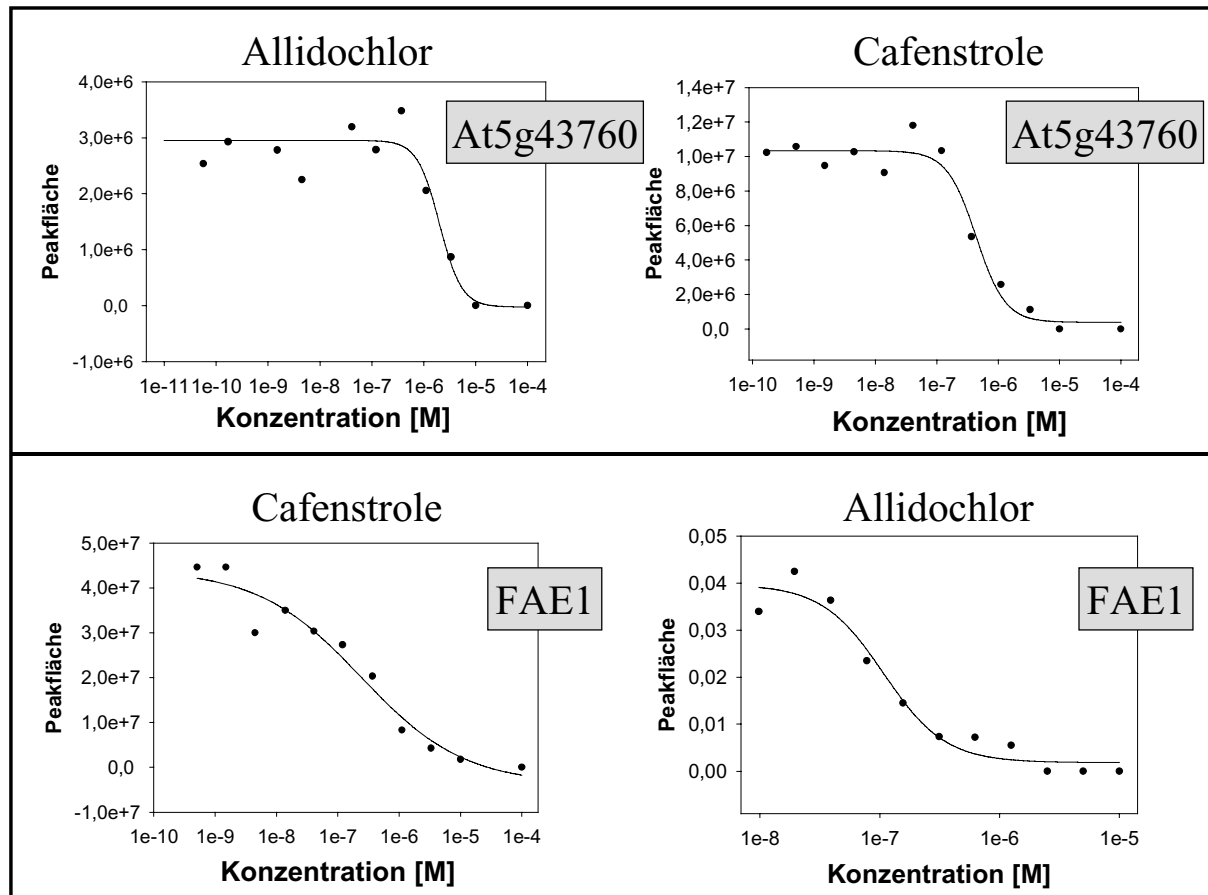


Abb. 3.9: Hemmkurven verschiedener Elongasen, gehemmt mit verschiedenen Verbindungen.

3.6 VLCFA-Analyse von *Arabidopsis* Wildtyp, *fiddlehead*-Mutante und Flufenacet behandelten Pflanzen

Abb. 3.10 zeigt einen Vergleich von *Arabidopsis* Wildtyp-Pflanzen mit *fiddlehead*-Mutanten und vor der Entwicklung von Blüten mit einer Aufwandmenge von 100 g/ha Flufenacet behandelten Pflanzen. Ebenso wie die *fiddlehead*-Mutanten weisen herbizidbehandelte Pflanzen Fusionen verschiedener Organe auf. Am häufigsten wurden Fusionen innerhalb der Blütenorgane und verschiedener Blüten untereinander beobachtet. Einzelne Blattfusionen, Fusionen von Blatt mit Blüte und Blatt mit Stängel traten ebenfalls auf. Zusammengefasst entspricht der Phänotyp der mit Flufenacet behandelten Pflanzen dem der *fiddlehead*-Mutanten.

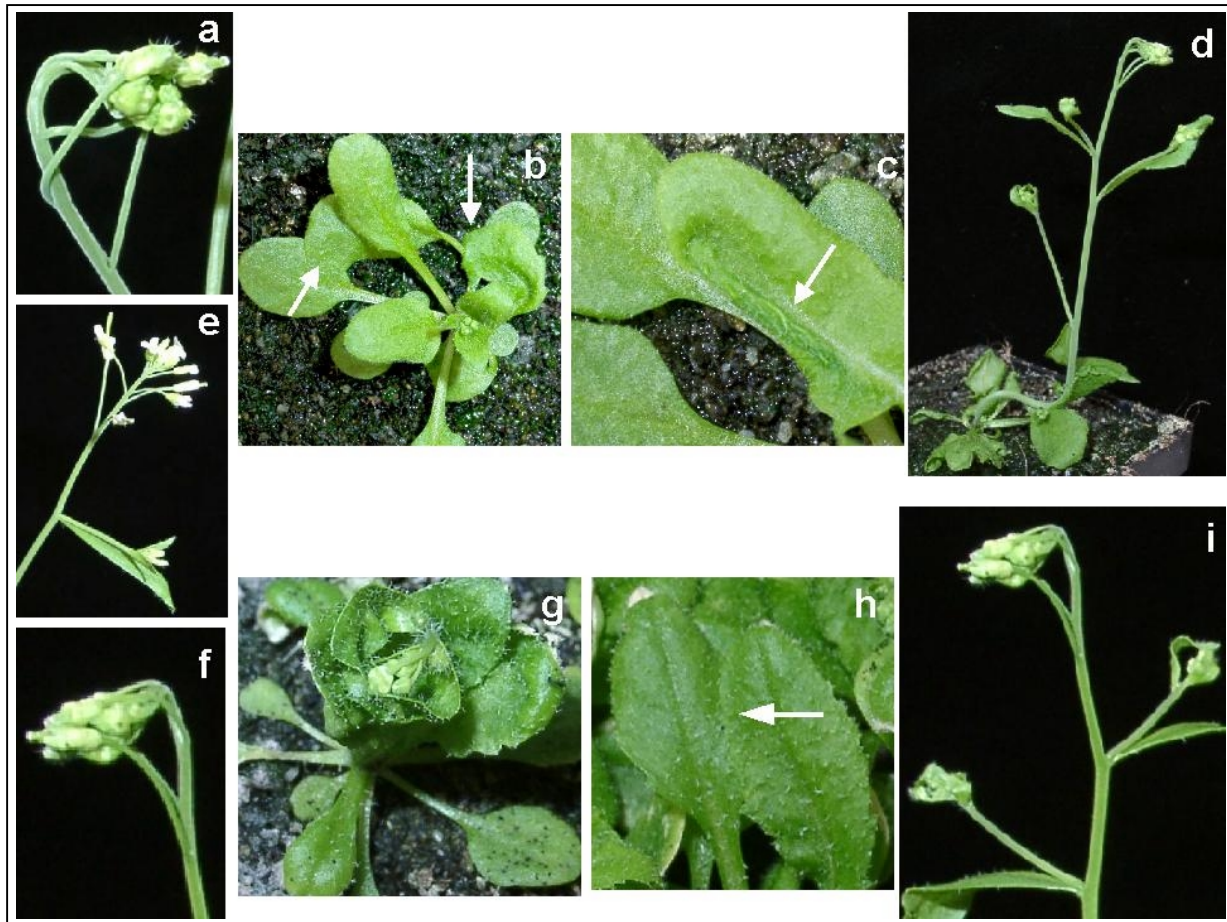


Abb. 3.10: *Arabidopsis thaliana* Wildtyp, *fiddlehead*-Mutante und mit Flufenacet behandelte Pflanze.

3-4 Wochen alte *Arabidopsis thaliana* Pflanzen a)-d) *fiddlehead* Mutante, e) Wildtyp, f)-i) mit Flufenacet behandelte Pflanzen.

Um die Fettsäurezusammensetzungen von *Arabidopsis* Wildtyp, *fiddlehead*-Mutante und mit Flufenacet behandelten Pflanzen zu untersuchen und miteinander zu vergleichen, wurden die gesamten Fettsäuren dieser Pflanzen als Fettsäuremethylester wie unter 2.12 beschrieben extrahiert und mittels GC/MS analysiert. Zu diesem Zweck wurde Blütenmaterial vier Wochen alter Pflanzen verwendet, da die Blüten den Hauptexpressionsort von *FDH* darstellen (Yephremov *et al.*, 1999). Der Vergleich einer gaschromatografischen Analyse der FAMES des Wildtyps mit der der *fiddlehead*-Mutante ist in Abb. 3.11 dargestellt. Die Ausschnitte zeigen den Bereich des Gaschromatogramms, in dem VLCFAs eluieren, da dies der interessante Bereich für die Analyse ist. Die Pfeile kennzeichnen die sichtbaren Unterschiede der FAME-Zusammensetzungen der unterschiedlichen Pflanzen.

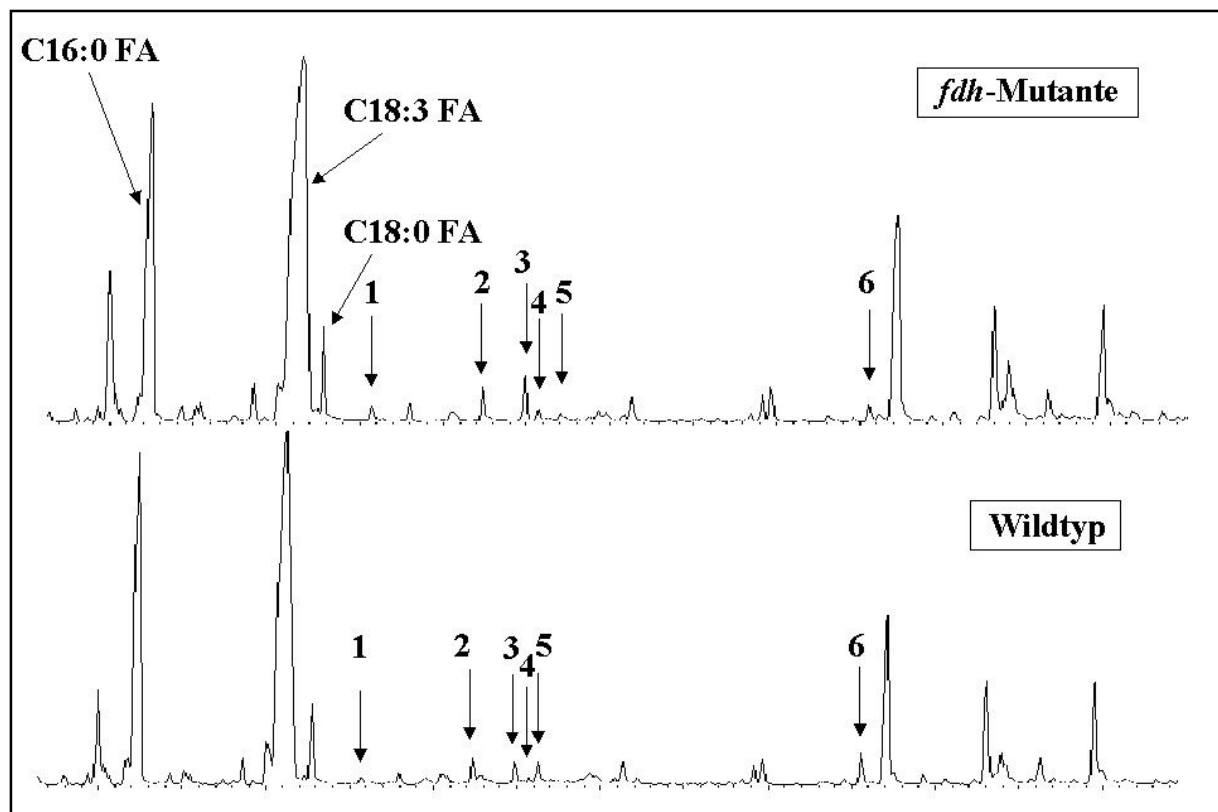


Abb. 3.11: Vergleich der Gaschromatogramme der FAME-Analyse von Wildtyp und *fiddlehead*-Mutante (Ausschnitt).

Die Unterschiede der Profile beschränken sich auf sehr kleine Peaks. Dies war zu erwarten, da *FDH* nur in einem geringen Teil des für die Untersuchung eingesetzten Gewebes exprimiert wird (s. 1.3). Um diese Unterschiede zu berechnen, wurden die Flächen der einzelnen Peaks zunächst auf die des C18:3-Säure Peaks normiert, damit unterschiedliche Ausbeuten der jeweiligen FAME-Aufarbeitungen ausgeglichen werden. Die daraus erhaltenen Werte für die Mutante wurden durch die des Wildtyps dividiert und in der Abb. 3.12 logarithmisch dargestellt. Eine Zunahme einer bestimmten Stoffwechselkomponente in der Mutante ist somit als Wert >1 erkennbar, eine Abnahme als Wert <1 . Da die hier gezeigten Werte nur einfach bestimmt sind, wurde zur Kontrolle der Aussagekraft eine unabhängige Messung mit zwei Proben des Wildtyps durchgeführt. Bei gleicher Auswertung der Daten befanden sich die erhaltenen Werte bei einer Aussagesicherheit von 96 % im Mittel in einem Vertrauensintervall von 7 % (maximal 26 %).

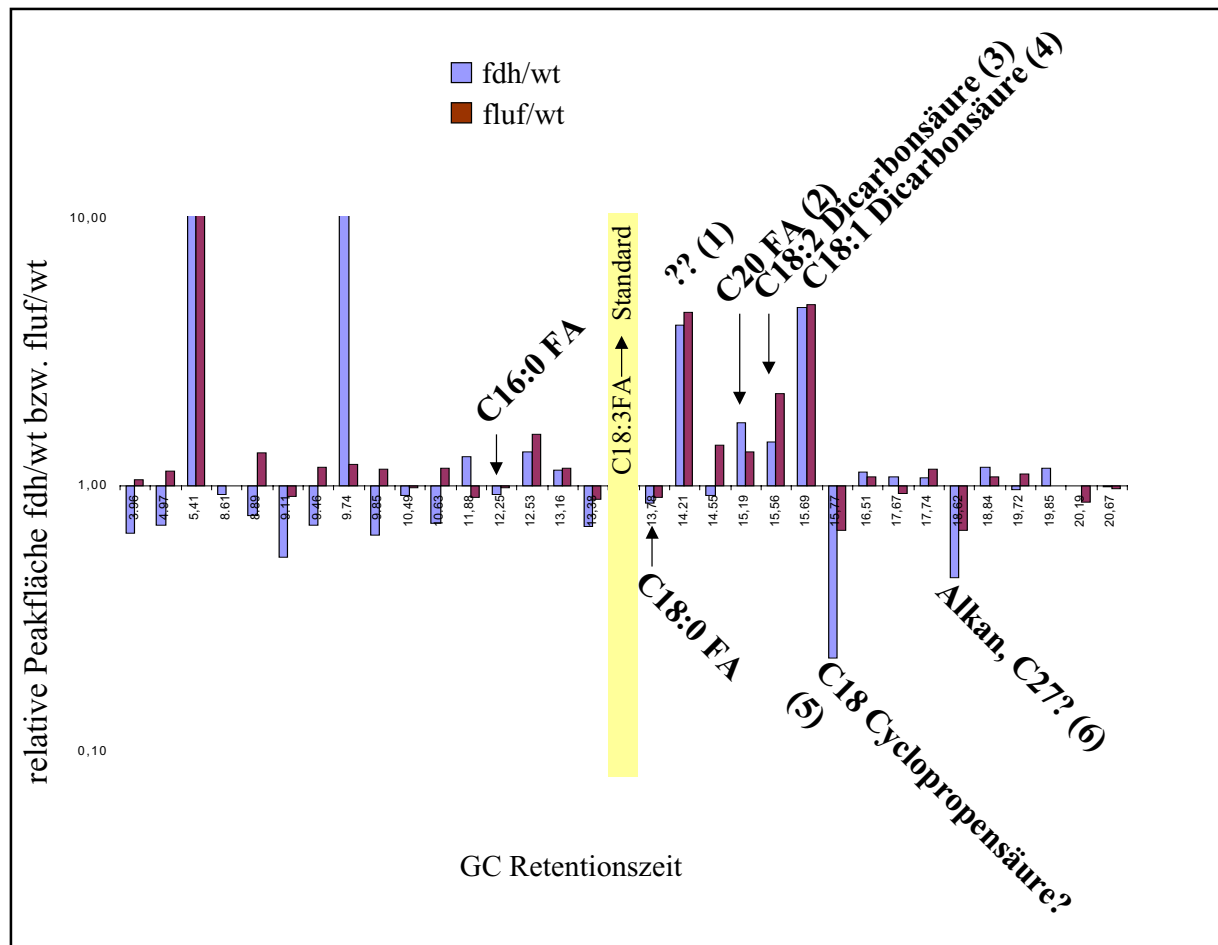


Abb. 3.12: Grafische Darstellung der Zu- und Abnahme verschiedener Stoffwechselkomponenten in *fiddlehead*-Mutanten und Flufenacet behandelten Pflanzen im Vergleich mit dem unbehandelten Wildtyp. Jede Peakfläche wurde zunächst auf die Peakfläche des C18:3-Peaks des gleichen Chromatogramms normiert. Die so erhaltenen Werte für die Mutante wurden durch die des Wildtyps geteilt und als Zu- oder Abnahme (Wert größer oder kleiner 1) logarithmisch dargestellt.

Es zeigt sich, dass in dem Bereich, in dem VLCFAs von der Säule eluieren, also jenseits von Stearilsäure (C18), *fiddlehead*-Mutanten und mit Flufenacet behandelte Pflanzen sehr ähnliche Abweichungen im Vergleich zum Wildtyp aufweisen. Bei einigen Komponenten ist die Veränderung sehr deutlich (Komponenten (1)-(6), s. Abb. 3.12). Die Identifizierung dieser Verbindungen erfolgte mittels Massenspektrometrie. Dazu wurde mit dem jeweiligen Massenspektrum der zu untersuchenden Komponente ein Datenbankvergleich (Bibliotheken: Wiley 4thEd© John Wiley & Sons, Inc.; MPI Library 17000 (c) Chemical Concepts, Germany; NIST 62000 © NIST; Steroids 518 © Chemical Concepts; Food Volatiles 1stEd© TNO Zeist; Bayer-eigene Bibliotheken) mit dem Programm MassLib T V8.7D durchgeführt. Das Ergebnis dieses Vergleichs zeigt die Referenzspektren mit der jeweils größten Ähnlichkeit zum untersuchten Massenspektrum in Prozent. Die Ergebnisse für die Komponenten (1)-(6) sind in Abb. 3.13 dargestellt. Hier sind die Massenspektren der einzelnen Komponenten dem jeweiligen Referenzspektrum mit der größten Ähnlichkeit

gegenübergestellt. Die von der Datenbank angegebene Prozentzahl zur Beschreibung der Ähnlichkeit ist jedoch nicht als absolut zu betrachten, da sie immer von der Qualität des jeweiligen Spektrums abhängt, die durch die gewählten Einstellungen des Messgerätes und die Menge der analysierten Substanz bestimmt wird. Anhand dieser und der Ergebnisse einer präparativen GC/NMR-Analytik, durchgeführt von Herrn Carmelo Scebi (Bayer AG, Leverkusen), konnten die Komponenten (2)-(4) eindeutig bestimmt werden. Bei Komponente (2) handelt es sich um eine gesättigte C20-Fettsäure, Komponenten (3) und (4) konnten als 18:2- bzw. 18:1-Dicarbonsäure identifiziert werden. Diese Komponenten zeigten zusammen mit einer weiteren, weder per Massenspektrometrie noch NMR identifizierbaren Verbindung, eine Akkumulation um den Faktor 1,33 (für C20-Säure) bis 4,75 (für C18:1-Dicarbonsäure) gegenüber dem Wildtyp. Zwei weitere Peaks nahmen gegenüber dem Wildtyp auf einen Faktor von 0,68 bzw. 0,23 ab. Wie anhand der Massenspektren der beiden Peaks ermittelt werden konnte, handelte es sich bei der Komponente (5) mit 35 %iger Wahrscheinlichkeit um C18-Cyclopropensäure, bei Komponente (6) um ein Alkan mit der vermutlichen Anzahl von 27 C-Atomen.

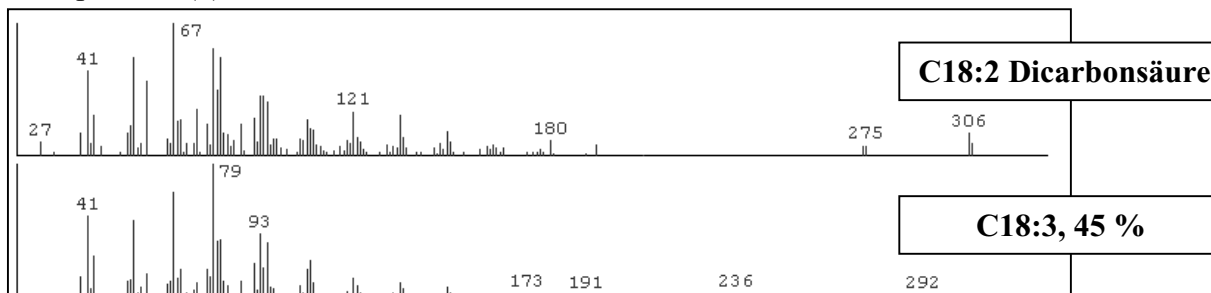
Komponente (1)



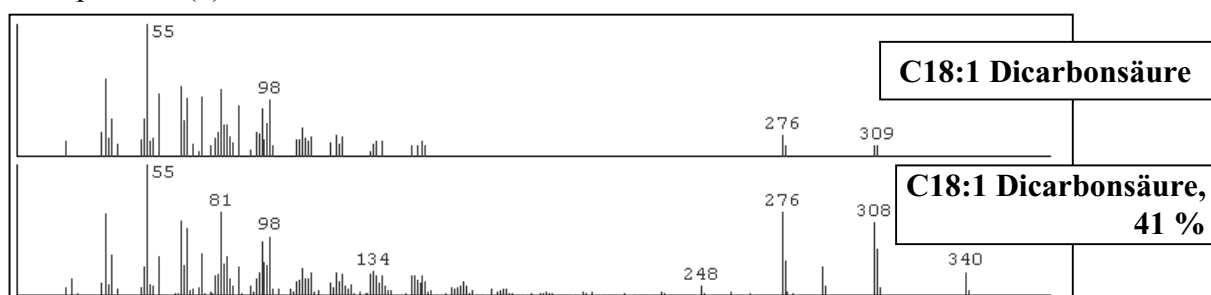
Komponente (2)



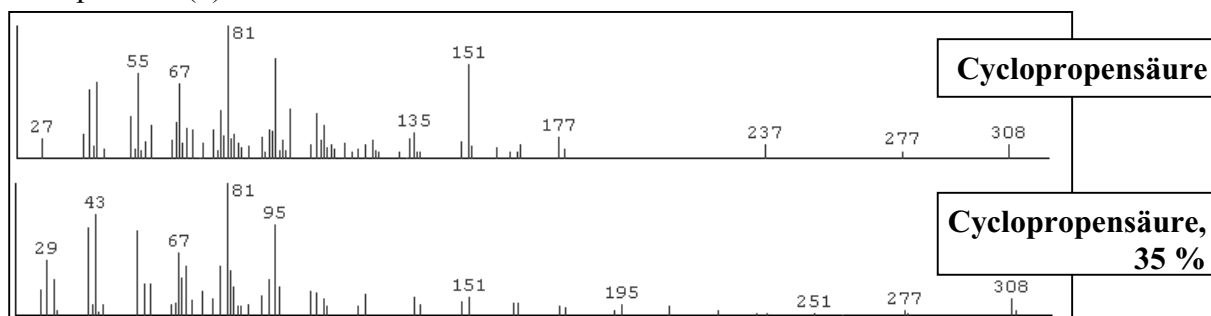
Komponente (3)



Komponente (4)



Komponente (5)



Komponente (6)

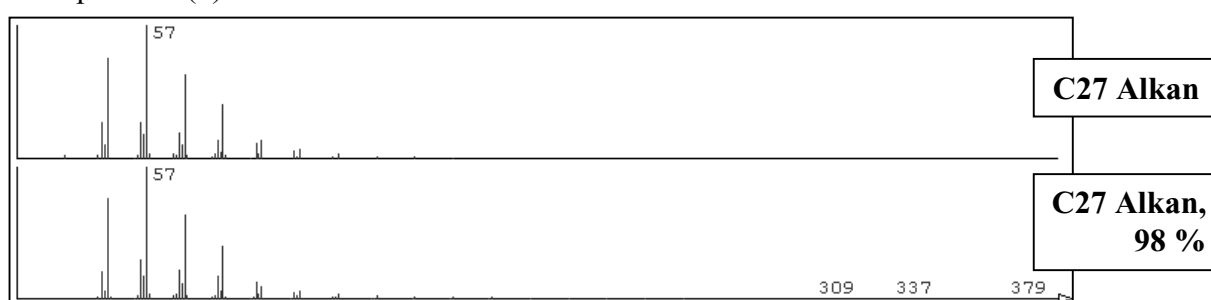


Abb. 3.13: Massenspektren der in der *fiddlehead*-Mutante und mit Flufenacet behandelten Pflanzen akkumulierten und abnehmenden Verbindungen (s. Abb. 3.12). Es ist jeweils das Massenspektrum der zu untersuchenden Komponente dem Referenzspektrum mit der jeweils größten Ähnlichkeiten in Prozent aus den verwendeten Bibliotheken (Wiley 4thEd© John Wiley & Sons, Inc.; MPI Library 17000 (c) Chemical Concepts, Germany; NIST 62000 © NIST; Steroids 518 © Chemical Concepts; Food Volatiles 1stEd© TNO Zeist; Bayer-eigene Bibliotheken) gegenübergestellt.

3.7 Untersuchungen der Organfusionsmutante *adhesion of calyx edges* (*ace*, *hothead*)

Neben *fiddlehead* gibt es, wie unter 1.4 erwähnt, weitere Organfusionsmutanten von *Arabidopsis thaliana*. Eine dieser Mutanten ist *adhesion of calyx edges* (*ace*), auch unter dem Namen *hothead* (*hth*) bekannt (Lolle *et al.*, 1998; Krolkowski *et al.*, 2003). Das *ACE*-Gen wurde kürzlich kloniert und anhand der Aminosäuresequenz als FAD enthaltende Oxidoreduktase charakterisiert. Um die genaue Funktion von *ACE* im pflanzlichen Stoffwechsel zu untersuchen, wurde eine Analyse der Fettsäuren als FAME mittels GC/MS durchgeführt. Da bei *ace*-Pflanzen ebenso wie bei *fdh*-Pflanzen hauptsächlich die Blütenorgane miteinander fusionieren, wurde auch hier Blütenmaterial vier Wochen alter Pflanzen zur Analyse verwendet, das freundlicherweise von A. Yephremov (MPI für Züchtungsforschung, Köln) zur Verfügung gestellt wurde. Abb. 3.14 zeigt den Vergleich der Chromatogramme der FAME-Analysen von *ace*- und Wildtyp-Blüten, sichtbare Veränderungen sind durch die Pfeile gekennzeichnet.

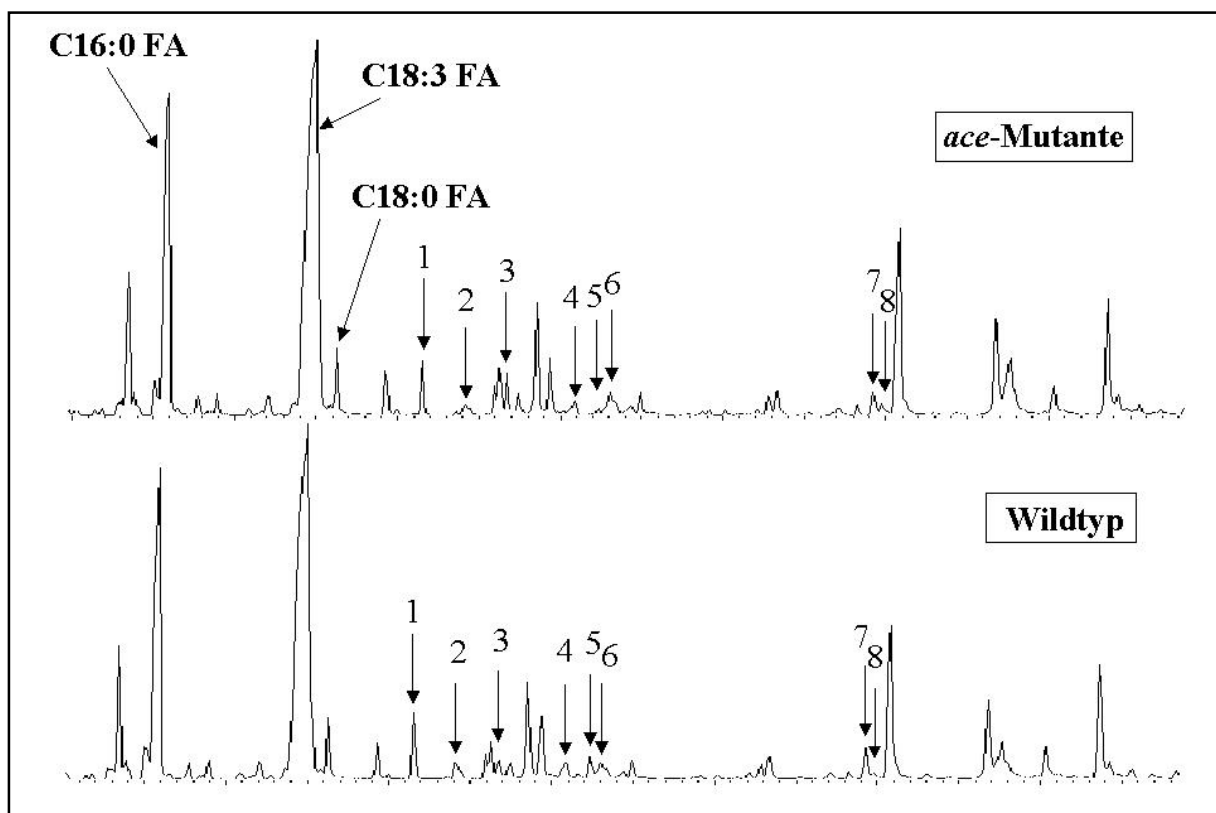


Abb. 3.14: Vergleich der Gaschromatogramme der FAME-Analyse von Wildtyp und *ace*-Mutante.

Die Berechnung der Unterschiede der Größen der einzelnen Peaks erfolgte wie unter 3.6 beschrieben und ist in Abb. 3.15 dargestellt. Der einzige Unterschied zur obigen

Berechnung ist, dass in diesem Fall die Mittelwerte mit Standardabweichung aus drei Messungen gebildet wurden.

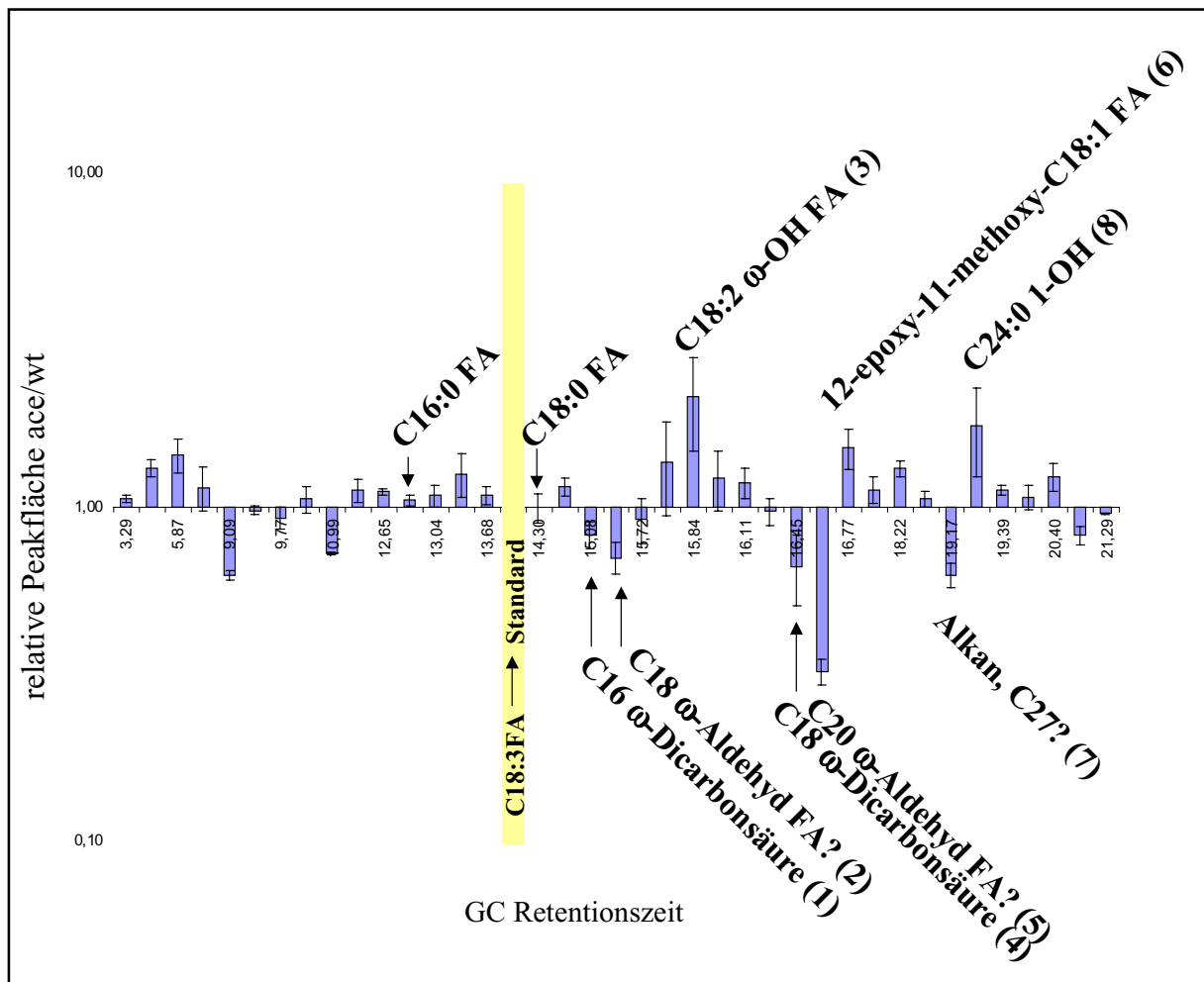
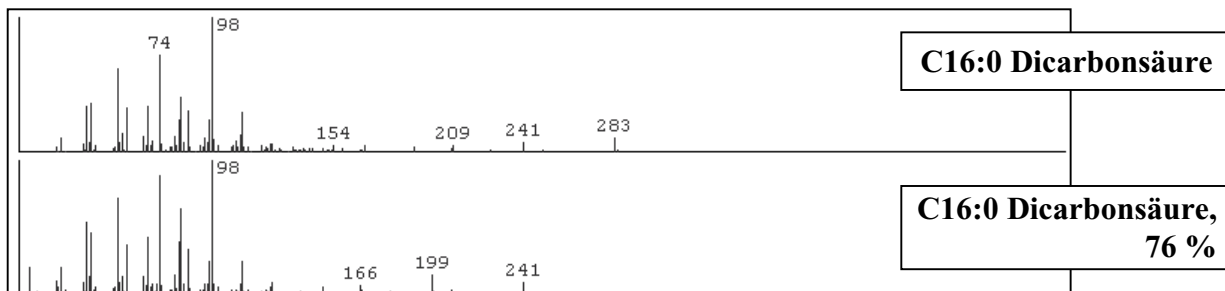


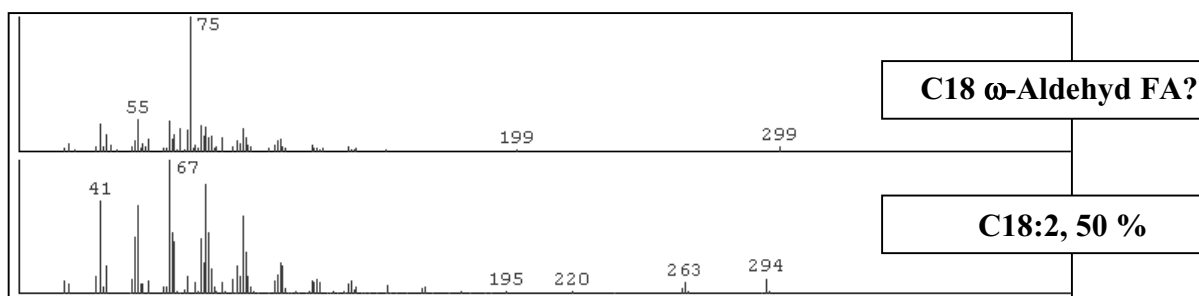
Abb. 3.15: Grafische Darstellung der Zu- und Abnahme verschiedener Stoffwechselkomponenten in *ace*-Mutanten im Vergleich mit dem Wildtyp. Jede Peakfläche wurde zunächst auf die Peakfläche des C18:3-Peaks des gleichen Chromatogramms normiert. Die so erhaltenen Werte für die Mutante wurden durch die des Wildtyps geteilt und als Zu- oder Abnahme (Wert größer oder kleiner 1) logarithmisch dargestellt.

Komponente (1)

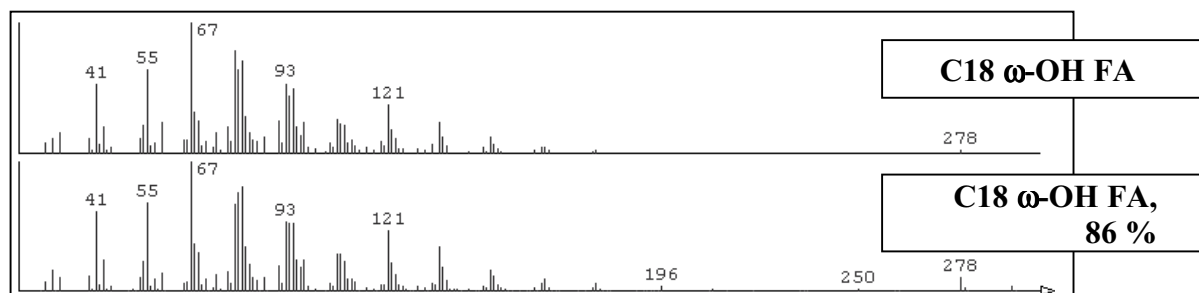


3 Ergebnisse

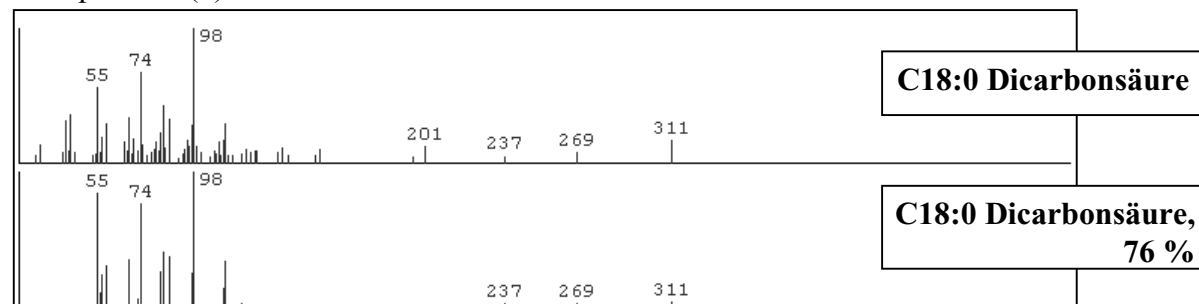
Komponente (2)



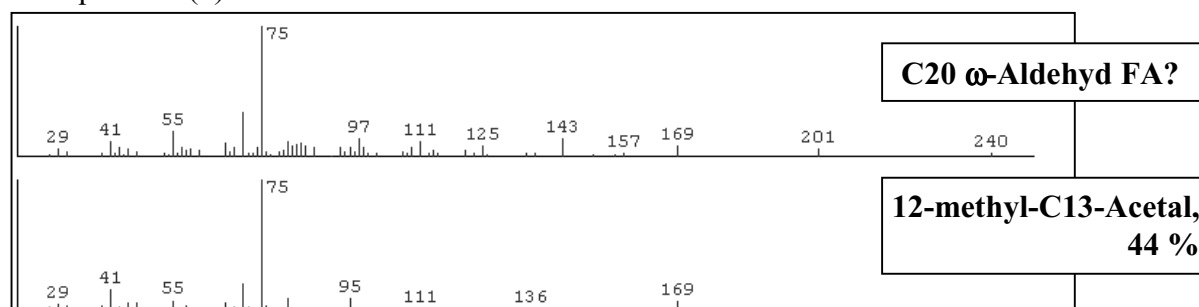
Komponente (3)



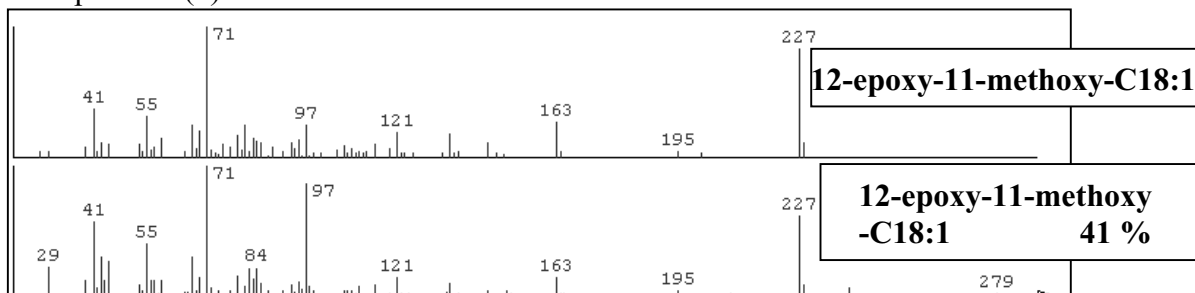
Komponente (4)



Komponente (5)



Komponente (6)



Komponente (7)



Komponente (8)



Abb. 3.16: Massenspektren der in der *ace*-Mutante akkumulierten und abnehmenden Verbindungen (s. Abb. 3.12). Es ist jeweils das Massenspektrum der zu untersuchenden Komponente dem Referenzspektrum mit der jeweils größten Ähnlichkeiten in Prozent aus den verwendeten Bibliotheken (Wiley 4thEd© John Wiley & Sons, Inc.; MPI Library 17000 (c) Chemical Concepts, Germany; NIST 62000 © NIST; Steroids 518 © Chemical Concepts; Food Volatiles 1stEd© TNO Zeist; Bayer-eigene Bibliotheken) gegenübergestellt.

Auch beim Vergleich der *ace*-Mutante mit dem Wildtyp fallen bestimmte Komponenten auf, die im Vergleich mit dem Wildtyp akkumulieren und verschieden sind von den Verbindungen, die in der *fdh*-Mutante akkumulierten oder abnahmen. Mittels Massenspektrometrie konnten diese Komponenten als 18:2- ω -OH-Säure (Komponente (3)), 12-Epoxy-11-methoxy-C18:1-Säure (Komponente (6)) und C24-1-Alkanol (Komponente (8)) identifiziert werden. Die stärkste Veränderung gegenüber dem Wildtyp stellt die starke Abnahme um einen Faktor von 0,32 einer Komponente dar, deren Massenspektrum eine hohe Ähnlichkeit zu einem Acetal aufweist (Komponente (5)). Es ist sehr gut möglich, dass dieses Acetal während der Fettsäureaufarbeitung aus einem ω -Aldehyd hervorgegangen ist. Die

Verbindung konnte allerdings nicht eindeutig identifiziert werden, ebenso wie eine zweite Verbindung mit ebenfalls hoher Ähnlichkeit des Massenspektrums zu dem Acetal, das für Komponente (5) gefunden wurde, vielleicht ein C18 ω -Aldehyd (Komponente (2)). Zusätzlich ist die Abnahme einer C16-Dicarbonsäure (Komponente (1)) und einer C18 Dicarbonsäure (Komponente (4)) sowie eines Alkans, vermutlich mit einer Kettenlänge von 27 C-Atomen (Komponente (7)), zu beobachten.

3.7.1 Expression des *ACE*-Gens in *Saccharomyces cerevisiae*

Um die Funktion des *ACE*-Gens weiter zu untersuchen, wurde *ACE* in der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* exprimiert und die FAME-Zusammensetzung transgener Zellen mittels GC/MS analysiert. Ein *ACE*-exprimierender Hefeklon wurde freundlicherweise von A. Yephremov (MPI für Züchtungsforschung, Köln) zur Verfügung gestellt. Transgene Hefezellen zeigten die gleiche FAME-Zusammensetzung wie Zellen, die mit dem leeren pYES2/CT-Vektor transformiert worden waren; die Funktion von *ACE* konnte somit anhand dieser Vorgehensweise nicht aufgeklärt werden. Aufgrund der Vermutung, dass es sich bei *ACE* um eine Alkoholoxidase handelt (s. auch 4.5), wurden *ACE*-exprimierende Hefezellen mit verschiedenen Hydroxyfettsäuren (C16:0- ω -OH, C18:0-12-OH und C18:1-12-OH) und einem Alkohol (C24-1-OH), der jedoch von den Zellen nicht aufgenommen wurde, inkubiert. Mit keinem dieser potenziellen Substrate konnte eine Aktivität in den transgenen Zellen beobachtet werden.

3.8 Entwicklung eines *in vitro* Assays zur Aktivitätsbestimmung von *FAE1*

Die Entwicklung eines *in vitro* Assays zur Aktivitätsbestimmung einer Elongase ist als schwierig zu betrachten. Elongasen sind membranständig und befinden sich somit in der unlöslichen Zellfraktion. Um jedoch Effekte von Fremdproteinen auf die gewählte Assaymethode möglichst auszuschließen, ist eine Aufreinigung des gewählten Enzyms sinnvoll. Hierfür wäre es notwendig, die Elongase zuvor aus der Membran zu solubilisieren.

Zur Entwicklung eines *in vitro* Testsystems für die Aktivitätsbestimmung wurde die Elongase *FAE1* ausgewählt. In *Saccharomyces cerevisiae* exprimierte *FAE1* konnte bereits solubilisiert und aufgereinigt werden (Ghanavati und Jaworski, 2002). Da von Aktivitätsverlusten während der Solubilisierung und Aufreinigung ausgegangen werden muss, war ein weiterer Grund für die Wahl von *FAE1* zur *in vitro* Aktivitätsbestimmung, dass das

Enzym in den GC/MS-Analysen der transgenen Hefen die größte Aktivität aller exprimierten Elongasen zeigte.

3.8.1 Solubilisierung von *FAE1*

Zu Beginn der Solubilisierung wurde die Mikrosomenfraktion transgener Zellen nach einem modifizierten Protokoll nach Ghanevati *et al.* (2001) aufgereinigt (s. 2.10.6). Da sich *FAE1* in der Mikrosomenfraktion befindet, bewirkt dieses Vorgehen zunächst eine Aufkonzentrierung des Proteins. Das Ergebnis der Aufreinigung ist in ihren einzelnen Schritten in Abb. 3.17 dargestellt. Das Pellet des ersten Zentrifugationsschrittes nach dem Zellaufschluss besteht hauptsächlich aus nicht aufgeschlossenen Zellen und Zelltrümmern. Der Überstand enthält die löslichen Zellbestandteile und Mikrosomen. Letztere werden durch eine zweite Zentrifugation abgetrennt. Die Anreicherung von *FAE1* in dieser Fraktion ist deutlich zu erkennen.

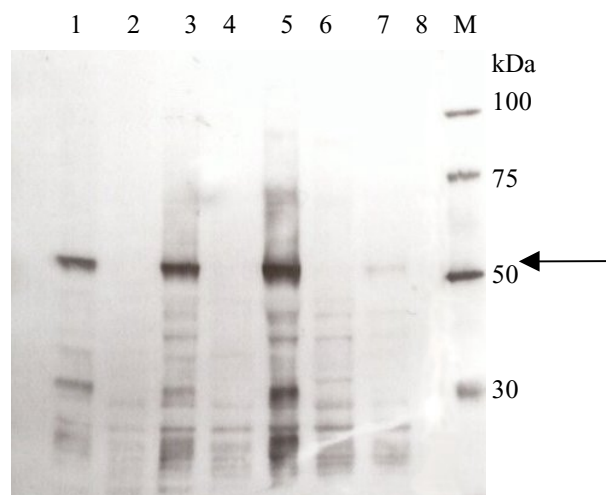


Abb. 3.17: Mikrosomenaufreinigung aus *FAE1* exprimierenden Hefezellen. Western Blot der Mikrosomenaufreinigung aus *FAE1* exprimierenden (ungeradzahlige Spuren) und Kontrollzellen (geradzahlige Spuren). Der Zellaufschluss mittels Glasperlen und die anschließende Mikrosomenaufreinigung erfolgten nach 2.10.6. Spuren: 1-2: Pellet nach erster Zentrifugation, 3-4: Überstand nach erster Zentrifugation, 5-6: Mikrosomen, 7-8: Überstand des Mikrosomenpellets, M: 6xHis Protein Ladder (Qiagen)

Zur Solubilisierung des Proteins aus den Mikrosomen wurden diese in dem sogenannten Solubilisierungspuffer mit Natriumchlorid und Triton X-100 aufgenommen und ähnlich wie von Ghanevati *et al.* (2002) beschrieben (s. 2.10.6) unter Rühren 1,5 h auf Eis solubilisiert. Das Ergebnis ist in Abb. 3.18 gezeigt, es konnten ca. 30-40 % des in den Mikrosomen vorhandenen Enzyms solubilisiert werden.

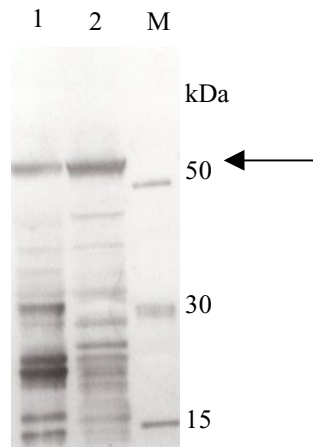


Abb. 3.18: Solubilisierung von *FAE1*. Western Blot der einzelnen Solubilisierungsschritte von *FAE1*. Spuren: 1: solubilisiertes Protein, 2: Pellet nach der Solubilisierung, M: 6xHis Protein Ladder (Qiagen)

3.8.2 Aufreinigung von *FAE1* mittels Ni-NTA-Affinitätschromatographie

Um den Einfluss fremder Proteine auf die Messung der Aktivität von *FAE1* so weit wie möglich auszuschließen, war es wünschenswert, *FAE1* von den übrigen Proteinen der Mikrosomenfraktion so gut wie möglich zu trennen. Die Aufreinigung des solubilisierten Proteins erfolgte durch dessen C-terminalen His-Tag mittels Ni-NTA-Affinitätschromatographie wie unter 2.11.1 beschrieben. Das Ergebnis der Aufreinigung ist in seinen Einzelschritten in Abb. 3.19 dargestellt. In den jeweiligen Eluatfraktionen ist eine deutliche Anreicherung eines Proteins der abgeleiteten Größe von 56 kDa für *FAE1* zu erkennen. Dass es sich dabei tatsächlich um *FAE1* handelt, wurde durch eine Western-Blot-Analyse mit Immunodetektion mittels Penta-His-Antikörpern nachgewiesen (Abb. 3.19). Eine Bestimmung der Proteinkonzentration des Eluats mittels BCA-Test (Smith *et al.*, 1985) ergab eine Konzentration von 0,4 µg/µl. Bei einem Gesamtvolumen des Eluats von 1 ml wurden also insgesamt 0,4 mg *FAE1* aus einer 400 ml Hefekultur aufgereinigt. Bei weiteren Aufreinigungen zeigte sich, dass dieser Wert jeweils zwischen 0,4 und 0,8 mg/400 ml lag.

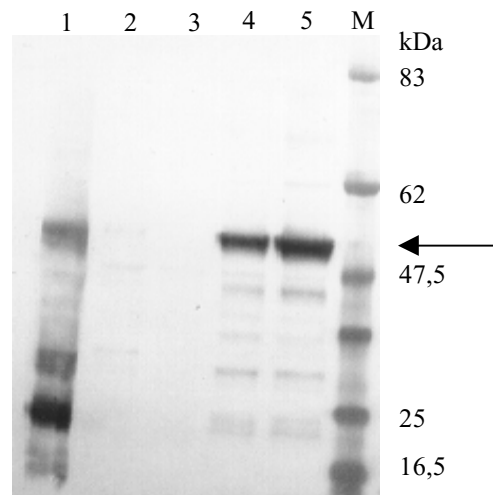


Abb. 3.19: Western-Blot-Analyse der Aufreinigung von *FAE1* mittels Ni-NTA-Affinitätschromatographie. 1: Mikrosomenfraktion mit solubilisierter *FAE1*, 2: Durchfluss, 3: 1. Wachfraktion, 4: 1. Eluat, 5: 2. Eluat, M: Molekulargewichtsstandard (Prestained Protein Marker, Broad Range, NEB)

3.8.3 Testprinzip zur Aktivitätsbestimmung der aufgereinigten *FAE1*

Um die Aktivität eines Enzyms messen zu können, ist es notwendig, einen Assay mit möglichst optimalen Arbeitsbedingungen für das entsprechende Enzym zu entwickeln. Diese Arbeitsbedingungen umfassen unter anderem einen geeigneten Puffer, optimale Substratkonzentrationen, eventuell benötigte Kofaktoren, Temperatur, pH-Wert und Inkubationszeit.

Die Aktivität von *FAE1* wurde von Ghanevati *et al.* (2001) über die Freisetzung von radioaktivem CO_2 aus Malonyl-CoA bestimmt. Für das Hochdurchsatzscreening wird jedoch ein nicht-radioaktiver Assay bevorzugt. Die von Fettsäureelongasen katalysierte Reaktion führt zur Freisetzung eines CoA-Restes, der mit Hilfe von 7-Diethylamino-3-(4'-maleimidylphenyl)-4-methylcoumarin (CPM) durch die Bindung an die freie SH-Gruppe des CoA-Restes nachgewiesen werden kann. Die Menge der bei dieser Reaktion entstehenden fluoreszierenden Verbindung kann über eine Fluoreszenzmessung bei einer Exitationswellenlänge von 355 nm und einer Emissionswellenlänge von 460 nm bestimmt werden (s. Abb. 2.2).

Ziel der vorhergehenden Aufreinigung von *FAE1* war es, das Enzym in möglichst reiner Form für die *in vitro*-Aktivitätsbestimmung zur Verfügung zu stellen. Da in diesem Assay die Aktivität über die SH-Gruppe des bei der Kondensation von Oleoyl-CoA mit Malonyl-CoA frei werdende Coenzym A bestimmt werden sollte (Abb. 2.2), war es nötig, weitere Quellen von SH-Gruppen, wie andere Proteine, möglichst auszuschließen. Eine hohe

Verunreinigung durch Fremdproteine würde vermutlich zu einem sehr hohen Hintergrundsignal führen.

3.8.4 Zeitabhängigkeit der *FAEI*-Reaktion

Nach der erfolgreichen Reinigung der Elongase *FAEI* mittels Affinitätschromatografie (s. 3.8.2) wurde die enzymatische Funktionalität des Proteins untersucht. Hierzu wurden zunächst verschiedene Proteinmengen mit verschiedenen Reaktionszeiten getestet. Um die Höhe des Hintergrundsignals zu bestimmen, wurden die Messungen parallel jeweils nur mit einem der beiden Substrate durchgeführt. Das Ergebnis ist in Abb. 3.20 dargestellt.

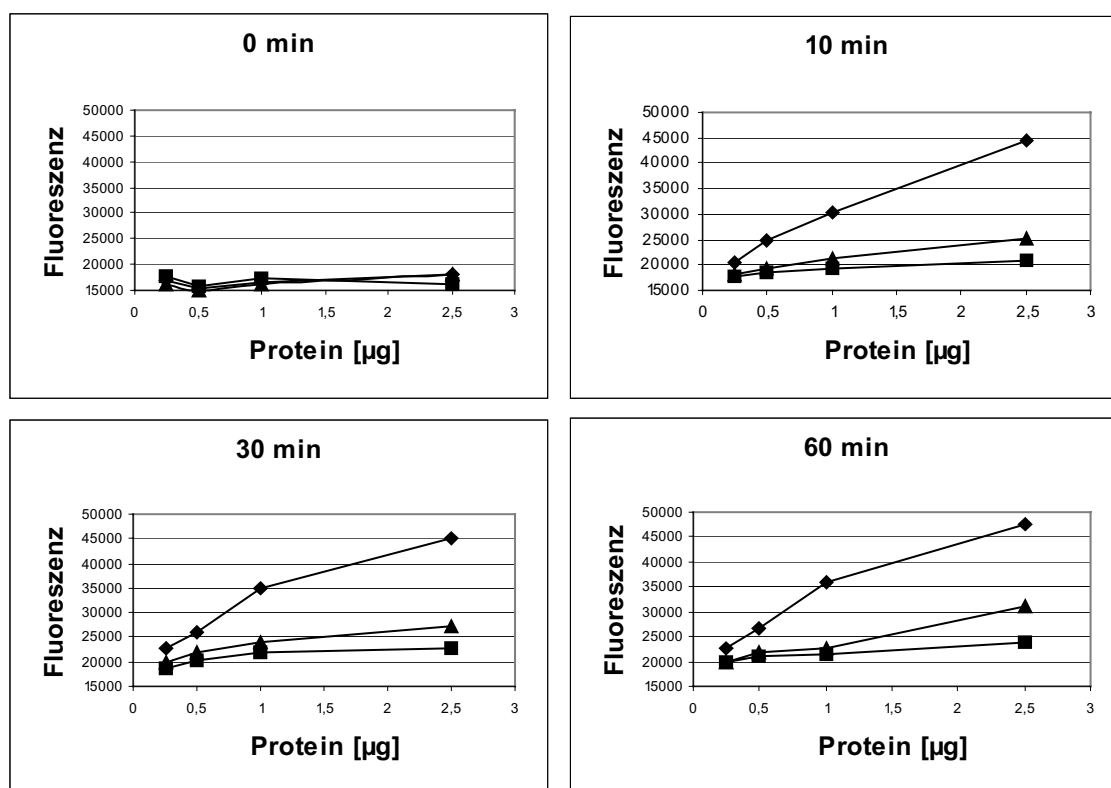


Abb. 3.20: Abhängigkeit der *FAEI*-Aktivität von der Proteinmenge. Unterschiedliche Mengen gereinigte *FAEI* wurden für die angegebenen Reaktionszeiten im Assayansatz mit 40 mM Natriumphosphat, 50 µM Oleoyl-CoA, 50 µM Malonyl-CoA in 25 µl Assayvolumen bei 30 °C inkubiert. Anschließend wurden die Reaktionen mit 25 µl 100 µM CPM in DMSO abgestoppt und zur Reaktion des CoA-Restes mit CPM für weitere 30 min bei 30 °C inkubiert (s. auch Abb. 3.21). Die Daten entsprechen dem Mittelwert aus einer Doppelbestimmung.

■ : Assayansatz ohne Oleoyl-CoA, ▲ : Assayansatz ohne Malonyl-CoA, ◆ : Assayansatz mit beiden Substraten

Es ist sowohl eine Abhängigkeit der Aktivität von der Proteinmenge als auch von der Reaktionszeit zu beobachten. Stellt man die Ergebnisse wie in Abb. 3.21 gezeigt dar, ist deutlich zu erkennen, dass die Reaktion nach 10-30 Minuten einem konstanten Wert entgegenstrebt. Der Hintergrund ist dabei relativ hoch, erst bei einer Proteinmenge von 1 µg,

das entspricht einer Endkonzentration von 100 ng/ μ l im Assayansatz bei einem Assayvolumen von 25 μ l, ist eine deutliche Abhebung der Aktivität vom Hintergrund zu beobachten.

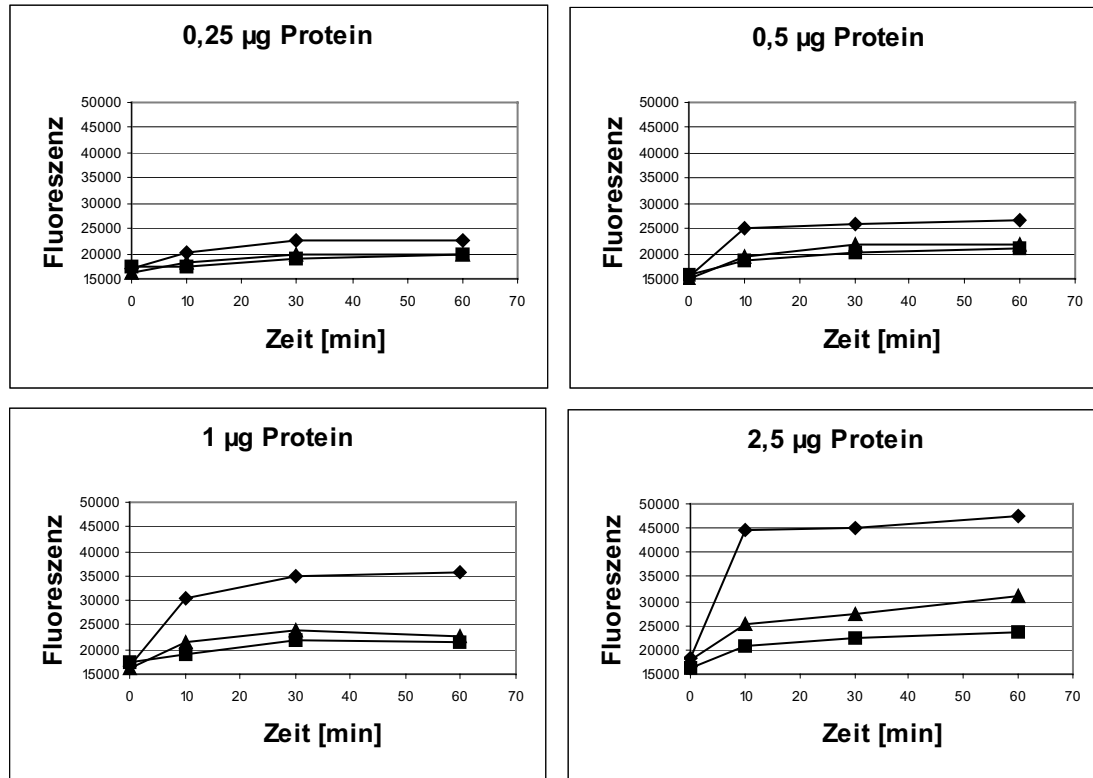


Abb. 3.21: Zeitabhängigkeit der FAE1-Aktivität. Unterschiedliche Mengen gereinigte FAE1 wurden für die angegebenen Reaktionszeiten im Assayansatz mit 40 mM Natriumphosphat, 50 μ M Oleoyl-CoA, 50 μ M Malonyl-CoA in 25 μ l Assayvolumen bei 30 °C inkubiert. Anschließend wurden die Reaktionen mit 25 μ l 100 μ M CPM in DMSO abgestoppt und zur Reaktion des CoA-Restes mit CPM für weitere 30 min bei 30 °C inkubiert (s. auch Abb. 3.20). Die Daten entsprechen dem Mittelwert aus einer Doppelbestimmung.

■ : Assayansatz ohne Oleoyl-CoA, ▲ : Assayansatz ohne Malonyl-CoA, ◆ : Assayansatz mit beiden Substraten

Anhand dieser Ergebnisse wurde für weitere Reaktionsansätze die Proteinmenge auf 2,5 μ g Protein bzw. 100 ng/ μ l Endkonzentration im Assayansatz festgesetzt, die Reaktionszeit auf 30 min.

3.8.5 Bestimmung des K_m -Wertes

Zur Bestimmung des K_m -Wertes, also der Substratkonzentration mit der halbmaximalen Reaktionsgeschwindigkeit, wurde jeweils eines der beiden Substrate Malonyl-CoA und Oleoyl-CoA in einer konstanten Konzentration von 50 μ M eingesetzt, die Konzentration des zweiten Substrates variierte von 0,1-1000 μ M. Das Ergebnis der ersten Messung unter den in 2.13 aufgeführten Bedingungen ist in Abb. 3. 22 dargestellt.

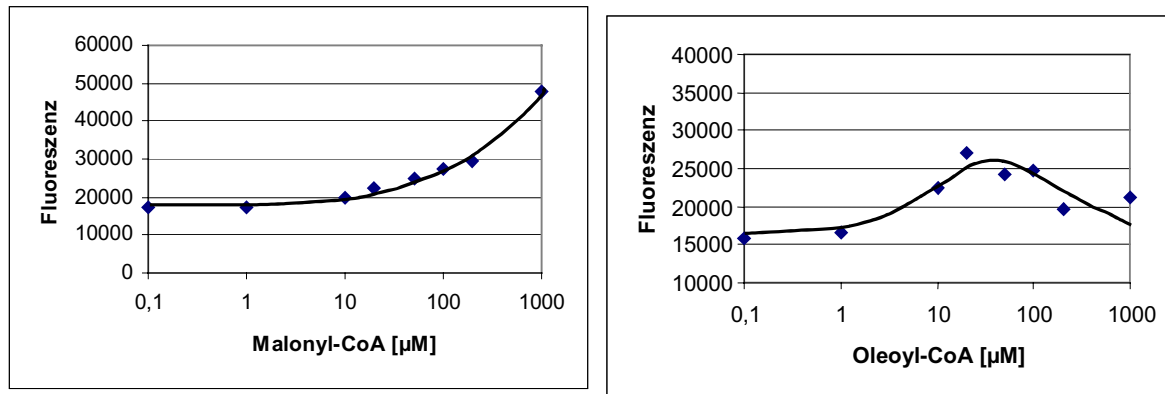


Abb. 3.22: K_m -Wert-Bestimmung für die beiden Substrate Malonyl-CoA und Oleoyl-CoA ohne Triton im Assay-Ansatz. Bei variierenden Konzentrationen von Malonyl-CoA bzw. Oleoyl-CoA wurde die Konzentration des jeweils zweiten Substrates auf 50 μM konstant gehalten. Pro Reaktion wurden 2,5 μg Protein mit 40 mM Natriumphosphat in 25 μl Assayvolumen eingesetzt und bei 30 °C inkubiert. Anschließend wurden die Reaktionen mit 25 μl 100 μM CPM in DMSO abgestoppt und zur Reaktion des CoA-Restes mit CPM für weitere 30 min bei 30 °C inkubiert. Die Daten entsprechen dem Mittelwert aus einer Doppelbestimmung.

Beide Kurven entsprechen nicht der in der logarithmischen Darstellung normalerweise erwarteten sigmoiden Form. Im Fall der Kurve für die unterschiedlichen Malonyl-CoA-Konzentrationen ist vermutlich bei der Konzentration von 1 mM die Sättigung noch nicht erreicht, es müssten noch höhere Konzentrationen Malonyl-CoA eingesetzt werden, was jedoch nicht mehr praktisch wäre.

Die Kurve für die unterschiedlichen Oleoyl-CoA-Konzentrationen zeigt einen ungewöhnlichen Verlauf. Zunächst ist mit steigender Substratkonzentration wie erwartet ein Anstieg der Aktivität zu beobachten. Bei Überschreiten einer Oleoyl-CoA-Konzentration von 20 μM sinkt die Aktivität jedoch wieder ab. Die Ursache hierfür könnte eine Micellenbildung des Oleoyl-CoA sein. Dies hätte zur Folge, dass mit ansteigender Substratkonzentration das micellenbildende Substrat nicht mehr für die Reaktion zur Verfügung stünde. Um dies zu überprüfen, wurde der gleiche Versuch mit 2 % Triton X-100 als Detergenz im Assayansatz durchgeführt, um die Bildung von Micellen möglichst auszuschließen. Das Ergebnis ist in Abb. 3.23 gezeigt. Für beide Kurven ist eine gestiegene absolute Aktivität zu beobachten. Die Kurve für Oleoyl-CoA entpricht nach Zugabe von Triton X-100 zu einer Endkonzentration von 2 % schon eher dem erwarteten sigmoiden Verlauf. Auf Basis dieser Ergebnisse ist die Konzentration von Malonyl-CoA für weitere Reaktionsansätze auf 500 μM , die Konzentration von Oleoyl-CoA auf 70 μM festzulegen. Außerdem sollte für weitere Versuche die Konzentration von Triton X-100 im Assay erhöht werden.

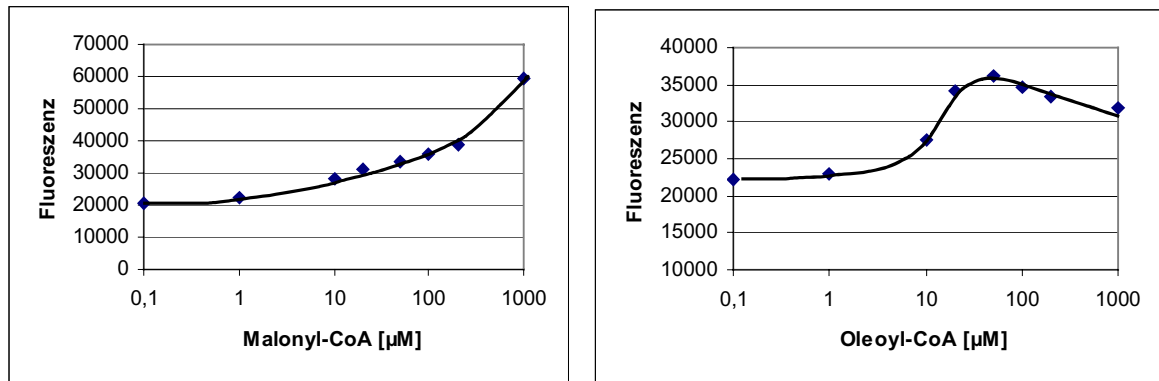


Abb. 3.23: K_m -Wert-Bestimmung für die beiden Substrate Malonyl-CoA und Oleoyl-CoA mit 2 % Triton im Assay-Ansatz. Bei variierenden Konzentrationen von Malonyl-CoA bzw. Oleoyl-CoA wurde die Konzentration des jeweils zweiten Substrates auf 50 μM konstant gehalten. Pro Reaktion wurden 2,5 μg Protein mit 40 mM Natriumphosphat in 25 μl Assayvolumen eingesetzt und bei 30 °C inkubiert. Anschließend wurden die Reaktionen mit 25 μl 100 μM CPM in DMSO abgestoppt und zur Reaktion des CoA-Restes mit CPM für weitere 30 min bei 30 °C inkubiert. Die Daten entsprechen dem Mittelwert aus einer Doppelbestimmung.

4 Diskussion

Der Wirkmechanismus von Chloracetamiden und anderen weit verbreiteten Herbiziden der HRAC-Klassen K₃ und N (vgl. Abb. 1.2) wird seit ihrer Entdeckung vor fast 50 Jahren erforscht, und fast alle Komponenten des grundlegenden Pflanzenstoffwechsels wurden schon mit der Wirkung dieser Hemmstoffe in Verbindung gebracht. Viele der beobachteten Wirkungen waren jedoch aufgrund der hohen eingesetzten und damit physiologisch irrelevanten Konzentrationen (>100 µM) unspezifisch oder es handelte sich um sekundäre Effekte, die als Folge der Hemmung des primären Targets in einem weiteren Stoffwechselweg auftraten (Zusammenfassung in: Böger & Matthes, 2002).

Böger *et al.* konnten anhand von Experimenten mit der Grünalge *Scenedesmus acutus* zeigen, dass einige Mitglieder aus der Gruppe der K₃-Herbizide die VLCFA-Biosynthese hemmen (Couderchet *et al.*, 1996; Schmalfuß *et al.*, 1998). Es folgten weitere Versuche mit höheren Pflanzen (Matthes *et al.*, 1998; Wu *et al.*, 2000) und *in vitro* Assays mit Lauch-Mikrosomen (Schmalfuß *et al.*, 2000; Takahashi *et al.*, 2001 & 2002). Das direkte Target innerhalb der vier enzymatischen Schritte der Fettsäureelongation konnte jedoch nicht identifiziert werden. Das gleiche gilt für N-Herbizide, von denen bisher bekannt ist, dass sie die VLCFA-Biosynthese für kutikuläres und epikutikuläres Wachs inhibieren (Kolattukudy *et al.*, 1974; Abulnaja *et al.*, 1992; Kern *et al.*, 1997; Baldwin *et al.*, 2003).

Lechelt-Kunze *et al.* (2003) fanden heraus, dass Pflanzen, die mit geringen Konzentrationen von K₃ und N Herbiziden behandelt wurden, dem Phänotyp der *Arabidopsis*-Mutante *fiddlehead* entsprechen. Das für die Mutation verantwortliche *FIDDLEHEAD*-Gen wurde 1999 fast gleichzeitig von zwei Arbeitsgruppen charakterisiert. Es weist eine hohe Homologie zu bekannten VLCFA-Elongasen auf (Yephremov *et al.*, 1999, Pruitt *et al.*, 2000). *FIDDLEHEAD* hat übereinstimmend mit den phänotypischen Merkmalen der *Arabidopsis*-Mutanten eine hohe Expressionsrate in Blüten und relativ geringe bzw. kaum nachweisbare Expression in Blättern und Wurzeln. Transkripte finden sich dabei in der L1-Schicht von vegetativem und Blütenmeristem, in der daraus hervorgehenden Epidermis, sowie in Trichomen. Anhand von Genchip-Analysen fanden Lechelt-Kunze *et al.* (2003) einen weiteren Hinweis auf die VLCFA-Elongation als Target dieser Herbizide. Nach Behandlung mit Flufenacet oder Benfuresate wurden insgesamt elf Gene spezifisch induziert, unter ihnen ganz speziell das Gen *At1g24470*, das eine hohe Homologie zu bekannten 3-Ketoacyl-

Reduktasen aufweist. Diese Enzyme katalysieren den zweiten Schritt nach der Kondensationsreaktion innerhalb der VLCFA-Elongation (s. Abb. 4.1). Aus diesen Gründen postulierten Lechelt-Kunze *et al.* (2003) *FDH* und andere VLCFA-Elongasen als Targets von K₃ und N Herbiziden.

Um den Wirkmechanismus der Herbizide der HRAC-Klassen K₃ und N aufzuklären, wurden in der vorliegenden Arbeit deren mutmaßliche Targets, VLCFA-Elongasen, zunächst in der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* exprimiert. Insgesamt wurde bei sechs dieser exprimierten VLCFA-Elongasen aus *Arabidopsis thaliana* eine Elongaseaktivität bei Expression in Hefe nachgewiesen. Drei bislang unbekannte Elongase-Aktivitäten, kodiert durch die Gene *At5g43760*, *At1g04220* und *CER60*, konnten durch diesen Ansatz neu charakterisiert werden. Zusammen mit den bereits bekannten Elongasen *FAE1*, *KCS1* und *KCS2*, die ebenfalls funktionell in *Saccharomyces* exprimiert wurden, konnten diese in der Hefe durch verschiedene K₃ Herbizide und ein N Herbizid gehemmt werden.

Dies ist der direkte Beweis, dass der erste Reaktionsschritt der Fettsäureelongation, die von den sogenannten Elongasen katalysierte Kondensationsreaktion von Acyl-CoA mit Malonyl-CoA, das Target für K₃ Herbizide darstellt. Mit dem verwendeten Ansatz konnten somit VLCFA-Elongasen erstmals eindeutig als Targets von K₃-Herbiziden identifiziert werden.

In *Saccharomyces cerevisiae* exprimierte VLCFA-Elongase *FAE1* konnte zudem solubilisiert und aufgereinigt und ihre Aktivität erstmalig in einem nicht-radioaktiven und somit grundsätzlich im Hochdurchsatz-Screening durchführbaren Assay nachgewiesen werden.

4.1 Expression von Fettsäureelongasen aus *Arabidopsis thaliana* in *Saccharomyces cerevisiae*

Von den 21 VLCFA-Elongasen aus *Arabidopsis thaliana* konnten 17 kloniert und in der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* exprimiert werden, darunter die bezüglich ihrer Substrate und Produkte bereits charakterisierten Elongasen *FAE1*, *KCS1* und *KCS2*. In sechs dieser transgenen Hefen, transformiert jeweils mit *FAE1*, *KCS1*, *KCS2*, *At5g43760*, *At1g04220* und *CER60* konnte eine Elongaseaktivität in Form eines hin zu längerkettigen Fettsäuren verschobenen Fettsäureprofils der Hefen nachgewiesen werden (s. 3.2). Dieses Ergebnis zeigt,

dass in diesen Fällen allein die Einführung der Elongaseaktivität in Hefezellen zur Verlängerung endogener Fettsäuren genügt. Die Kondensationsreaktion stellt hier also den limitierenden Schritt der Fettsäureelongation dar (Millar & Kunst, 1997).

Die restlichen elf Elongasen wurden zwar in den Hefezellen exprimiert, wie durch Immunodetektion der Proteine mittels Western-Blot-Analyse gezeigt werden konnte, dies führte jedoch nicht zur Akkumulation von VLCFAs in den transgenen Zellen. Für dieses Ergebnis gibt es unterschiedliche Erklärungsmöglichkeiten: Es ist denkbar, dass die betreffenden Elongasen nicht funktionell in *S. cerevisiae* exprimiert werden konnten. Außerdem ist möglich, dass entsprechende Substrate der einzelnen Elongasen in Hefezellen nicht vorkommen oder zugeführte Substrate von den Zellen nicht aufgenommen oder mit CoA verestert werden können. Es besteht ebenfalls die Möglichkeit, dass die drei Folgeenzyme zugeführte Fettsäuren nicht als Substrat verwenden können oder dass die C-terminale Fusion mit sechs Histidinresten die Aktivität der Enzyme einschränkt. Diese Möglichkeiten werden in den folgenden Absätzen ausführlich diskutiert.

Wie oben erwähnt ist als Grund dafür, dass Elongasen keine Aktivität in den Hefezellen zeigten, eine nicht funktionelle Expression beispielsweise durch nicht korrekte Faltung des exprimierten Enzyms denkbar. Dass trotz Zugabe der vermuteten Substrate C26- und C28-Fettsäure (Millar *et al.*, 1999) zu den *CUT1* exprimierenden Hefezellen (s. 3.4.1) keine Aktivität von *CUT1* nachgewiesen werden konnte, spricht für diese Möglichkeit.

Es ist ebenfalls möglich, dass spezielle Substrate in Hefezellen nicht vorkommen. Um dieses Problem zu untersuchen, wurden verschiedene Fettsäuren, die normalerweise nicht in Hefezellen gebildet werden, zu den Zellen ins Medium gegeben. Wie anhand des Beispiels der Zugabe von C18:2-Säure zu *FAE1* exprimierenden Zellen gezeigt werden konnte, können zumindest einige langkettige Fettsäuren von den Hefezellen aufgenommen und mit Coenzym A verestert werden, so dass sie als Substrate für rekombinante Elongasen dienen können (s. 3.4.1). Dass dies im Fall von *FDH* und *CUT1* jedoch nicht zum Erfolg führte (s. 3.4.1), ist entweder darauf zurückzuführen, dass das jeweils passende Substrat nicht gefunden werden konnte, oder dass die Enzyme, die für den Transport der Fettsäuren in die Zelle und die Veresterung mit Coenzym A (Acyl-CoA-Synthetasen) verantwortlich sind, die zugegebenen Fettsäuren ebenfalls nicht als Substrat verwenden können. Aus *Saccharomyces* sind vier Gene (*FAA1-FAA4*) bekannt, die Acyl-CoA-Synthetasen kodieren (Johnson *et al.*, 1994,

Faergemann *et al.*, 2001). Ein weiteres Gen, *FAT1*, kodiert für ein Protein, das vermutlich für die Aufnahme exogener Fettsäuren über einen bislang nicht aufgeklärten Mechanismus verantwortlich ist. *FAT1* besitzt außerdem ebenfalls eine Acyl-CoA-Synthetaseaktivität (Faergeman *et al.*, 1997; Watkins *et al.*, 1998; Hirsch *et al.*, 1998; Choi & Martin, 1999; Dutta-Roy, 2002). Über die Substratspezifitäten von *FAA1-FAA4* und *FAT1* ist allerdings nur wenig bekannt (Zusammenfassung in: Black & DiRusso, 2003). Mittels GC/MS-Analytik konnte nachgewiesen werden, dass alle in dieser Arbeit zu den Hefezellen ins Medium gegebenen Fettsäuren in den Zellen akkumulierten. Das lässt den Schluss zu, dass diese Fettsäuren zumindest von den Hefezellen aufgenommen werden konnten. Über die Aktivierung der aufgenommenen Fettsäuren durch Acyl-CoA-Synthetasen kann jedoch keine Aussage gemacht werden.

Über die drei Folgeenzyme der Kondensationsreaktion ist bisher ebenfalls wenig bekannt (Abb. 4.1). Aus *Saccharomyces cerevisiae* wurde das Protein *YBR159* charakterisiert, das verantwortlich für einen Großteil der 3-Ketoacyl-CoA-Reduktase Aktivität, also den zweiten Schritt der VLCFA-Elongation, in Hefemikrosomen ist (Han *et al.*, 2002). Die gleiche Funktion erfüllt *GLOSSY8* in *Zea mays* (Xu *et al.*, 2002). Diese zwei Reduktaseaktivitäten sind ebenfalls in Mensch und Maus identifiziert und charakterisiert worden (Moon *et al.*, 2003). Zu diesen bekannten 3-Ketoacyl-CoA-Reduktasen gibt es zwei Homologe in *Arabidopsis*, die durch die Gene *At1g67730* und *At1g24470* kodiert werden. Lechelt-Kunze *et al.* (2003) konnten wie erwähnt zeigen, dass letzteres dieser beiden Gene nach Behandlung von *Arabidopsis* mit Flufenacet oder Benfuresate spezifisch induziert wurde. Bisher konnte kein Gen identifiziert werden, das ein Enzym kodiert, das den dritten Schritt innerhalb der VLCFA-Elongation, die Dehydration von 3-Hydroxyacyl-CoA, katalysiert. Das Gen *TSC13* aus *Saccharomyces cerevisiae* kodiert für ein Protein, das mit hoher Wahrscheinlichkeit den letzten Schritt der VLCFA-Elongation, die Reduktion von trans-Enoyl-CoA, katalysiert (Kohlwein *et al.*, 2001). Die trans-Enoyl-CoA-Reduktase besitzt ein Homolog aus *Arabidopsis*, kodiert durch *At3g55360*. Han *et al.* (2002) vermuten, dass die vier Enzyme, die an der Fettsäureelongation beteiligt sind, in multiplen Komplexen organisiert sind. Verschiedene Substrate werden von diesen Komplexen elongiert, wobei die Elongasen, die den ersten Schritt, also die Kondensationsreaktion, katalysieren, die Substratspezifität bestimmen. Die restlichen drei Enzyme verlängern alle Fettsäureelongase-Substrate. Zu dem gleichen Schluss kommen auch Domergue *et al.* (2000), die den Elongase-Komplex aus Raps aufreinigen konnten. Für diese Theorie spricht ebenfalls, dass es 21

Elongase-Gene in *Arabidopsis* gibt, die die Substratspezifität bestimmen könnten; dem stehen jeweils nur ein bis zwei Gene für die drei Folgeenzyme gegenüber (s. Abb. 4.1). Unter Berücksichtigung der Tatsache, dass es in *Arabidopsis* zwei verschiedene Arten von Elongasen, nämlich FAE- und ELO-typische gibt, wäre es möglich, dass es deshalb auch zwei Gene für 3-Ketoacyl-CoA-Reduktasen gibt, also eines für den FAE- und das andere für den ELO-Weg. Dann bliebe sogar nur noch jeweils ein Enzym für mindestens zwei der drei Folgereaktionen.

Gegen die Idee, dass die drei Folgeenzyme vermutlich nicht die Substratspezifität der exprimierten Elongasen bestimmen, spricht jedoch die Tatsache, dass die Hefe *Saccharomyces*, die die Folgeenzyme für die exprimierten *Arabidopsis*-Elongasen zur Verfügung stellt, nach bisherigem Wissensstand selbst nur zwei Elongase-Gene besitzt. Diese Elongasen sind in *Saccharomyces* für die Verlängerung von gesättigten Fettsäuren mit einer Kettenlänge von 18 C-Atomen bis hin zu Fettsäuren einer Kettenlänge von 26 C-Atomen zuständig. Es ist daher möglich, dass die Hefe-Folgeenzyme nicht über die gleiche breite Substratspezifität verfügen wie die Enzyme aus *Arabidopsis*. Ebenso ist es möglich, dass nicht alle 21 *Arabidopsis*-Elongasen in der Lage sind, mit den Folgeenzymen aus *Saccharomyces* zu interagieren, also funktionelle Elongase-Komplexe zu bilden.

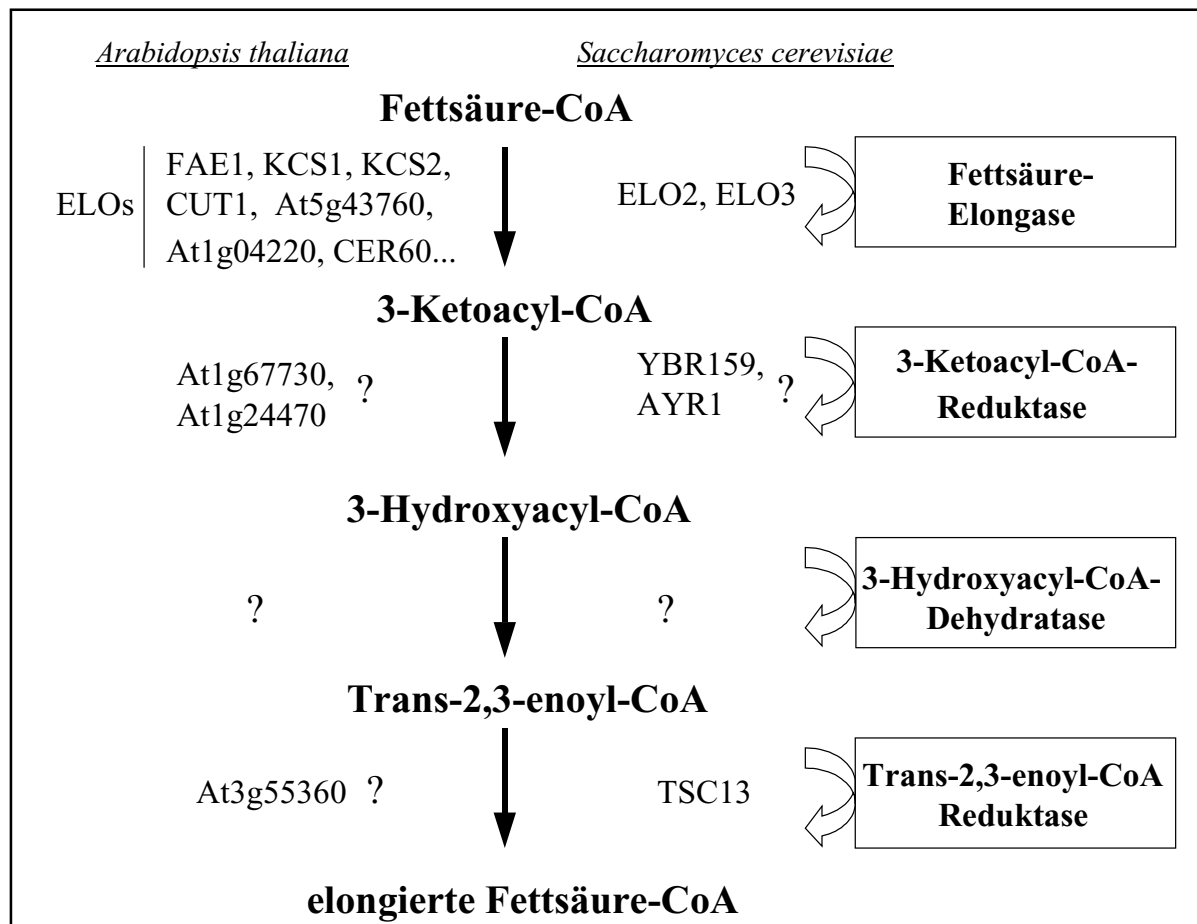


Abb. 4.1: Mikrosomale Fettsäureelongation. Das Schema zeigt die einzelnen Schritte der VLCFA-Elongation und bisher charakterisierten und die putativen Enzyme, die die jeweiligen Schritte katalysieren, für *Arabidopsis thaliana* und *Saccharomyces cerevisiae*.

Einen weiteren Grund für die nicht funktionelle Expression der elf Elongasen bietet die Möglichkeit, dass deren Aktivität durch die C-terminale Fusion mit sechs Histidinresten gestört wird. Betrachtet man das Alignment der verschiedenen Elongasen (s. Abb. 3.1), ist eine hohe Konservierung der Aminosäuresequenzen im C-terminalen Bereich zu beobachten. Dies zeigt an, dass dieser Sequenzabschnitt vermutlich eine kritische Rolle bei der katalysierten Reaktion spielt. Es wäre denkbar, dass dieser Bereich mit den Folgeenzymen der Kondensationsreaktion interagiert. Daher könnte sich ein His-Tag in dieser Position besonders negativ auf die Aktivität der Elongase auswirken. Ghanevati und Jaworski (2002) berichten von einem signifikanten Verlust an *FAE1*-Aktivität von in Hefe exprimiertem Enzym, das mit einem C-terminalen His-Tag fusioniert ist. Wie anhand des Beispiels von *FDH* deutlich wurde, kann die Fusion die Aktivität so stark einschränken, dass Produkte im Gaschromatogramm nicht mehr erkennbar sind (s. 3.2).

Unter den elf Elongasen ohne nachweisbare Aktivität befindet sich ein Enzym, dem ein für die Elongation essentieller Aminosäurerest fehlt. *At3g10280* ist bis auf eine Deletion

von sieben Aminosäuren, die einen Cysteinrest im aktiven Zentrum einschliesst (s. Abb. 3.1), identisch zu *HIC*. Dieser Cysteinrest ist jedoch für die Aktivität essentiell (Ghanevati & Jaworski, 2001), vermutlich spielt er eine Rolle beim Transfer des Acylrestes. Es wäre möglich, dass *At3g10280* durch Genduplikation entstanden ist und aufgrund des Verlusts eines Teils des aktiven Zentrums keine enzymatische Funktion besitzt. Einem weiteren Gen, *At3g52160*, fehlt ein für die Aktivität essentieller Histidinrest. Lechelt-Kunze *et al.* (2003) konnten durch den Vergleich der Sequenzen der VLCFA-Elongasen mit denen von Chalcon-Synthasen und Fettsäuresynthasen, deren aktives Zentrum durch Röntgenstrukturanalyse charakterisiert ist, zeigen, dass der in Abb. 3.1 markierte, hochkonservierte Histidinrest im aktiven Zentrum liegt. Aus diesem Grund ist anzunehmen, dass *At3g52160* ebenfalls keine enzymatische Funktion besitzt.

Bis heute sind nur einige wenige VLCFA-Elongasen hinsichtlich ihrer Substrate, Produkte, und Gewebe, in denen sie aktiv sind, hinreichend charakterisiert. In *Arabidopsis thaliana* sind dies *FAE1* (James & Dooner, 1990; Kunst *et al.*, 1992; James *et al.*, 1995; Millar & Kunst, 1997), *KCS1* (Todd *et al.*, 1999) und *KCS2* (Clemens & Kunst, 2001). Im Rahmen dieser Arbeit konnten drei weitere Elongasen hinsichtlich ihrer Substrate und Produkte charakterisiert werden. *At5g43760*, *At1g04220* und *At1g25450*, letztere ebenfalls bekannt unter dem Namen *CER60* (Fiebig *et al.*, 2000), konnten funktionell in der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* unter der Kontrolle eines Galaktose-induzierbaren Promotors exprimiert werden (s. 3.2). Transgene Zellen zeigten eine Akkumulation sehr langkettiger Fettsäuren mit einer Kettenlänge von 20-30 C-Atomen. Endogene Fettsäuren aus *Saccharomyces cerevisiae*, vermutlich C16, C18 und C26 gesättigte und einfach ungesättigte Fettsäuren, dienten dabei als Substrate. Hefen, die mit dem *At5g43760*- oder dem *At1g04220*-Konstrukt transformiert wurden, akkumulierten gesättigte Fettsäuren mit Kettenlängen von 22, 24 und 26 C-Atomen (s. 3.2). Dass zwei Gene für verschiedene Elongasen mit der gleichen biochemischen Substratspezifität innerhalb eines Organismus existieren, lässt vermuten, dass die Enzyme in verschiedenen Geweben oder zu verschiedenen Zeiten der Pflanzenentwicklung exprimiert werden. Zellen mit dem *CER60*-Konstrukt akkumulierten längerkettige Fettsäuren mit Kettenlängen von 26-30 C-Atomen. Zusätzlich konnte eine geringe Aktivität mit einfach ungesättigten Fettsäuren beobachtet werden, die sich in der Akkumulation geringer Mengen C20:1-Fettsäure äußerte (s. 3.2). Aufgrund der hohen Sequenz-Homologie zu *CUT1* wurde *CER60* von Fiebig *et al.* (2002) der Wachs-Biosynthese zugeordnet. Das vorliegende Ergebnis, dass *CER60* in die Synthese von sehr langkettigen

Fettsäuren involviert ist, bestätigt diese Vermutung. Die genaue Funktion dieser drei Gene innerhalb des pflanzlichen Organismus‘ könnte durch Expressionsanalysen mit Hilfe eines Northern Blot oder „knock out“-Pflanzen, die jeweils eine Mutationen in den entsprechenden Genen aufweisen, weiter geklärt werden.

Die Expression der klonierten Elongasen in *Saccharomyces* resultierte in allen Fällen in nicht löslichem Protein. Da alle 21 putativen Elongasen aus *Arabidopsis* laut Vorhersage mit dem „DAS transmembrane prediction server“ (Cserzo *et al.*, 1997, <http://www.sbc.su.se/~miklos/DAS/>) wenigstens eine, die meisten sogar zwei Transmembrandomänen (Ergebnis nicht gezeigt) besitzen, sind diese Enzyme wahrscheinlich membrangebunden. Auch die *FDH*- und *FAE1*-Konstrukte ohne putative Transmembrandomänen befanden sich nach dem Zellaufschluss in der unlöslichen Fraktion. Vermutlich waren sie auch ohne Transmembrandomänen doch zumindest mit der Membran assoziiert. Dies ist wahrscheinlich auch notwendig, damit die Elongasen ihre Substrate, die ebenfalls membrangebunden sind, umsetzen können. Zellen mit dem verkürzten *FAE1*-Konstrukt akkumulierten allerdings nur noch geringe Mengen VLCFAs im Vergleich zu Zellen mit dem Konstrukt in voller Länge (s. 3.2). Ghanevati und Jaworski (2002) konnten nach Abspaltung der Transmembrandomänen durch eine eingefügte Thrombinschnittstelle sogar gar keine Aktivität von *FAE1* im *in vitro* Assay mehr nachweisen. Dieses Ergebnis zeigt ebenfalls die Bedeutung der Transmembrandomänen für die Aktivität. Eine weitere Möglichkeit als Ursache für die Akkumulation der verkürzten Proteine in der unlöslichen Zellfraktion und die geringere Aktivität stellt die Bildung von nicht löslichen Proteinaggregaten dar.

4.2 Wirkmechanismus von K₃ und N Herbiziden

Zellen, die *At5g43760*, *At1g04220*, *CER60* oder eine der bereits charakterisierten Elongasen *FAE1*, *KCS1* und *KCS2* exprimieren, wurden in Gegenwart verschiedener K₃ und N Herbizide inkubiert. Alle exprimierten Elongasen konnten von verschiedenen Wirkstoffen gehemmt werden (s. Tab. 3.3). Jede Elongase hat dabei ihr eigenes Spektrum aktiver Inhibitoren. Umgekehrt hemmt ein einziges Herbizid immer mehrere Elongasen gleichzeitig. In einigen Fällen wurde sogar jede der sechs in dieser Arbeit getesteten Elongasen von einem Wirkstoff gehemmt. Die Tatsache, dass jedoch nicht immer jede Elongase durch ein Herbizid gehemmt werden konnte, stellt den ersten direkten Beweis dar, dass der erste Schritt innerhalb der VLCFA-Elongation, der durch die Elongasen katalysiert wird, das Target der getesteten

Herbizide ist. Wäre eines der Folgeenzyme innerhalb der Fettsäureelongation durch eine getestete Substanz inhibiert, müsste bei jeder Elongase die gleiche Hemmung zu beobachten sein. Dies ist jedoch nicht der Fall. Weiterhin konnte eine Abhängigkeit der Hemmung verschiedener VLCFA-Elongasen von den eingesetzten Herbizidkonzentrationen gezeigt und in Dosis-Wirkungskurven dargestellt werden (s. 3.5.3 und 3.5.4). Die pI_{50} -Werte der jeweiligen Hemmung lagen in dem Bereich von 5,7-7,1. Dabei ist zu beachten, dass die Hemmung nicht direkt am Enzym sondern an Hefezellen, die das untersuchte Enzym exprimieren, gemessen wurde. Die gemessenen pI_{50} -Werte liegen in der gleichen Größenordnung wie die von Böger und Mitarbeitern an der Alge *Scenedesmus* und im zellfreien Assay mit Lauch-Mikrosomen gemessenen Werte für verschiedene Chloracetamide (Takahashi *et al.*, 2001; Böger, 2003).

Während mehrere K_3 Herbizide eine Wirkung auf verschiedene VLCFA-Elongasen zeigten, konnte nur bei einem der getesteten Herbizide der Klasse N, nämlich Triallate, eine Wirkung auf eine Elongase gefunden werden (s. Tab. 3.3). Da diese Wirkung zudem nicht besonders stark war (bei einer Konzentration von 10^{-4} M konnte keine 100 %ige Hemmung erzielt werden), kann nicht eindeutig geklärt werden, ob VLCFA-Elongasen ebenfalls Targets von N Herbiziden sind. Hierzu sind weitere Versuche mit weiteren Herbiziden der Klasse N in verschiedenen Konzentrationen und eventuell weiteren VLCFA-Elongasen wie z. B. *FDH* nötig.

K_3 und N Herbizide wirken auf monokotyle Pflanzen stärker als auf dikotyle. Sie hemmen die Entwicklung meristematischer Gewebe in Triebspitzen, Seitentrieben und Knospen; das Gedeihen fertiger Pflanzenorgane wird nicht beeinflusst. Samen keimen nach Behandlung normalerweise noch aus, aber das Keimlingswachstum ist inhibiert, und die Keimlinge bleiben in ihrer Entwicklung gehemmt (Hock *et al.*, 1995; Böger *et al.*, 2000). In Gräsern entwickelt sich oft kein Spross aus der Coleoptile, oder die sich entwickelnden Blätter können sich nicht komplett abrollen, so dass die Spitzen der nächsten Blätter darin gefangen sind und eine Schleife entsteht (Lechelt-Kunze *et al.*, 2003). Das Wurzelwachstum ist ebenfalls in einigen Fällen gehemmt (Fuerst *et al.*, 1987). Anhand der oben aufgeführten Ergebnisse lassen sich diese Phänotypen herbizidbehandelter Pflanzen als Resultat einer starken Hemmung von mehreren verschiedenen Elongasen gleichzeitig interpretieren. Vermutlich ist es sogar eine Voraussetzung für ein sehr wirksames Herbizid, ein breites Spektrum verschiedener Elongasen mit lebenswichtigen Funktionen für die Pflanze zu

hemmen. Zusätzlich bietet diese Annahme eine schlüssige Erklärungsmöglichkeit für die äußerst selten auftretende Resistenzbildung gegenüber Chloracetamiden und anderen Herbiziden der Klassen K₃ und N (Burnet *et al.*, 1994; Huang *et al.*, 1997; Böger *et al.*, 2002). Zur Ausbildung einer Target-Enzym Resistenz wäre die genetische Modifikation mehrerer Enzyme in einer Mutante notwendig, dies ist jedoch ein sehr unwahrscheinliches Ereignis.

Sowohl die *de novo* Fettsäuresynthese durch die Fettsäuresynthasen KASI-KASIII als auch die Bildung von endogenen VLCFAs durch die hefeeigenen ELO-Enzyme (Toke & Martin, 1996; Oh *et al.*, 1997; Roessler *et al.*, 2003) wurden durch K₃ und N Herbizide nicht gestört oder gar inhibiert (s. 3.5.2). Zusammen mit der Tatsache, dass FAE-Elongasen absolut pflanzenspezifisch sind, stellt diese spezifische Wirkung eine weitere gute Voraussetzung für ein herbizides Target in Bezug auf Nebenwirkungen entsprechender Herbizide auf Mensch und Umwelt dar.

4.3 VLCFA-Analyse von *Arabidopsis* Wildtyp, *fiddlehead*-Mutante und Flufenacet behandelten Pflanzen

Um die Wirkweise von Oxyacetamiden und die Funktion des *FDH*-Gens anhand von Veränderungen im VLCFA-Stoffwechsel betroffener Pflanzen zu untersuchen, wurden die Fettsäuren entsprechender Pflanzen extrahiert und mittels GC/MS analysiert. Im einfachsten Fall, so die Vermutung, würden sich Substrate der betroffenen inhibierten Reaktion anhäufen, da sie nicht mehr umgesetzt werden können. Die Menge der gebildeten Produkte würde dementsprechend abnehmen oder vollkommen zurückgehen. Anhand der gleichen Vorgehensweise versuchten Millar *et al.* (1999) die biochemische Funktion von *CUT1* aufzuklären. Eine Untersuchung mit dem Ziel der Aufklärung der von *FDH* katalysierten Reaktion wurde ebenfalls bereits mit Blattmaterial von *Arabidopsis* Wildtyp und *fiddlehead*-Mutanten durchgeführt (Lolle *et al.*, 1997). Hier konnte ein Anstieg der Menge an C20 und C22 Fettsäure bei einer gleichzeitigen Abnahme von C24-Säure beobachtet werden. Da die Blüten jedoch den Hauptexpressionsort von *FDH* darstellen und in *FDH* exprimierenden Hefezellen keine Aktivität mit diesen Fettsäuren beobachtet werden konnte (s. 3.4.1 und 3.4.2), wurde für die Extraktion der Fettsäuren in der vorliegenden Arbeit Blütenmaterial verwendet.

Vergleicht man das Fettsäureprofil von *Arabidopsis* Wildtyp-Blüten mit dem von *fiddlehead*-Mutanten oder mit Flufenacet behandelten Pflanzen fällt zunächst auf, dass die

Unterschiede sich auf einige in relativ geringen Mengen auftretende Komponenten beschränken (s. Abb. 3.11). Unter Berücksichtigung der Tatsache, dass sich *FDH*-Transkripte jedoch auch nur in einem geringen Teil des untersuchten Gewebes, nämlich in der L1-Schicht des Blütenmeristems, befinden, entspricht dieses Ergebnis den Erwartungen. Bemerkenswert ist, dass das Fettsäureprofil der mit Flufenacet behandelten Pflanze dabei dem der *fiddlehead*-Mutante sehr ähnlich ist. Im Vergleich mit dem Wildtyp betreffen die Veränderungen stets die gleichen Komponenten (s. Abb. 3.12).

Es wurden insgesamt vier Komponenten gefunden, die sowohl in der Mutante als auch in Flufenacet behandelten Pflanzen akkumulierten (s. Abb. 3.12). Diese Verbindungen stellen potenzielle Substrate von *FDH* dar. Am deutlichsten, nämlich um den Faktor 4,75, nahm die Menge an C18:1 Dicarbonsäure zu. Eine mittels Massenspektrometrie nicht zu identifizierende Verbindung wurde um etwa den gleichen Faktor angehäuft. In etwas geringerem Maße akkumulierten C20 Fettsäure und C18:2 Dicarbonsäure.

Dicarbonsäuren sind wichtige Komponenten von Suberin und eher seltene Bestandteile von Wachs (Kolattukudy, 1980). Sie sind mit Glycerin und ω -Hydroxyfettsäuren verestert und bilden so die typische dreidimensional vernetzte Struktur von Suberin und Kutin (Graca & Pereira, 1997 & 2000; Graca *et al.*, 2002). Damit kommen sie nach Yephremov *et al.* (1999) und Pruitt *et al.* (2000), die die Organfusionen der *fdh*-Mutanten als Folge einer veränderten Kutikulazusammensetzung betrachten, als Substrat für *FDH* in Betracht. Zwei Verbindungen nahmen in ihrer Menge um einen Faktor von 0,68 bzw. 0,23 ab. Bei der Verbindung, die im Vergleich zum Wildtyp am stärksten in ihrer Menge zurückgeht, handelt es sich möglicherweise um eine Cyclopropensäure. Etwas weniger stark nahm ein Alkan, vielleicht mit einer Kettenlänge von 27 C-Atomen, ab. Cyclopropensäuren sind in Pflanzen nicht ungewöhnlich und kommen hauptsächlich als Speicherlipide in Samen vor, außerdem in Wurzeln, Blättern, Stengeln und Kallusgewebe von Pflanzen der Familie der Malvaceae (Gurr, 1980). Die biologische Rolle dieser Fettsäuren ist jedoch unklar. Aus *Arabidopsis thaliana* ist eine Cyclopropan-Synthase identifiziert worden (Bao *et al.*, 2003). Eine antisense-Expression dieses Gens in *Arabidopsis* würde helfen, die Funktion von Cyclopropensäuren aufzuklären und würde vielleicht die Cyclopropensynthase als Target validieren. Alkane sind Hauptbestandteile pflanzlicher Wachse (Kolattukudy, 1980) und gehen über den Decarbonylierungsweg aus VLCFAs hervor (Kunst & Samuels, 2003).

Als Substrate bisher charakterisierter FAE-Typ Elongasen sind gesättigte und einfach ungesättigte Fettsäuren bekannt (Kunst *et al.*, 1992; Millar & Kunst, 1997; Todd *et al.*, 1999; Millar *et al.*, 1999; Schreiber *et al.*, 2000; Kunst & Clemens, 2001; Han *et al.*, 2001; Kajikawa *et al.*, 2003). Außerdem ist eine Elongase entdeckt worden, die C18-12-OH-Fettsäuren als Substrate verwendet (Smith *et al.*, 2000; Moon *et al.*, 2001). ELO-typische Elongasen sind in Pflanzen nach bisherigem Wissensstand für die Verlängerung mehrfach ungesättigter (≥ 3 Doppelbindungen) Fettsäuren vermutlich für die Bildung von Sphingolipiden zuständig (Parker-Barnes *et al.*, 2000; Beaudoin *et al.*, 2000; Heinz *et al.*, 2001). Als Bestandteile von Kutin, Suberin und Wachs kommen in Pflanzen eine Reihe weiterer unterschiedlicher Fettsäuren vor: verschiedene Hydroxyfettsäuren, Epoxyfettsäuren, Dicarbonsäuren und Fettsäuren, die mehrere dieser funktionellen Gruppen aufweisen (Kolattukudy, 1980). Die Frage, welche dieser Fettsäuren außerdem als Substrate für VLCFA-Elongasen fungieren können, bleibt offen. Es liegt nahe, die hohe Anzahl verschiedener Fettsäuren mit der großen Auswahl an Elongasen in Verbindung zu bringen. Leider sind die meisten dieser ungewöhnlichen Fettsäuren nicht kommerziell erhältlich und auch nur sehr schwer zu isolieren oder synthetisieren, so dass weitere Tests bezüglich der Substratspezifität von *FDH* und anderen Elongasen nicht durchführbar waren.

4.4 Zusammenhang von VLCFA-Mutanten und der Wirkung von K₃ und N Herbiziden

In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass K₃ und N Herbizide die Kondensationsreaktion innerhalb der VLCFA-Biosynthese hemmen. Dies wirft die Frage auf, auf welchen Angriffspunkt innerhalb des pflanzlichen Stoffwechsels nun genau die herbizide und somit phytotoxische Wirkung zurückzuführen ist. Oder anders gefragt: Gibt es eine oder mehrere innerhalb der 21 putativen und teilweise charakterisierten Elongasen aus *Arabidopsis thaliana*, deren Hemmung stärkere Auswirkungen auf die betroffene Pflanze hat als die Hemmung anderer?

Die Antwort auf diese Frage können die unterschiedlichen VLCFA-Elongase-Mutanten bzw. die jeweiligen physiologischen Rollen der von den entsprechenden Elongasen gebildeten VLCFAs geben (s. 1.5 und 1.6). Die Mutation von *FAE1* in *Arabidopsis* führt dazu, dass keine VLCFAs als Bestandteile von Speicherlipiden in Samen mehr gebildet werden können. Dies hat jedoch keine Auswirkungen auf die Lebensfähigkeit der Pflanze. Andere Elongasen wie *CUT1* und *KCSI* spielen eine wichtige Rolle bei der

Wachsbiosynthese. Eine reduzierte Wachsschicht schränkt zwar die Lebensfähigkeit der betroffenen Pflanze besonders bei Trockenheit stark ein, führt aber vermutlich nicht zu den bei mit K₃ und N Herbiziden behandelten Pflanzen beobachteten Schäden, insbesondere sei hier die Hemmung der Entwicklung neu entstehender Pflanzenorgane und die Krümmung von im Wachstum befindlichen Blättern und Blütenorganen genannt. Das Bindeglied zwischen dieser herbiziden Wirkung und der VLCFA-Biosynthese ist die *fdh*-Mutante (Lechelt-Kunze *et al.*, 2003). In sehr geringen Konzentrationen angewendet induzieren K₃ und N Herbizide bei unterschiedlichen Pflanzen den *fdh*-Phänotyp mit den oben genannten typischen Merkmalen. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Veränderungen im Fettsäureprofil der so behandelten Pflanzen gegenüber dem unbehandelten Wildtyp genau den Veränderungen in der *fdh*-Mutante entsprechen. Auch diese Tatsache spricht für eine besondere Rolle von *FDH*.

Obwohl die *fdh*-Mutante seit mehr als zehn Jahren bekannt ist (Lolle *et al.*, 1992), und die Ähnlichkeit der *FDH*-DNA-Sequenz mit VLCFA-Elongasen bereits 1999 festgestellt wurde (Yephremov *et al.*, 1999; Pruitt *et al.*, 2000), konnte die genaue Funktion dieses Enzyms bisher nicht geklärt werden. Sowohl *FDH* als auch die Elongase *HIC* scheinen besondere Rollen innerhalb des pflanzlichen Stoffwechsels zu spielen. *FDH* wird in der L1-Schicht von Meristemen, der daraus hervorgehenden Epidermis und Trichomen exprimiert, *HIC* ausschließlich in Schließzellen von Spaltöffnungen. In *fdh*-Mutanten ist unter anderem die Zahl der Trichome stark reduziert (Yephremov *et al.*, 1999), *hic*-Mutanten zeigen eine veränderte Stomata-Dichte bei erhöhten CO₂-Konzentrationen (Gray *et al.*, 2000). Sowohl Trichome als auch Stomata gehen aus protodermalen Zellen hervor, somit scheinen bestimmte, bislang unbekannte Produkte einiger Elongasen einen indirekten Einfluß auf das Schicksal von meristemoiden Zellen in der Epidermis von Blättern zu haben. Diese unbekannten Produkte scheinen Bestandteile der Kutikula zu sein (Yephremov *et al.*, 1999; Pruitt *et al.*, 2000; Gray *et al.*, 2000; Bird & Gray, 2003), die als Folge eine veränderte Permeabilität für bestimmte Signalmoleküle besitzt. Ein weiteres Indiz für diese Theorie ist die Expression einer Kutinase aus dem Pilz *Fusarium solani* in *Arabidopsis thaliana*. Transgene Pflanzen zeigen typische Merkmale des *fdh*-Organfusionsphänotyp (Sieber *et al.*, 2000). Die Entdeckung, dass auch in anderen VLCFA- und Wachsbiosynthesemutanten die Zahl der Stomata gegenüber dem Wildtyp verändert ist, führt zu der Vermutung, dass die kutikuläre Wachszusammensetzung das Zellschicksal epidermaler Zellen bestimmt (Bird & Gray, 2003).

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass durch die Veränderung der Zusammensetzung der Kutikula das Pflanzenwachstum stark beeinträchtigt, Pollen unfruchtbar, Seneszenz verspätet, die Epidermis deformiert und das Schicksal epidermaler Zellen verändert wird. Erkennbar sind diese Auswirkungen an *fdh*-, *hic*- und *lcr*-Mutanten und Kutinase überexprimierenden Pflanzen (Yephremov *et al.*, 1999; Pruitt *et al.*, 2000; Gray *et al.*, 2000; Wellesen *et al.*, 2001; Sieber *et al.*, 2000). Der Grund für diese Auswirkungen der veränderten Kutikula-Zusammensetzung ist vermutlich die damit verbundene veränderte Permeabilität und die Möglichkeit zum verbesserten Signalaustausch der betroffenen Zellen (Pruitt *et al.*, 2000; Bird & Gray, 2003). Diese Theorie wird auch durch die stark veränderte Morphologie von *FAEI*-überexprimierenden Pflanzen unterstützt (Millar *et al.*, 1998), bei denen man einen eingeschränkten Austausch von Signalmolekülen erwarten würde. Lechelt-Kunze *et al.* (2003) vermuten die meristematische *CLAVATA* „feed back“-Schleife als Kandidaten für so ein regulatorisches System (Rojo *et al.*, 2002; Sharma *et al.*, 2002).

4.5 VLCFA-Analyse von *Arabidopsis* Wildtyp und *ace*-Mutante

Da die *Arabidopsis hothead*-Mutante (*hth* bzw. *ace*) ebenfalls einen Organfusionsphänotyp zeigt, ist sie für die Untersuchung des betroffenen Stoffwechselweges und eventuell als neues herbizides Target interessant. Um die Funktion von *ACE* zu untersuchen, wurden *ace*-Mutanten auf die gleiche Weise wie *fiddlehead*-Mutanten auf Veränderungen der VLCFA-Zusammensetzung gegenüber dem Wildtyp untersucht. Krolkowski *et al.* (2003) konnten zeigen, dass Blüten und Stängel Hauptexpressionsorte des *ACE*-Gens sind. Da außerdem auch bei der *ace*-Mutante die Organfusionen hauptsächlich die Blüten betreffen, wurde hier ebenfalls Blütenmaterial zur Analyse verwendet (s. 3.7).

Es fallen drei Verbindungen auf, die in der Mutante akkumulieren und damit potenzielle Substrate von *ACE* darstellen: eine zweifach ungesättigte C18 Fettsäure mit einer ω -OH-Gruppe, eine 12-Epoxy-11-methoxy-C18:1 Fettsäure und ein C24 Alkanol mit einer ebenfalls endständigen OH-Gruppe. Auffällig unter den gegenüber dem Wildtyp abnehmenden Verbindungen sind zwei, die mittels Massenspektrometrie nicht eindeutig zu identifizieren sind, aber hohe Ähnlichkeit zu langkettigen Aldehyden aufweisen. Es könnte sich hierbei um C18 bzw. C20 Fettsäurealdehyde handeln. Eine C16- und eine C18-Dicarbonsäure befinden sich ebenfalls unter den abnehmenden Verbindungen. Zusammengefasst lässt sich feststellen, dass in der *ace*-Mutante primäre Alkohole akkumulieren und gleichzeitig Aldehyde und Dicarbonsäuren abnehmen. Zusammen mit der

Tatsache, dass die Sequenz des *ACE*-Gens Ähnlichkeiten zu FAD bindenden Oxidoreduktasen zeigt (Krolkowski *et al.*, 2003), weisen diese Ergebnisse darauf hin, dass es sich bei *ACE* um eine Alkoholoxidase handeln könnte, die langkettige ω -Hydroxyfettsäuren zu Aldehyden und diese eventuell noch weiter zu Dicarbonsäuren oxidiert.

Fasst man alle diese und bisherige Ergebnisse in Bezug auf Organfusionsmutanten zusammen, entsteht ein hypothetischer Stoffwechselweg wie in Abb. 4.2 gezeigt. C16 und C18 gesättigte und einfach ungesättigte Fettsäuren werden entweder von *FATTY ACID ELONGASE1* und anderen Fettsäureelongasen zu VLCFAs verlängert oder aber von *LACERATA* hydroxyliert. Die so entstandenen ω -Hydroxyfettsäuren können im weiteren Verlauf von *ACE* zum Aldehyd und eventuell weiter bis zur Dicarbonsäure oxidiert werden. Da Dicarbonsäuren in der *fiddlehead*-Mutante akkumulieren und *FDH* homolog zu Fettsäureelongasen ist, ist es möglich, dass *FDH* die Verlängerung dieser Dicarbonsäuren katalysiert. Diese These ließe sich durch die gemeinsame Expression der verschiedenen Gene in einem Hefeklon weiter untersuchen.

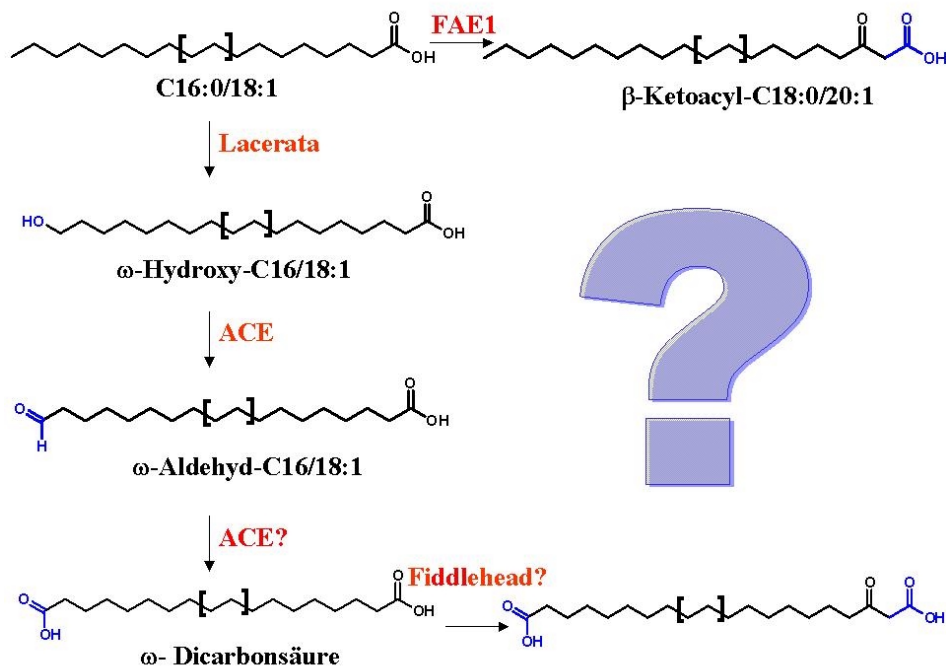


Abb. 4.2: Hypothetisches Schema möglicher Reaktionswege von VLCFAs.

4.6 Assayentwicklung zur *in vitro* Aktivitätsbestimmung von *FAE1*

4.6.1 Überlegungen zu einem Elongaseassay: Prinzip und Voraussetzungen

Um die Hemmung der Fettsäureelongation nicht nur in Elongase-exprimierenden Hefezellen sondern ebenfalls im zellfreien, HTS-fähigen Assay messen zu können, waren zunächst eine Reihe verschiedener Überlegungen notwendig. Als erstes stellte sich die Frage nach der Nachweisbarkeit der Aktivität der Fettsäureelongasen, also dem Assayprinzip bzw. der Messmethode. Bisher wurde die Elongase-Aktivität von mikrosomalen Membranfraktionen oder aufgereinigter *FAE1* über radioaktiv markiertes Oleoyl-CoA oder Malonyl-CoA nachgewiesen (Garwin *et al.*, 1980; Hlousek-Radojcic *et al.*, 1995; Ghanevati & Jaworski, 2001; Ghanevati & Jaworski, 2002). Für ein Hochdurchsatzscreening wäre es jedoch sehr vorteilhaft, einen nicht-radioaktiven Assay zu entwickeln. Bei der Kondensationsreaktion von Acyl-CoA mit Malonyl-CoA entsteht freies Coenzym A, dessen freie SH-Gruppe mit 7-Diethylamino-3-(4'-maleimidylphenyl)-4-methylcoumarin (CPM) zu einer fluoreszierenden Verbindung reagiert (s. Abb. 2.2), die somit nachgewiesen werden kann. Aufgrund der höchsten Aktivität unter allen sechs funktionell in *Saccharomyces* exprimierten Elongasen wurde *FAE1* für dieses Vorhaben ausgewählt. Da CPM jedoch ebenfalls mit freien SH-Gruppen von Proteinen reagieren kann und um außerdem weitere Nebenreaktionen auszuschließen, erschien es sinnvoll, *FAE1* für den Einsatz im *in vitro* Assay über den C-terminalen His-Tag aufzureinigen. Dies stellte aufgrund der Membranassoziation von *FAE1* ein weiteres Problem dar. Aus diesem Grund wurde zuerst versucht, *FAE1* nach einem modifizierten Protokoll von Ghanevati & Jaworski (2002) aus der Membran zu solubilisieren. Hierzu wurden zunächst Mikrosomen aus *FAE1* exprimierenden Hefezellen isoliert. Dies bewirkte eine starke Aufkonzentrierung des Proteins und eine erste Aufreinigung durch die Abtrennung nicht-mikrosomaler Proteine (s. 3.8.1). Kritisch bei dieser Vorgehensweise scheint der Zellaufschluss zu sein. Nach dem ersten Zentrifugationsschritt nach dem Aufschluss konnte *FAE1* im Pellet detektiert werden. Es wurde davon ausgegangen, dass dieses Protein aus nicht aufgeschlossenen Zellen stammt.

Für den Aufschluss von Hefezellen gibt es verschiedene Methoden. Die beiden gängigsten sind der Aufschluss mit Glasperlen und der Aufschluss mittels French Press. Es handelt sich hierbei um mechanische Zellaufschlussverfahren (Präve, 1990). Beide wurden in dieser Arbeit verwendet. Der Aufschluss mit Glasperlen ist sehr effektiv, allerdings hat diese Methode den Nachteil, dass sich aufgrund der Scherkräfte hohe Temperaturen entwickeln, die

die Aktivität des Enzyms beeinträchtigen können. Die French Press bietet den Vorteil eines relativ schonenden Aufschlussverfahrens, in dieser Arbeit konnte jedoch mit diesem Verfahren kein hoher Aufschlussgrad erzielt werden, weshalb der Aufschluss mittels Glasperlen vorgezogen wurde.

Aus den *FAEI*-enthaltenen Mikrosomen konnten in einem Solubilisierungspuffer, der 0,5 % des nichtionischen Detergenz Triton X-100 enthielt, ca. 30-40 % des Enzyms solubilisiert werden (s. 3.8.1). Diese Fraktion wurde zur Aufreinigung von *FAEI* mittels Ni-NTA-Affinitätschromatographie verwendet. Diese Methode bietet die Vorteile einer hohen Bindungskapazität und –affinität, einer schnellen und einfachen Durchführbarkeit und einer großen Flexibilität des Präparationsmaßstabs (Porath *et al.*, 1975; Hochuli *et al.*, 1989). *FAEI* konnte so weitgehend von fremdem Protein abgetrennt und zur *in vitro* Aktivitätsbestimmung eingesetzt werden (s. 3.8.2).

4.6.2 *in vitro* Aktivitätsbestimmung von *FAEI*

Die Bedingungen bezüglich der Pufferzusammensetzung zur Aktivitätsbestimmung von *FAEI* im Assay wurden weitgehend von Ghanevati *et al.* (2002) übernommen. Es handelt sich dabei lediglich um einen Phosphatpuffer und die beiden Substrate von *FAEI*, Oleoyl-CoA und Malonyl-CoA. Durch Zugabe von CPM in DMSO zu einer DMSO-Endkonzentration von 50 % im Assay wurde die Reaktion abgestoppt. Die Ergebnisse der Messungen in 3.8.4 und 3.8.5 zeigen, dass hier eindeutig erstmals eine Aktivität von *FAEI* mit diesem Ansatz nachgewiesen werden konnte. Dass die Fluoreszenz jedoch schon nach 10-30 min einen je nach Proteinmenge unterschiedlichen konstanten Wert erreicht, spricht dafür, dass *FAEI* im verwendeten Assaypuffer nicht stabil ist. Unter optimalen Voraussetzungen müsste sich die Reaktionszeit mit abnehmender Proteinmenge verlängern und die Fluoreszenz den gleichen konstanten Wert erreichen.

Die Fluoreszenzmessungen der Ansätze, in denen jeweils eines der beiden Substrate fehlt, zeigen auch ohne das jeweils zweite Substrat einen schwachen Anstieg des Fluoreszenzsignals sowohl mit der Zeit als auch mit zunehmender Proteinmenge. Zwei Erklärungsmöglichkeiten dafür wären, dass zum einen beide Substrate, vor allem Oleoyl-CoA, im Assaypuffer nicht stabil sind und SH frei setzen, und zum anderen, dass CPM mit freien SH-Gruppen von *FAEI* reagiert.

Die vorliegenden Ergebnisse zeigen, dass ein Assay zum Nachweis der Elongaseaktivität nach dem oben genannten Prinzip grundsätzlich durchführbar und nach Optimierung einzelner Assayparameter wie beispielsweise Pufferzusammensetzung, pH-Wert oder Inkubationstemperatur vermutlich auch HTS-fähig ist.

5 Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Aufklärung des molekularen Wirkmechanismus‘ von Herbiziden der HRAC-Klassen K₃ und N. Chloracetamide, Oxyacetamide und andere zu diesen Gruppen gehörige Herbizide werden seit ca. 50 Jahren im Pflanzenschutz zur Bekämpfung von Unkräutern eingesetzt. Der molekulare Wirkort dieser Hemmstoffe war jedoch bislang nicht bekannt. K₃ Herbizide galten nach HRAC-Definition aufgrund bisheriger Forschungsergebnisse als Inhibitoren der Synthese sehr langkettiger Fettsäuren (VLCFAs), N Herbizide als Inhibitoren der Lipid-Synthese. Der Wirkmechanismus dieser Herbizidklassen wurde hier auf prinzipiell zwei unterschiedlichen Wegen untersucht. Darüber hinaus wurde ein nichtradioaktiver Assay zur Bestimmung der Aktivität der VLCFA-Elongase *FAE1* entwickelt, der sich zur Auffindung möglicher neuer Hemmstoffe im Hochdurchsatzscreening eignet.

Fettsäureelongasen katalysieren den ersten, limitierenden Schritt innerhalb der VLCFA-Elongation, die Kondensation von Acyl-CoA mit Malonyl-CoA, und stellen deshalb mögliche Targets von K₃ und N Herbiziden dar. Ein weiterer Grund für diese Vermutung ist die Beobachtung, dass Pflanzen, die mit diesen Herbiziden behandelt werden, einen Organfusions-Phänotyp ähnlich dem von *fiddlehead*-Mutanten zeigen. Das *FIDDLEHEAD*-Gen hat eine hohe Homologie zu bekannten Fettsäureelongasen. Um die Wirkung von K₃ und N Herbiziden an Fettsäureelongasen zu testen, wurden bereits charakterisierte und putative Fettsäureelongasen aus *Arabidopsis thaliana* kloniert und in der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* exprimiert. Anhand eines Vergleichs der Fettsäureprofile von transgenen und nicht transformierten Hefezellen mittels GC/MS konnten durch diesen Ansatz zusätzlich zu den drei bisher hinsichtlich ihrer Substrate und Produkte schon bekannten Elongasen *FAE1*, *KCS1* und *KCS2* drei neue Fettsäureelongasen, kodiert durch die Gene *At5g43760*, *At1g04220* und *CER60*, charakterisiert werden.

Die Hemmung der Fettsäureelongation durch K₃ und N Herbizide wurde über die Fettsäurezusammensetzung der transgenen Hefezellen vor und nach Inkubation mit verschiedenen Substanzen dieser Herbizidklassen geprüft. In der vorliegenden Arbeit konnte bewiesen werden, dass K₃ Herbizide die Elongasefunktion der VLCFA-Synthese hemmen. Unterschiedliche Elongasen werden von unterschiedlichen Wirkstoffen im submikromolekularen Bereich verschieden stark gehemmt.

In einem zweiten Ansatz konnte gezeigt werden, dass mit dem Herbizid Flufenacet behandelte Pflanzen und *fiddlehead*-Mutanten die gleichen Veränderungen im Fettsäureprofil im Vergleich mit dem Wildtyp aufweisen. Sowohl in *fdh*-Mutanten als auch in Flufenacet behandelten Pflanzen konnte eine Anhäufung von Dicarbonsäuren beobachtet werden. Auch dieses Ergebnis deutet auf die Hemmung der Kondensationsreaktion der VLCFA-Elongation als Target von K₃ Herbiziden hin.

Beim Vergleich der Fettsäurezusammensetzung einer weiteren *Arabidopsis* Organfusionsmutante mit dem Namen *hothead* bzw. *ace* mit dem *Arabidopsis* Wildtyp konnte gezeigt werden, dass es sich bei den in der Mutante anhäufenden Verbindungen um ω -Hydroxyfettsäuren handelt, während gleichzeitig eine Abnahme von Aldehyden und Dicarbonsäuren zu beobachten war. Zusammen mit der Tatsache, dass das *ACE*-Gen mittels Sequenzanalyse als FAD bindende Oxidoreduktase charakterisiert werden konnte, legt dies die Vermutung nahe, dass es sich bei *ACE* um eine Alkoholoxidase handelt, die die Oxidation von langkettigen Alkoholen zu Aldehyden und eventuell weiter zu Carbonsäuren katalysiert.

Aus diesen Ergebnissen kann folgender hypothetischer Stoffwechselweg erstellt werden: gesättigte und einfach ungesättigte Fettsäuren mit einer Kettenlänge von 16 oder 18 C-Atomen können entweder von *FAEI* und anderen VLCFA-Elongasen verlängert oder von *LACERATA*, einer Cytochrom P450 Monooxygenase, deren Mutation in *Arabidopsis* ebenfalls zu einem Organfusionsphänotyp führt, hydroxyliert werden. Es wäre möglich, dass diese Hydroxyfettsäuren durch *ACE* zum Aldehyd und eventuell weiter zur Dicarbonsäure oxidiert werden. *FDH* könnte diese Dicarbonsäuren möglicherweise als Substrat zur Verlängerung verwenden.

In *Saccharomyces* exprimierte VLCFA-Elongase *FAEI* konnte aus der unlöslichen Zellfraktion solubilisiert und mittels Ni-NTA-Affinitätschromatographie aufgereinigt werden. Die Aktivität des Enzyms konnte erstmals in einem nichtradioaktiven Assay *in vitro* bestimmt werden. Dieser Assay kann prinzipiell zur Auffindung neuer herbizider Wirkstoffe innerhalb eines High Throughput Screening (HTS) verwendet werden.

6 Literatur

Abulnaja, K. O., Tighe, C. R., Harwood, J. L. (1992) Inhibition of fatty acid elongation provides a basis for the action of the herbicide, ethofumesate, on surface wax formation. *Phytochemistry* 31 (4), 1155-1159

Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., Lipman, D. J. (1990) Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* 215 (3), 403-410

Baldwin, A., Rogers, H. J., Francis D., Harwood, J. L. (2003) Fatty acid elongation is important in the activity of thiocarbamate herbicides and in safening by dichlormid. *J. Exp. Bot.* 54 (385), 1289-1294

Bao, X., Thelen, J. J., Bonaventure, G., Ohlrogge, J. B. (2003) Characterization of cyclopropene fatty-acid synthase from *Sterculia foetida*. *J. Biol. Chem.* 278 (15), 12846-12853

Barret, P., Delourme, R., Renard, M., Domergue, F., Lessire, R., Delseny, M., Roscoe, T. J. (1998) A rapeseed *FAEI* gene is linked to the *EI* locus associated with variation in the content of erucic acid. *Theor. Appl. Genet.* 96, 177-186

Beaudoin, F., Michaelson, L. V., Hey, S. J., Lewis, M. J., Shewry, P. R., Sayanova, O., Napier, J. A. (2000) Heterologous reconstitution in yeast of the polyunsaturated fatty acid biosynthetic pathway. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 97 (12), 6421-6426

Beaudoin, F., Michaelson, L. V., Lewis, M. J., Shewry, P. R., Sayanova, O., Napier, J. A. (2000) Production of C20 polyunsaturated fatty acids (PUFAs) by pathway engineering: identification of a PUFA elongase component from *Caenorhabditis elegans*. *Biochem. Soc. Trans.* 28 (6), 661-663

Benveniste, I., Tijet, N., Adas, F., Philipps, G., Salaün, J.-P., Durst, F. (1998) *CYP86A1* from *Arabidopsis thaliana* encodes a cytochrome P450-dependent fatty acid omega-hydroxylase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 243, 688-693

Berg, D., Tietjen, K., Wollweber, D., Hain, R. (1999) From genes to targets: Impact of functional genomics on herbicide discovery. Brighton Conf.-Weeds 2 491-500

Bernard, P., Gabant, P., Bahassi, E. M., Couturier, M. (1994) Positive selection vectors using the F plasmid *ccdB* killer gene. Gene 148, 71-74

Bird, S. M., Gray, J. E. (2003) Signals from the cuticle affect epidermal cell differentiation. New Phytol. 157, 9-23

Birnboim, H. C., Doly, J. (1979) A rapid alkaline lysis procedure for screening recombinant plasmid DNA. Nucl. Acids Res. 7, 1513-1522

Black, P. N., DiRusso, C. C. (2003) Transmembrane movement of exogenous long-chain fatty acids: proteins, enzymes, and vectorial esterification. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 67 (3), 454-472

Blacklock, B. J., Jaworski, J. G. (2002) Studies into factors contributing to substrate specificity of membrane-bound 3-ketoacyl-CoA synthases. Eur. J. Biochem. 269, 4789-4798

Böger, P., Matthes, B. (2002) Inhibitors of biosynthesis of very-long-chain fatty acids. In: Böger, P., Wakabayashi, K., Hirai, K. (Hrsg.) Herbicide classes in development. 115-137, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg

Böger, P., Matthes, B., Schmalfuß, J. (2000) Towards the primary target of chloroacetamides – new findings pave the way. Pest. Manag. Sci. 56, 497-508

Bradford, M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem. 72, 248-254

Browse, J., McCourt, P. J., Somerville, C. R. (1986) Fatty acid composition of leaf lipids determined after combined digestion and fatty acid methyl ester formation from fresh tissue. Anal. Biochem. 152, 141-145

Burnet, M. W. M., Barr, A. R., Powles, S. B. (1994) Chloroacetamide resistance in rigid ryegrass (*Lolium rigidum*). Weed Sci. 42, 152-157

Choi, J.-Y., Martin, C. E. (1999) The *Saccharomyces cerevisiae* *FAT1* gene encodes an acyl-CoA synthetase that is required for maintenance of very long chain fatty acid levels. J. Biol. Chem. 274 (8), 4671-4683

Corpet, F. (1988) Multiple sequence alignment with hierarchical clustering. Nucl. Acids Res. 16 (22), 10881-10890

Couderchet, M., Schmalfuß, J., Böger, P. (1996) Incorporation of oleic acid into sporopollenin and its inhibition by the chloroacetamide herbicide metazachlor. Pestic. Biochem. Physiol. 55, 189-199

Cserzo, M., Wallin, E., Simon, I., von Heijne G., Elofsson A. (1997) Prediction of transmembrane alpha-helices in procariotic membrane proteins: the dense alignment surface method. Prot. Eng. 10 (6), 673-676

Dittrich, F., Zajonc, D., Hühne, K., Hoja, U., Ekici, A., Greiner, E., Klein, H., Hofmann, J., Bessoule, J.-J., Sperling, P., Schweizer, E. (1998) Fatty acid elongation in yeast. Biochemical characteristics of the enzyme system and isolation of elongation-defective mutants. Eur. J. Biochem. 252, 477-485

Dohmen, R. J., Strasser, A. W., Honer, C. B., Hollenberg, C. P. (1991) An efficient transformation procedure enabling long-term storage of competent cells of various yeast genera. Yeast 7 (7), 691-692

Domergue, F., Chevalier, S., Créach, A., Cassagne, C., Lessire, R. (2000) Purification of the acyl-CoA elongase complex from developing rapeseed and characterization of the 3-ketoacyl-CoA synthase and 3-hydroxyacyl-CoA dehydratase. Lipids 35 (5), 487-494

Donahue, T. F., Cigan, A. M. (1990) Sequence and structural requirements for efficient translation in yeast. Methods Enzymol. 185, 366-372

Dutta-Roy, A. K. (2002) Cellular uptake of long-chain fatty acids: role of membrane-associated fatty-acid-binding/transport proteins. *CMLS* 57, 1360-1372

Faergeman, N. J., Black, P. N., Zhao, X. D., Knudsen, J., DiRusso, C. C. (2002) The acyl-CoA synthetases encoded within *FAA1* and *FAA4* in *Saccharomyces cerevisiae* function as components of the fatty acid transport system linking import, activation, and intracellular utilization. *J. Biol. Chem.* 276 (40), 37051-37059

Faergeman, N. J., DiRusso, C. C., Elberger, A., Knudsen, J., Black, P. N. (1997) Disruption of the *Saccharomyces cerevisiae* homologue to the murine fatty acid transport protein impairs uptake and growth on long-chain fatty acids. *J. Biol. Chem.* 272 (13), 8531-8538

Fehling, E., Mukherjee, K. D. (1991) Acyl-CoA elongase from a higher plant (*Lunaria annua*): metabolic intermediates of very-long-chain acyl-CoA products and substrate specificity. *Biochim. Biophys. Acta* 1082, 239-246

Fiebig, A., Mayfield, J. A., Miley, N. L., Chau, S., Fischer, R. L., Preuss, D. (2000) Alterations in *CER6*, a gene identical to *CUT1*, differentially affect long-chain lipid content on the surface of pollen and stems. *Plant Cell* 12, 2001-2008

Fuerst, E. P. (1987) Understanding the mode of action of the chloroacetamide and thiocarbamate herbicides. *Weed Technol.* 1, 270-277

Ghanevati, M., Jaworski, J. G. (2001) Active-site residues of a plant membrane-bound fatty acid elongase β -ketoacyl-CoA synthase, *FAE1 KCS*. *Biochim. Biophys. Acta* 1530, 77-85

Ghanevati, M., Jaworski, J. G. (2002) Engineering and mechanistic studies of the *Arabidopsis FAE1* β -ketoacyl-CoA synthase, *FAE1 KCS*. *Eur. J. Biochem.* 269, 3531-3539

Girke, T., Schmidt, H., Zähringer, U., Reski, R., Heinz, E. (1998) Identification of a novel $\Delta 6$ -acyl-group desaturase by targeted gene disruption in *Physcomitrella patens*. *Plant J.* 15 (1), 39-48

Graca, J., Pereira, H. (1997) Cork suberin. A glyceryl based polyester. *Holzforschung* 51 (3), 225-234

Graca, J., Pereira, H. (2000) Diglycerol alkenedioates in suberin: Building Units of a Poly(acylglycerol) Polyester. *Biomacromolecules* 1 (4), 519-522

Graca, J., Schreiber, L., Rodrigues, J., Pereira, H. (2002) Glycerol and glyceryl esters of ω -hydroxyacids in cutins. *Phytochemistry* 61 (2), 205-215

Gray, J. E., Holroyd, G. H., van der Lee, F. M., Bahrami, A. R., Sijmons, P. C., Woodward, F. I., Schuch, W., Hetherington, A. M. (2000) The *HIC* signalling pathway links CO₂ perception to stomatal development. *Nature* 408, 713-716

Gurr, M. I. (1980) The biosynthesis of Triacylglycerols. In: Stumpf, P. K. (Ed.) *The biochemistry of plants*. Academic Press, New York, 205-248

Hamm, P. C. (1974) Discovery, development, and current status of the chloroacetamide herbicides. *Weed Sci.* 22, 541-545

Han, G., Gable, K., Kohlwein, S. D., Beaudoin, F., Napier, J. A., Dunn, T. M. (2002) The *Saccharomyces cerevisiae YBR159w* gene encodes the 3-ketoreductase of the microsomal fatty acid elongase. *J. Biol. Chem.* 277 (38), 35440-35449

Han, J., Lühs, W., Sonntag, K., Zähringer, U., Borchardt, D. S., Wolter, F. P., Heinz, E., Frentzen, M. (2001) Functional characterization of β -ketoacyl-CoA synthase genes from *Brassica napus* L. *Plant Mol. Biol.* 46, 229-239

Harwood J. L. (1980) Plant acyl lipids: structure, distribution and analysis. In: *The Biochemistry of plants* (Stumpf, P. K. and Conn, E. eds.). New York, NY: Academic Press, pp 2-56

Heinz, E., Zank, T., Zaehring, U., Lerchl, J., Renz, A. (2001) Novel microbial fatty acid elongase genes and methods for producing polyunsaturated fatty acids. *PCT Internat. Appl.* WO 2001059128

Hetherington, A. M. (2001) Guard cell signaling. *Cell* 107, 711-714

Hirsch, D., Stahl, A., Lodish, H. F. (1998) A family of fatty acid transporters conserved from mycobacterium to man. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 95, 8625-8629

Hlousek-Radojcic, A., Hiroyuki, I., Jaworski, J. G. (1995) Oleoyl-CoA is not an immediate substrate for fatty acid elongation in developing seeds of *Brassica napus*. *Plant J.* 8 (6), 803-809

Hochuli, E. (1989) Genetically designed affinity chromatography using a novel metal chelate absorbent. *Biologically Active Molecules* 217-239

Hock, B., Fedtke, C., Schmidt, R. R. (1995) in: *Herbizide. Entwicklung, Anwendung, Wirkungen, Nebenwirkungen.* Thieme, Stuttgart (Germany)

Hooker, T. S., Millar, A. A., Kunst, L. (2002) Significance of the expression of the *CER6* condensing enzyme for cuticular wax production in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 129, 1568-1580

Huang, B.-Q., Gressel, J. (1997) Barnyardgrass (*Echinochloa crus-galli*) resistance to both butachlor and thiobencarb in china. *Resist. Pestic. Manage.* 9, 5-7

James, D. W. and Dooner, H. K. (1990) Isolation of EMS-induced mutants in *Arabidopsis* altered in seed fatty acid composition. *Theor. Appl. Genet.* 80, 241-245

James, D. W. Jr., Lim, E., Keller, J., Plooy, I., Ralston, E., Dooner, H. K. (1995) Direct tagging of the *Arabidopsis FATTY ACID ELONGATION1 (FAE1)* gene with the maize transposon *activator*. *Plant Cell* 7, 309-319

Jenks, M. A., Rashotte, A. M., Tuttle, H. A., Feldmann, K. A. (1996) Mutants in *Arabidopsis thaliana* altered in epicuticular wax and leaf morphology. *Plant Physiol.* 110, 377-385

- Jenks, M. A., Tuttle, H. A., Feldmann K. A.** (1996) Changes in epicuticular waxes on wildtype and *eceriferum* mutants in *Arabidopsis* during development. *Phytochemistry* 42 (1), 29-34
- Johnson, D. R., Knoll, L. J., Levin, D. E., Gordon, J. I.** (1994) *Saccharomyces cerevisiae* contains four fatty acid activation (*FAA*) genes: an assessment of their role in regulating protein N-myristoylation and cellular lipid metabolism. *J. Cell Biol.* 127 (3), 751-762
- Jones, E. W.** (1990) Vacuolar proteases in yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Methods Enzymol.* 185, 372-386
- Kajikawa, M., Yamato, K. T., Kanamaru, H., Sakuradani, E., Shimizu, S., Fukuzawa, H., Sakai, Y., Ohyama, K.** (2003) *MpFAE3*, a beta-ketoacyl-CoA synthase gene in the liverwort *Marchantia polymorpha* L., is preferentially involved in elongation of palmitic acid to stearic acid. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 67 (8), 1667-1674
- Kern, A. J., Jackson, L. L., Dyer, W. E.** (1997) Fatty acid and wax biosynthesis in susceptible and triallate-resistant *Avena fatua* L. *Pestic. Sci.* 51, 21-26
- Kohlwein, S. D., Eder, S., Oh, C.-S., Martin, C. E., Gable, K., Bacikova, D., Dunn, T.** (2001) *Tsc13p* is required for fatty acid elongation and localizes to a novel structure at the nuclear-vacuolar interface in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and Cellular Biology* 21 (1), 109-125
- Kolattukudy, P. E.** (1980) Cutin, suberin, and waxes. In: Stumpf, P. K. (Ed.) *The biochemistry of plants*. Academic Press, New York, 571-645
- Kolattukudy, P. E., Brown, L.** (1974) Inhibition of cuticular lipid biosynthesis in *Pisum sativum* by thiocarbamates. *Plant Physiol.* 53, 903-906
- Kreße, G.-B.** (1999) Lipide. In: Michal, G. (Hrsg.) *Biochemical pathways*. Spektrum, Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, 75-84

- Krolikowski, K. A., Victor, J. L., Nussbaum Wagler, T., Lolle, S. J., Pruitt, R. E. (2003)** Isolation and characterization of the *Arabidopsis* organ fusion gene *HOTHEAD*. Plant J. 35, 501-511
- Kunst, L. and Clemens, S. (2001)** *Arabidopsis* long chain β -ketoacyl-CoA synthase2 for modification of fatty acid composition. PCT Internat. Appl. WO 0107586
- Kunst, L., Clemens, S., Hooker, T. (2000)** Expression of the wax-specific condensing enzyme *CUT1* in *Arabidopsis*. Biochem. Soc. Trans. 28 (6), 651-654
- Kunst, L., Samuels, A. L. (2003)** Biosynthesis and secretion of plant cuticular wax. Prog. Lipid Res. 42, 51-80
- Kunst, L., Taylor, D. C., Underhill, E. W. (1992)** Fatty acid elongation in developing seeds of *Arabidopsis thaliana*. Plant Physiol. Biochem. 30 (4), 425-434
- Lassner, M. W., Lardizabal, K., Metz, J. G. (1996)** A jojoba beta-Ketoacyl-CoA synthase cDNA complements the canola fatty acid elongation mutation in transgenic plants. Plant Cell 8 (2), 281-292
- Lechelt-Kunze, C., Meissner, R. C., Drewes, M., Tietjen, K. (2003)** Flufenacet herbicide treatment phenocopies the *fiddlehead* mutant in *Arabidopsis thaliana*. Pest. Manag. Sci. 59 (8), 847-856
- Lolle, S. J., Cheung, A. Y., Sussex, I. M. (1992)** *Fiddlehead*: An *Arabidopsis* mutant constitutively expressing an organ fusion program that involves interactions between epidermal cells. Dev. Biol. 152, 383-392
- Lolle, S. J., Berlyn, G. P., Engstrom, E. M., Krolikowski, K. A., Reiter, W.-D., Pruitt, R. E. (1997)** Developmental regulation of cell interactions in the *Arabidopsis fiddlehead-1* mutant: A role for the epidermal cell wall and cuticle. Dev. Biol. 189, 311-321
- Lolle, S. J., Hsu, W., Pruitt, R. E. (1998)** Genetic Analysis of Organ Fusion in *Arabidopsis thaliana*. Genetics 149, 607-619

Lynch, D. V. (1993) Sphingolipids. In: Lipid metabolism in plants (Moore, T. S. Jr ed). Boca Raton, FL: CRC Press, 286-308

Mariani, C., Wolters-Arts, M. (2000) Complex waxes. Plant Cell 12, 1795-1798

Matthes, B., Böger, P. (2002) Chloroacetamides affect the plasma membrane. Z. Naturforsch. 57 (9-10), 843-852

Matthes, B., Schmalfuß, J., Böger, P. (1998) Chloroacetamide mode of action, II: Inhibition of very long chain fatty acid synthesis in higher plants. Z. Naturforsch. 53c, 1004-1011

McNevin, J. P., Woodward, W., Hannoufa, A., Feldmann, K. A., Lemieux, B. (1993) Isolation and characterization of *eceriferum* (*cer*) mutants induced by T-DNA insertions in *Arabidopsis thaliana*. Genome 36, 610-618

Millar, A. A., Clemens, S., Zachgo, S., Giblin, E. M., Taylor, D. C., Kunst, L. (1999) *CUT1*, an *Arabidopsis* gene required for cuticular wax biosynthesis and pollen fertility, encodes a very-long-chain fatty acid condensing enzyme. Plant Cell, 11, 825-838

Millar, A. A., Kunst, L. (1997) Very-long-chain fatty acid biosynthesis is controlled through the expression and specificity of the condensing enzyme. Plant J. 12 (1), 121-131

Millar, A. A., Wrisher, M., Kunst, L. (1998) Accumulation of very-long-chain fatty acids in membrane glycerolipids is associated with dramatic alterations in plant morphology. Plant Cell 11, 1889-1902

Moon, H., Smith, M. A., Kunst, L. (2001) A condensing enzyme from the seeds of *Lesquerella fendleri* that specifically elongates hydroxy fatty acids. Plant Phys. 127, 1635-1643

Moon, Y.-A., Horton, J. D. (2003) Identification of two mammalian reductases involved in the two-carbon fatty acyl elongation cascade. J. Biol. Chem. 278, 7335-7343

Oh, C.-S., Toke, D. A., Mandala, S., Martin, C. E. (1997) *ELO2* and *ELO3*, homologues of the *Saccharomyces cerevisiae ELO1* gene, function in fatty acid elongation and are required for sphingolipid formation. *J. Biol. Chem.* 272 (28), 17376-17384

Parker-Barnes, J. M., Das, T., Bobik, E., Leonard, A. E., Thurmond, J. M., Chaung, L.-T., Huang, Y.-S., Mukerji, P. (2000) Identification and characterization of an enzyme involved in the elongation of n-6 and n-3 polyunsaturated fatty acids. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 97 (15), 8284-8289

Pompon, D., Louerat, B., Bronine, A., Urban, A. (1996) Yeast expression of animal and plant P450s in optimized redox environments. *Methods Enzymol.* 272, 51-64

Porath, J., Carlsson, J., Olsson, I., Belfrage, G. (1975) Metal chelate affinity chromatography, a new approach to protein fractionation. *Nature* 258, 598-599

Post-Beittenmiller, D. (1996) Biochemistry and molecular biology of wax production in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 47, 405-430

Präve, P. (1990) Mechanische Zellaufschlussverfahren. In: *Jahrbuch der Biotechnologie III*, Hanser Fachbuch, München

Preuss, D., Lemieux, B., Yen, G., Davis, R. W. (1993) A conditional sterile mutation eliminates surface components from *Arabidopsis* pollen and disrupts cell signaling during fertilization. *Genes Dev.* 7, 974-985

Pruitt, R. E., Vielle-Calzada, J.-P., Ploense, S. E., Grossniklaus, U., Lolle, S. J. (2000) *FIDDLEHEAD*, a gene required to suppress epidermal cell interactions in *Arabidopsis*, encodes a putative lipid biosynthetic enzyme. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 97 (3), 1377-1316

Rashotte, A. M., Jenks, M. A., Feldmann, K. A. (2001) Cuticular waxes on *eceriferum* mutants of *Arabidopsis thaliana*. *Phytochemistry* 57, 115-123

Roessler, H., Rieck, C., Delong, T., Hoja, U., Schweizer, E. (2003) Functional differentiation and selective inactivation of multiple *Saccharomyces cerevisiae* genes involved in very-long-chain fatty acid synthesis. *Mol. Genet. Genomics* 269 (2), 290-298

Rojo, E., Sharma, V. K., Kovaleva, V., Raikhel, N. V., Fletcher, J. C. (2002) *CLV3* is localized to the extracellular space, where it activates the *Arabidopsis CLAVATA* stem cell signaling pathway. *Plant Cell* 14, 969-977

Roscoe, T. J., Lessire, R., Puyaubert, J., Renard, M., Delseny, M. (2001) Mutations in the *fatty acid elongation 1* gene are associated with a loss of β -ketoacyl-CoA synthase activity in low erucic acid rapeseed. *FEBS Letters* 492, 107-111

Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higuchi, R., Horn, G. T., Mullis, K. B., Erlich, H. A. (1988) Primer directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239, 487-491

Sambrook, J., Fritsch, E. F., Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning: A laboratory Manual*, 2nd edn. Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press

Schmalfuß, J., Matthes, B., Knuth, K., Böger, P. (2000) Inhibition of acyl-CoA elongation by chloroacetamide herbicides in microsomes from leek seedlings. *Pest. Biochem. Physiol.* 67, 25-35

Schmalfuß, J., Matthes, B., Mayer, P., Böger, P. (1998) Chloroacetamide mode of action, I: Inhibition of very long chain fatty acid synthesis in *Scenedesmus acutus*. *Z. Naturforsch.* 53c, 995-1003

Schneider, R., Tatzer, V., Gogg, G., Leitner, E., Kohlwein, S. D. (2000) Elo1p-dependent carboxy-terminal elongation of C14:1 Δ^9 to C16:1 Δ^{11} fatty acids in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* 182 (13), 3655-3660

Schreiber, L., Skrabs, M., Hartmann, K., Becker, D., Cassagne, C., Lessire, R. (2000) Biochemical and molecular characterization of corn (*Zea mays* L.) root elongases. *Biochem. Soc. Trans.* 28 (6), 647-649

Sharma, V. K., Fletcher, J. C. (2002) Maintenance of shoot and floral meristem cell proliferation and fate. *Plant Physiol.* 129, 31-39

Sieber, P., Schorderet, M., Ryser, U., Buchala, A., Kolattukudy, P., Métraux, J.-P., Nawrath, C. (2000) Transgenic *Arabidopsis* plants expressing a fungal cutinase show alterations in the structure and properties of the cuticle and postgenital organ fusions. *Plant Cell* 12, 721-737

Sinha, N. (2000) The response of epidermal cells to contact. *Trend plant Sci.* 5 (6), 233-234

Smith, P. K., Krohn, R. I., Hermanson, G. T., Mallia, A. K., Gartner, F. H., Provenzano, M. D., Fujimoto, E. K., Goeke, N. M., Olson, B. J., Klenk, D. C. (1985) Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal. Biochem.* 150 (1), 76-85

Smith, M., Moon, H., Kunst, L. (2000) Production of hydroxy fatty acids in the seeds of *Arabidopsis thaliana*. *Biochem. Soc. Trans.* 28 (6), 947-950

Sperling, P., Lee, M., Girke, T., Zähringer, U., Stymne, S., Heinz, E. (2000) A bifunctional Δ^6 -fatty acyl acetylenase/desaturase from the moss *Ceratodon purpureus*. A new member of the cytochrome b₅ superfamily. *Eur. J. Biochem.* 267, 3801-3811

Takahashi H., Ohki A., Kanzaki M., Tanaka A., Sato Y., Matthes B., Böger P., Wakabayashi K. (2001) Very-long-chain fatty acid biosynthesis is inhibited by cafenstrole, N,N-diethyl-3-mesitylsulfonyl-1*H*-1,2,4-triazole-1-carboxamide and its analogs. *Z. Naturforsch.* 56 (9-10), 781-786

Takahashi, H., Ohki, A., Kato, S., Tanaka, A., Sato, Y., Matthes, B., Böger, P., Wakabayashi, K. (2001) Inhibition of very-long-chain fatty acid biosynthesis by 2-chloro-N-(3-methoxy-2-thenyl)-2',6'-dimethylacetanilide, thenylchlor, and its analogs. *Pest. Biochem. Physiol.* 71, 140-146

Takahashi H., Schmalfuss J., Ohki A., Hosokawa A., Tanaka A., Sato Y., Matthes B., Böger P., Wakabayashi K. (2002) Inhibition of very-long-chain fatty acid formation by

indanofan, 2-[2-(3-chlorophenyl)oxiran-2-ylmethyl]-2-ethylindan-1,3-dione, and its relatives. *Z. Naturforsch.* 57 (1-2), 72-74

Todd, J., Post-Beittenmiller, D., Jaworski, J. (1999) *KCS1* encodes a fatty acid elongase 3-ketoacyl-CoA synthase affecting wax biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* 17 (2), 119-130

Toke, D. A., Martin, C. E. (1996) Isolation and characterization of a gene affecting fatty acid elongation in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 271 (31), 18413-18422

Towbin, H., Staehelin, T., Gordon, J. (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76, 4350-4354

Truan, G., Cullin, C., Reisdorf, P., Urban, P., Pompon, D. (1993) Enhanced in vivo monooxygenase activities of mammalian P450s in engineered yeast cells producing high levels of NADPH-P450 reductase and human cytochrome b₅. *Gene* 125, 49-55

Uemura, M., Joseph, R. A., Steponkus, P. L. (1995) Cold acclimation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol.* 109, 15-30

Urban, P., Mignotte, C., Kazmaier, M., Delorme, F., Pompon, D. (1997) Cloning, yeast expression, and characterization of the coupling of two distantly related *Arabidopsis thaliana* NADPH-Cytochrome P450 CYP73A5. *J. Biol. Chem.* 272 (31), 19176-19186

Ward, E., Bernasconi, P. (1999) Target-based discovery of crop protection chemicals. *Nature Biotechnol.* 17 (8), 618-619

Watkins, P. A., Lu, J.-F., Steinberg, S. J., Gould, S. J., Smith, K. D., Braiterman, L. T. (1998) Disruption of the *Saccharomyces cerevisiae* *FAT1* gene decreases very long-chain fatty acyl-CoA synthetase activity and elevates intracellular very long-chain fatty acid concentrations. *J. Biol. Chem.* 273 (29), 18210-18219

Weiss, B., Jacquemin-Sablon, A., Live, T. R., Fareed, G. C., Richardson, C. C. (1968) Enzymatic breakage and joining of desoxyribonucleic acid. VI. Further purification and

properties of polynucleotide ligase from *Escherichia coli* infected with bacteriophage T4. J. Biol. Chem. 243, 4543-4555

Wellesen, K., Durst, F., Pinot, F., Benveniste, I., Nettesheim, K., Wisman, E., Steiner-Lange, S., Saedler, H., Yephremov, A. (2001) Functional analysis of the *LACERATA* gene of *Arabidopsis* provides evidence for different roles of fatty acid ω -hydroxylation in development. Proc. Nat. Acad. Sci. 98 (17), 9694-9699

Wienand, U., Janke, S., Da Costa E Silva, O. (2000) Method to alter fatty acid metabolism in plants. PCT Internat. Appl. WO 0008172

Wu, J., Hwang, I.-T., Hatzios, K. (2000) Effects of chloroacetanilide herbicides on membrane fatty acid desaturation and lipid composition in rice, maize, and sorghum. Pest. Biochem. Physiol. 66, 161-169

Xu, X., Dietrich, C. R., Lessire, R., Nikolau, B. J., Schnable, P. S. (2002) The endoplasmatic reticulum-associated maize GL8 protein is a component of the acyl-coenzyme A elongase involved in the production of cuticular waxes. Plant Phys. 128, 924-934

Yephremov, A., Wismann, E., Huijser, P., Huijser, C., Wellesen, K., Saedler, H. (1999) Characterization of the *FIDDLEHEAD* gene of *Arabidopsis* reveals a link between adhesion response and cell differentiation in the epidermis. Plant Cell 11, 2187-2201

Zank, T. K., Zähringer, U., Lerchl, J., Heinz, E. (2000) Cloning and functional expression of the first plant fatty acid elongase specific for Δ^6 -polyunsaturated fatty acids. Biochem. Soc. Trans. 28, 654-658

Danksagungen

An dieser Stelle danke ich allen, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben. Einige Personen, denen mein besonderer Dank gilt, möchte ich kurz erwähnen:

Ein sehr großes Dankeschön gilt Herrn Dr. Klaus Tietjen für die Bereitstellung des Themas, die stete Unterstützung und wertvollen Anregungen, die wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben. Außerdem möchte ich mich für das mir entgegengebrachte Vertrauen und die damit verbundenen Freiheiten bedanken.

Prof. Dr. William Martin danke ich für die Betreuung dieser Arbeit, seine immerwährende Unterstützung und ständige Diskussionsbereitschaft.

Prof. Dr. Peter Westhoff danke ich für die freundliche Übernahme des Korreferats.

Dem Geschäftsbereich Pflanzenschutz der Bayer AG, vertreten durch Herrn Dr. Wollweber und der Abteilung Target Research, vertreten durch Herrn Dr. Stenzel sei gedankt für die Möglichkeit der Durchführung dieser Arbeit.

Ippazio Cicerello und Antje Rottmann danke ich für die liebevolle Anzucht der Pflanzen im Gewächshaus und dafür, dass irgendwie immer Pflanzen da waren, wenn ich welche brauchte.

Ganz besonders möchte ich mich auch bei Herrn Dr. Thielking und seinen Mitarbeitern, insbesondere bei Jürgen Brust, für die Einführung in die Gaschromatographie bedanken.

Mein besonderer Dank gilt ebenfalls der gesamten Arbeitsgruppe von Prof. Martin für die freundliche Aufnahme und Unterstützung.

Bei Marco Busch, Andrea Hansen, Silke Schäfer, Meike Hoffmeister und Eike Hupe möchte ich mich für die fachliche und emotionale Unterstützung während dieser Arbeit bedanken.

Mein ganz besonderer Dank gilt Christina Meschede und Josef Hens, sowie allen anderen Mitarbeitern der Abteilung Target Research für die unendliche Hilfs- und Diskussionsbereitschaft und so freundliche Arbeitsatmosphäre.

Mein letzter Dank gilt jenen, denen ich am meisten zu verdanken habe, meiner gesamten Familie und Philipp.

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und nur unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel und Quellen angefertigt habe.

Sandra Trenkamp

Düsseldorf, 19. November 2003