

# **Die Wirkungsweise herbizidaler Chloracetamide**

Dissertation  
zur Erlangung des akademischen Grades  
des Doktors der Naturwissenschaften

vorgelegt von

**Bernd Matthes**

Universität Konstanz  
im Dezember 2000

Diese Arbeit wurde am Lehrstuhl für Physiologie und Biochemie der Pflanzen des Fachbereichs Biologie an der Universität Konstanz angefertigt. Teile der vorliegenden Arbeit wurden bereits veröffentlicht. Aus diesem Grund erfolgte die Beschriftung der Abbildungen und Tabellen in englischer Sprache.

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

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

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

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

### **Dissertation der Universität Konstanz**

Datum der mündlichen Prüfung: 3.5.2001

1. Referent: Prof. Dr. Peter Böger
2. Referent: Prof. Dr. Kurt Mendgen
3. Referent: Prof. Dr. Joachim Schröder (Universität Freiburg)

## INHALTSVERZEICHNIS

### 1 Einleitung

1.1 Effekte der Chloracetamide: Frühe Literaturberichte.....	3
1.2 Untersuchungen zur Fettsäure-Biosynthese .....	4
1.3 Biosynthese sehr langkettiger Fettsäuren und epicuticularer Wachse .....	5
1.4 Molekularer Wirkungsmechanismus .....	10
1.5 Zielsetzung der Arbeit .....	11

### 2 Material und Methoden ..... 13

2.1 Chemikalien.....	13
2.1.1 Lösungsmittel, Reagenzien und [ <sup>14</sup> C]Substrate.....	13
2.1.2 Wirkstoffe.....	13
2.2 Untersuchungen mit Keimlingen.....	15
2.2.1 Anzucht von Gurke, Gerste und Mais .....	15
2.2.2 Inkubation von Blattstücken.....	16
2.2.3 Lipidhydrolyse und Extraktion <sup>14</sup> C-markierter Fettsäuren.....	17
2.3 Untersuchungen mit Soja-Zellkulturen .....	18
2.3.1 Kultivierung der Sojazellen.....	18
2.3.2 Inkubation der Sojazellen und Zellernte.....	18
2.4 Untersuchungen an <i>FAE1</i> -transformierter Hefe.....	19
2.4.1 Hefe-Zellkulturen .....	19
2.4.2 Wirkstoffapplikation und Zellernte .....	20
2.4.3 <i>In vivo</i> Einbau von [ <sup>14</sup> C]Ölsäure.....	20
2.4.4 Zellaufschluß und Herstellung der mikrosomalen Fraktion.....	21
2.4.5 <i>In vitro</i> Test auf Elongaseaktivität.....	21
2.5 Untersuchung epicuticularer Wachse aus Gurke.....	22
2.5.1 Wirkstoffapplikation.....	22
2.5.2 Analyse der Wachskomponenten .....	22
2.5.3 Einbau von [ <sup>14</sup> C]Substrat.....	23
2.6 Untersuchung der Plasmamembran aus Gurke.....	23
2.6.1 Inkubation mit Herbizid und Herstellung der mikrosomalen Fraktion .....	23
2.6.2 Reinigung der Plasmamembran (2-Phasen-Verteilung).....	24
2.6.3 Einbau von [ <sup>14</sup> C]Malonat in Membran-Fettsäuren.....	25
2.6.4 Western-Blotting.....	26
2.6.5 Immunodetektion.....	26
2.6.6 Fettsäure- und Lipidextraktion .....	27
2.7 Analyse von Fettsäuren .....	28
2.7.1 Fettsäureextraktion (Standardmethode).....	28
2.7.2 Methylierung von Fettsäuren.....	28
2.7.3 Identifizierung <sup>14</sup> C-markierter Fettsäuren .....	29

2.7.4	Identifizierung unmarkierter Analyten .....	29
2.7.5	Quantifizierung und Wiederfindung der Analyten .....	31
2.8	Chromatographische Methoden.....	31
2.8.1	Radio-HPLC .....	31
2.8.2	GC/ FID .....	32
2.8.3	GC/ EI-MS.....	33
2.8.4	Dünnschichtchromatographie.....	33
2.9	Bestimmung von Parametern.....	34
2.9.1	Zellvolumen und Zelldichte.....	34
2.9.2	Chlorophyllgehalt .....	34
2.9.3	Proteingehalt .....	34
2.9.4	Radioaktivität.....	35
2.10	Statistische Auswertung .....	35
<b>3</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>36</b>
3.1	Hemmung der VLCFA-Biosynthese in höheren Pflanzen .....	36
3.1.1	Wachstum und Entwicklung der Keimlinge.....	36
3.1.2	Einbau <sup>14</sup> C-markierter Substrate und Identifizierung markierter Metabolite.....	37
3.1.3	Nachweis der reduzierten VLCFA-Bildung .....	39
3.1.4	Sensitivität der Herbizidwirkung.....	41
3.1.5	Zeitlicher Verlauf des Stearinsäure-Einbaus .....	43
3.2	Hemmung der VLCFA-Biosynthese in Sojazellen.....	44
3.2.1	Wachstum der Zellkulturen mit Metazachlor .....	44
3.2.2	Nachweis der reduzierten VLCFA-Bildung .....	45
3.3	Hemmung der VLCFA-Bildung in transgener Hefe .....	47
3.3.1	Wachstum der Hefezellen.....	47
3.3.2	Fettsäure-Zusammensetzung in Wildtyp und <i>FAE1</i> -Transformante .....	48
3.3.3	Wirkung von Metazachlor auf die Fettsäure-Zusammensetzung .....	50
3.3.4	<i>In vivo</i> Elongation von [ <sup>14</sup> C]Ölsäure .....	52
3.3.5	<i>In vitro</i> Elongation von [ <sup>14</sup> C]Oleoyl-CoA.....	53
3.4	Reduktion der epicuticularen Wachse .....	55
3.4.1	Charakterisierung der Wachskomponenten.....	55
3.4.2	Einfluß von Metazachlor auf die Wachszusammensetzung .....	56
3.4.3	<i>In vivo</i> Einbau von [ <sup>14</sup> C]Malonat in Wachskomponenten.....	59
3.5	Rückgang der Plasmamembran-VLCFAs .....	62
3.5.1	Charakterisierung der Plasmamembran- und Endomembran-Fraktionen .....	63
3.5.2	Charakterisierung der Membranlipide.....	63
3.5.3	Wirkung von Metazachlor auf die Plasmamembran-Fettsäuren .....	66
3.5.4	<i>In vivo</i> Einbau von [ <sup>14</sup> C]Malonat in Plasmamembran-VLCFAs.....	68
3.6	Herbizid-Test .....	70

<b>4 Diskussion</b> .....	<b>72</b>
4.1 Wirkungsweise der Chloracetamide <i>in vivo</i> .....	72
4.1.1 VLCFA-Markierung durch verschiedene exogene [ <sup>14</sup> C]Vorläufer .....	72
4.1.2 <i>In vivo</i> Hemmung der VLCFA-Biosynthese .....	73
4.1.3 Abhängigkeit der Hemmung von der Kettenlänge .....	75
4.1.4 Abgrenzung zu <i>de novo</i> Fettsäure-Synthese und Desaturierung .....	78
4.1.5 Verschiedene Inhibitoren der VLCFA-Biosynthese.....	80
4.2 Wirkungsweise der Chloracetamide <i>in vitro</i> .....	81
4.2.1 Hemmung des Kondensationsschrittes der Fettsäure-Elongation .....	81
4.2.2 Zusätzliche Effekte der <i>FAE1</i> -Expression auf den Fettsäurestoffwechsel.....	85
4.3 Wirkung der Chloracetamide auf epicuticulare Wachse .....	86
4.3.1 Hemmung der Wachsbildung .....	86
4.3.2 Beitrag zur phytotoxischen Wirkung.....	89
4.4 Wirkung der Chloracetamide auf die Plasmamembran .....	91
4.4.1 VLCFA-Mangel in Membranlipiden.....	91
4.4.2 Phytotoxizität durch Einwirkung auf Struktur und Integrität von Membranen.....	93
<b>5 Zusammenfassung</b> .....	<b>96</b>
<b>6 Literaturverzeichnis</b> .....	<b>98</b>

## ABBILDUNGEN

Figure 1: Chemical structure of typical chloro- and oxyacetamide herbicides. ....	2
Figure 2: Scheme of fatty acid processing in plants. ....	7
Figure 3: Biosynthesis of plant wax constituents. ....	9
Figure 4: Name and structure of applied active substances. ....	15
Figure 5: Flow diagram showing the procedure of fatty acid solubilization. ....	17
Figure 6: Purification of cucumber plasma membrane by two-phase partition. ....	24
Figure 7: Synthesis of <sup>14</sup> C-labelled very-long-chain fatty acid methyl esters. ....	29
Figure 8: 6-day old seedlings treated with 1 μM metazachlor. ....	36
Figure 9: Separation of cucumber VLCFAs by radio-HPLC. ....	40
Figure 10: Inhibition of VLCFA biosynthesis depends on fatty acid chain length. ....	42
Figure 11: Metazachlor-induced inhibition of VLCFA biosynthesis in different plants. ....	42
Figure 12: Time course of [ <sup>14</sup> C]stearic acid metabolism in cucumber cotyledons. ....	43
Figure 13: Growth inhibition of soybean cells with metazachlor. ....	44
Figure 14: Effect of metazachlor on soybean fatty acids. ....	45
Figure 15: Cell proliferation of <i>Saccharomyces cerevisiae</i> wild-type and transformant. ....	48
Figure 16: GC/FID analysis of fatty acids of wild-type and <i>FAE1</i> transformant. ....	49
Figure 17: Effect of metazachlor on fatty acids from the <i>FAE1</i> yeast. ....	51
Figure 18: Effect of metazachlor on 18:1 elongation in <i>FAE1</i> yeast. ....	52
Figure 19: GC/FID analysis of epicuticular waxes of <i>Cucumis sativus</i> cotyledons. ....	55
Figure 20: Metazachlor effect on composition of very-long-chain wax components. ....	57
Figure 21: Chain length distribution of wax fatty acids affected by metazachlor. ....	58
Figure 22: Radio-HPLC analysis of <sup>14</sup> C-labelled wax components. ....	60
Figure 23: Immunoreaction of plasma membrane-H <sup>+</sup> -ATPase from <i>Cucumis sativus</i> . ....	63
Figure 24: TLC analysis of membrane lipids of <i>Cucumis sativus</i> seedlings. ....	64
Figure 25: Effect of metazachlor upon membrane fatty acids of cucumber. ....	66
Figure 26: Radio-HPLC analysis of <sup>14</sup> C-labelled plasma membrane fatty acids. ....	68
Figure 27: Effect of metazachlor on labelling of membrane fatty acids. ....	69
Figure 28: Four-step mechanism of fatty acid elongation. ....	77
Figure 29: Acyl-CoA-regulated enzymes instrumental in fatty acid elongation. ....	77
Figure 30: Model for the active site of condensing enzymes. ....	84
Figure 31: Structural features of VLCFA-containing plasma membrane lipids. ....	94

## TABELLEN

Table 1: Labelled lipid precursors applied in the experiments.....	13
Table 2: Concentrations of [ <sup>14</sup> C]precursors applied in assays of leaf tissue. ....	16
Table 3: Nutrient for photoheterotrophic cell cultures of <i>Glycine max</i> .....	18
Table 4: Characteristic ions of fatty acid and alcohol derivatives (GC/ EI-MS). ....	30
Table 5: Conditions of GC/ FID analysis of fatty acids and epicuticular waxes.....	32
Table 6: Growth inhibition of cucumber seedlings by metazachlor. ....	37
Table 7: Incorporation of [ <sup>14</sup> C]precursors into cucumber fatty acids.....	38
Table 8: Influence of metazachlor on biosynthesis of cucumber fatty acids.....	39
Table 9: Metazachlor-induced reduction of soybean VLCFAs.....	47
Table 10: Incorporation of [ <sup>14</sup> C]oleic acid into fatty acids of <i>FAE1</i> yeast.....	53
Table 11: Metazachlor-induced inhibition of recombinant <i>Arabidopsis</i> seed elongase.....	54
Table 12: Effect of metazachlor on the wax composition of cucumber cotyledons.....	56
Table 13: Effect of metazachlor on incorporation of [ <sup>14</sup> C]malonate into wax components.....	59
Table 14: Fatty acid composition in membranes of <i>Cucumis sativus</i> seedlings. ....	62
Table 15: Data showing the purity of plasma membrane preparation.....	65
Table 16: Fatty acid composition of cucumber membrane lipids.....	65
Table 17: Inhibition of VLCFA synthesis with different herbicides.....	70
Table 18: Inhibition of recombinant fatty acid elongase <i>in vitro</i> . ....	71
Table 19: Inhibition of very-long-chain fatty acid biosynthesis by metazachlor.....	75

## ABKÜRZUNGEN

ACCCase	Acetyl-CoA-Carboxylase
ACP	Acyl-Carrier-Protein
BSA	Rinderserumalbumin (bovine serum albumin)
cpm	Impulse pro Minute (counts per minute)
ER	Endoplasmatisches Retikulum
GA	Golgi-Apparat
G3P	Glycerin-3-phosphat
GC	Gaschromatographie
FAE1	Kondensationsenzym der Fettsäure-Elongase aus <i>Arabidopsis</i> -Samen (fatty acid elongation)
FID	Flammenionisationsdetektor
FSME, FAME	Fettsäuremethylester, fatty acid methyl ester
EI	Ionisierung durch Elektronenstoß (electron impact)
EM	Endomembranen (mikrosomale Membranen ohne Plasmamembran)
Hepes	<i>N</i> -(2-hydroxyethyl)piperazin- <i>N'</i> -(2-ethansulfonsäure)
HPLC	Hochdruck-Flüssigchromatographie (high pressure liquid chromatography)
I <sub>50</sub>	Herbizidkonzentration bei halbmaximaler Hemmung (50 % inhibition)
LTP	Lipidtransportprotein
MF	Mikrosomale Fraktion
Mops	3-( <i>N</i> -morpholino)propansulfonsäure
MS	Massenspektroskopie
MZ	Metazachlor
OD	Optische Dichte
pcv	Zelldichte (packed cell volume)
PVPP	Polyvinylpolypyrrolidon
PM	Plasmamembran
PMSF	Phenylmethyldisulfonylchlorid
R	Kanalverhältnis
SDS	Natriumdodecylsulfat (sodium dodecylsulfate)
TEMED	<i>N,N,N',N'</i> -Tetramethylethylendiamin
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
Tween 20	Polyoxyethylensorbitanmonolaurat
Triton X-100	Octylphenolpoly(ethylenglycolether) <sub>n</sub>
VLCFA	Sehr langkettige Fettsäure mit einer Kettenlänge von mehr als 18 Kohlenstoffatomen (very-long-chain fatty acid)
x:y	Für die Fettsäure x:y bedeutet x die Anzahl der Kohlenstoffatome und y die Anzahl der Doppelbindungen im Molekül



## 1 EINLEITUNG

Seit der Entwicklung der Chloracetamide Anfang der 50er Jahre (zusammengefaßt durch Hamm, 1974) machen diese Wirkstoffe einen wesentlichen Teil des jährlichen Herbizideinsatzes aus. Die Chloracetamide werden vor allem in den USA in Mais- und Soja-Kulturen gegen Gräser, aber auch gegen dikotyle Unkräuter eingesetzt. Die Aufnahme des Wirkstoffs erfolgt über den keimenden Sproß, bei Gräsern insbesondere über die Koleoptile (Fuerst *et al.*, 1991), daher werden die Chloracetamide in der Regel im Voraufverfahren, d.h. vor der Keimung der Saat, ausgebracht. Sie hemmen die Keimung und das Wachstum der Unkräuter und verschaffen damit den Nutzpflanzen vor allem zu Beginn der Kultur einen Wachstumsvorsprung.

Aufgrund der Applikation im Voraufverfahren ist die benötigte Aufwandsmenge (im Bereich von kg/ha, LeBaron *et al.*, 1988) im Vergleich zu anderen Herbizidtypen relativ hoch. Trotzdem ist z.B. Metolachlor für den Einsatz in über 70 Nutzpflanzen registriert worden (O'Connell *et al.*, 1998). Dies ist der Selektivität der Chloracetamide zuzuschreiben, die durch den Einsatz von Safenern zusätzlich gesteigert wird. Safener schützen die Nutzpflanze vor den phytotoxischen Wirkungen der Chloracetamide (Hatzios, 1991), indem sie die Detoxifizierung des Wirkstoffs beschleunigen (Breaux, 1987; Scarponi *et al.*, 1991) oder diesen in einem Kompartiment fernab vom Wirkort deponieren (Coupland, 1991). Biochemisch wird die Detoxifizierung durch Bindung des Herbizids an das Tripeptid Glutathion eingeleitet, dessen Gehalt in der Zelle durch den Safener entweder erhöht (Gronwald, 1991) oder dessen Verfügbarkeit durch Aktivitätssteigerung der Glutathion *S*-Transferase verbessert wird (Fuerst *et al.*, 1991; Lamoureux und Rusness, 1989).

Der derzeit wieder zunehmende Einsatz von Chloracetamiden liegt auch darin begründet, daß sich unter den bekämpften Unkräutern bisher nur wenige Resistenzen bilden konnten. Während z.B. gegen Atrazin mehr als 60 Resistenzen bekannt sind (Heap, 1997), wurden bisher nur zwei Chloracetamid-resistente Organismen gefunden, *Echinochloa crus-galli* (Huang und Gressel, 1997), und *Lolium rigidum* (Burnet *et al.*, 1994). Die in den letzten Jahren insgesamt stark zunehmenden Populationen resistenter Unkräuter entstehen vor allem nach mehrjähriger Behandlung einer Kultur mit dem gleichen Herbizid. Einem anhaltend hohen und einseitigen Selektionsdruck kann durch die Kombination verschiedener Wirkstoffe sowie der Fruchtwechsel-Kultur entgegengewirkt werden. Dadurch wird die Bildung von Resistenzen verzögert oder ganz vermieden (Powles *et al.*, 1997).

Neben dem Versuch, die Nutzpflanzen durch gezielte genetische Manipulation gegen unerwünschte Herbizidwirkungen zu schützen, werden auch an die Wirkstoffe selbst höhere Anforderungen gestellt. Die geringe gesellschaftliche Akzeptanz der Pestizide und die heute vom Gesetzgeber vorgegebenen umfangreichen Auflagen zur Zulassung eines neuen Wirkstoffs führen zu einem steigenden Aufwand in der Wirkstoffentwicklung. Neben den Untersuchungen zur erwünschten Applikation und der phytotoxischen Wirkung muß insbesondere über das Umweltverhalten, z.B. die Persistenz im Boden, die Toxikologie für den Menschen sowie dem Abbau des Wirkstoffs Nachweis geführt werden. Die Entwicklung eines neuen Herbizids kann somit mehrere 100 Mio. DM kosten, so daß die Nachfrage nach neuen, effizienten Methoden der Wirkstoffsuche, sowie der schnellen und gleichzeitig zuverlässigen Erprobung von neusynthetisierten Wirkstoffen in automatisierten, leistungsfähigen Bioassays groß ist (Ridley *et al.*, 1998).

Andererseits macht der hohe Entwicklungsaufwand für neue Wirkstoffe den Einsatz und die stetige Verbesserung „altbewährter“ herbizidaler Verbindungen attraktiv, deren Stammverbindungen zum Teil heute noch verkauft werden. Mehr als drei Viertel aller Herbizide gehören etwa einem Dutzend verschiedener Stoffgruppen an, wobei nicht jede Stoffklasse zwangsläufig einen anderen Wirktypus zeigt, sondern die Art und Weise der Wirkung als Grundlage der Wirkstoffeinteilung herangezogen wird (Powles *et al.*, 1997). Bisher wurden nur 11 Zielenzyme als primäre Angriffspunkte kommerzieller Herbizide charakterisiert, somit ist eine vollständige Einteilung nach ihrer spezifischen Wirkungsweise (noch) nicht möglich. Die Chloracetamide gehören zum Typ der Zellteilungs-Inhibitoren, das Zielenzym der Chloracetamide war zu Beginn dieser Arbeit nicht bekannt.

Die chemische Struktur der Chloracetamide ist vom Säureamid der Chloressigsäure abgeleitet, wobei der Amid-Stickstoff in der Regel durch einen Alkyl- ( $R_1$ ) und einen Arylrest ( $R_2$ ) substituiert ist. In Oxyacetamiden ist das Chloratom durch eine Aryloxy-Gruppe ( $OR_3$ ) ersetzt (Figure 1).

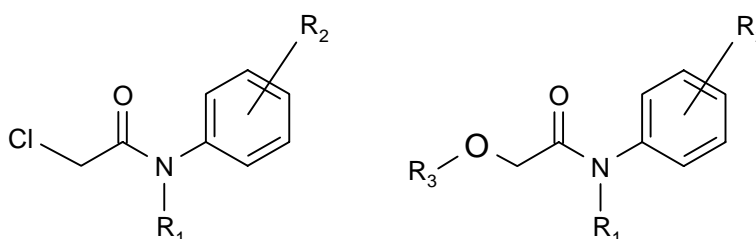


Figure 1: Chemical structure of typical chloro- and oxyacetamide herbicides.

Das Chloracetamid Metolachlor (Struktur s. Figure 4, S. 15) trägt in Nachbarschaft des Amid-Stickstoffs ein chirales C-Atom und besitzt eine chirale Achse, die durch die unterschiedlichen Substituenten am Arylrest erzeugt wird. Das resultierende Enantiomerenpaar sowie die zugehörigen Atropisomere besitzen nicht die gleichen phytochemischen Eigenschaften (Moser und Sauter, 1982): während die Atropisomerie einen geringen Einfluß auf die biologische Aktivität hat, ist das *S*-Enantiomer ca. 1000fach wirksamer als das *R*-Enantiomer. Heute wird *S*-Metolachlor durch enantioselektive Synthese hergestellt (Blaser und Spindler, 1997), so daß sich die Aufwandmenge im Feld etwa halbiert. Die stereoselektive Wirksamkeit der beiden chiralen Chloracetamide Metolachlor und Dimethenamid (Couderchet *et al.*, 1997) werden als Hinweis auf einen spezifischen, ebenso chiralen Wirkort, z.B. die Bindungstasche eines potentiellen Zielenzym, gewertet. Diese beiden Wirkstoffe sind daher sehr gut geeignet, potentielle Zielenzyme zu prüfen.

### 1.1 Effekte der Chloracetamide: Frühe Literaturberichte

Die Derivate der Chloracetamide wurden als Hemmstoffe der Keimung und der Entwicklung von Pflanzen im frühen Wachstumsstadium charakterisiert (Hamm, 1974). Dabei zog die Behandlung von Keimlingen mit diesen Wirkstoffen auffallende morphologische Veränderungen nach sich (zusammengefaßt in Fuerst, 1987), z.B. gestörtes Wachstum von Sproß, Wurzel und Koleoptile.

Diese sichtbaren Schädigungen wurden mit einer Hemmung des Zellwachstums und der Zellteilung in Verbindung gebracht (Deal und Hess, 1980; Hess *et al.*, 1980; Fedtke, 1991), die gemäß der Einteilung der Chloracetamide als Mitose-Inhibitoren als Basis für ihre Phytotoxizität betrachtet wird. Davon ausgehend wurde der primäre Angriffspunkt der Chloracetamide in einer grundlegenden und zentralen Störung des Stoffwechsels vermutet. Seither wurden von den etwa zehn im Handel befindlichen Derivaten dieser Herbizidgruppe unterschiedlichste und zum Teil gegensätzliche Effekte auf den pflanzlichen Stoffwechsel berichtet (zur Übersicht: Fuerst, 1987; LeBaron *et al.*, 1988).

Mit Ausnahme der Kohlenhydrate wurde eine Reduktion aller Produkte des Grundstoffwechsels nachgewiesen, nämlich der Proteine aus Hafer (Deal und Hess, 1980), Hirse (Zama und Hatzios, 1987) und Gurke (Sloan und Camper, 1985) sowie der Purine aus Hirse (Zama und Hatzios, 1987) und Mais (Narsaiah und Harvey, 1977; Sloan und Camper, 1985). Anhand des Einbaus radioaktiv markierten Acetats oder Malonats wurde eine Reduktion des Lipidstoffwechsels in Hanf (Mann und Pu, 1968), Hirse (Zama und Hatzios,

1987) und in der Grünalge *Scenedesmus acutus* gefunden (Weisshaar und Böger, 1987), nicht jedoch in Baumwolle (Mellis *et al.*, 1982).

Darüberhinaus wurden verschiedene Wirkungen auf den Sekundärstoffwechsel berichtet, der von mehreren Autoren anhand der zu den verbreitetsten Unkräutern gehörenden Wildhirse untersucht wurde. Wilkinson (1981) führte die Hemmung des Wachstum nach Metolachlor-Behandlung auf einen reduzierten Gehalt des Wachstumshormons Gibberellinsäure zurück, begleitet von einem Rückgang der Carotinoid-Biosynthese. Den verkümmerten Wuchs der Keimlinge begründeten Molin *et al.* (1986) mit einer reduzierten Lignin-Biosynthese. Gleichzeitig war eine Hemmung der Anthocyanbildung zu beobachten, die auch in Mais, nicht aber in Soja beobachtet wurde (Nemet Alla und Younis, 1995). Die im Langzeitexperiment beobachtete Induktion verschiedener Schlüsselenzyme des Phenolstoffwechsels führten diese Autoren auf Streß zurück.

Die im Hinblick auf diese Arbeit interessantesten physiologischen Wirkungen wurden von Metolachlor berichtet. Ebert (1980) beobachtete anhand elektronenmikroskopischer Untersuchungen eine reduzierte Membranbildung in Hirse, und Mellis *et al.* (1982) fanden in Wurzeln von Zwiebel, Baumwolle und Gurke eine erhöhte Permeabilität für Phosphat-Verbindungen. Wie Ebert und Ramsteiner (1984) beobachteten, wurde die epicuticulare Wachsschicht reduziert, weil der Gehalt sehr langkettiger Alkohole und Fettsäuren (C28-C32) zurückging. Tevini und Steinmüller (1987) bestätigten die Reduktion sehr langkettiger Alkohole in Metolachlor-behandelten Gurke-Keimlingen und berichteten von einer Verschiebung der Alkanzusammensetzung hin zu kürzeren Kettenlängen.

Die berichteten Wirkungen der Chloracetamide wurden in der Regel mit höheren Wirkstoffkonzentrationen oder nach längerer Behandlungsdauer gefunden, während in der Zelle submikromolare Konzentrationen für die phytotoxische Wirkung ausreichen (Fuerst, 1987). Die spezifische Hemmung eines zugrundeliegenden Stoffwechselprozesses, etwa innerhalb des von mehreren Autoren untersuchten Lipidstoffwechsels, konnte aber bisher nicht gezeigt werden. Aus diesem Grund wurde in unserem Labor der Fettsäurestoffwechsel bzw. seine Hemmung durch Chloracetamide näher untersucht.

## 1.2 Untersuchungen zur Fettsäure-Biosynthese

Wie aus dem vorhergehenden Abschnitt hervorgeht, deutete sich in mehreren Arbeiten an, daß die Fettsäure-Biosynthese durch Chloracetamide beeinflusst wird. Obwohl der Gesamtgehalt normaler (C16- und C18-) Fettsäuren offenbar nicht beeinträchtigt wird (Wu *et al.*,

2000), wurde von einer Hemmung der Fettsäure-Desaturierung zugunsten einer Akkumulation von Stearinsäure in Raps (Möllers und Albrecht, 1994), Reis und der Grünalge *Scenedesmus acutus*, nicht aber in Soja, berichtet (Couderchet und Böger, 1993a; Couderchet *et al.*, 1994).

In unserer Arbeitsgruppe wurde der Einfluß von Chloracetamiden auf die Fettsäure-Desaturierung anhand der Metabolisierung markierter Ölsäure in der Grünalge *Scenedesmus acutus* geprüft (Couderchet und Böger, 1993b). Nach Abtrennung einer Fraktion löslicher Lipide stießen Kring *et al.* (1995) und Couderchet *et al.* (1996) auf eine Fraktion unlöslicher Zellwandbestandteile, die auch das resistente Biopolymer Sporopollenin enthielten (zur Übersicht: Blokker *et al.*, 1999; Scott, 1994), in das ein Teil der markierten Ölsäure inkorporiert wurde. In Kurzzeitversuchen hemmten mikromolare Konzentrationen der Chloracetamide sowie des Oxyacetamids Mefenacet diesen Ölsäureeinbau in Sporopollenin. Mit einem  $I_{50}$  von 10-100 nM Metazachlor war somit im Vergleich zu den bis dato berichteten Effekten die empfindlichste Wirkung herbizidaler Chloracetamide beobachtet worden. In Folgeuntersuchungen konnte gezeigt werden, daß der gehemmte Einbau von Ölsäure in Sporopollenin auf einer Hemmung der Fettsäure-Elongation zu sehr langkettigen Fettsäuren (very-long-chain fatty acids, VLCFAs) mit der Kettenlänge C20-C26 zurückzuführen war (Mayer, 1997). Darüberhinaus gehorchte die Hemmung des VLCFA-Einbaus stereoselektiven Prinzipien, da nur das *S*-Enantiomer des chiralen Chloracetamids Metolachlors die Hemmung der VLCFA-Synthese bewirkte.

Darüberhinaus wurden in einer Mutante von *Scenedesmus acutus*, die gegen Metazachlor tolerant war (Couderchet *et al.*, 1995), weniger VLCFAs gefunden als im Wildtyp. Die Mutante inkorporierte exogen applizierte Ölsäure in Sporopollenin, metabolisierte sie jedoch nicht zu längerkettigen Homologen. Schmalfuß *et al.* (1998) werteten diese Fähigkeit der Mutante, VLCFAs durch einen höheren Ölsäuregehalt zu ersetzen, als Basis für ihre Toleranz. Die hohe Empfindlichkeit der Hemmung der VLCFA-Biosynthese, die Stereospezifität, die Charakteristika der Metazachlor-toleranten Mutante sowie die Korrelation zu den phytotoxischen Eigenschaften der Chloracetamide waren für unser Labor ein klarer Hinweis auf einen spezifischen, enzymalen Angriffspunkt dieser Wirkstoffe innerhalb der cytosolischen Fettsäure-Elongation.

### 1.3 Biosynthese sehr langkettiger Fettsäuren und epicuticularer Wachse

Sehr langkettige Fettsäuren (VLCFAs) haben eine Kettenlänge von mindestens 20 C-Atomen und sind Bestandteil verschiedener Kompartimente in eukaryotischen Zellen (Cook, 1994; Schneiter, 1999). In den Epidermis-Zellen der Pflanzen dienen *gesättigte* VLCFAs vor allem als Vorläufer der Biosynthese epicuticularer Wachse (vgl. Figure 2, S. 7), sind aber auch Bestandteil von zellulären Membranen, insbesondere der Plasmamembran, deren Lipide ca. 10 % VLCFAs enthalten (Cassagne *et al.*, 1994; Moreau *et al.*, 1998). Daneben sind *ungesättigte* VLCFAs häufig in Speicherlipiden des Samens enthalten, in besonders hoher Menge z.B. in Raps (Budziszewski *et al.*, 1996). Durch *genetic engineering* von Elongase-Genen wird heute versucht, den Gehalt von Erucasäure (22:1) und Eicosapentensäure (20:5) zu steigern, die für die Herstellung von Kosmetika und pharmazeutischen Produkten benötigt werden, z.B. als Vorläufer der Prostaglandin-Synthese oder zur Senkung des Cholesterin-Spiegels (Murphy, 1999).

In der Zelle werden VLCFAs in den cytosolischen Membransystemen des endoplasmatischen Retikulums (ER) und des Golgi-Apparates (GA) aus vorhandenen C16- und C18-Fettsäuren gebildet, somit ist ihre Biosynthese von der plastidären *de novo* Synthese der Fettsäuren abhängig (Figure 2, S. 7). Für beide Prozesse ist die Bereitstellung des C2-Donors Malonyl-CoA entscheidend, dem geschwindigkeits-bestimmenden Schritt des Fettsäure-Aufbaus (Ohlrogge und Jaworski, 1997). Diesen Schritt katalysiert die Acetyl-CoA-Carboxylase (ACCase), die in Isoformen sowohl im Chloroplasten als auch im Cytosol arbeitet. Die plastidäre ACCase ist Zielenzym der bekannten Herbizidgruppen der Cyclohexandione und Aryloxypropionsäuren, ihre Hemmung reduziert die gesamte *de novo* Synthese der Fettsäuren (Harwood, 1998; Rendina und Felts, 1988).

Die aktivierte C2-Einheit Malonyl-CoA dient als Substrat sowohl für die plastidäre *de novo* Synthese als auch für die cytosolische Fettsäure-Elongation. Dabei wird die Fettsäure, entsprechend dem chemischen Mechanismus einer Claisen-Kondensation, durch Malonyl-CoA unter CO<sub>2</sub>-Abspaltung um zwei C-Atome verlängert. Während die Fettsäuren durch die plastidäre Fettsäure-Synthase (FAS) bis zum Erreichen der terminalen Kettenlänge (C16 oder C18) fest an Acyl-Carrier-Protein gebunden bleiben, setzt die extraplastidäre Elongase die Fettsäuren als CoA-Ester um, wodurch ein Freisetzen von Produkten beliebiger Kettenlängen, meist C20-C26-Fettsäuren, möglich ist. Isoenzyme der Fettsäure-Elongase bilden im Samen vorherrschend ungesättigte, in der Pflanze gesättigte VLCFAs (Domergue *et al.*, 1998).

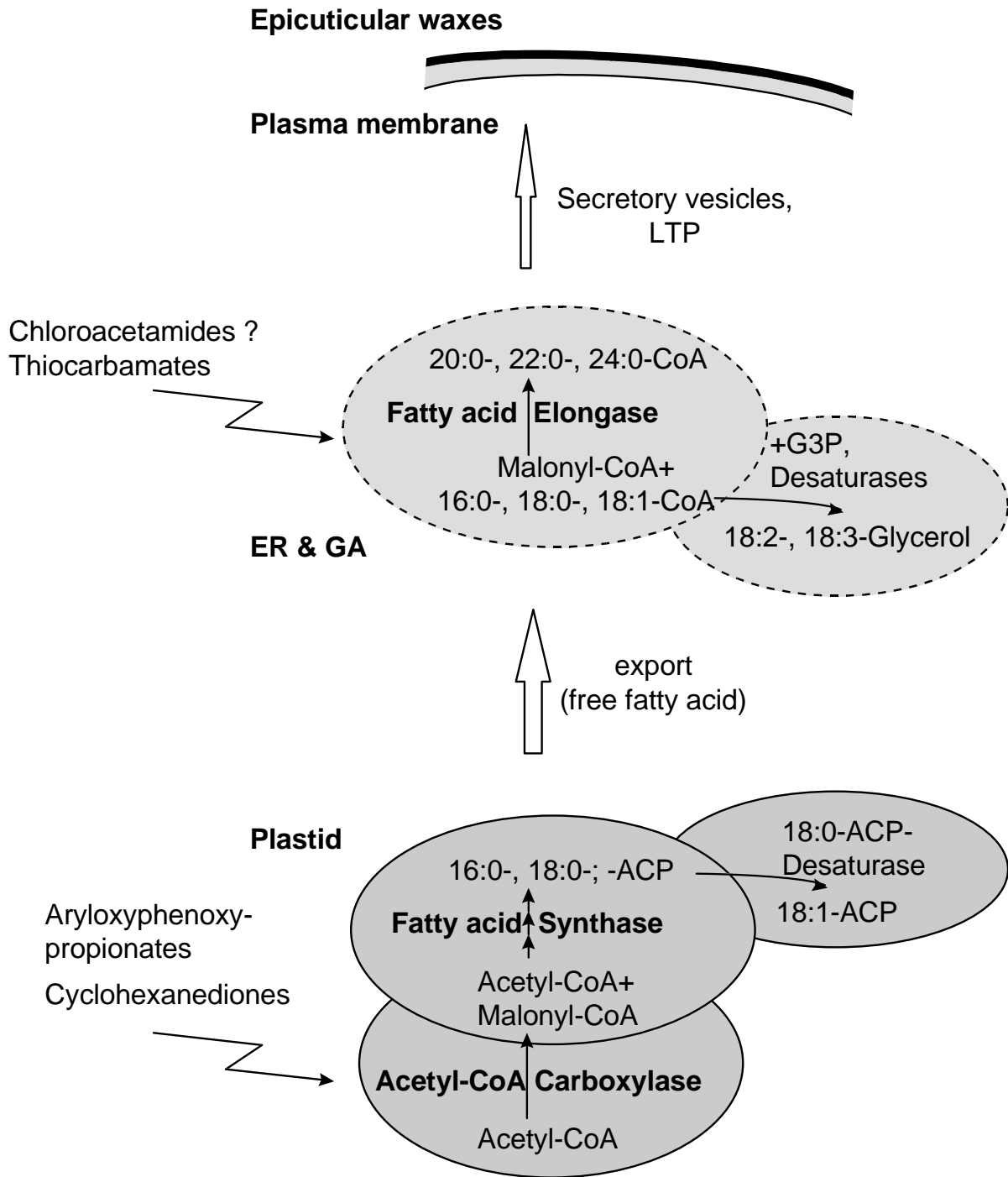


Figure 2: Scheme of fatty acid processing in plants.

Scheme according to Ohlrogge and Jaworski, 1997 and Moreau *et al.*, 1998. Abbreviations: ACP, acyl carrier protein; G3P, glycerol-3-phosphate; ER, endoplasmatic reticulum; GA, Golgi apparatus, LTP, lipid transport protein.

Die Desaturierung wird stets ausgehend von gesättigten C16- und C18-Fettsäuren beschrieben, sie erfolgt teils über den plastidären prokaryotischer Weg (16:3-Pflanzen), der Hauptumsatz findet jedoch im cytosolischen eukaryotischen Weg statt (Sommerville und Browse, 1995). Um die Doppelbindung in die Fettsäuren einzuführen, werden diese als Diacylglyceride gebunden und durch zumeist Membran-assoziierte Desaturasen der Chloroplasten-Hüllmembran oder des endoplasmatischen Retikulums schrittweise zu (mehrfach) ungesättigten Fettsäuren oxidiert. Stearinsäure kann im Chloroplasten durch eine 18:0-ACP-Desaturase hoher Aktivität zu Ölsäure desaturiert werden, mithin der Grund für die geringe 18:0-, aber hohe 18:1-Akkumulation in Pflanzen (Harwood, 1996, Ohlrogge und Jaworski, 1997).

Die durch Fettsäure-Elongation entstandenen sehr langkettigen Acyl-CoAs werden in den Membransystemen des ER und GA als Glycero- und Sphingolipide gebunden und durch vesikulären Transport zu ihren Bestimmungsorten, d.h. insbesondere zum Aufbau und der Reparatur von Membranen überführt (Moreau *et al.*, 1998). Sphingolipide bestehen aus dem C18-Aminoalkohol Sphingosin als Grundkörper, an den jeweils eine Fettsäure, typischerweise eine (hydroxylierte) VLCFA als Säureamid gebunden ist (Schneiter, 1999). Pflanzliche Sphingolipide sind meist nicht phosphoryliert (anders das in Nervenzellen vorkommende Sphingolmyelin), sondern werden in glycosylierter Form (Cerebroside) als Bestandteil von Membranen gefunden (Cahoon und Lynch, 1991; Renault *et al.*, 1997).

Epicuticulare Wachse werden aus VLCFA-Vorstufen generiert (Figure 3, S. 9). Sie bilden eine hydrophobe Schicht auf der Cuticula von Blättern und Sproß der Pflanzen und bestehen sehr artspezifisch aus einem Gemisch verschiedenster, in der Mehrzahl sehr langkettiger (C20-C36) Verbindungen, einschließlich gesättigter Fettsäuren, Alkoholen, Estern, Aldehyden, Alkanen und Ketonen (zur Übersicht Bianchi, 1994). Obwohl nicht kovalent gebunden, haften epicuticulare Wachse infolge ihrer hydrophobischen Wechselwirkungen fest an der Cuticula. Sie bilden gleichermaßen eine äußere Schutzbarriere und eine eigene Mikrosphäre, die verschiedensten Funktionen gerecht wird. So wird die Pflanze nicht nur vor Wasserverlust durch Verdunstung, sondern auch vor Strahlung, mechanischer Beschädigung und Pathogenbefall geschützt. Wachskomponenten sind aber auch an der Interaktion mit Insekten beteiligt und bieten Lebensraum für Mikroorganismen (Kerstiens, 1996).



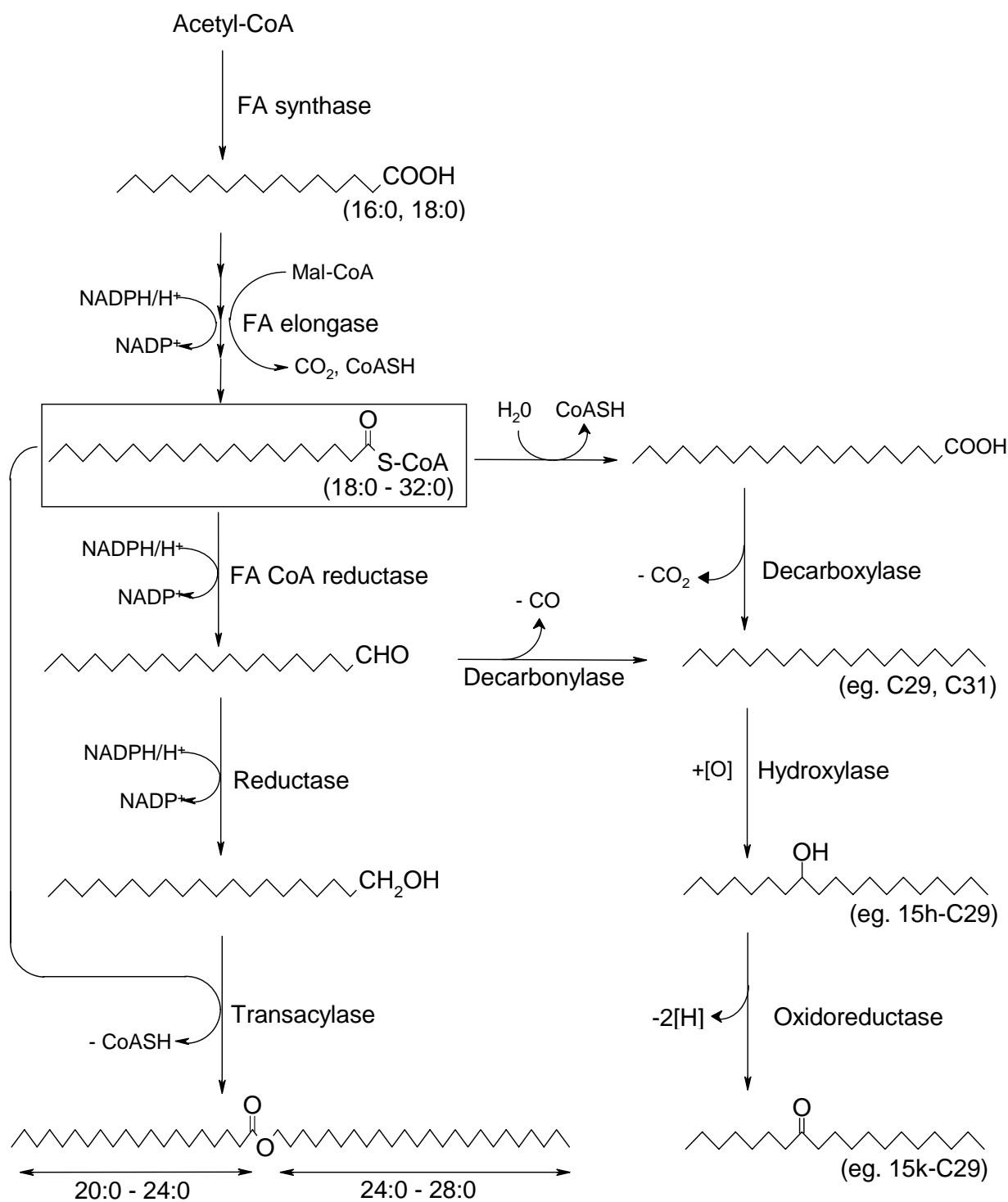


Figure 3: Biosynthesis of plant wax constituents.

Scheme of plant wax biosynthesis adapted from Houtz *et al.*, 2000 and Post-Beittenmiller, 1996. Very-long chain wax components originate from very-long-chain fatty acid precursors synthesized by microsomal fatty acid elongase. In addition, plant wax may also contain terpenoids and phenolics.

Die genaue Lokalisation der Wachsbiosynthese ist noch nicht geklärt, vermutlich findet die weitere Fettsäure-Elongation bis zu C36 und deren Umwandlung in weitere sehr langkettige Wachskomponenten in der Plasmamembran oder der Cuticula der Epidermiszellen statt. Nach Houtz *et al.* (2000) und Post-Beittenmiller (1996) entstehen aus den (sehr langkettigen) Fettsäuren durch Reduktion Aldehyde und Alkohole; Alkane werden infolge einer Decarbonylierung oder Decarboxylierung gebildet. Ketone und sekundäre Alkohole entstehen durch oxidative Hydroxylierung von Alkanen (vgl. Figure 3, S. 9).

Den Transport der so entstandenen Wachskomponenten durch die Epidermis zur extrazellulären Wachsschicht stellt man sich durch Lipid-Transfer-Proteine vermittelt vor (Moreau *et al.*, 1998). Nach Sekretion der Wachse liegen kristalline und amorphe Wachsablagerungen unterschiedlicher Ausprägung vor (Lemieux, 1996; Riederer und Schreiber, 1994).

#### 1.4 Molekularer Wirkungsmechanismus

Die besonderen chemischen Eigenschaften der herbizidalen Chloracetamide beruhen auf der Reaktivität des elektrophilen, Chlor-substituierten Kohlenstoffatoms im Molekül. Diese ist sowohl für die Entgiftung der Substanz durch Glutathion im Organismus von Pflanzen, Mikroorganismen und Säugern (Fuerst und Gronwald, 1986; Lamoureux und Rusness, 1989; O'Connell *et al.*, 1988), als auch für die abiotische Abbaubarkeit überschüssigen Herbizids im Boden verantwortlich (Stamper und Tuovinen, 1998).

Die phytotoxische Wirkung ist ebenfalls von der durch Chlor bedingten Elektrophilie abhängig, da Chlor-freie Strukturanaloga eine um Größenordnungen kleinere Sensitivität zeigen (Hamm, 1974; Kring *et al.*, 1995). Durch nukleophile Substitution am  $\alpha$ -Kohlenstoffatom wirken Chloracetamide alkylierend (Fuerst, 1987; McFarland und Hess, 1984), ein Zusammenhang mit der Phytotoxizität wurde daher von Anfang an gefordert (Jablonkai und Dutka, 1989; Jaworski, 1956). Leavitt und Penner (1979) konnten prinzipiell die S-Alkylierung reaktiver Cystein-Komponenten von Proteinen nachweisen, eine spezifische Inaktivierung eines einzelnen Zielenzym mit geringen Chloracetamid-Konzentrationen wurde aber nicht gefunden.

Die beobachteten vielfältigen und zum Teil widersprüchlichen Effekte der Chloracetamide auf Komponenten des Primär- wie des Sekundärstoffwechsels konnten anders nur erklärt werden, wenn entweder mehrere Stoffwechselprozesse gleichzeitig gestört werden oder eine – bislang unbekannt – zentrale oder stark regulierte Komponente des Stoffwechsels affiziert wird.

Fuerst *et al.* (1987) begründeten die vielfältigen Effekte der Chloracetamide mit einer Beeinträchtigung des Coenzym A-Haushalts, etwa durch Adduktbildung mit Chloracetamiden. Darüberhinaus wurden in früheren Untersuchungen der intrazelluläre Lipidtransport und die posttranslationale Modifikation von Proteinen (Weisshaar und Böger, 1991, Kring *et al.*, 1995) als potentielle Ausgangspunkte der Chloracetamid-Wirkung diskutiert.

Ein weiterer Ansatzpunkt zur Aufklärung der Wirkungsweise ist durch die teilweise analogen Effekte gegeben, die durch herbizidale Thiocarbamate hervorgerufen werden (diskutiert durch Gronwald, 1991, und Fuerst, 1987), einer Substanzklasse mit chemisch nur bedingt vergleichbarer Struktur (vgl. Struktur von EPTC, S. 14). Beide Herbizidgruppen sind als Wachstumsinhibitoren v.a. von Gräsern bekannt und rufen am Keimling die gleichen morphologischen Veränderungen hervor. Die Aufnahme und Metabolisierung der Wirkstoffe sind ebenfalls sehr ähnlich charakterisiert worden.

Hinsichtlich ihrer biochemischen Wirkungsweise wurden Thiocarbamate und Chloracetamide als Inhibitoren verschiedener Acetyl-CoA-abhängiger Stoffwechselsysteme charakterisiert. Von keinem der Wirkstoffe wurde eine bleichende Wirkung berichtet, somit wurde eine unmittelbare Wirkung auf die Photosynthese ausgeschlossen (Weisshaar und Böger, 1987). Die alkylierenden Eigenschaften der Chloracetamide finden ihre Entsprechung nach oxidativer Aktivierung des Schwefelatoms der Thiocarbamate zum herbizidal wirksamen Sulfoxid (Barret und Harwood, 1996, Kern *et al.*, 1997). Thiocarbamat(sulfoxide) wurden in *in vivo* und *in vitro* Untersuchungen mit Erbsen-Mikrosomen und Gerste-Blättern als Hemmstoffe der cytosolischen VLCFA-Biosynthese charakterisiert (Abulnaja und Harwood, 1991). Ähnlich wie durch Chloracetamide in Gurke (Tevini und Steinmüller, 1987) und Hirse (Ebert und Ramsteiner, 1984) wurde durch Thiocarbamate die Bildung epicuticularer Wachse beeinflusst (Wilmesmeier und Wiermann, 1995, Still *et al.*, 1970).

## 1.5 Zielsetzung der Arbeit

Insbesondere diese Parallelen zur biochemischen Wirkung der als Inhibitoren der Fettsäure-Elongation charakterisierten Thiocarbamate sowie die empfindliche Hemmung der Ölsäure-Elongation durch Chloracetamide, die im Sporopollenin der Grünalge *Scenedesmus acutus* nachgewiesen werden konnte, begründen die Untersuchung der Fettsäure-Elongation in höheren Pflanzen als Angriffspunkt von Chloracetamiden.

---

Ziel der Arbeit war somit, den primären Angriffspunkt der herbizidalen Chloracetamide im pflanzlichen Lipidstoffwechsel zu finden und die Hemmung des zugrundeliegenden Zielenzym zu charakterisieren. Neben der Aufklärung des molekularen Wirkungsmechanismus sollte durch die Untersuchung der unmittelbaren physiologischen Folgewirkungen ein Zusammenhang zur Phytotoxizität dieser Herbizidklasse nachgewiesen werden.

Auf der Basis von Markierungsexperimenten sollte zunächst der *in vivo* Lipidstoffwechsel in Abhängigkeit von Chloracetamiden untersucht werden und anhand der Analyse markierter Metabolite auf das zugrundeliegende Zielenzym rückgeschlossen werden. Eine nähere Charakterisierung durch Untersuchungen *in vitro* bzw. an einem rekombinanten Zielenzym war wünschenswert.

Vor dem Hintergrund der beiden bekannten Arbeiten zur Reduktion epicuticularer Wachskomponenten (Ebert und Ramsteiner, 1984; Tevini und Steinmüller, 1987) durch Chloracetamide sollte am Beispiel der Biogenese zelluärer Membranen und Wachskomponenten die Folgen eines gestörten Fettsäure-Metabolismus analysiert und die beobachtete phytotoxische Wirkung der Chloracetamide begründet werden.

## 2 MATERIAL UND METHODEN

### 2.1 Chemikalien

#### 2.1.1 Lösungsmittel, Reagenzien und [ $^{14}\text{C}$ ]Substrate

Feinchemikalien, Derivatisierungsreagenzien und Enzyme wurden von Sigma (Deisenhofen) bezogen, Standardsubstanzen für die Chromatographie von Sigma und Fluka (Buchs, Schweiz). Die verwendeten Lösungsmittel waren von *pro analysi* Qualität und stammten von Sigma, Merck (Darmstadt), Baker (Deventer, Niederlande) oder Roth (Karlsruhe). Für die Flüssigchromatographie wurde Mikromembran-gefiltertes destilliertes Wasser, Methanol Chromasolv (Riedel-de Haën, Niederlande), Acetonitril für die Chromatographie (Merck) und Hexan (Spektroskopie-Qualität, Merck) benutzt.

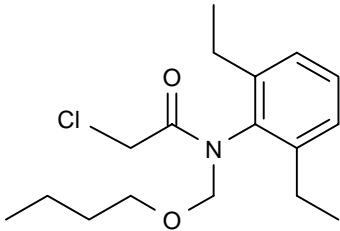
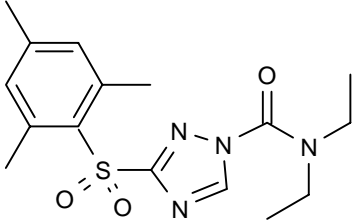
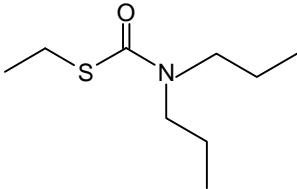
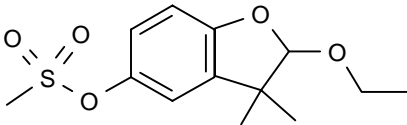
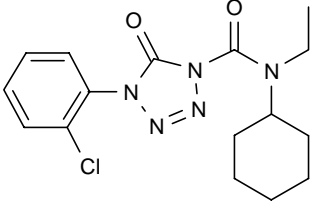
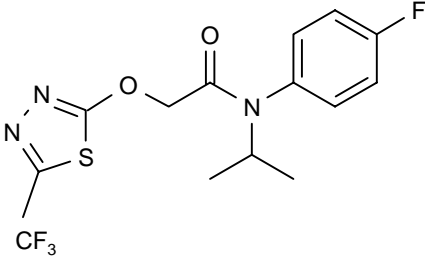
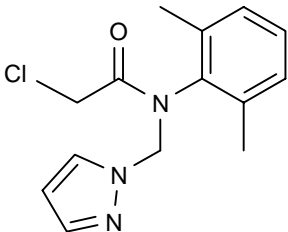
Zur Untersuchung des Lipidstoffwechsels und als Standardsubstanzen für die Chromatographie wurden verschiedene radioaktiv markierte Substrate (Amersham, Braunschweig; Biotrend, Köln; Hartmann Analytics, Hannover) eingesetzt (Table 1).

Table 1: Labelled lipid precursors applied in the experiments.

Radiochemicals	Manufacturer	Specific activity
[2- $^{14}\text{C}$ ]Acetate	Amersham	1.96 GBq mmol $^{-1}$
[1- $^{14}\text{C}$ ]Linolic acid (18:1)	Amersham	2.0 GBq mmol $^{-1}$
[1- $^{14}\text{C}$ ]Linolenic acid (18:2)	Amersham	2.0 GBq mmol $^{-1}$
[2- $^{14}\text{C}$ ]Malonate	Amersham	2.1 GBq mmol $^{-1}$
[2- $^{14}\text{C}$ ]Malonyl-CoA	Amersham or Biotrend	2.0 GBq mmol $^{-1}$
[ $^{14}\text{C}$ ]Methanol	Amersham	46 GBq mmol $^{-1}$
[2- $^{14}\text{C}$ ]Mevalonate	Amersham	2.0 GBq mmol $^{-1}$
[1- $^{14}\text{C}$ ]Oleic acid (18:1)	Amersham	2.0 GBq mmol $^{-1}$
[1- $^{14}\text{C}$ ]Oleoyl-CoA (18:1-CoA)	Hartmann Analytics	2.0 GBq mmol $^{-1}$
[1- $^{14}\text{C}$ ]Palmitic acid (16:0)	Amersham	2.0 GBq mmol $^{-1}$
[1- $^{14}\text{C}$ ]Stearic acid (18:0)	Hartmann Analytics	2.0 GBq mmol $^{-1}$

#### 2.1.2 Wirkstoffe

Als Testsubstanzen wurden verschiedene Vertreter der Substanzgruppe der Chloracetamide sowie weitere strukturell unterschiedliche Wirkstoffe eingesetzt. Alle Substanzen wurden in Ethanol gelöst und bei -20°C aufbewahrt.

<p><b>Butachlor</b> (Dr. Ehrenstorfer GmbH, Augsburg)</p> <p><i>N</i>-(butoxymethyl)-2-chlor-<i>N</i>-(2,6-diethylphenyl)acetamide</p>	
<p><b>Cafenstrole</b> (Eiko Kasei K.K., Fukushima, Japan)</p> <p>1-(diethylcarbamoyl)-3-(2,4,6-trimethylphenylsulfonyl)1,2,4-triazole</p>	
<p><b>EPTC</b> (Dr. Ehrenstorfer GmbH, Augsburg)</p> <p><i>S</i>-ethylidipropylcarbamothioate</p>	
<p><b>Ethofumesat</b> (Dr. Ehrenstorfer GmbH, Augsburg)</p> <p>2-ethoxy-2,3-dihydro-3,3-dimethyl-5-benzofuranylmethanesulfonate</p>	
<p><b>Fentrazamid</b> (Bayer AG, Monheim)</p> <p>1-(ethylcyclohexylcarbamoyl)-4-(2-chlorophenyl)tetrazolinone</p>	
<p><b>Flufenacet</b> (Bayer AG, Monheim)</p> <p><i>N</i>-(4-fluorphenyl)-<i>N</i>-(1-methylethyl)-2-[5-(trifluormethyl)-1,3,4-thiadiazol-2-yl]oxy]acetamide</p>	
<p><b>Metazachlor</b> (BASF AG, Limburgerhof)</p> <p>2-Chlor-<i>N</i>-(2,6-dimethylphenyl)-<i>N</i>-(1<i>H</i>-pyrazol-1-ylmethyl)acetamide</p>	

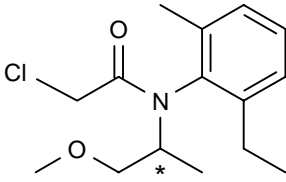
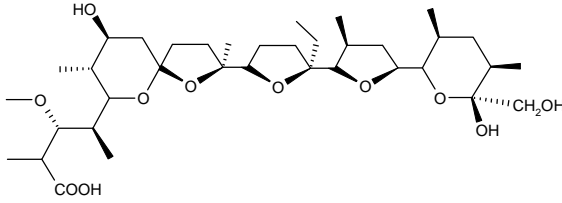
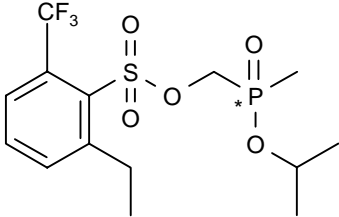
<p><b>Metolachlor</b> (Novartis AG, Basel, Schweiz)</p> <p>2-Chlor-<i>N</i>-(2-ethyl-6-methylphenyl)-<i>N</i>-(2-methoxy-1-methylethyl)acetamide</p>	
<p><b>Monensin</b> (Sigma)</p> <p>2-[ethyloctahydro-3'-methyl-5'-[tetrahydro-6-hydroxy-6-(hydroxymethyl)-3,5-dimethyl-2<i>H</i>-pyran-2-yl]][2,2'-bifuran]-5-yl]-9-hydroxy-β-methoxy-α,γ,2,8-tetramethyl-1,6-dioxaspirol[4.5]decan-7-butanoic acid</p>	
<p><b>RH-4641/-4642</b> (Rohm &amp; Haas Comp., Philadelphia, USA)</p> <p><i>O</i>-isopropyl-<i>P</i>-methyl[[2-ethyl-6-(trifluoromethyl)phenyl]sulfonyloxy]-methylphosphinate</p>	

Figure 4: Name and structure of applied active substances.

## 2.2 Untersuchungen mit Keimlingen

### 2.2.1 Anzucht von Gurke, Gerste und Mais

Die Samen von Gurke (*Cucumis sativus* var. Delikateß) stammen von Gawaz, Bergheim, Gerste (*Hordeum vulgare* var. Colombo) von Küpper, Eschwege und Mais (*Zea mays* var. Anjou) von Saaten-Union, Rastatt.

Die Keimlinge wurden auf mit Leitungswasser getränktem Vermiculit 5-6 Tage in einer Klimakammer unter Belichtung ( $80 \mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$ ) im Zyklus von 16 h Tag/ 8 h Nacht bei  $25^\circ\text{C}$  angezogen. Als Lichtquelle dienten 65 W Kaltlichtröhren der Typen 'Universal White' und 'Warm White De Luxe' (Osram, München).

Alternativ (Experimente zur Analyse der Plasmamembran) keimten die Samen auf einem mit Papier befeuchteten Gitter, so daß die Wurzeln in einen Vorrat mit Leitungswasser tauchten. In Experimenten zur Analyse der Plasmamembran und epicuticularer Wachse betrug die Anzuchttemperatur  $28\text{-}30^\circ\text{C}$ , wobei die Keimlinge zum Schutz vor zu großer Verdunstung unter Lochfolie gehalten wurden.

### 2.2.2 Inkubation von Blattstücken

Um eine größtmögliche Aufnahme exogener Substrate zu gewährleisten, wurden Blattstücke von Gurkenkotyledonen in Nährlösung mit radioaktiv markiertem Vorläufer und Herbizid inkubiert. Dazu wurden Blattscheiben von 5 mm Durchmesser mit dem Korkbohrer ausgestanzt und in Nährlösung (20 mM KNO<sub>3</sub>, 0,2 mM CaSO<sub>4</sub>, 1 µM Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>; vgl. Durner und Böger, 1990) in Petrischalen umgesetzt.

Der Wirkstoff wurde als ethanolische Stammlösung in Konzentrationen von 10<sup>-8</sup>-10<sup>-6</sup> M zugegeben, die Kontrollcharge enthielt Ethanol in gleicher Endkonzentration (0,1 %, v/v). Gleichzeitig wurden als <sup>14</sup>C-markierte Fettsäure-Vorläufer entweder Acetat, Malonat oder Stearinsäure verwendet, in Einzelversuchen ferner Mevalonat, Ölsäure und Palmitinsäure (genaue Angaben zu Konzentration und Radioaktivität s. Table 2). Sofern das [<sup>14</sup>C]Substrat in Toluol gelöst war, wurde das für die Pflanzen toxische Lösungsmittel unter Stickstoff eingedampft und durch DMSO ersetzt (Endkonzentration 0,5 %, v/v). Die Proben wurden unter Belichtung (80 µEm<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup>, 25°C) 6 h oder 20 h inkubiert, in kinetischen Untersuchungen wurden Chargen im Zeitraum von 2-48 h betrachtet.

Die Primärblätter 5 Tage alter Keimlinge von Gerste und Mais wurden mit dem Skalpell in 3-5 mm breite Streifen quer zur Faserrichtung zerschnitten. Je Ansatz wurden 400 mg Blattmaterial mit 8 ml Nährlösung, 2,5 µM [<sup>14</sup>C]Malonat (36 kBq) und 10<sup>-8</sup>-10<sup>-6</sup> M Metazachlor für 6 h inkubiert.

Table 2: Concentrations of [<sup>14</sup>C]precursors applied in assays of leaf tissue.

[ <sup>14</sup> C]Precursor	Leaf discs/ volume	Substrate concentration	Incubation period
Acetate	15 pieces / 2 ml	19 µM (70 kBq)	6 h, 20 h
Malonate	15 pieces / 2 ml	6.2 µM (23 kBq)	6 h, 20 h
Mevalonate	20 pieces / 6 ml	1.3 µM (14 kBq)	20 h
Oleic acid	20 pieces / 6 ml	0.8 µM (9 kBq)	20 h
Palmitic acid	20 pieces / 6 ml	1.1 µM (12 kBq)	20 h
Stearic acid	20 pieces / 6 ml	2.3 µM (25 kBq)	6 h, 20 h, 2-48 h



### 2.2.3 Lipidhydrolyse und Extraktion $^{14}\text{C}$ -markierter Fettsäuren

Die in den Blattstücken enthaltenen Lipide wurden einer schrittweisen Hydrolyse und jeweiligen Extraktion der freigesetzten Fettsäuren unterworfen (Figure 5). Sämtliche Arbeitsschritte wurden in verschließbaren Reagenzgläsern (Schraubdeckel mit Teflondichtung) durchgeführt. Die Blattstücke wurden zunächst 30 s mit 5 ml Chloroform gewaschen, um anhaftende Wachse und nicht aufgenommene [ $^{14}\text{C}$ ]Vorläufer zu entfernen.

Das Blattmaterial wurde mit 4 ml 10 % (w/v) KOH/ MeOH bei 70°C 1 h behandelt, um Phospholipide zu spalten; nach Eiskühlung und Protonierung durch 3 ml 12 % HCl wurden die Fettsäuren mit 2×2 ml Hexan extrahiert (Fraktion alkalisch hydrolysierter Fettsäuren). Die Phasentrennung wurde durch kurze Zentrifugation beschleunigt. Im Falle der Inkubation mit [ $^{14}\text{C}$ ]Acetat wurde das Hydrolysat noch vor dem Ansäuern der Fettsäure-Extraktion mit 2×2 ml Hexan extrahiert, um markierte Carotinoide zu entfernen. Die verbliebenen Blattreste wurden mit 5 ml H<sub>2</sub>O dest. gewaschen und mit 4 ml Dioxan/ 1 M HCl (70°C, 5 h) behandelt, um sauer hydrolysierbare Lipide zu spalten und Zellwandmaterial teilweise zu solubilisieren. Nach Abkühlung und Verdünnung mit 3 ml H<sub>2</sub>O dest. wurden die freigesetzten Fettsäuren ebenfalls in 2×2 ml Hexan extrahiert.

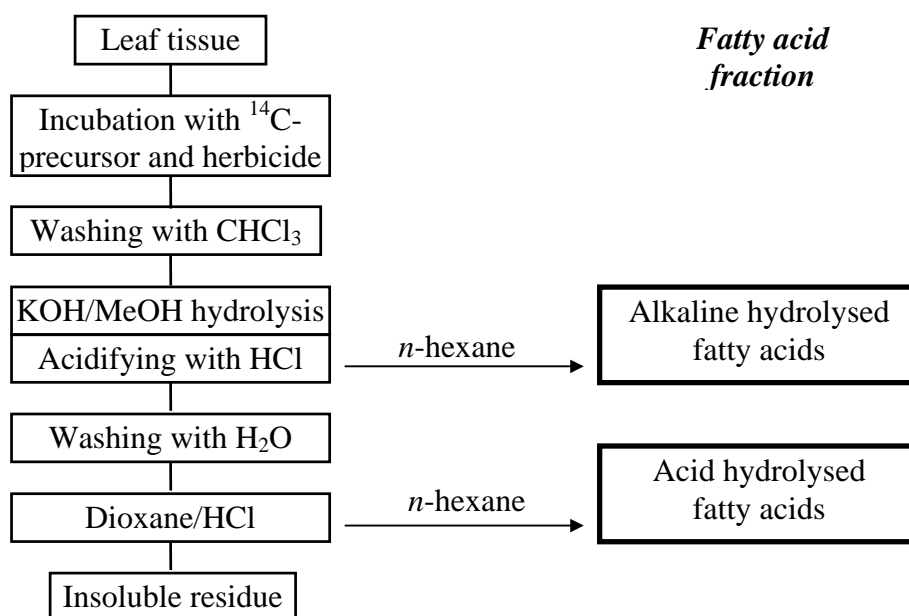


Figure 5: Flow diagram showing the procedure of fatty acid solubilization.

## 2.3 Untersuchungen mit Soja-Zellkulturen

### 2.3.1 Kultivierung der Sojazellen

Photoheterotrophe Zellkulturen von Soja (*Glycine max* L.) wurden bei pH 6,2 unter sterilen Bedingungen mit Murashige & Skoog Basalmedium wie von Knörzer et al. (1996) beschrieben kultiviert. Dem Medium wurde Saccharose,  $\alpha$ -Naphthyl-Essigsäure und Kinetin zugesetzt. (vgl. Mediumzusammensetzung Table 3). Dazu wurden in 250 ml Erlenmeyerkolben je 100 ml Zellsuspension unter Wachstumsbedingungen (vgl. Abschnitt 2.2.1, S. 15) geschüttelt (130 rpm, Certomat U Rotationsschüttler, Braun, Melsungen). Die Stammkulturen wurden im 14-tägigen Rhythmus überimpft. Das Wachstum der Zellkulturen wurde anhand der Zunahme des Zellvolumens bestimmt (vgl. Abschnitt 2.9.1, S. 34). Für Experimente wurden Zellkulturen einer Dichte von 60-80  $\mu\text{l ml}^{-1}$  verwendet, die typischerweise nach 4 Tagen Wachstum erreicht wurde.

Table 3: Nutrient for photoheterotrophic cell cultures of *Glycine max*.

Component	Conc. ( $\text{mg l}^{-1}$ )	Component	Conc. ( $\text{mg l}^{-1}$ )
$\text{NH}_4\text{NO}_3$	$1.65 \times 10^3$	$\text{MgSO}_4$	180.7
$\text{H}_3\text{BO}_3$	6.2	$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	16.9
$\text{CaCl}_2$	332.2	$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	0.25
$\text{CoCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$	0.025	Nicotinic acid	1.0
EDTA $\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	37.26	Pyridoxine hydrochloride	1.0
$\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	27.8	Thiamine hydrochloride	10.0
myo-Inositol	100.0	$\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	8.6
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	170.0	Sucrose	$10.0 \times 10^3$
KI	0.83	$\alpha$ -Naphthalene acetic acid	1.0
$\text{KNO}_3$	$1.9 \times 10^3$	Kinetin	0.2
$\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$	0.025		

### 2.3.2 Inkubation der Sojazellen und Zellernte

Die Soja-Zellsuspension wurde frisch überimpft und mit einer Stammlösung von Metazachlor in Aceton versetzt, so daß die Endkonzentrationen 2-200  $\mu\text{M}$  Metazachlor und 0,02 % (v/v) Aceton betragen. Die Kontrollcharge enthielt nur Aceton. Die Zellen wurden unter Wachstumsbedingungen kultiviert (vgl. Abschnitt 2.2.1, S. 15) und im 2-tägigem Abstand je

0,25-1 ml Zellsuspension zur photometrischen Bestimmung von Chlorophyll und Zellvolumen entnommen (s. Abschnitt 2.9.1, 2.9.2, S. 34f).

In den Experimenten mit Zufütterung von VLCFAs wurde die gleiche Inkubation in Gegenwart von 20:0, 22:0, 24:0 und 26:0 (je 10  $\mu\text{M}$ ) durchgeführt. Dazu wurde eine VLCFA-Stammlösung (in Aceton, Enkonzentration 0,5 %, v/v) zugegeben und die in wäßrigem Medium unlöslichen VLCFAs unter ständigem Schütteln suspendiert.

Für die Analyse von Fettsäuren wurden Sojazellen einer Anfangsdichte von 60-80  $\mu\text{l}$  Zellvolumen  $\text{ml}^{-1}$  verwendet, die typischerweise nach 4 Tagen Kultivierung erreicht wurde. Die Zellsuspension wurde mit ethanolischen Stammlösungen von Metazachlor versetzt (Endkonzentrationen  $10^{-5}$ - $10^{-8}$  M Metazachlor und 0,1 %, v/v, EtOH) und weitere 24 h kultiviert. Für kinetische Untersuchungen wurde nach 8, 24 und 48 h geerntet.

Die Ernte der Sojazellen erfolgte durch Vakuumfiltration. Dazu wurden die Zellen über einem Membranfilter aus Celluloseacetat (0,8  $\mu\text{m}$  Porenweite, Schleicher & Schuell, Dassel) filtriert, mit 100 ml  $\text{H}_2\text{O}$  dest. gewaschen und anschließend für eine weitere Minute trockenfiltriert. Die resultierende Zellpaste wurde in Portionen von 500-1500 mg sofort 24 h gefriergetrocknet (Lyophylle Alpha, Medizinischer Gerätebau Christ, Osterode) und der Fettsäureanalyse unterworfen (Abschnitt 2.7, S. 28) oder für spätere Untersuchungen bei  $-70^\circ\text{C}$  eingefroren.

## 2.4 Untersuchungen an *FAE1*-transformierter Hefe

### 2.4.1 Hefe-Zellkulturen

Die Zellen der transformierten Bierhefe *Saccharomyces cerevisiae* (Stamm LRB 520) wurden von Prof. Dr. L. Kunst, University of British Columbia, Vancouver, Canada, zur Verfügung gestellt. Sie enthalten das Gen der Fettsäure-Elongase (*FAE1*) aus *Arabidopsis* im Hefe-Expressions-System pYES2 (Invitrogen, Groningen, Niederlande). Die Expression der exogenen Elongase ist durch Galaktose induzierbar (Millar und Kunst, 1997). Da die transformierten Zellen ferner über ein Gen zur Biosynthese von Uracil verfügen, können sie in einem entsprechendem Medium selektiert werden.

Die Zellen der *FAE1*-Transformante wurden in Agarkultur in Petrischalen auf selektivem Medium angezogen, das aus 1,7 g  $\text{l}^{-1}$  Yeast Nitrogen Base (Difco, Augsburg), 1,9 g  $\text{l}^{-1}$  Yeast Minimal Dropout - Ura (Sigma), 5,0 g  $\text{l}^{-1}$   $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (Roth) und 20 g  $\text{l}^{-1}$  Galaktose (Roth) bestand. Die Zellen des Wildtyps enthielten das Plasmid ohne das *FAE1*-Gen und wurden in

komplettem Medium angezogen, bestehend aus 10 g l<sup>-1</sup> Hefe-Extrakt (Sigma), 20 g l<sup>-1</sup> Bacto-Peptide (Difco) und 20 g l<sup>-1</sup> Galaktose. Nach Einwaage der Zusätze wurde die Lösung (pH 6,0) 25 min bei 120°C autoklaviert. Galaktose wurde als 10fach Konzentrat steril-filtriert und nachträglich zugegeben, um Karamelisation zu vermeiden. Für die Herstellung der Agarkulturen wurde dem Medium vor der Autoklavierung 2 % (w/v) Agar (Difco) zugesetzt. Die Anzucht erfolgte bei 30°C im Dunkeln über 2-3 Tage, die Kulturen waren anschließend bei 4°C über Monate haltbar. Zur Anzucht für Experimente wurden die Zellen in 100 ml Erlenmeyerkolben mit 20 ml komplettem Flüssigmedium bei 30°C und 240 rpm geschüttelt (Certomat U Rotationsschüttler). Zur Induktion der *FAE1*-Expression wurde Galaktose statt der Kohlenstoff-Quelle Glucose zugegeben. Sämtliche Arbeitsschritte wurden unter sterilen Bedingungen nach dem Standardprotokoll für Hefe-Anzucht von Ausubel *et al.* (1992) durchgeführt.

#### 2.4.2 Wirkstoffapplikation und Zellernte

Metazachlor wurde dem jeweiligen Nährmedium als ethanolische Stammlösung (Endkonzentration 0,1 Vol%) in Konzentrationen von 0-100 µM zugesetzt und die Zellsuspension unter Wachstumsbedingungen kultiviert. Nach 6-24 h wurden ein Aliquot (1 ml) zur Bestimmung der Zelldichte (s. Abschnitt 2.9.1, S. 34) entnommen. Für die Extraktion von Fettsäuren wurden Zellen einer OD (660 nm) von 1,0-1,2, die typischerweise nach ca. 12 h erreicht wurde, vollständig geerntet.

Die Ernte der Hefezellen erfolgte durch Zentrifugation (1000×g, 10 min), anschließendem Waschen mit 10 ml H<sub>2</sub>O dest. und erneuter Zentrifugation. Die nach dem Dekantieren erhaltene Zellpaste wurde über Nacht gefriergetrocknet und anschließend der Fettsäureanalyse unterworfen (s. Abschnitt 2.7, S. 28).

#### 2.4.3 *In vivo* Einbau von [<sup>14</sup>C]Ölsäure

Die Analyse der *de novo* Fettsäure-Elongation erfolgte nach Wachstum der Hefezellen unter Induktion des *FAE1*-Gens in Gegenwart von 2,7 µM [<sup>14</sup>C]Ölsäure (25 kBq) oder, in einem weiteren Experiment, von 6,5 µM [<sup>14</sup>C]Ölsäure (59 kBq). Metazachlor wurde in Konzentrationen von 1, 10 und 100 µM zugesetzt, die Kontrolle enthielt 0,1 % (v/v) Ethanol. Die Zelldichte wurde zu Beginn der Inkubation auf OD (660 nm) = 0,3 eingestellt, die Hefezellen in 5 ml komplettem Flüssigmedium bei 37°C kultiviert und nach 4-6 h Inkubation

bei einer OD von 1,2-1,4 geerntet. Die radioaktiv inkubierten Zellen wurden durch mehrfaches Einfrieren (-70°C) und Wiederauftauen aufgebrochen, um die Ausbeute der nachfolgenden Fettsäureextraktion (s. Abschnitt 2.7, S. 28) zu erhöhen.

#### 2.4.4 Zellaufschluß und Herstellung der mikrosomalen Fraktion

Um die Aktivität der Fettsäure-Elongase zu testen, wurde zunächst nach der Methode von Todd *et al.* (1999) eine Fraktion mikrosomaler Proteine der *FAE1*-transformierten Hefezellen gewonnen. Die Hefezellen wurden induziert und über Nacht bis zu einer Zelldichte mit einer OD von 1-1,5 angezogen. Nach der Zellernte (s. Abschnitt 2.4.2, S. 20) wurden die Zellen mit 80 mM Hepes (pH 7,2), 320 mM Saccharose, 5 mM EDTA, 10 mM DTT, 10 mM KCl versetzt und erneut gewaschen.

Der Aufbruch der Zellen erfolgte in einer Vibrationszelmühle (Vibrogen, Laborgerätebau Bühler, Tübingen) bei 4°C, ebenso wurden alle folgenden Präparationen bei 4°C durchgeführt. Die Zellpaste wurde mit dem 80 mM Hepes-Puffer pH 7,2 und Glasperlen (Durchmesser 0,5 mm) in einem 20 ml-Einsatz gründlich vermischt und unter Luftausschluß in Intervallen (3×1 min) aufgebrochen. Die Glasperlen wurden durch Vakuumfiltration mit einer Fritte A1 vom Lysat getrennt. Das Lysat wurde 20 min bei 10.000×g zentrifugiert und die im Überstand enthaltenen Mikrosomen nochmals 1 h per Ultrazentrifugation (UZ L8-70M, Beckmann, Frankfurt) bei 100.000×g sedimentiert. Das mikrosomale Pellet wurde mit Hilfe eines Potter-Homogenisierers in 400 µl 80 mM Hepes (pH 7,2), 1 mM DTT, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,1 % Triton X-100 resolubilisiert und unter Zugabe von 15 % Glycerin bei -70°C gelagert.

#### 2.4.5 *In vitro* Test auf Elongaseaktivität

Der Test der Elongase-Aktivität wurde, zurückgehend auf Todd *et al.* (1999), verändert. 20 µg mikrosomale Proteine wurden in 50 µl 80 mM Hepes (pH 7,2) in Gegenwart von 2 mM NADPH, 2 mM NADH, 1 mM DTT, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,1 % (v/v) Triton X-100, 100 µM Malonyl-CoA und 15 µM [<sup>14</sup>C]Oleoyl-CoA bei 30°C 20 min inkubiert. Die Herbizide wurden als ethanolische Stammlösung zugesetzt, die Kontrollchargen enthielten 2 % (v/v) Ethanol. Sofern eine Vorinkubation durchgeführt wurde, wurden die Mikrosomen mit dem Herbizid, jedoch ohne Cofaktoren und Substrate, bei 14°C 90 min inkubiert. Diese Temperatur wurde gewählt, da bei Raumtemperatur bereits merkliche Aktivitätsverluste auftraten.

Die Reaktion wurde gestoppt, indem 25  $\mu\text{l}$  11 M KOH zugegeben und die gebildeten CoA-Ester 30 min bei 80°C hydrolysiert wurden. Die freigesetzten Fettsäuren wurden protoniert (50  $\mu\text{l}$  12 M HCl) und mit 350  $\mu\text{l}$  Aceton/ Hexan (4:3, v/v) extrahiert. Die organische Phase wurde mit 50  $\mu\text{l}$  4 M HCl gewaschen, die Radioaktivität eines Aliquots bestimmt, die Fettsäuren methyliert und per Radio-HPLC analysiert (s. Abschnitt 2.8.1, S. 31).

## 2.5 Untersuchung epicuticularer Wachse aus Gurke

### 2.5.1 Wirkstoffapplikation

Die Gurkenkeimlinge (20 Stück) wurden nach 4 Tagen Anzucht (s. Abschnitt 2.2.1, S. 15) in Glasschalen, gefüllt mit 30 ml Nährlösung, umgesetzt. Metazachlor war in Konzentrationen von 1  $\mu\text{M}$  und 10  $\mu\text{M}$  enthalten, die Kontrolle enthielt 0,1 % (v/v) EtOH. Um Kontamination durch Hautfett zu vermeiden, wurden alle Arbeiten mit Handschuhen durchgeführt. Im Wachstum zurückgebliebene Keimlinge bzw. beim Umsetzen verletzte Pflanzen wurden nicht verwendet. Nach weiterem Wachstum für 48 h (insgesamt 6 Tage alt) wurden die Kotyledonen geerntet und das Frischgewicht bestimmt.

### 2.5.2 Analyse der Wachskomponenten

Die auf der Oberfläche der Keimblätter anhaftenden Lipide wurden mit Chloroform extrahiert. Dazu wurden 30-40 Keimblätter (entsprechend ca. 4-8 g Frischgewicht) in einem Becherglas mit 50 ml Chloroform 1 min geschwenkt. Die dekantierte Lösung wurde mit jeweils 20  $\mu\text{l}$  einer Lösung (1  $\text{mg ml}^{-1}$  Aceton) von Nonadecanol (19:0-Alkohol), Tricosansäure (23:0-Fettsäure) und Hexacosan (26:0-Alkan) als interne Aufarbeitungsstandards dotiert und anschließend am Rotationsverdampfer eingengt.

Die Proben wurde mit 3×500  $\mu\text{l}$  Chloroform in 2 ml-Reaktionsgefäße überführt, das Lösungsmittel unter Stickstoff eingetrocknet und der Rückstand mit  $\text{BF}_3/\text{MeOH}$  transmethyliert (vgl. Abschnitt 2.7.2, S. 28). Die gewonnene Fraktion von Fettsäuremethylestern, Alkoholen und Alkanen wurde in ein GC-Probengläschen überführt und wiederum bis zur vollständigen Trockne eingengt. Der Rückstand wurde mit 100  $\mu\text{l}$  Decan aufgenommen und mit 100  $\mu\text{l}$  *N,N*-Bis(trimethylsilyl)acetamid versetzt. Die Silylierung der Alkohole erfolgte bei 60°C in 1 h. Das Reaktionsgemisch wurde direkt gaschromatographisch untersucht.

### 2.5.3 Einbau von [<sup>14</sup>C]Substrat

Für Markierungsexperimente wurden Blattscheiben von 8 mm Durchmesser, die aus 6 Tage alten Gurkenkotyledonen ausgestanzt wurden, verwendet. In Petrischalen wurden jeweils 30 Blattscheiben in 5 ml Nährlösung mit 188 kBq [<sup>14</sup>C]Malonat (20 µM) oder 227 kBq [<sup>14</sup>C]Acetat (25 µM) versetzt. Metazachlor wurde in Konzentrationen von 10<sup>-9</sup>-10<sup>-5</sup> M aus ethanolischen Stammlösungen zugegeben (Endkonzentration 0,1 % Ethanol, v/v). Die Kontrolle enthielt nur Ethanol. Die Ansätze wurden mit 16 µE m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> belichtet und bei Raumtemperatur 24 h inkubiert.

Die Blattscheiben wurden in verschließbare Reagenzgläser überführt, 30 s mit 7 ml und je 15 s mit 2×3,5 ml Chloroform extrahiert, die Überstände dekantiert und vereinigt. Die in der Chloroform-Phase enthaltenen Wachse wurden, wie oben beschrieben, transmethyliert und das resultierende Gemisch von Fettsäuremethylestern, Alkoholen und Alkanen direkt per Radio-HPLC analysiert.

## 2.6 Untersuchung der Plasmamembran aus Gurke

### 2.6.1 Inkubation mit Herbizid und Herstellung der mikrosomalen Fraktion

Die Gurkenkeimlinge wurden 3 Tage auf einem Gitter angezogen (s. Abschnitt 2.2.1, S. 15) und für weitere 3 Tage mit 1-100 µM Herbizid behandelt. Die Wirkstoffe wurden als ethanolische Stammlösung verabreicht (Endkonzentration 0,1 %, v/v).

Die folgenden Arbeitsschritte der Homogenisierung und Reinigung wurden sämtlich bei 4°C oder unter Eiskühlung durchgeführt. Chargen von je 30 g Keimlingen (ohne Wurzel) wurden im Omni-Mixer 17220 (Sorvall, Newton, CO, USA) 4×20 s mit 100 ml 50 mM Mops-KOH (pH 7,5), 0,2 % (w/v) Casein, 2 mM DTT, 5 mM EDTA, 1 mM PMSF, 0,6 % (w/v) PVPP und 0,33 M Saccharose zerkleinert. Das Homogenat wurde durch Gazé (Miracloth 100 µm) filtriert und mit 10.000 g 20 min zentrifugiert. Die mikrosomale Fraktion wurde aus dem Überstand durch Ultrazentrifugation (Ultrazentrifuge L8-70M, Beckmann) bei 35.000×g (1 h) gewonnen und in 4 ml 5 mM Phosphatpuffer (pH 7,8), 2 mM DTT, 5 mM EDTA und 0,33 M Saccharose mit Hilfe eines Potter-Homogenisierers resolubilisiert.

### 2.6.2 Reinigung der Plasmamembran (2-Phasen-Verteilung)

Die Plasmamembran wurde durch die Methode der 2-Phasen-Verteilung aus der mikrosomalen Fraktion gewonnen (Figure 6). Alle Schritte verliefen unter Eiskühlung. Die Methode (Kjellbom und Larsson, 1984) wurde im Labor von Prof. Larsson, Universität Lund, Schweden, für die Anwendung an Gurkenkeimlingen modifiziert. Insbesondere wurde die Anzahl der Reinigungsschritte auf ein Mindestmaß reduziert, um die gleichzeitige Reinigung (und damit den Vergleich) mehrerer Herbizid-behandelter Proben zu ermöglichen. Als Nebenprodukt der Reinigung verbleiben die übrigen in der mikrosomalen Fraktion enthaltenen Endomembranen (Bestandteile aus Membranen der Thylakoide, Mitochondrien, ER, GA, Glyoxisomen, Tonoplasten etc.). Der Fortschritt der Aufreinigung war anhand der zunehmenden Entfärbung der Plasmamembran-Fraktion, die kein Chlorophyll enthält, gut mit dem Auge zu verfolgen.

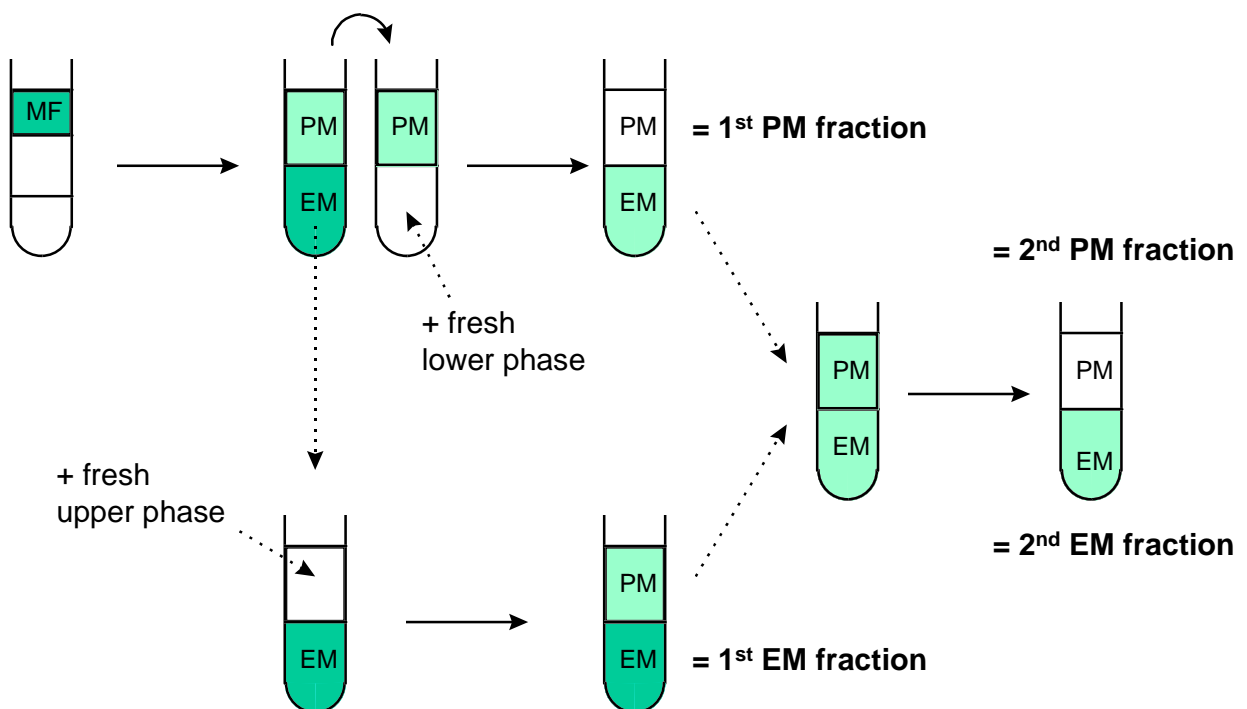


Figure 6: Purification of cucumber plasma membrane by two-phase partitioning.

Scheme and method adapted from Kjellbom and Larsson (1984). The microsome fraction (MF) was separated by a two-phase system containing Dextran 500 and PEG 3350 (details see text) yielding an almost colourless plasma membrane fraction (PM) and a fraction of chlorophyll-containing endomembranes (indicated by grey colouring).



Für die Reinigung von je 4 ml mikrosomaler Fraktion wurden 2-Phasen-Systeme von je 12 g Gesamtgewicht verwendet, die aus Dextran 500 und PEG 3350 (je 6,1 %), 0,33 M Saccharose, 5 mM Phosphatpuffer (pH 7,8), 1 mM KCl, 0,1 mM EDTA, 1 mM DTT zusammengesetzt waren. Dextran und PEG wurden aus wäßrigen Stammlösungen (20 % bzw. 40 %) zugegeben, sobald die übrigen Ingredienzen vollständig gelöst waren. Die im Verlauf der Reinigung verwendeten Waschphasen wurden aus einem 450 g 2-Phasen-System (Zusammensetzung w.o.) durch Phasentrennung (4°C, über Nacht) gewonnen.

Die Mikrosomen wurden zugesetzt, die Mischung mehrfach geschwenkt und die Phasen nach Zentrifugation im Ausschwingrotor bei 1000×g (5 min) separiert. Beide Phasen wurden jeweils ein weiteres Mal mit frischer Waschphase in der gleichen Weise weitergereinigt. In den Routineexperimenten wurde die daraus resultierende (jeweils sauberste im Sinne der Extraktion) Plasmamembran- bzw. Endomembran-Fraktion durch Ultrazentrifugation in 3-4fachem Volumen Phosphatpuffer bei 100.000×g 1 h pelletiert, um überschüssiges Dextran und PEG abzutrennen. Nach Resolubilisierung in 1 ml Phosphatpuffer wurde der Proteingehalt bestimmt, die Probe aliquotiert und in flüssigem Stickstoff eingefroren.

### 2.6.3 Einbau von [<sup>14</sup>C]Malonat in Membran-Fettsäuren

Für Markierungsexperimente wurden Blattstücke von Kotyledonen 7 Tage alter Keimlinge verwendet, die in Nährlösung schwimmend inkubiert wurden. Je Ansatz wurden 2,1 g halbierte Keimblätter in 10 ml Nährlösung (Zusammensetzung s. Abschnitt 2.2.2, S. 16), 10<sup>-8</sup>-10<sup>-6</sup> M Herbizid und 230 kBq [<sup>14</sup>C]Malonat (16 µM) unter Belichtung (16 µE m<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup>) bei Raumtemperatur 24 h inkubiert. Die Wirkstoffe wurden als ethanolische Stammlösung verabreicht (Endkonzentration 0,1 %, v/v).

Die geringe Menge an Blattmaterial sowie die enthaltene Radioaktivität erforderte eine Modifizierung der im vorhergehenden Abschnitt beschriebenen Plasmamembran-Reinigung: Die Blattstücke wurden in 30 ml Medium homogenisiert und auf die Gazé-Filtration wurde verzichtet. Das mikrosomale Pellet wurde in 400 µl Phosphatpuffer resolubilisiert und mittels eines Mini-2-Phasensystems von 1,2 g Gesamtgewicht in 1,5 ml-Eppendorf-Plastikgefäßen extrahiert. Um keine Radioaktivität zu verlieren, wurde auch die jeweils 2. Plasmamembran- und Endomembran-Fraktion gewonnen (vgl. Figure 6, S. 24). Die Membranfraktionen wurden jeweils vereinigt (insgesamt je 1,6 ml), die Radioaktivität eines Aliquots bestimmt und ohne nochmalige Zentrifugation der Fettsäureanalyse unterworfen.

#### 2.6.4 Western-Blotting

Die SDS-PAGE wurde entsprechend dem Cold Spring Harbor Method Manual, zurückgehend auf Lämmli (1970), durchgeführt. Die Elektrophoreseapparatur (Hofer Mighty Small Mod. SE 250, Pharmacia, Freiburg) wurde mit einem Trenngel (100×60×0,75 mm) bestückt, das aus 7,5 % Acrylamid, 0,05 % Bisacrylamid, 0,37 M Tris-HCl pH 8,7, 0,1 % SDS, 0,04 % Ammoniumpersulfat und 0,04 % TEMED polymerisiert wurde. Das Sammelgel (ca. 1,5 cm Laufstrecke) enthielt 4 % Acrylamid, 0,1% Bisacrylamid, 0,15 M Tris/HCl pH 8,7, 0,1 % SDS, 0,05 % Ammoniumpersulfat und 0,04 % TEMED. Der Laufpuffer bestand aus 192 mM Glycin, 25 mM Tris, 0,1 % SDS, pH 8,7.

Zur Proteinanalyse der Membranfraktionen im Polyacrylamidgel wurden die Membranen in 50 mM Mops-KOH (pH 7,5) resuspendiert und erneut ultrazentrifugiert (s.o.). Membranbestandteile entsprechend einem Proteingehalt von 15-40 µg wurden im Verhältnis 1:1 mit SDS-Probenpuffer (80 mM Tris/HCl pH 6,8, 4% SDS, 2 % DTT, 20 % (v/v) Glycerin und 0,02 % Bromphenolblau) versetzt und 5 min bei 40°C inkubiert. Die anschließende Elektrophorese erfolgte bei 5°C in ca. 2 h. Die angelegte Spannung betrug zunächst 80 V (Migration der Proben in das Trenngel), für den verbleibenden Zeitraum 150-180 V.

Die in SDS-Polyacrylamidgelen aufgetrennten Proteine wurden in einem Sandwich zwischen zwei Lagen Schaumstoff und zwei Lagen Filterpapier (Schleicher & Schuell, Dassel) auf eine Immobilon-P Membran (PVDV mit 0,45 µm Porengröße, Millipore, Eschborn) übertragen. Dazu wurde eine Hofer TE 22 Apparatur (Pharmacia, Freiburg) über einen Zeitraum von 1 h bei einer konstanten Spannung von 150 V mit Elektrolytlösung (200 mM Glycin, 25 mM Tris und 20% Methanol, pH 8,7) betrieben.

#### 2.6.5 Immunodetektion

Ein charakteristisches Enzym der Plasmamembran ist ein Isoenzym der H<sup>+</sup>-ATPase, das durch Immunreaktion mit dem monoklonalen Antikörper gegen Plasmamembran-H<sup>+</sup>-ATPase aus Mais detektiert wurde. Der Antikörper aus Maus (Klon Nr. 46E5B11C10) wurde von Dr. Wolfgang Michalke, Universität Freiburg, zur Verfügung gestellt.

Die folgenden Inkubationen wurden, wenn nicht anders angegeben, bei Raumtemperatur jeweils 10 min auf einem Schüttler mit ca. 20 ml Lösung pro Blot durchgeführt. Die Membranen wurden mit 5 % fettarmem Milchpulver, 4,1 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 3,3 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>

(pH 6,8), 140 mM NaCl, 0,05 % Tween 20 abgesättigt. Überschüssiges Milchpulver wurde durch Waschen mit Phosphatpuffer entfernt.

Der primäre Antikörper wurde 1:10.000 mit diesem Puffer verdünnt und bei 4°C über Nacht auf einer Wippe inkubiert. Die Antikörper-Lösung wurde zurückbehalten und der Blot mit 50 mM Tris-HCl, 5 mM EDTA, 150 mM NaCl, 0,05 % Triton X-100 zweimal gewaschen. Der sekundäre Antikörper, Peroxidase-konjugierter Maus-Antikörper (Bio-Rad, München), wurde 1:5.000 mit dem gleichen Tris-Puffer verdünnt und in 1 h Inkubation gebunden. Anschließend wurden die Blots zweimal mit Pufferlösung gewaschen.

Der Nachweis der Immunreaktion erfolgte durch Chemilumineszenz (ECL Western Blot Chemilumineszenz Detektion, Amersham). Dazu wurden die Blots 5 min mit 1 ml des Substrats behandelt, sofort in Folie eingeschweißt und ein Röntgenfilm (Hyperfilm ECL Film, Amersham) für 2-10 s belichtet. Die Immunreaktion wurde anhand der relativen Schwärzung des Films durch densitometrische Analyse (Software ImageQuant, Molecular Dynamics, Sunnyvale, USA) quantifiziert. Zur unspezifischen Anfärbung von Proteinen auf der Immobilon-P Membran wurden die Blots 3-5 min in Färbelösung (0,1% Amidoschwarz (Merck), 20% Methanol und 7% Essigsäure) inkubiert und anschließend der überschüssige Farbstoff durch Entfärben in 20% Methanol und 7% Essigsäure entfernt.

#### 2.6.6 Fettsäure- und Lipidextraktion

Die durch die 2-Phasen-Verteilung gewonnenen Membranfraktionen wurden sowohl auf die Zusammensetzung der enthaltenen Gesamtfettsäuren (s. Abschnitt 2.7, S. 28) als auch auf ihre Lipid-Zusammensetzung untersucht. Die Lipide wurden mittels einer nach Bligh und Dyer (1959) modifizierten Methode extrahiert.

Dazu wurden 0,5 ml der Membransuspension mit 2,5 ml MeOH unter mehrfachem Schütteln 15 min bei 70°C erhitzt und nach Abkühlung mit 5000×g 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde gesammelt und der Rückstand mit 2 ml CHCl<sub>3</sub>:MeOH (2:1, v/v) nochmals im Ultraschallbad (5 min) extrahiert. Die unlöslichen Bestandteile wurden abzentrifugiert und die vereinigten Extrakte mit 2,5 ml NaCl versetzt, so daß Phasentrennung eintritt. Die wäßrig-methanolische Phase wurde verworfen, die in der CHCl<sub>3</sub>-Phase enthaltenen Lipide unter Stickstoff getrocknet und in 100 µl CHCl<sub>3</sub>:MeOH:H<sub>2</sub>O (65:25:4, v/v) aufgenommen.

Als indirekte Nachweismöglichkeit für die in den Lipiden enthaltenen Cerebroside wurde eine selektive Hydrolyse von Phospholipiden durchgeführt (Hechtberger *et al.*, 1994). Hierfür wurden 100 µl der Lipidlösung mit 500 µl 0,2 M methanolischer NaOH versetzt. Nach 1 h

Reaktion bei Raumtemperatur wurden zur Phasentrennung 300  $\mu\text{l}$  10 % EDTA und 300  $\mu\text{l}$   $\text{CHCl}_3$  zugegeben und mit 100  $\mu\text{l}$  Eisessig neutralisiert. Nicht hydrolysierte Lipide, darunter Cerebroside, wurden aus der Chloroform-Phase gewonnen.

## 2.7 Analyse von Fettsäuren

### 2.7.1 Fettsäureextraktion (Standardmethode)

Die nachfolgende Methode der Fettsäureextraktion wurde gleichermaßen für homogenisiertes Blattmaterial, Blattstücke, ganze Zellen (Soja- und Hefe-Zellkulturen) sowie der Membranfraktionen verwendet. Die beschriebene kombinierte basische und saure Hydrolyse stellt eine nahezu vollständige Hydrolyse aller gebundenen Fettsäuren sicher.

Das Material wurde in fest verschließbare Reagenzgläser überführt, die mit einem Teflonbeschichteten Schraubverschluß (unempfindlich gegen Lösungsmittel) versehen waren. Zur späteren Quantifizierung wurde als Aufarbeitungsstandard 20  $\mu\text{g}$  Tricosansäure (23:0) aus einer Stammlösung (1 mg  $\text{ml}^{-1}$  Aceton) zugesetzt (nicht bei Aufarbeitung radioaktiv markierter Proben).

Die Proben wurden mit jeweils 3 ml 10 % (w/v) KOH/ MeOH aufgenommen und 1 h im Wasserbad auf 70°C erhitzt. Nach Eiskühlung der Reaktionsmischung wurden langsam 3 ml 4 M HCl zugesetzt und nochmals 1 h auf 70°C erhitzt. Die Mischung wurde mit 2×2 ml Hexan extrahiert, wobei zur Erleichterung der Phasentrennung zentrifugiert wurde. Die Extrakte wurden vereinigt und das Lösungsmittel im Stickstoffstrom bei 40°C eingetrocknet.

### 2.7.2 Methylierung von Fettsäuren

Die Proben wurden mit 3×500  $\mu\text{l}$  MeOH in 2 ml-Reaktionsgefäße (Teflon-beschichtete Schraubdeckel) überführt, das Lösungsmittel unter Stickstoff abgeblasen und der Rückstand mit 14 %  $\text{BF}_3/\text{MeOH}$  30 min auf 100°C erhitzt. Oft war die Produktbildung bereits als Trübung der Reaktionslösung erkennbar, da sich die entstehenden Fettsäuremethylester (FSME) nicht vollständig in Methanol lösten. Nach Abkühlung wurde das Reaktionsgemisch mit 2×2 ml Hexan extrahiert und die verbliebene wäßrige Phase verworfen.

Für nachfolgende GC-Analysen wurde das FSME-Extrakt nach Eintrocknung des Lösungsmittels in 1 ml Decan aufgenommen. Die Proben wurden zweimal analysiert, das Injektionsvolumen betrug jeweils 1  $\mu\text{l}$ . Radioaktiv markierte FSME wurden per Radio-HPLC

analysiert; dazu wurden die Proben in 25 µl Hexan gelöst, nicht lösliche Rückstände wurden zuvor bei 3000×g abzentrifugiert und 20 µl eingespritzt.

### 2.7.3 Identifizierung <sup>14</sup>C-markierter Fettsäuren

Die aus dem Zellmaterial extrahierten <sup>14</sup>C-markierten Metabolite wurden nach Methylierung durch Vergleich der Retentionszeiten mit <sup>14</sup>C-markierten FSME als Fettsäuren identifiziert. Dazu wurden aus käuflichen [<sup>14</sup>C]Fettsäuren durch die oben beschriebene Methylierung die entsprechenden [<sup>14</sup>C]FSME hergestellt (16:0, 18:0, 18:1, 18:2, 18:3). Längerkettige [<sup>14</sup>C]FSME wurden synthetisiert, indem die jeweils *nicht markierte Fettsäure* mit <sup>14</sup>C-markiertem Methanol umgesetzt wurde.

Dazu mußte die im vorhergehenden Abschnitt beschriebene Methode modifiziert werden. Je 6 mg Arachinsäure (20:0), Behensäure (22:0), Lignocerinsäure (24:0) und Hexacosansäure (26:0) wurden im 2 ml-Reaktionsgefäß (fest verschließbar) unter Kühlung mit Trockeneis (-70°C) mit 300 µl 14 % BF<sub>3</sub>/ [<sup>14</sup>C]MeOH mit einer spezifischen Aktivität von 4,6 Bq mol<sup>-1</sup> versetzt. Die Mischung wurde 45 min auf 80°C erhitzt, bis sich die Suspension auflöste. Nach Kühlung (-70°C) wurden die FSME in Hexan extrahiert (s. vorhergehender Abschnitt).

Die auf diese Weise hergestellten [<sup>14</sup>C]FSME tragen die Markierung im Kohlenstoffatom der Estergruppe (Figure 7) und können, wie beschrieben, per Radio-HPLC anhand ihrer Retentionszeiten identifiziert werden.

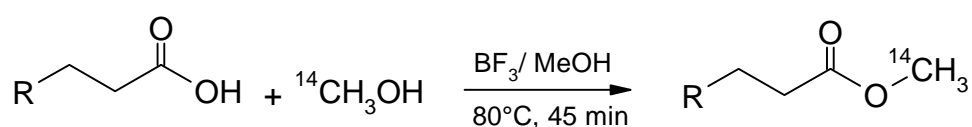


Figure 7: Synthesis of <sup>14</sup>C-labelled very-long-chain fatty acid methyl esters

### 2.7.4 Identifizierung unmarkierter Analyten

Unmarkierte Fettsäuren der Pflanzen- und Zellextrakte sowie Wachskomponenten wurden per GC/ FID analysiert (s. Abschnitt 2.8.2, S. 32) und durch den Vergleich mit Standardsubstanzen identifiziert. Zusätzlich wurden ausgewählte Extrakte per GC/ EI-MS (Ionisierung durch *electron impact* bei 70 eV und 10 eV) untersucht. Die Identifizierung erfolgte durch das Molekülion bzw. durch Tochterionen, die für die angewandte

Derivatisierungsmethode oder die Fragmentierung der Mutterverbindung charakteristisch waren (Table 4).

Gesättigte Fettsäuren fragmentieren charakteristisch unter Verlust von  $\cdot\text{CH}_3(\text{CH}_2)_2$ ,  $m/z = 43$ , ungesättigte unter Verlust von Methanol,  $m/z = 32$  (Kuksis und Myher, 1989). Infolge der McLafferty-Umlagerung werden die Ionen  $m/z = 74, 87, 143$  gebildet (Hamilton, 1994). Bei den längerkettigen Homologen war das Molekülion  $\text{M}^+$  am intensivsten. Alkoholtrimethylsilylether spalteten bei 10 eV Ionisierungsenergie fast ausschließlich die Methylgruppe ab ( $m/z = 15$ ). Unterschiede zwischen der nominellen Molekülmasse und dem detektierten Molekülion ( $m/z$ ) liegen in der Eichung des Geräts begründet. Alkane bildeten ausschließlich niedermolekulare Fragmente ( $[\text{C}_n\text{H}_{2n+1}]^+$ ), hervorgerufen durch die Fragmentierung der Kohlenwasserstoffkette. Soweit in der Spektrenbibliothek verfügbar, wurde mit Referenzspektren verglichen.

Table 4: Characteristic ions ( $m/z$ ) of fatty acid and alcohol derivatives (GC/ EI-MS).

carbon chain	R-COOMe		R-CH <sub>2</sub> OSiMe <sub>3</sub>	
	$\text{M}^+$	$[\text{M}-\cdot\text{CH}_3(\text{CH}_2)_2]^+$	$\text{M}^+$	$[\text{M}-\cdot\text{CH}_3]^+$
14:0	242			
16:0	270	227	314	299
16:1	268			
17:0	284	241		
18:3	292	249		
18:2	294	251		
18:1	296			
18:0	298	255	342	327
20:0	326	283	370	355
20:1	324			
22:0	354	311	398	383
22:1	352			
24:0	382	339	426	411
26:0	410	367	454	439
28:0	438	395	482	467
30:0	466	423	510	495
32:0	494	451	538	523
34:0			566	551

### 2.7.5 Quantifizierung und Wiederfindung der Analyten

Die Analyten wurde nach gaschromatographischer Trennung durch den Flammenionisationsdetektor (FID) quantifiziert. Die Homologen der Fettsäuren, Alkohole und Alkane wurden anhand der Dotierung mit je einem internen Standard jeder Stoffklasse quantifiziert (s. Abschnitt 2.5.2, S. 22). Innerhalb einer Stoffklasse war die Detektorempfindlichkeit annähernd konstant und betrug mit einer Abweichung von max.  $\pm 2\%$  nicht mehr als die Abweichung zwischen zwei Einspritzungen derselben Probe.

Die Wiederfindung für Fettsäuren verschiedener Kettenlänge wurde ermittelt, indem die gekauften Fettsäuremethylester eingewogen und analysiert wurden. Parallel wurden die entsprechenden Mengen freier Fettsäuren verestert, extrahiert und analysiert. Für Fettsäuren mit einer Kettenlänge bis C26 betrug die Wiederfindung  $96\pm 3\%$ , für längerkettige (bis C32) war die Schwankungsbreite größer und eine zunehmende Diskriminierung der Substanzen im Injektor (max. 35 %) wurde festgestellt. Da der Siedepunkt der Analyten mit der Kettenlänge schnell zunimmt, verdampfen höhere Homologe nur unvollständig. Um *memory*-Effekte der Säule zu vermeiden, wurde zwischen zwei Proben ein Leerlauf gefahren.

## 2.8 Chromatographische Methoden

### 2.8.1 Radio-HPLC

Das Radio-HPLC-System bestand aus einer Kontron Analytik constant Flow Pumpe (Modell 600/200, Neufahrn), einer C18-Umkehrphasen-Säule (4  $\mu\text{m}$  Partikelgröße, 25 cm  $\times$  4,6 mm, Macherey-Nagel, Düren), einem Tiefdruck-Gradienten-Steuerungsgerät (CIM Autochrom, ERC, Alteglofsheim) und einem *on-line*-Entgaser (ERC-3315, ERC). Als Laufmittel dienten Acetonitril, Methanol und Wasser, das mit 0,1 % Trifluoressigsäure versetzt wurde (pH 3). Die Flußrate betrug  $1,5\text{ ml min}^{-1}$  bei einer Laufmittelzusammensetzung von MeCN:MeOH:H<sub>2</sub>O (80:10:10, v/v) zu Beginn der Chromatographie. In einem linearen Gradienten wurde nach 10 min die Zusammensetzung MeCN: H<sub>2</sub>O (90:10) erreicht, die über 25 min beibehalten wurde. Im Anschluß wurde die Säule 10 min mit Methanol gespült. Die radioaktiven Metabolite wurden unter Beimischung des Szintillationscocktails Flo Szint III (Packard Bioscience B.V., Groningen, Niederlande) im Durchfluß-Szintillator (Ramona, Raytest, Straubenhardt) detektiert und durch den Vergleich der Retentionszeiten mit Standards identifiziert (s. Abschnitt 2.7.3, S. 29).

Die Trennung der Wachskomponenten erfolgte mit Methanol als Laufmittel. Nach 45 min wurde Methanol binnen 5 min im linearen Gradienten durch Hexan ersetzt, um besonders unpolare Metabolite zu eluieren. Ein Teil der Metabolite (gesättigte C16-C26-Fettsäuren) wurde durch Vergleich mit  $^{14}\text{C}$ -markierten FSMEs identifiziert.

### 2.8.2 GC/FID

Für die Trennung von Fettsäuremethylestern wurde der mit einem *split*-Injektor (Modell 9A, Shimadzu) ausgerüstete Gaschromatograph (Shimadzu 15A, Shimadzu, Duisburg) mit einer polar beschichteten Kapillarsäule (SP-2330, Supelco, Deisenhofen) der Dimensionen 30 m × 0,25 µm und der Beschichtungsstärke 0,20 µm im *split*-Modus (90 % Split) betrieben.

Alternativ wurde eine unpolar beschichtete Säule (SPB-5, Supelco) der gleichen Dimensionen verwendet, die gegenüber Silylierungsreagenzien stabil war und eine höhere Elutionstemperatur erlaubte. Somit konnten auch schwerflüchtige Komponenten mit mehr als 28 Kohlenstoffatomen analysiert werden. Gesättigte und ungesättigte FSME sowie die Komponenten epicuticularer Wachse wurden unter den in Table 5 aufgeführten Bedingungen getrennt. Als Trägergas wurde Helium mit einer Flußrate von 40 ml min<sup>-1</sup> verwendet, die Detektion erfolgte durch einen Flammenionisationsdetektor (FID). Die Einspritzung der Proben (1 µl Injektionsvolumen) erfolgte durch einen Autoinjektor (AOC-20, Shimadzu). Die Quantifizierung der Signale wurde computer-gestützt mit der Software Class-VP (Shimadzu) vorgenommen.

Table 5: Conditions of GC/ FID analysis of fatty acids and epicuticular waxes.

Separated compounds	Saturated and unsaturated FAMES	Saturated FAMES	Saturated FAMES, alcohol-TMS, alkanes
Capillary column	SP-2330	SPB-5	SPB-5
Injector temperature	300°C	320°C	320°C
Detector temperature	320°C	340°C	340°C
Analysis time	30 min	30 min	60 min
Temperature program	1 min 160°C 5°C min <sup>-1</sup> → 270°C 7 min 270°C	1 min 160°C 8°C min <sup>-1</sup> → 310°C 10 min 310°C	1 min 160°C 8°C min <sup>-1</sup> → 240°C 2°C min <sup>-1</sup> → 310°C 14 min 310°C
Samples examined	Cucumber membranes Yeast total fatty acids	Soybean cell total fatty acids	Cucumber wax components



### 2.8.3 GC/EI-MS

Die mit Massenspektroskopie gekoppelte Gaschromatographie (Varian Saturn D4, Walnut Creek, CA, USA) wurde mit einer  $30\text{ m} \times 0,25\text{ mm} \times 0,25\text{ }\mu\text{m}$  Kapillarsäule (DB-5MS, Varian oder HP-5MS, Hewlett-Packard) mit Helium ( $40\text{ ml min}^{-1}$ ) durchgeführt. Mittels *on-column* Injektion wurde  $1\text{ }\mu\text{l}$  der 5-10fach verdünnten Proben eingespritzt. Die weiteren Bedingungen waren: Injektor-, Transferline-, Detektortemperatur je  $300^\circ\text{C}$ ; Ionisierung  $10\text{ eV}$  (oder  $70\text{ eV}$ ), Temperaturprogramm des Säulenofens (70 min):  $1\text{ min } 150^\circ\text{C}$ , mit  $4^\circ\text{C min}^{-1}$  auf  $230^\circ\text{C}$  erhöht, mit  $1^\circ\text{C min}^{-1}$  auf  $260^\circ\text{C}$  erhöht, mit  $8^\circ\text{C min}^{-1}$  auf  $310^\circ\text{C}$  erhöht (15 min gehalten). Ein Teil der Fettsäure-Analysen wurde mit einem Hewlett-Packard GC/MS-Gerät unter vergleichbaren Bedingungen durchgeführt.

### 2.8.4 Dünnschichtchromatographie

Die Trennung von Lipiden wurde per Dünnschichtchromatographie auf  $10 \times 10\text{ cm}$  Silica Gel 60 Platten (Trägermaterial Aluminium, Merck) im geschlossenen System durchgeführt. Die Proben wurden als Bande ( $5\text{-}10\text{ }\mu\text{l}$ ) aufgetragen, zur quantitativen Analyse auch über die gesamte Breite der Dünnschichtfolie ( $50\text{ }\mu\text{l}$ ). Als Laufmittel wurde  $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}:\text{H}_2\text{O}$  ( $65:25:4$ , v/v) verwendet. Phosphatidylethanolamin, -cholin, -inositol, -säure, Cerebroside, Cholesterol und  $\beta$ -Carotin wurden als Standards aufgetragen.

Die Lipide wurden mit Iod-Dampf sichtbar gemacht und nachfolgend durch kurzes Eintauchen in  $10\%$   $\text{H}_2\text{SO}_4$  oxidiert. Die Schwärzung wurde densitometrisch quantifiziert (Software ImageQuant, Molecular Dynamics, Sunnyvale, CA, USA).

Für nachfolgende Fettsäure-Analysen wurden die Dünnschichtfolien randständig gefärbt, die entsprechenden Lipid-Banden anhand der Identifizierung mit Standards ausgekratzt und mit  $2 \times 1\text{ ml}$  Laufmittel (s.o.) im Ultraschallbad ( $2 \times 5\text{ min}$ ) resolvatisiert. Die Extrakte wurden unter Stickstoff eingetrocknet,  $90\text{ min}$  bei  $100^\circ\text{C}$  mit  $\text{BF}_3/\text{MeOH}$  transmethyliert (s. Abschnitt 2.7.2, S. 28) und gaschromatographisch analysiert (s. Abschnitt 2.8.2, S. 32).

## 2.9 Bestimmung von Parametern

### 2.9.1 Zellvolumen und Zelldichte

Das Wachstum der Soja-Zellkulturen wurde anhand der Zunahme des verdichteten Zellvolumens pro Volumeneinheit der Kultur bestimmt (packed cell volume, pcv). Zur Bestimmung des Zellvolumens wurden im graduierten Hämatokritröhrchen mit einem Kapillarvolumen von 80  $\mu\text{l}$  (Kummer, Freiburg) 0,25-1 ml Zellkultur 5 min bei 1000 $\times$ g zentrifugiert (Rotanta Tischzentrifuge, Hettich, Tuttlingen) und als  $\mu\text{l}$  pcv abgelesen.

Das Wachstum der Hefe-Zellkulturen wurden anhand der optischen Dichte der Zellsuspension bestimmt. Dazu wurde 1 ml der Zellsuspension durchmischt und die Absorption bei 660 nm bestimmt. Die Umrechnung in Anzahl der Zellen pro ml erfolgte tabellarisch (Ausubel et al., 1992).

### 2.9.2 Chlorophyllgehalt

Zur Bestimmung des Chlorophyllgehalts wurden das jeweilige Zellmaterial mit 5 ml MeOH 15 min auf 70°C erhitzt und in der Tischzentrifuge (Rotanta, Hettich, Tuttlingen) bei 1000 $\times$ g 10 min pelletiert. Der Überstand wurde dekantiert und das gelöste Chlorophyll nach Böger (1964) über die beiden Absorptionsmaxima bei 650 und 665 nm bestimmt (Spektrometer Hitachi U-2000, Colora Messtechnik, Lorch). Der Chlorophyllgehalt errechnet sich nach:

$$\text{Chlorophyll } [\mu\text{g ml}^{-1}] = (A_{650} \times 25,5 + A_{665} \times 4) \times \text{Verdünnungsfaktor}$$

### 2.9.3 Proteingehalt

Der Proteingehalt von Zellrückständen wurde durch Färbung mit Bio-Rad-Färbelösung (Protein Dye Reagent Concentrate, Bio-Rad, München) und anschließender Bestimmung der Absorption bei 595 nm bestimmt (zurückgehend auf Bradford, 1976).

Die Proteinlösung (200  $\mu\text{l}$ ) wurden mit 800  $\mu\text{l}$  der 1:4 (v/v) verdünnten Färbelösung vermischt und nach 15 min gegen eine Referenz (ohne Protein) gemessen. Die Proteinkonzentration wurde anhand von Vergleichslösungen mit 0-21  $\mu\text{g}$  BSA bestimmt.

#### 2.9.4 Radioaktivität

Die in einer Probenlösung enthaltene Radioaktivität wurde durch Szintillationsmessung bestimmt. Ein Aliquot von max. 500 µl Lösung wurde mit 3 ml Szintillationscocktail Ultima Gold (Packard Bioscience B.V., Groningen, Niederlande) im Szintillationsgefäß vermischt und im Flüssigszintillationszähler LKB 1215 Rackbeta II (Pharmacia, Freiburg) 1-5 min, je nach Radioaktivitätsgehalt, vermessen.

Die erhaltenen Werte in counts per minute (cpm) wurden anhand des geräte-internen Radioaktivitätsstandards unter Berücksichtigung des Kanalverhältnisses R mit Hilfe einer Eichfunktion in die tatsächliche Radioaktivität umgerechnet.

$$\text{Radioaktivität [Bq]} = \text{cpm} \times 1,67 \times (100 - e^{0,64R^2 - 2,78R + 5,08})^{-1}$$

#### 2.10 Statistische Auswertung

Die Experimente wurden mindestens zweimal unabhängig voneinander wiederholt. Bei Angabe von numerischen Abweichungen oder Fehlerbalken wurden die Daten als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung von mindestens drei unabhängigen Experimenten angegeben. Andernfalls wurde das Ergebnis eines repräsentativen Experiments dargestellt. Die Qualität der Fettsäure- und Lipidanalysen wurde durch parallele Behandlung von Blindproben (ohne Pflanzen oder Zellmaterial) bestätigt. Die gaschromatographischen Analysen wurden jeweils zweifach durchgeführt.

### 3 ERGEBNISSE

#### 3.1 Hemmung der VLCFA-Biosynthese in höheren Pflanzen

##### 3.1.1 Wachstum und Entwicklung der Keimlinge

Keimlinge von *Cucumis sativus* (Gurke) und *Hordeum vulgare* (Gerste) wurden in Gegenwart von 0.1-10  $\mu\text{M}$  Metazachlor 6 Tage angezogen und das Wachstum beobachtet. Gegenüber der Kontrollcharge ging die Keimrate leicht zurück, die Sproßlänge und das Frischgewicht wurden bis auf  $\frac{1}{4}$  reduziert (Table 6, S. 37), wobei sich die Morphologie der Keimlinge durch die Herbizid-Behandlung nachhaltig veränderte (Figure 8).



Figure 8: 6-day old seedlings treated with 1  $\mu\text{M}$  metazachlor.

Seedlings of cucumber (left hand) and barley (right hand) were grown on vermiculite and tap water. Illumination was  $80 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$  in a 16 h day/ 8 h night cycle at  $25^\circ\text{C}$ . Treated seedlings (left of control) were smaller than control plants (cucumber shoot length was 45 mm) and showed a changed morphology (see text).

Insgesamt waren Keimung und Wuchs der Keimlinge verzögert, Sproß und Kotyledonen der Gurke waren gedrungener, sie erschienen verdickt und wurden teilweise gekrümmt ausgebildet. Das Wurzelgewebe war stark verringert und zeigte keine Verästelungen. Das

Primärblatt der Gerste brach 1-2 Tage verspätet durch die (verdickte) Koleoptile, das sich im Anschluß entfaltende Blatt knickte meist ab und stellte das Wachstum ein. Die morphologischen Veränderungen waren mit 0,1  $\mu\text{M}$  Metazachlor sichtbar, Konzentrationen  $> 10 \mu\text{M}$  wirkten letal.

Table 6: Growth inhibition of cucumber seedlings by metazachlor.

Samples of 30 seeds germinated for 6 days on vermiculite and tap water including 0.1, 1, and 10  $\mu\text{M}$  metazachlor. Control seeds were grown with 0.1 % (v/v) ethanol present. Illumination was  $80 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$  in a 16 h day/ 8 h night cycle at  $25^\circ\text{C}$ .

Treatment	Germination (%)	Shoot length (mm)	Fresh weight (g)
Control	$89 \pm 8$	$51 \pm 4$	$6.8 \pm 1.7$
0.1 $\mu\text{M}$ Metazachlor	$96 \pm 8$	$37 \pm 3$	$5.1 \pm 0.3$
1 $\mu\text{M}$ Metazachlor	$82 \pm 8$	$16 \pm 3$	$2.4 \pm 0.5$
10 $\mu\text{M}$ Metazachlor	$80 \pm 6$	$12 \pm 1$	$2.1 \pm 0.3$

### 3.1.2 Einbau $^{14}\text{C}$ -markierter Substrate und Identifizierung markierter Metabolite

Um die Wirkung von Chloracetamiden auf die Fettsäure-Biosynthese zu untersuchen, wurde die Metabolisierung verschiedener  $^{14}\text{C}$ -markierte Vorläuferverbindungen in Blattstücken analysiert. Die Aufnahme der Radioaktivität wurde nach 20-stündiger Inkubation bestimmt, indem die in der Nährlösung verbliebene Radioaktivität zugrundegelegt wurde. Die im Blattmaterial enthaltenen Lipide wurden in zwei aufeinanderfolgenden Schritten durch basische und saure Hydrolyse gespalten; die gewonnenen Extrakte freier Fettsäuren enthielten maximal 18 % der applizierten Radioaktivität (Table 7, S. 38). Die nachfolgende saure Hydrolyse brachte nochmals bis zu 2 % der inkorporierten Radioaktivität in Lösung, d.h. etwa 3-8mal weniger als die vorhergehende basische Hydrolyse. Ölsäure wurde praktisch nicht in die Fraktion sauer hydrolysierbarer Lipide aufgenommen. Mevalonat wurde nicht in Fettsäuren, sondern nahezu ausschließlich in Carotinoide inkorporiert, dies konnte durch den Standard  $\beta$ -Carotin und die UV-Absorption bei 450 nm nachgewiesen werden.

Table 7: Incorporation of [ $^{14}\text{C}$ ]precursors into cucumber fatty acids.

Leaf discs of 5 day old cotyledons were incubated for 20 h with different [ $^{14}\text{C}$ ]precursors of lipid metabolism. Lipids hydrolyzed by alkali (first) and acid (second) and the resulting fatty acids (FA) were extracted into hexane after each step of hydrolysis.

[ $^{14}\text{C}$ ]Precursor	Concentration	Incorporation of label (%)		
		Leaf discs	1 <sup>st</sup> FA extract	2 <sup>nd</sup> FA extract
Acetate	19 $\mu\text{M}$ (70 kBq)	85 $\pm$ 15	7 $\pm$ 3	2 $\pm$ 1
Malonate	6.3 $\mu\text{M}$ (23 kBq)	31 $\pm$ 8	5 $\pm$ 2	1 $\pm$ 1
Mevalonat	1.3 $\mu\text{M}$ (14 kBq)	51 <sup>b</sup>	4 <sup>a,b</sup>	- <sup>c</sup>
Oleic acid (18:1)	0.8 $\mu\text{M}$ (9 kBq)	89 $\pm$ 3	18 $\pm$ 8	0.3 $\pm$ 0.2
Palmitic acid (16:0)	1.1 $\mu\text{M}$ (12 kBq)	86 <sup>b</sup>	1 <sup>b</sup>	- <sup>c</sup>
Stearic acid (18:0)	2.3 $\mu\text{M}$ (25 kBq)	67 $\pm$ 18	10 $\pm$ 4	2 $\pm$ 1

<sup>a</sup> only carotinoids labelled, <sup>b</sup> single experiment, <sup>c</sup> not determined

Die  $^{14}\text{C}$ -markierten Metabolite konnten via Radio-HPLC getrennt und als Fettsäuremethylester mit einer Kettenlänge von C16-C24 (Spuren C26) identifiziert werden. Palmitinsäure (16:0) und Ölsäure (18:1) koeluierten unter diesen Analysenbedingungen. Die Retentionszeiten der markierten Metabolite stimmten mit denen der hergestellten  $^{14}\text{C}$ -markierten Standard-FSME überein (Figure 9, S. 40). Die in den Fettsäuren enthaltene Markierung war, je nach eingesetztem [ $^{14}\text{C}$ ]Vorläufer, sehr unterschiedlich auf C16-C18-Fettsäuren bzw. C20-C26-Fettsäuren (very-long-chain fatty acids, VLCFAs) verteilt, unter den sehr langkettigen Fettsäuren (VLCFA) aus Gurke war Behensäure (22:0) die Hauptkomponente (Figure 9, S. 40).

Die VLCFAs wurden durch [ $^{14}\text{C}$ ]Malonat mit bis zu 50 % der in die Fettsäuren insgesamt aufgenommenen Radioaktivität markiert, [ $^{14}\text{C}$ ]Stearinsäure, -Palmitinsäure und -Acetat markierten diese Fettsäuren zu 1-15 %. [ $^{14}\text{C}$ ]Mevalonat wurde ausschließlich in Carotinoiden des Hexan-Extrakts gefunden, die durch HPLC-Analyse (Detektion bei 450 nm) und den Vergleich mit dem Standard  $\beta$ -Carotin identifiziert wurden. Aus [ $^{14}\text{C}$ ]Ölsäure stammende Radioaktivität wurde nicht in VLCFAs eingebaut, sondern ausschließlich in Linolsäure (16  $\pm$  2 % der Markierung) und Linolensäure (50  $\pm$  4 %) der basisch hydrolysierten Fettsäuren gefunden.

### 3.1.3 Nachweis der reduzierten VLCFA-Bildung

Wurde die Inkubation der Blattstücke in Gegenwart von 1  $\mu$ M Metazachlor durchgeführt, konnte anhand der Metabolisierung der [ $^{14}$ C]Substrate eine Veränderung der Fettsäure-Prozessierung festgestellt werden. Die Fraktion gesättigter VLCFAs (20:0, 22:0, 24:0) verschwand nahezu vollständig, während der Einbau der Markierung in ungesättigte (18:3, 18:2, 18:1) und gesättigte (16:0, 18:0) langkettige Fettsäuren weitgehend unverändert blieb (Figure 9, S. 40). Dieser Befund ergab sich übereinstimmend für die Metabolisierung aller drei näher untersuchten [ $^{14}$ C]Vorläufer, Acetat, Malonat, und Stearinsäure (Table 8), mit [ $^{14}$ C]Malonat als Vorläufer war auch die Gesamt-Radioaktivität der Fettsäureextrakte stark reduziert. Metazachlor hemmte den Einbau von [ $^{14}$ C]Malonat in Stearinsäure (18:0), nicht jedoch den Einbau von [ $^{14}$ C]Acetat.

Table 8: Influence of metazachlor on biosynthesis of cucumber fatty acids.

Leaf discs of cucumber cotyledons were incubated for 20 h with  $^{14}$ C-labelled stearic acid (C18), malonate (C3) or acetate (C2). Lipids were alkaline-hydrolysed (A) followed by acid hydrolysis (B). Labelled fatty acids were determined by radio-HPLC, palmitic acid (16:0) and oleic acid (18:1) coeluted under these separation conditions. The metazachlor (MZ)-induced loss of very-long-chain fatty acids (VLCFA, 20:0, 22:0, 24:0) corresponds to a reduced uptake of label from [ $^{14}$ C]malonate and a higher level of remaining stearic acid (18:0) when [ $^{14}$ C]stearic acid was applied.

Substrate	MZ	Fatty acid labelling (Bq/ leaf disc)								n.d. <sup>a</sup>	
		Total	18:2	16:0/18:1	18:0	20:0	22:0	24:0	VLCFA		
<b>A</b>	C18	none	143.1	19.0	30.7	68.8	7.4	10.1	1.9	19.4	5.2
		1 $\mu$ M	152.8	17.8	29.0	97.5	1.8	-	-	1.8	6.7
	C3	none	204.5	14.9	48.0	18.0	17.1	56.3	21.6	95.0	28.6
		1 $\mu$ M	95.7	15.1	45.5	7.8	3.1	1.1	0.4	4.6	22.6
	C2	none	205.7	35.7	118.6	15.3	1.7	2.0	0.3	4.0	32.2
		1 $\mu$ M	196.6	38.8	109.5	16.1	0.4	-	-	0.4	31.7
<b>B</b>	C18	none	44.5	-	-	16.0	2.6	6.7	2.6	11.9	16.5
		1 $\mu$ M	40.9	-	-	28.5	0.5	0.4	-	0.9	11.5
	C3	none	40.5	-	3.6	2.9	3.9	13.7	8.5	26.1	7.9
		1 $\mu$ M	10.8	-	3.9	1.4	1.0	-	-	1.0	4.5
	C2	none	40.4	-	18.4	4.9	2.3	6.3	2.9	11.5	5.4
		1 $\mu$ M	48.6	-	30.7	6.3	-	1.9	-	1.9	9.7

<sup>a</sup> n.d., not determined

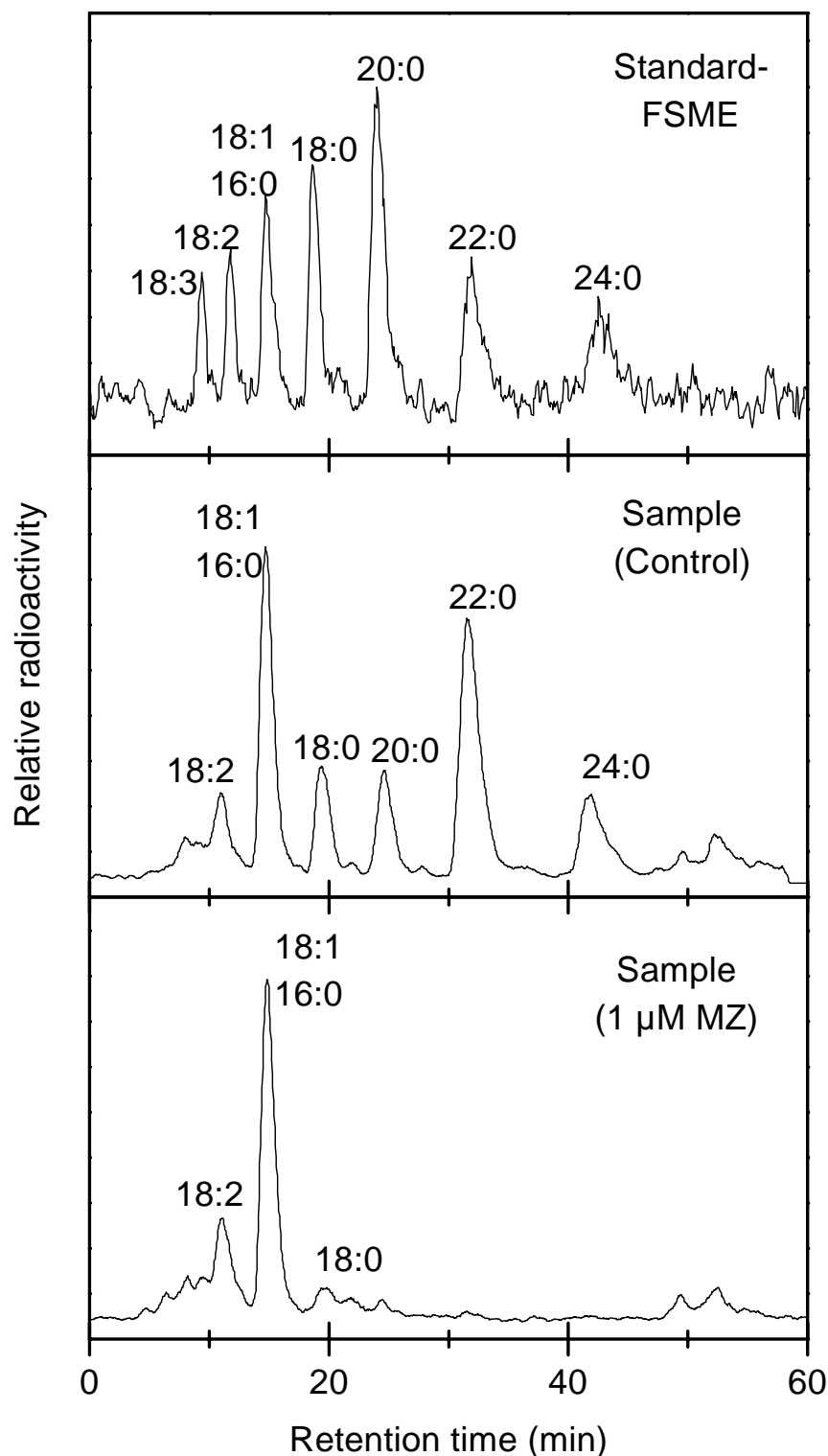


Figure 9: Separation of cucumber VLCFAs by radio-HPLC.

Leaf discs of 5-day-old cotyledons were incubated for 5 h with 6  $\mu\text{M}$  [ $^{14}\text{C}$ ]malonate and with 1  $\mu\text{M}$  metazachlor (MZ) added as an ethanolic stock solution or ethanol only (control). Lipids were hydrolysed and resulting fatty acids extracted into hexane and subjected to methylation followed by radio-HPLC analysis. Fatty acids were identified as methyl ester derivatives by comparison with standards.  $^{14}\text{C}$ -labelled fatty acid methyl esters (FAME) were formed by methylation with  $\text{BF}_3$ / [ $^{14}\text{C}$ ]methanol (see Material and Methods). Palmitic acid (16:0) and oleic acid (18:1) coeluted under these separation conditions.



Die Hemmung der VLCFA-Bildung durch Metazachlor war sowohl in der Fraktion der basisch als auch der sauer hydrolysierbaren Fettsäuren zu beobachten. Diese Fraktion beinhaltete nur etwa ein Viertel der in basisch hydrolysierten Fettsäuren gefundenen Radioaktivität und konzentriert sich auf Palmitin- bzw. Ölsäure (Koelution), Stearinsäure und VLCFAs. Markierte mehrfach ungesättigte Fettsäuren (18:2, 18:3) wurden nicht gefunden.

#### 3.1.4 Sensitivität der Herbizidwirkung

Der reduzierte Einbau von Radioaktivität in VLCFAs durch exogene Vorläuferverbindungen korreliert mit der angewandten Herbizidkonzentration. Eine 50 %ige Reduktion der durch [<sup>14</sup>C]Malonat markierten VLCFAs wurde mit 10-100 nM Metazachlor gefunden. Die Hemmung des Malonateinbaus ist nicht gleichmäßig für die Spezies 18:0, 20:0, 22:0 und 24:0, sondern wird jeweils mit zunehmender Kettenlänge empfindlicher (Figure 10, S. 42). So werden 22:0 und 24:0 schon mit 0,01 µM Metazachlor deutlich reduziert, 20:0 wird erst mit 0,1 µM gehemmt. Eine Reduktion der 18:0-Markierung wurde erst mit 1 µM Metazachlor erreicht.

Der Inkubation von Blattstücken wurde gleichermaßen mit Primärblättern von Gerste und Mais (je 5 Tage alt) durchgeführt. Nach 6 h Inkubation wurde die als [<sup>14</sup>C]Malonat applizierte Markierung ebenfalls in C16-C24-Fettsäuren gefunden. Im Vergleich zu Gurke war die Aufnahme des [<sup>14</sup>C]Malonats aus der Nährlösung bis zu 5mal geringer und die relative Markierung der VLCFAs gegenüber den Gesamtfettsäuren war bei den Gräsern etwa halb so groß (Figure 11, S. 42). In Gurke und Gerste bildete Behensäure (22:0), in Mais Lignocerinsäure (24:0) den Hauptbestandteil der VLCFAs.

In Gerste und Gurke unterblieb in Gegenwart von 1 µM Metazachlor die VLCFA-Bildung aus [<sup>14</sup>C]Malonat praktisch vollständig, in Mais wurde diese nur um etwa 50 % reduziert. Eine mit der Kettenlänge zunehmende Empfindlichkeit der VLCFA-Bildung war in Mais nicht zu beobachten.

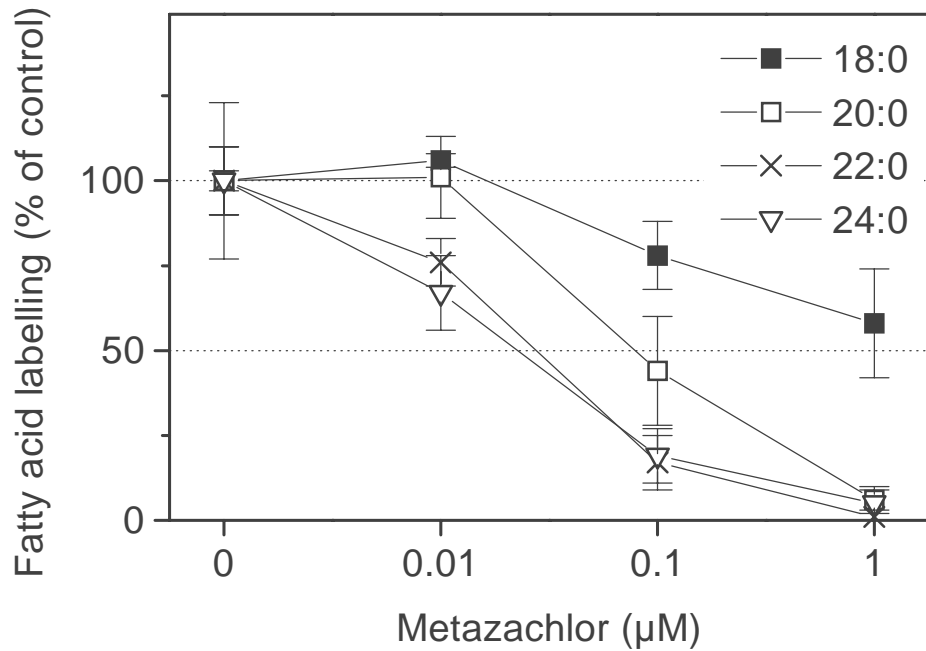


Figure 10: Inhibition of VLCFA biosynthesis depends on fatty acid chain length.

Very-long-chain fatty acid (VLCFA) synthesis is shown by incorporation of [ $^{14}\text{C}$ ]malonate into cucumber seedlings, which were untreated or treated with different concentrations of metazachlor. After a 6-h incubation, fatty acids were extracted and analysed by radio-HPLC.

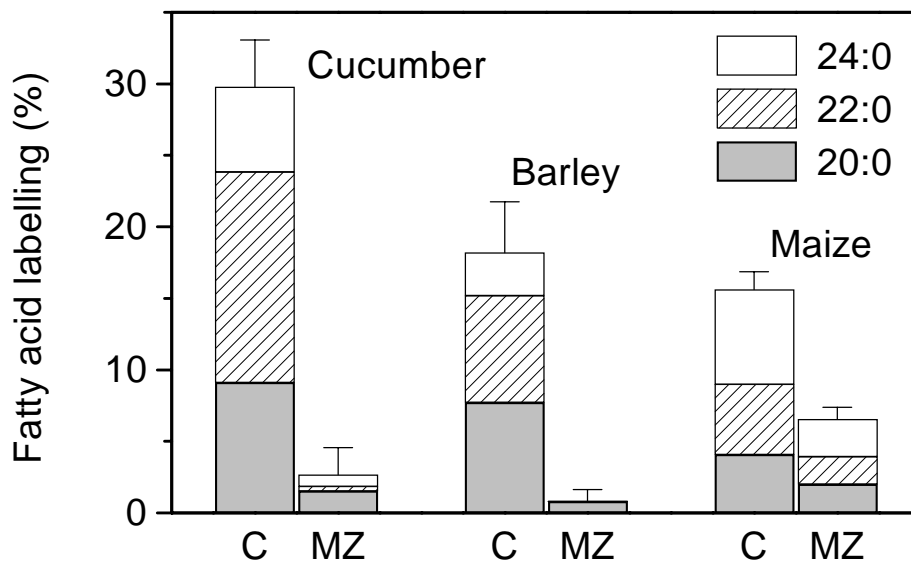


Figure 11: Metazachlor-induced inhibition of VLCFA biosynthesis in different plants.

VLCFA synthesis is reflected by incorporation of [ $^{14}\text{C}$ ]malonate into monocotyledonous (barley, maize) and dicotyledonous (cucumber) seedlings, which were untreated or treated with 1  $\mu\text{M}$  metazachlor. After a 6-h incubation, fatty acids were extracted and analysed by radio-HPLC.

### 3.1.5 Zeitlicher Verlauf des Stearinsäure-Einbaus

Der zeitliche Verlauf des  $^{14}\text{C}$ -Einbaus wurde anhand der Prozessierung von [ $^{14}\text{C}$ ]Stearinsäure (18:0) untersucht (Figure 12). Die Radioaktivität konnte innerhalb von 2 h in VLCFAs nachgewiesen werden, nach ca. 12-24 h wurde eine Sättigung der VLCFA-Markierung erreicht. Wurden die Blattstücke in Gegenwart von  $1\ \mu\text{M}$  Metazachlor inkubiert, fand von Anfang an praktisch keine Markierung von VLCFAs statt; im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle betrug der VLCFA-Gehalt maximal 6 %.

Die Bildung ungesättigter C18-Fettsäuren war ungefähr linear während der betrachteten Inkubationszeit. Nach 24 h waren ca. dreimal mehr ungesättigte (18:1, 18:2, 18:3) als sehr langkettige (20:0, 22:0, 24:0) Fettsäuren nachweisbar. Metazachlor ( $1\ \mu\text{M}$ ) beeinflusste die Desaturierung von Stearinsäure nicht signifikant.

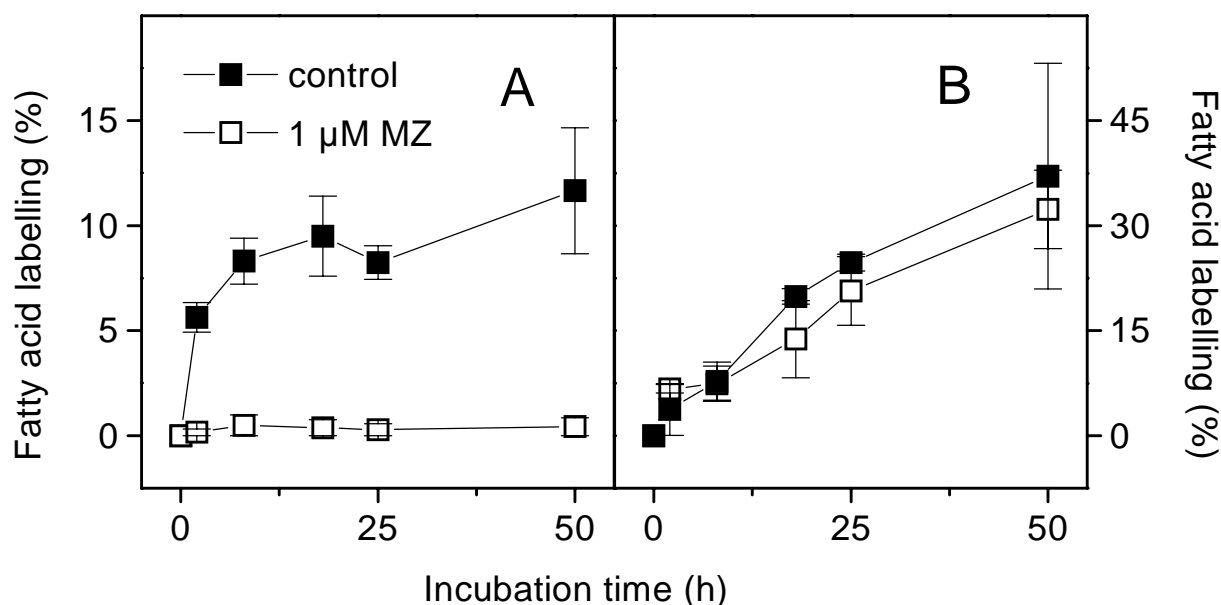


Figure 12: Time course of [ $^{14}\text{C}$ ]stearic acid metabolism in cucumber cotyledons.

Cotyledon discs of 5 day old seedlings incorporated  $2.3\ \mu\text{M}$  [ $^{14}\text{C}$ ]stearic acid for 2 to 50 h with or without  $1\ \mu\text{M}$  metazachlor present. Metabolites determined by radio-HPLC are distinguished in very-long-chain fatty acids including 20:0, 22:0, 24:0 (A) and unsaturated fatty acids including 18:3, 18:2, 18:1 (B).

### 3.2 Hemmung der VLCFA-Biosynthese in Sojazellen

#### 3.2.1 Wachstum der Zellkulturen mit Metazachlor

Die Zellkulturen von *Glycine max* wurden in Kulturmedium mit steigenden Konzentrationen Metazachlor unter Wachstumsbedingungen 7 Tage kultiviert. In Gegenwart von Metazachlor ging das Zellwachstum, gemessen als Zellvolumen (pcv) bzw. Chlorophyllgehalt (Figure 13), um 60-80 % zurück. Eine Konzentration von 20  $\mu\text{M}$  Metazachlor wurde von den Zellen toleriert (auch noch nach 14 Tagen), 200  $\mu\text{M}$  Metazachlor verfärbten die Zellen nach 3 Tagen braun und die Zellen starben nach ca. 7 Tagen ab. Unter dem Mikroskop betrachtet, war die Organisation der Zellen in Coenobien durch Metazachlor nicht beeinträchtigt. Eine Zugabe von VLCFAs (je 10  $\mu\text{M}$  20:0, 22:0, 24:0, 26:0) zeigte, innerhalb der in Figure 13 gezeigten Schwankungen, weder eine Wirkung auf das Zellwachstum noch auf die durch Metazachlor verursachte Hemmung des Zellwachstums.

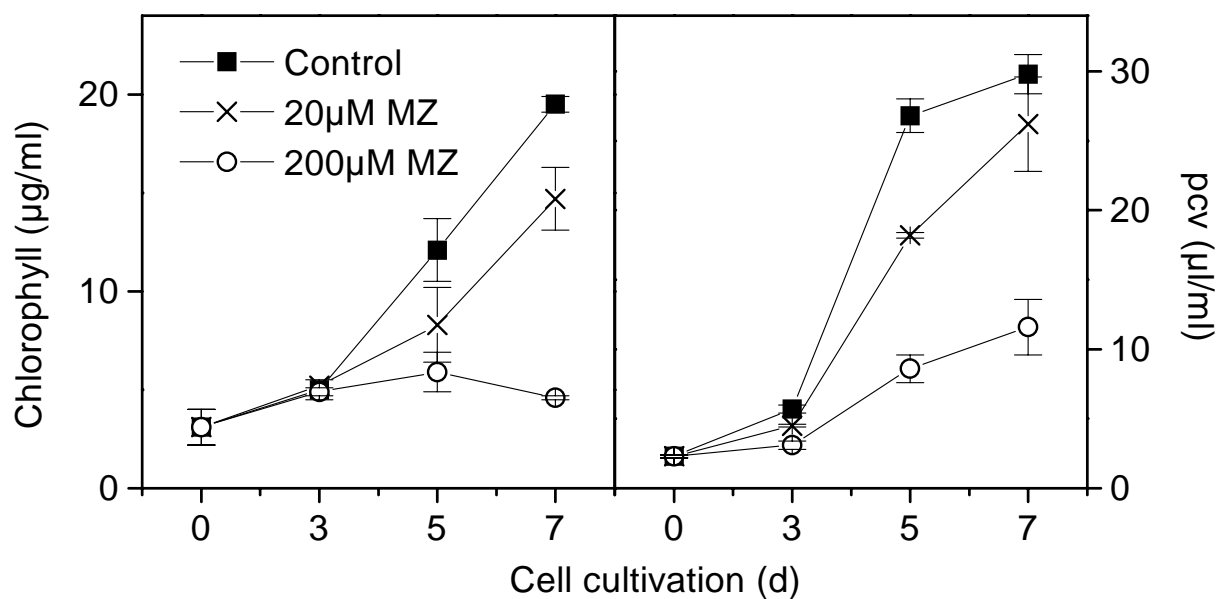


Figure 13: Growth inhibition of soybean cells with metazachlor.

Cell cultures of *Glycine max* were cultivated with increasing concentrations of metazachlor (MZ). Cell proliferation was interpreted as packed cell volume (pcv) and chlorophyll content. A concentration of 200  $\mu\text{M}$  of metazachlor was found lethal after 7 days.

### 3.2.2 Nachweis der reduzierten VLCFA-Bildung

Vier Tage vorkultivierte Sojazellen wurden mit Metazachlor ( $10^{-8}$ - $10^{-5}$  M) 24 h kultiviert. In diesem Zeitraum verdoppelte sich die Zelldichte annähernd (vgl. Figure 13, S. 44). Anschließend wurden durch kombinierte basische und saure Hydrolyse die Gesamtfettsäuren gewonnen und gaschromatographisch quantifiziert. Die Sojazellen enthielten nahezu ausschließlich C16-C18-Fettsäuren mit Ölsäure (18:1) als Hauptkomponente. Neben einem geringen Anteil 16:1 (0,5 %) und Spuren 14:0 (0,1 %) sind 1,6 % gesättigte VLCFAs enthalten (20:0, 22:0, 24:0, 26:0). Metazachlor hatte auf den Gehalt langkettiger Fettsäuren (C16-C18) keinen signifikanten Einfluß (Figure 14A, S. 46), die Menge der insgesamt extrahierbaren Fettsäuren (bezogen auf das Frischgewicht) nahm mit  $10^{-5}$  M Metazachlor tendenziell ( $92 \pm 5$  % der Kontrolle) ab. Der VLCFA-Gehalt nahm schon mit der kleinsten eingesetzten Herbizidkonzentration ( $10^{-8}$  M Metazachlor) nach 24 h Inkubation um 30 % ab (Figure 14B, S. 46), höhere Konzentrationen reduzierten den VLCFA-Gehalt um etwa die Hälfte.

Der herbizidale Effekt war für die detektierten VLCFA-Komponenten verschiedener Kettenlänge nicht in gleichem Maße zu beobachten, sondern war umso empfindlicher, je länger die Kohlenstoffkette der Fettsäure war (Figure 14C, S. 46). So wurde z.B. mit  $10^{-8}$  M Metazachlor 20:0 noch nicht reduziert, der Gehalt an 22:0 bzw. 24:0 sank jedoch um 25 % bzw. 50 %. Parallel zur Reduktion des VLCFA-Gehalts war ein tendenzieller Anstieg von Stearinsäure (18:0) zu beobachten (Figure 14A, S. 46).

Die Hemmung der VLCFA-Bildung war bereits nach 8stündiger Inkubation nachweisbar. Sowohl eine Steigerung der Metazachlor-Konzentration als auch eine Verlängerung der Inkubationszeit führte zu einer intensiveren Hemmung der VLCFA-Bildung in Sojazellen. Die VLCFA-Reduktion steigerte sich mit weiter zunehmender (ab  $10^{-7}$  M) Herbizidkonzentration nur sehr langsam (Table 9, S. 47).

---

Figure 14 (next page): Effect of metazachlor on soybean fatty acids.

Cell cultures of *Glycine max* were grown 24 h with increasing concentrations of metazachlor present. Fatty acid content was determined by gas chromatography (A), 18:x means sum of 18:2 und 18:3, which were not separated by this procedure. Metazachlor specifically reduced saturated very-long-chain fatty acids (VLCFA) with 20-26 carbons (B). Inhibition increased with ascending carbon number of VLCFAs (C), obtaining  $I_{50}$ -values from 10 nM (26:0) to more than 10  $\mu$ M (20:0).

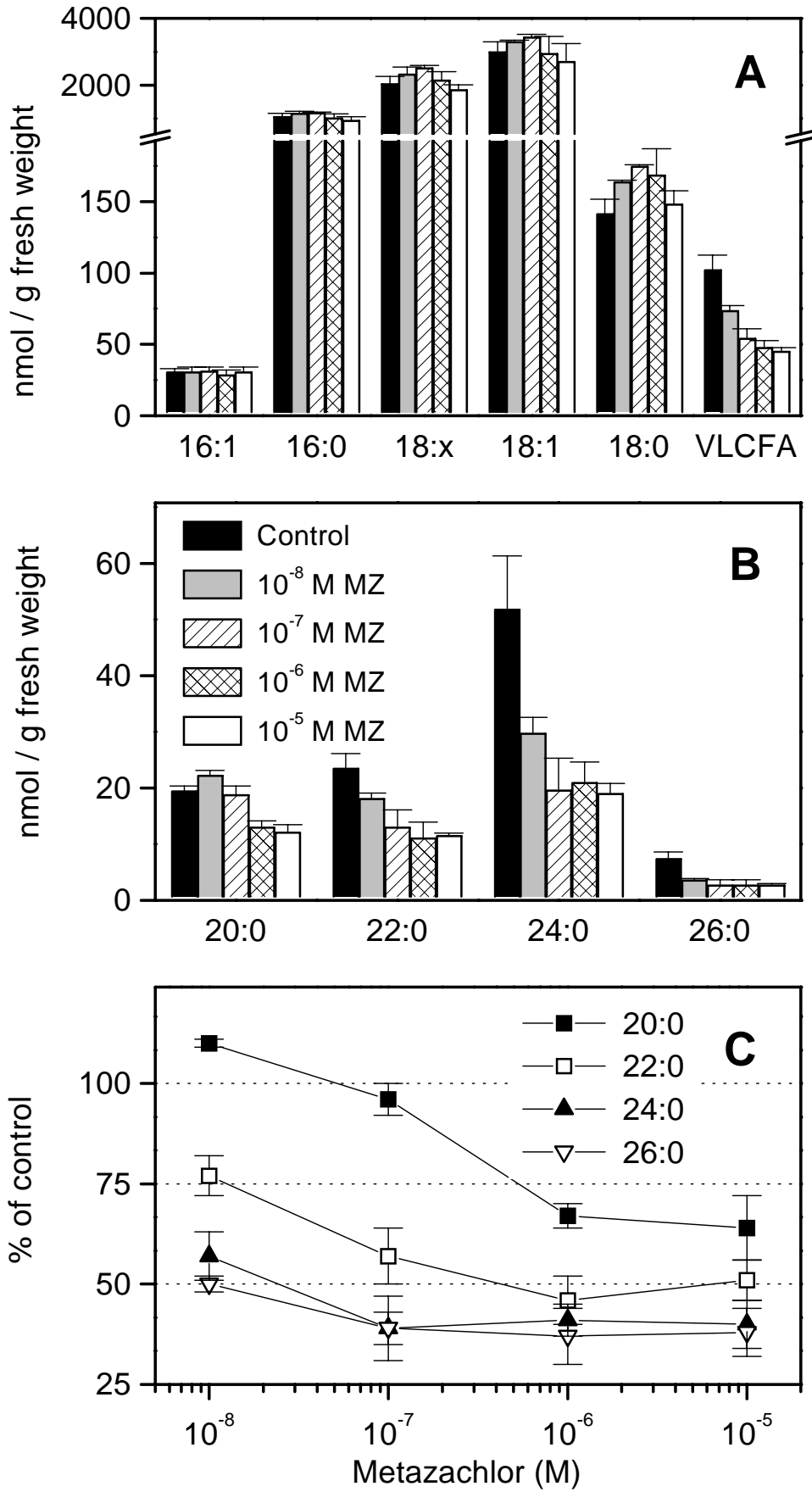


Figure 14

Table 9: Metazachlor-induced reduction of soybean VLCFAs.

Cell cultures of *Glycine max* were cultivated 8-48 h with increasing amounts of metazachlor. Fatty acids were extracted and the level of saturated very-long-chain fatty acids (C20-C26) was determined by means of gas chromatography.

Metazachlor	$10^{-8}$ M	$10^{-7}$ M	$10^{-6}$ M	$10^{-5}$ M
	VLCFA level (% of control)			
8 h	$114 \pm 10$	$74 \pm 18$	$71^a$	$66^a$
24 h	$75 \pm 5$	$55 \pm 3$	$47 \pm 3$	$47 \pm 6$
48 h	$^b$	$^b$	$52^a$	$37^a$

<sup>a</sup> single experiment, <sup>b</sup> not examined

### 3.3 Hemmung der VLCFA-Bildung in transgener Hefe

Eine weitere Möglichkeit zur Untersuchung der VLCFA-Biosynthese und ihrer Hemmung durch Chloracetamide eröffnete die Existenz einer transgenen Hefe, welche das Kondensationsenzym der Fettsäureelongase aus *Arabidopsis* - Samen (*FAE1*, fatty acid elongase) exprimiert. Dies führt zu einem unnatürlich hohen Gehalt ungesättigter VLCFAs in den *Saccharomyces cerevisiae* Zellen.

#### 3.3.1 Wachstum der Hefezellen

Zunächst wurde das Zellwachstum des Wildtyps und der Transformante mit und ohne Metazachlor untersucht. Die Zellkulturen wurden unter Induktion des *FAE1*-Gens in Gegenwart von Galaktose und 0-100  $\mu$ M Metazachlor 24 h bei 30°C kultiviert und die Zelldichte bestimmt. Frisch subkultivierte Zellen kamen nach 8-12 h in die Phase exponentiellen Wachstums ( $10$ - $50 \times 10^6$  Zellen) und nach 15-18 h in die stationäre Phase (Figure 15, S. 48). Die transformierten Zellen wuchsen im Vergleich zum Wildtyp zunächst tendenziell schwächer, ab dem Zeitraum des exponentiellen Wachstums traten innerhalb der Abweichungen keine Wachstumsunterschiede auf. Die Zugabe von bis zu 100  $\mu$ M Metazachlor beeinflusste weder das Zellwachstum des Wildtyps noch der Transformante, die ermittelten Zelldichten unterschieden sich um weniger als  $\pm 5$  % (Figure 15, S. 48). Somit reagierten die Hefe-Genotypen nicht, wie am Wachstum höherer Pflanzen oder Zellkulturen von Soja zu beobachten, sensitiv gegenüber dem Herbizid.

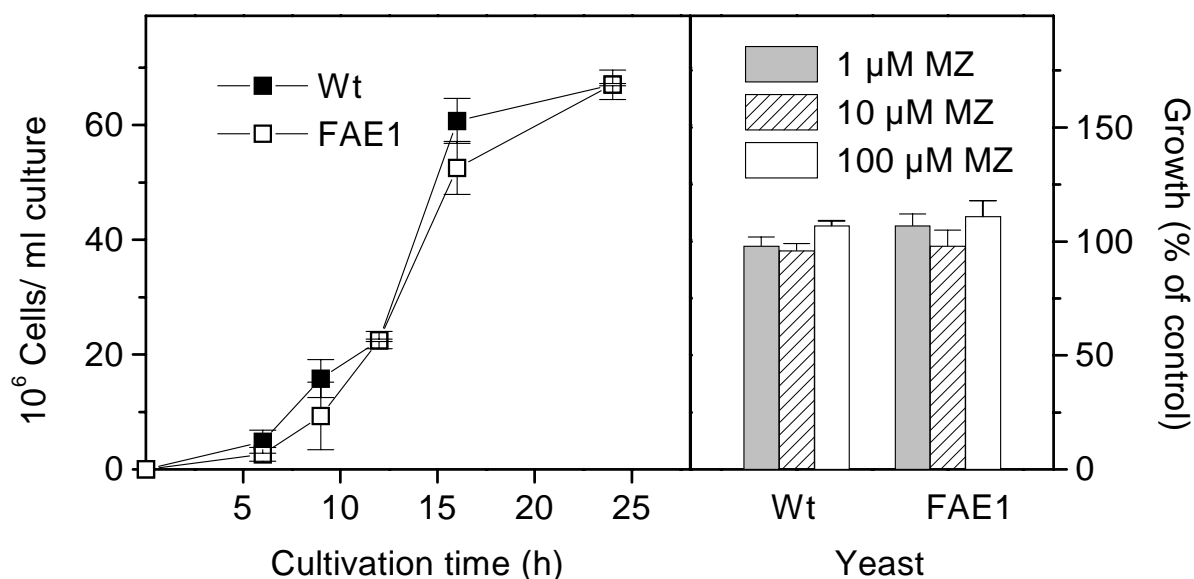


Figure 15: Cell proliferation of *Saccharomyces cerevisiae* wild-type and transformant.

Cells were grown in complete medium supplied with 2 % galactose at 30°C in the dark for 24 h. Wild-type cells (Wt) also contained the pYES2-Plasmid without *FAE1* insert. Cell density was determined spectrometrically at 660 nm. Metazachlor was added as an ethanolic stock solution (final concentrations 1-100 μM), the control sample contained ethanol only. In the presence of metazachlor (MZ), cell density was measured during exponential growth.

### 3.3.2 Fettsäure-Zusammensetzung in Wildtyp und *FAE1*-Transformante

Zur Frage, ob das in Hefe eingeführte *FAE1*-Gen aus *Arabidopsis* eine VLCFA-Synthese induziert, welche durch Chloracetamide hemmbar ist, konnte auf der Ebene des Zellwachstums keine Antwort gefunden werden (s. vorhergehender Abschnitt). Um die von Millar und Kunst (1997) berichteten Unterschiede auf der Ebene der Fettsäure-Biosynthese zwischen dem Wildtyp und der Transformante zu prüfen, wurde zunächst eine vergleichende gaschromatographische Analyse endogener Fettsäuren der beiden Genotypen durchgeführt (Figure 16, S. 49).

Im *Saccharomyces cerevisiae* Wildtyp wurden trotz der Abwesenheit des *FAE1*-Gens VLCFAs gebildet. Ihr Anteil an den Gesamtfettsäuren war kleiner als 1 %, als Komponenten konnten Spuren von 20:0, 20:1, 22:0, 22:1, 24:0 und 26:0, d.h. sowohl gesättigte als auch ungesättigte VLCFA gefunden werden. In der Transformante führte die Expression der *Brassica*-Elongase zu einem ca. 10fach höheren Gehalt an ungesättigten VLCFAs (0,3 %,



Wildtyp; 3,1 %, Transformante), der Gehalt gesättigter VLCFAs war hingegen nahezu unverändert klein (Wildtyp 0,6 %, Transformante 0,8 %).

Die überwiegende Komponente der VLCFAs war Eicosensäure (20:1), die etwa drei Viertel der in der *FAE1*-Transformanten gefundenen VLCFAs ausmachte. Die Hauptkomponenten der Hefe-Fettsäuren (Palmitinsäure, 16:1 und Palminsäure, 16:0) waren in beiden Hefen in vergleichbaren Mengen enthalten. Neben der Bildung zusätzlicher ungesättigter VLCFAs kam es in der Transformante zu einer Akkumulation von bis zu 10 % kurzkettiger C12- und C14-Fettsäuren. Der Gehalt dieser Fettsäuren war gegenüber dem Wildtyp 3-4fach erhöht, begleitet von einem tendenziellen Rückgang des Ölsäuregehalts (18:1). Mehrfach ungesättigte C18-Fettsäuren waren in *S. cerevisiae* nur in geringen Mengen (ca. 1 %) enthalten.

Der gefundene VLCFA-Gehalt der *FAE1*-Transformante war von der Kulturdauer und der Methode der Fettsäureextraktion abhängig. Die Fettsäure-Ausbeute konnte durch Gefriertrocknung und anschließende Lipidhydrolyse 4fach gesteigert werden. Die Extraktion von Zellen, die in der frühen exponentiellen Wachstumsphase entnommen wurden, erhöhte die VLCFA-Ausbeute überproportional, so daß der gefundene VLCFA-Gehalt bis zu 10 % der Gesamt-Fettsäuren betrug.

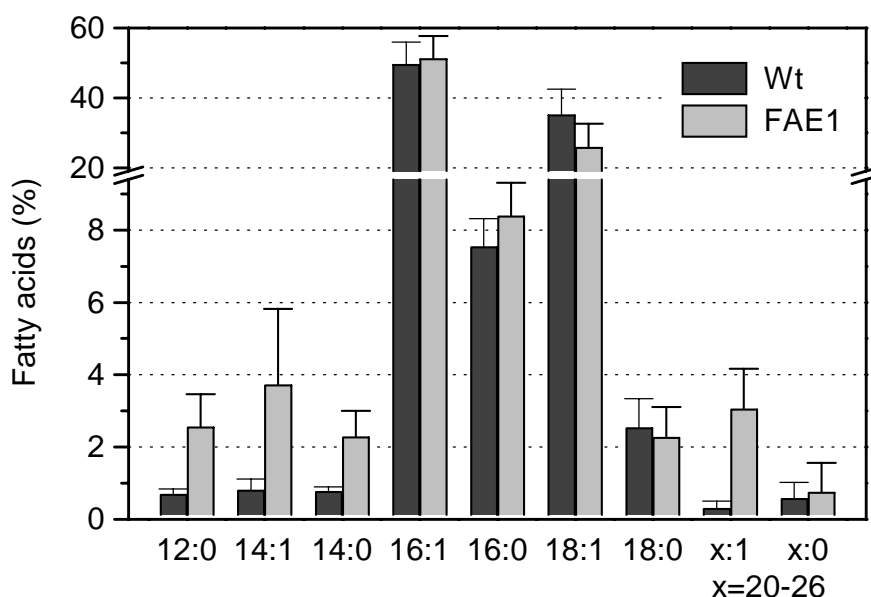


Figure 16: GC/FID analysis of fatty acids of wild-type and *FAE1* transformant.

Cells were grown in complete medium supplied with 2 % galactose at 30°C in the dark for 24 h. Wild-type cells also contained the pYES2-plasmid without *FAE1* insert. Cells were harvested at the end of exponential growth ( $60\text{-}70 \times 10^6$  cells/ml medium) and fatty acids were extracted. Oleic acid coeluted with up to 5 % 18:2 and 18:3, as determined by means of a more polar capillary column (see Material and Methods).

### 3.3.3 Wirkung von Metazachlor auf die Fettsäure-Zusammensetzung

Als Folge der Expression des Fremdgens konnten, im Vergleich zwischen Wildtyp und *FAE1*-Transformante, über den VLCFA-Gehalt hinausgehende Unterschiede in der Fettsäure-Zusammensetzung festgestellt werden. Anhand einer Chloracetamid-Behandlung der Fettsäureelongase-exprimierenden Hefezellen wurde der Einfluß des Herbizids auf die Fettsäure-Zusammensetzung untersucht (Figure 17, S. 51).

Metazachlor zeigte einen von der Konzentration abhängigen Einfluß auf das gesamte Fettsäurespektrum der *FAE1*-exprimierenden Hefezellen. Die Fraktion der VLCFAs wurden durch 100 µM um bis zu 75 % ihrer ursprünglichen Menge reduziert, begleitet von einer deutlichen Akkumulation von C16-C18-Fettsäuren. Am stärksten wurden der Gehalt von Öl- (18:1) und Stearinsäure (18:0) Gehalt erhöht (max. je +61 %), gefolgt von Palmin- (16:0, +51 %) und Palmitinsäure (16:1, +19%). Neben den VLCFAs wurde der für die Transformante typische höhere Gehalt kurzkettiger C14-Fettsäuren, ebenfalls in Abhängigkeit der Metazachlorkonzentration, um bis zu 65 % (14:1) bzw. 23 % (14:0) reduziert.

Der Rückgang der VLCFAs ist differenziert zu betrachten, da Metazachlor auf die in *FAE1*-transformierter Hefe enthaltenen gesättigten und ungesättigten VLCFAs eine unterschiedliche Wirkung hat. Der relative Gehalt *gesättigter* VLCFAs (20:0, 22:0, 24:0 und 26:0) bezogen auf die Gesamt-VLCFAs betrug ca. 10 % und wurde durch das Herbizid nicht signifikant verändert. Der Gehalt *ungesättigter* VLCFAs, der auf die heterologe *FAE1*-Expression zurückzuführen ist, ging durch Applikation von 1-100 µM Metazachlor empfindlich zurück. Die Intensität der Hemmung war nicht von der Kettenlänge der VLCFA abhängig, sondern betrug für 20:1, 22:1, 24:1 und 26:1 mit 1 µM Metazachlor ca. 25 % (9-28 %), mit 10 µM ca. 50 % (29-60 %) und mit 100 µM ca. 75 % (73-100 %).

Durch den Einsatz einer polaren GC-Kapillarsäule konnten die ungesättigten VLCFAs in *cis*- und *trans*-Isomere aufgetrennt werden, die durch Standard-FSMs identifiziert wurden. Die vollständige (Basislinie-)Trennung gelang nur mit den hochsiedenden ungesättigten VLCFAs. Die Konformere lagen in unterschiedlichem Verhältnis vor, wurden jedoch beide durch Metazachlor reduziert. Die Massenspektren der *cis*-/*trans*-Isomere von 20:1 bzw. 22:1 waren identisch, im Wildtyp konnte aufgrund der geringen Menge ungesättigter VLCFAs keine diesbezügliche Analyse durchgeführt werden.

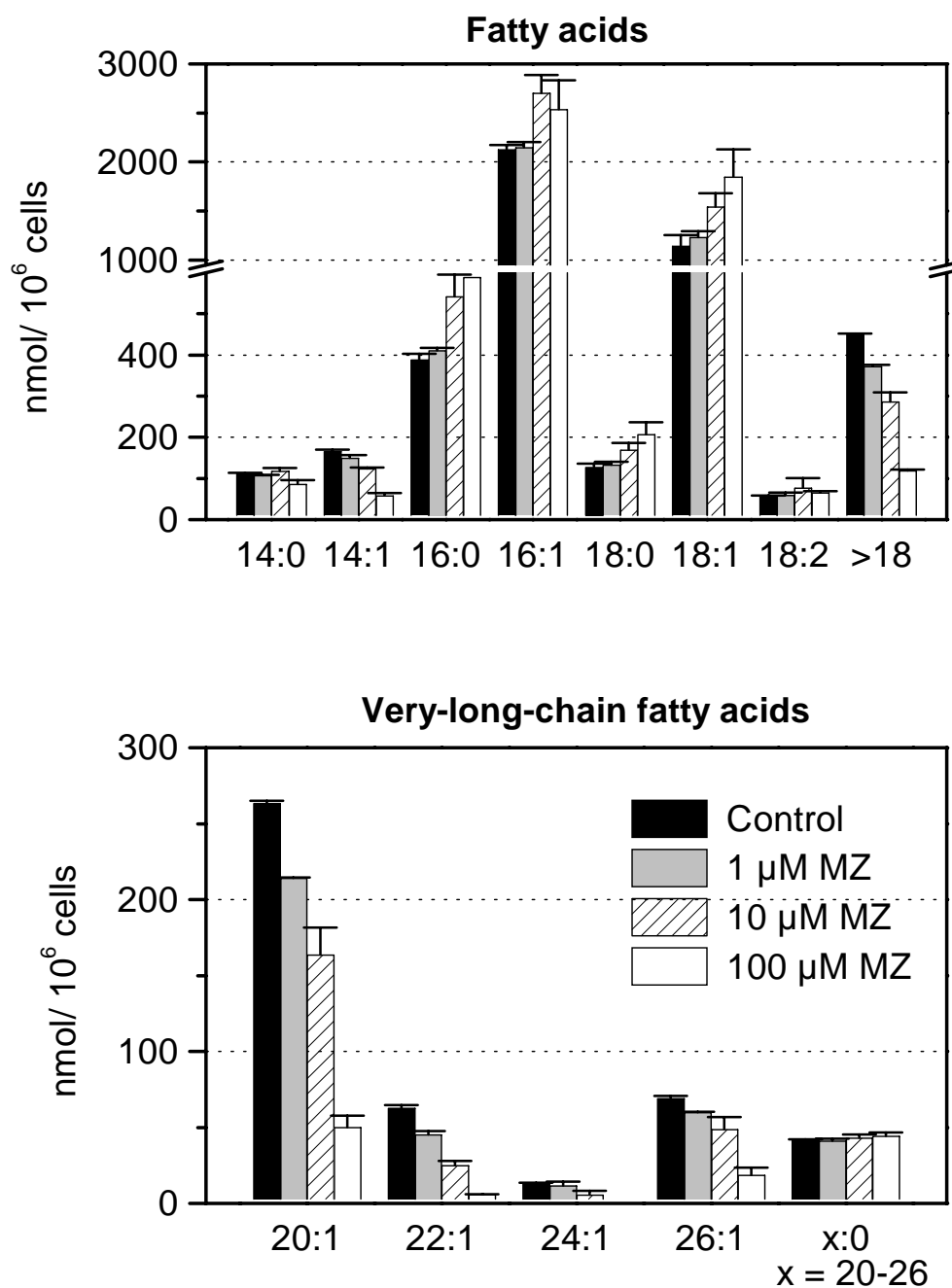


Figure 17: Effect of metazachlor on fatty acids from *FAE1* yeast.

Cells were grown in complete medium supplied with increasing concentrations of metazachlor (MZ) and 2 % galactose at 30°C in the dark and harvested at the beginning of exponential growth ( $20\text{-}25 \times 10^6$  cells  $\text{ml}^{-1}$  medium). Hydrolysable fatty acids were determined by GC/FID. Saturated and unsaturated very-long-chain fatty acids ranging from C20-C26 were found, the latter contained *cis*-isomers as well as *trans*-isomers (see Discussion).

### 3.3.4 *In vivo* Elongation von [ $^{14}\text{C}$ ]Ölsäure

Die Aktivität des in Hefe heterolog exprimierten Kondensationsenzym der Fettsäure-Elongase und dessen Sensitivität gegenüber Chloracetamiden wurde durch den *in vivo* Einbau exogener [ $^{14}\text{C}$ ]Ölsäure überprüft. Die applizierte markierte Ölsäure konnte im Fettsäureextrakt der Hefezellen wiedergefunden und die markierten Ölsäuremetabolite durch Radio-HPLC getrennt und identifiziert werden. Die VLCFAs wurden anhand von Standard-[ $^{14}\text{C}$ ]Fettsäuremethylestern identifiziert.

Wildtyp und *FAE1*-Transformante inkorporierten bis zu 60 % der applizierten Ölsäure in die hydrolysierbaren Lipide. Die *FAE1*-Transformante inkorporierte 11-21 % der in den Gesamt-Fettsäuren gebundenen  $^{14}\text{C}$ -Markierung in einfach ungesättigte VLCFAs, während der Wildtyp die exogene Ölsäure nicht metabolisierte (Figure 18).

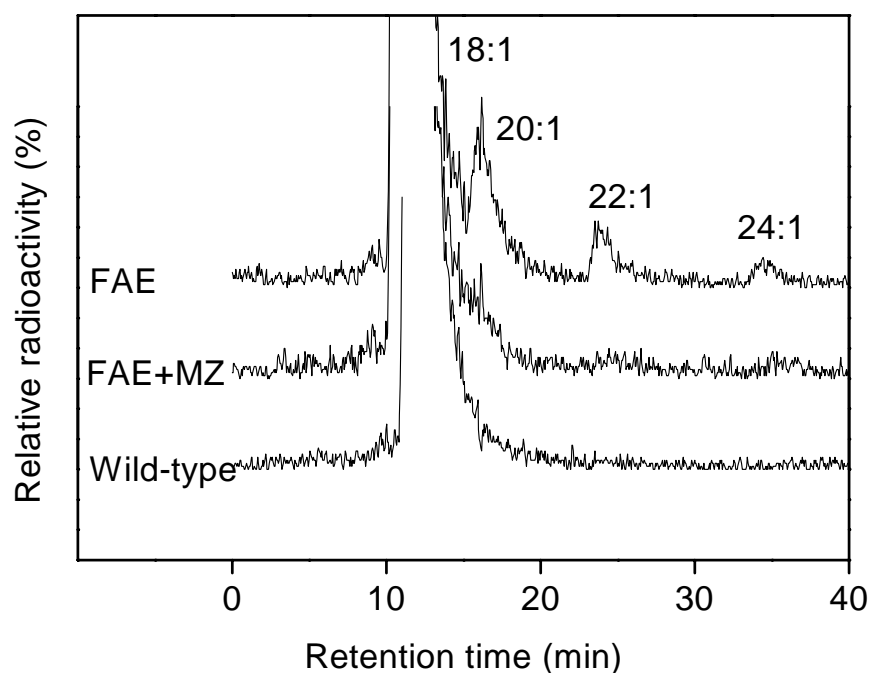


Figure 18: Effect of metazachlor on 18:1 elongation in *FAE1* yeast.

Yeast cells ( $0.4 \times 10^6$  cells  $\text{ml}^{-1}$  medium) were grown at  $30^\circ\text{C}$  in the dark until a density of  $30 \times 10^6$  cells/ ml medium was reached. Complete medium also contained 2 % galactose, [ $^{14}\text{C}$ ]oleic acid ( $2.7 \mu\text{M}$  or  $6.5 \mu\text{M}$ , two experiments), and  $10 \mu\text{M}$  metazachlor. The control sample and the wild-type contained ethanol only. Fatty acids were extracted and analysed by radio-HPLC as described in Material and Methods.

In Gegenwart von Metazachlor ging der VLCFA-Gehalt in Abhängigkeit der Konzentration zurück, wobei die VLCFAs um jeweils etwa 25 % der Kontrolle abnahmen, wenn die Herbizidkonzentration, ausgehend von 1  $\mu\text{M}$ , verzehnfacht wurde (Table 10). Entsprechend betrug der  $I_{50}$ -Wert für die Hemmung der aus exogener Ölsäure gebildeten VLCFA etwa 10  $\mu\text{M}$  Metazachlor. Mit 100  $\mu\text{M}$  war auch der Einbau der Ölsäure in die Gesamtfettsäuren um 35 % reduziert.

Eine signifikante Abhängigkeit der Hemmung von der VLCFA-Kettenlänge konnte nicht festgestellt werden. So reduzierte z.B. 1  $\mu\text{M}$  Metazachlor 20:1 um 22 %, 22:1 bzw. 24:1 um 36 % bzw. 35 %. Somit wurde für die Reduktion der aus *exogener* Ölsäure neugebildeten VLCFAs die gleiche Hemmcharakteristik gefunden wie zuvor für die Absenkung des Gehalts *endogener* ungesättigter VLCFAs (s. vorhergehendes Kapitel).

Table 10: Incorporation of [ $^{14}\text{C}$ ]oleic acid into fatty acids of *FAE1* yeast.

Yeast cells ( $0.4 \times 10^6$  cells  $\text{ml}^{-1}$  medium) were grown at 30°C in the dark until a density of  $30 \times 10^6$  cells/ ml medium was reached. Complete medium also contained 2 % galactose, 2.7  $\mu\text{M}$  [ $^{14}\text{C}$ ]oleic acid (2.7  $\mu\text{M}$  or 6.5  $\mu\text{M}$ , two experiments), and increasing concentrations of metazachlor. Fatty acids were extracted and analysed by radio-HPLC as described in Material and Methods.

Metazachlor	Total fatty acids	VLCFAs
	% of control	
1 $\mu\text{M}$ MZ	118 $\pm$ 18	79 $\pm$ 4
10 $\mu\text{M}$ MZ	112 $\pm$ 26	54 $\pm$ 12
100 $\mu\text{M}$ MZ	65 $\pm$ 6	19 $\pm$ 1

### 3.3.5 *In vitro* Elongation von [ $^{14}\text{C}$ ]Oleoyl-CoA

Um die herbizidale Wirkung auf das *FAE1*-Enzym näher zu charakterisieren, wurde aus der Transformante eine Fraktion mikrosomaler Proteine präpariert und mit den Substraten der Fettsäure-Elongation, [ $^{14}\text{C}$ ]Oleoyl-CoA und Malonyl-CoA, in Gegenwart von Cofaktoren und gegebenenfalls Herbizid 20 min bei 30°C inkubiert. Anschließend wurden die  $^{14}\text{C}$ -markierten Elongationsprodukte verseift und per Radio-HPLC bestimmt.

Vor der Durchführung von Hemmstudien wurden die Konzentrationen des Gesamtproteins, der Substrate und Cofaktoren auf der Grundlage von Todd *et al.* (1999) und Schmalfuß *et al.* (2000) modifiziert und der lineare zeitliche Verlauf der Produktbildung bis 30 min

sichergestellt. Innerhalb von 20 min wurden bis zu 30 % der applizierten [ $^{14}\text{C}$ ]Ölsäure in Eicosensäure (20:1) umgesetzt. Die Aktivität der Fettsäure-Elongase betrug im Standardassay  $40 (\pm 8) \text{ nmol h}^{-1} \text{ mg}^{-1} \text{ Protein}$ , die Zugabe von ATP reduzierte die Elongaseaktivität um ca. 70 %.

Metazachlor hemmte die *in-vitro*-Elongation von [ $^{14}\text{C}$ ]18:1-CoA zu 20:1 mit einem  $I_{50}$ -Wert von 10-100  $\mu\text{M}$  (Table 11). Somit war diese im zellfreien System bestimmte Hemmung der VLCFA-Synthese tendenziell kleiner als die in lebenden Zellen ( $I_{50}$  ca. 10  $\mu\text{M}$  Metazachlor). Um den Zusammenhang zwischen der Empfindlichkeit der herbizidalen Hemmung und der Einwirkungsdauer des Herbizids zu charakterisieren, wurden die mikrosomalen Proteine mit Metazachlor unter verschiedenen Bedingungen vorinkubiert und anschließend die Elongaseaktivität getestet.

Aus den Daten ist erkennbar, daß die Hemmintensität sowohl mit der Dauer der Vorinkubation als auch mit der Temperatur zunahm. Der Wert der halbmaximalen Hemmung sank um etwa eine Zehnerpotenz von 10-100  $\mu\text{M}$  ohne Vorinkubation auf 1-10  $\mu\text{M}$  (30 min) bzw. 0,1-1  $\mu\text{M}$  Metazachlor nach 30- bzw. 90minütiger Vorinkubation bei  $14^\circ\text{C}$  (vgl. Table 11, fettgedruckte Daten). Wurde bei  $30^\circ\text{C}$  vorinkubiert, war grundsätzlich ein über 50 %iger Verlust der Enzymaktivität zu beobachten, die vollständige Hemmung der Elongaseaktivität durch Metazachlor trat jedoch binnen kürzerer Zeit ein.

Table 11: Metazachlor-induced inhibition of recombinant *Arabidopsis* seed elongase.

Microsomal protein of *FAE1* yeast was preincubated with increasing concentrations of metazachlor before elongase activity was determined by 20-min processing ( $30^\circ\text{C}$ ) of [ $^{14}\text{C}$ ]oleoyl-CoA and malonyl-CoA. 100 % means activity of elongase without preincubation ( $40 \text{ nmol h}^{-1} \text{ mg}^{-1} \text{ protein}$ ). Sensitivity of inhibition increased about 10fold within a 30-90 min period of preincubation (see bold printed data).

Preincubation	0 min	$14^\circ\text{C}$ , 30 min	$14^\circ\text{C}$ , 90 min	$30^\circ\text{C}$ , 30 min
	% of elongase activity			
Control	100	91	105	41
$10^{-7}$ M Metazachlor	-	-	77	-
$10^{-6}$ M Metazachlor	89	31	<b>17</b>	0
$10^{-5}$ M Metazachlor	80	<b>20</b>	4	0
$10^{-4}$ M Metazachlor	<b>27</b>	-	-	-

(-), not examined

### 3.4 Reduktion der epicuticularen Wachse

#### 3.4.1 Charakterisierung der Wachskomponenten

Nachdem die Chloracetamid-bedingte Reduktion von VLCFAs innerhalb der Zelle nachgewiesen worden war, wurden als weiteres Kompartiment mit sehr langkettigen Verbindungen die epicuticularen Wachse, die auf der Oberfläche von Blättern und Sproß der Pflanze haften, untersucht.

Die epicuticularen Wachse der Keimblätter wurden durch kurzes Eintauchen in Chloroform abgewaschen und die Komponenten dieser löslichen Wachsfraktion durch Derivatisierung der Fettsäuren und Alkohole für die gaschromatographische Analyse zugänglich gemacht. Vorliegende Wachsester wurden unter diesen Bedingungen gespalten, so daß durch diese Analyse die „monomeren“ Wachskomponenten quantifiziert werden konnten (Figure 19).

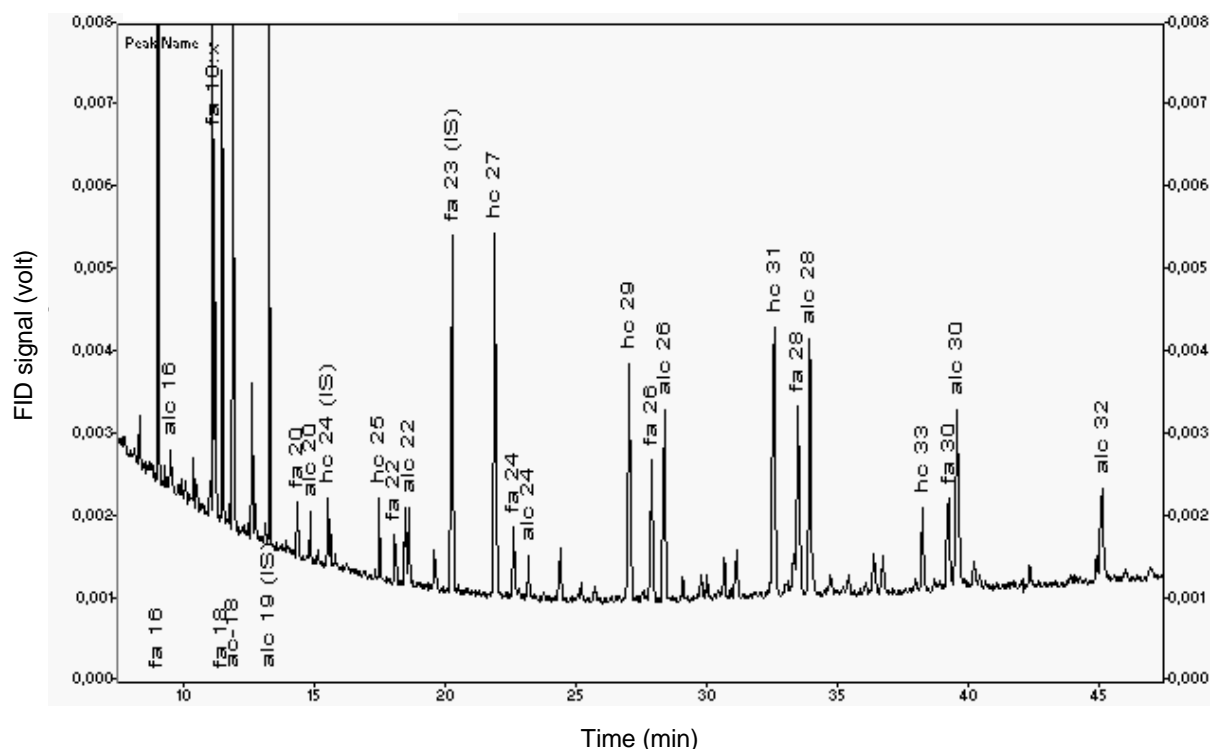


Figure 19: GC/FID analysis of epicuticular waxes of *Cucumis sativus* cotyledons.

Cotyledons of 6-day old seedlings were extracted by washing with chloroform. The wax components were subjected to transmethylation and silylation yielding fatty acid methyl esters (fa), trimethylsilyl ethers of alcohols (alc) and hydrocarbons (hc). Aldehydes were not examined. The mixture could be separated in a single run using a SPB5 capillary column. Components were identified by standards and GC/MS.

Das resultierende Gemisch der Wachskomponenten enthielt C16-C32-Fettsäuren (als Fettsäuremethylester), C16-C34-Alkohole (als Trimethylsilylether) und C25-C33-Alkane, die ohne weitere Vorreinigung gaschromatographisch getrennt werden konnten. Unter den sehr langkettigen Komponenten waren die Hauptbestandteile 28:0-Fettsäure, 28:0-Alkohol und C31-Alkan.

### 3.4.2 Einfluß von Metazachlor auf die Wachszusammensetzung

Um den Einfluß von Metazachlor auf die Zusammensetzung der Gurke-Wachse zu untersuchen, wurden 4 Tage alte Keimlinge für 48 h in herbizid-haltige Nährlösung umgesetzt, ehe die Chloroform-lösliche Fraktion der epicuticularen Wachse extrahiert und gaschromatographisch analysiert wurde (Table 12; Figure 20, S. 57).

Die Oberflächenwachse bestanden aus gesättigten VLCFAs (19 %), Alkoholen (37 %) sowie einer Fraktion von Alkanen (17 %). Metazachlor reduzierte in Abhängigkeit der Konzentration die Summe sehr langkettiger (> C18) Komponenten der Oberflächenwachse von Gurkenkotyledonen um bis zu 40 % im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. Die Wirkung (10 µM Metazachlor) erstreckte sich insbesondere auf VLCFAs (-43 %) und Alkane (-48 %); Alkohole wurden um 25 % reduziert. Epicutulare Wachse aus Gurke enthielten ferner ca. 30 % (Anteil stark schwankend) C16-C18-Fettsäuren, deren Gehalt durch Metazachlor nicht signifikant beeinflusst wurde. Somit war der insgesamt bedingte Rückgang der Menge epicuticularer Wachse gering (max. -15 %).

Table 12: Effect of metazachlor on the wax composition of cucumber cotyledons.

Surface waxes of 6-day old cotyledons were obtained by chloroform extraction. Metazachlor (MZ) was applied 48 h before by adding an ethanolic stock to the aqueous solution. Wax components were determined by gas chromatography.

Herbicide treatment	Control	1 µM MZ	10 µM MZ
	nmol g <sup>-1</sup> fresh weight		
Fatty acids (C16+C18)	26 ± 10	47 ± 16	36 ± 7
Very-long-chain fatty acids	19 ± 3	16 ± 2	11 ± 1
Fatty alcohols	37 ± 5	34 ± 4	28 ± 2
Hydrocarbons	17 ± 4	12 ± 2	9 ± 1
Sum of very-long-chain wax constituents	73 ± 7	62 ± 4	48 ± 2
Total wax	99 ± 12	109 ± 16	84 ± 7



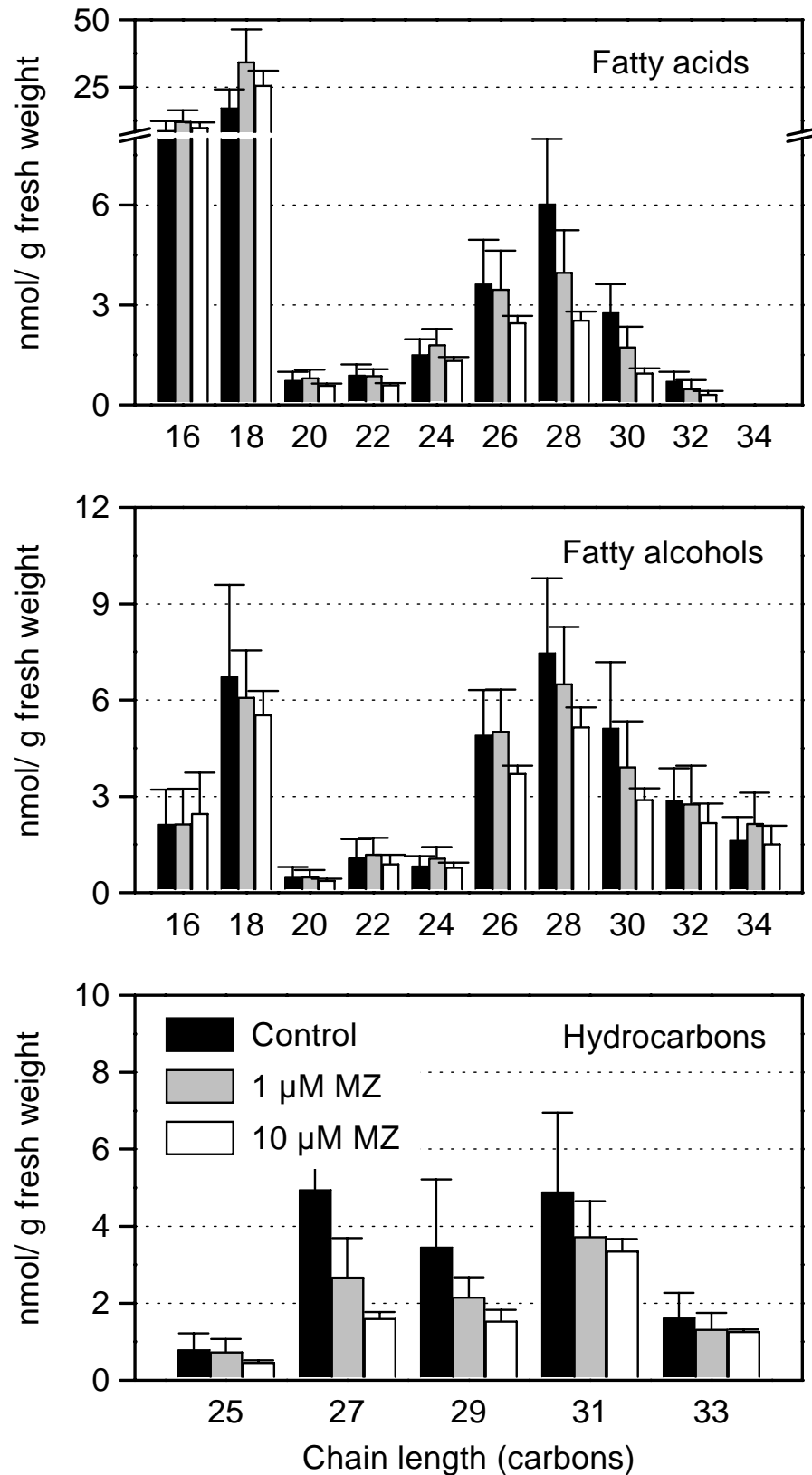


Figure 20: Metazachlor effect on composition of very-long-chain wax components.

Metazachlor (MZ) was applied to 4-day old seedlings for 48 h and epicuticular wax of the cotyledons was extracted with chloroform. Major wax components were determined by gas chromatography after derivatisation of fatty acids and alcohols.

Für die Einzelkomponenten der enthaltenen Fettsäuren, Alkohole und Alkane war charakteristisch, daß sehr langkettige Alkohole und Fettsäuren bezüglich ihrer Kettenlänge ähnlich einer Normalverteilung um das Maximum C28 enthalten auftraten ( Figure 20, S. 57). Die Kettenlänge der häufigsten Alkane war mit C27, C29 und C31 zu langkettigeren Spezies verschoben, zudem traten die Alkane im Gegensatz zu Fettsäuren und Alkoholen mit Kettenlängen *ungerader* Anzahl von Kohlenstoffatomen auf. An dieser Stelle muß erwähnt werden, daß neben den Fettsäuren und Alkoholen gerader C-Anzahl solche ungerader C-Anzahl enthalten waren, mit einem relativen Anteil von 10-15 %.

Metazachlor reduzierte sämtliche sehr langkettige Einzelkomponenten der VLCFAs, Alkohole und Alkane. Die Hemmung war im Wesentlichen in jeder der Stoffgruppen umso intensiver, je größer die Kettenlänge der zugrundeliegenden Komponente war. Dabei wurden verschiedene Komponenten gleicher Kettenlänge vergleichbar stark reduziert. Betrachtet man die Abhängigkeit der Hemmung von der Kettenlänge im Detail, wie am Beispiel der VLCFAs in Figure 21 gezeigt, wurden insbesondere C26-C32-VLCFAs reduziert, während sich C16-C24 Fettsäuren akkumulierten.

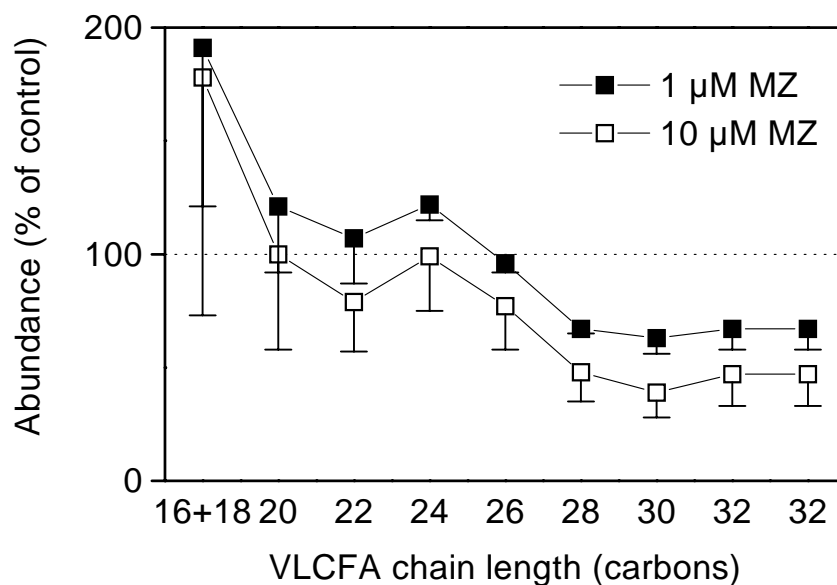


Figure 21: Chain length distribution of wax fatty acids affected by metazachlor.

Metazachlor (MZ) was applied to 4-day old seedlings for 48 h before epicuticular wax of the cotyledons was extracted with chloroform. Fatty acids were determined by gas chromatography after transmethylation of the raw wax.

Die C26-C32 VLCFAs wurden auch durch die kleinste verwendete Metazachlorkonzentration (1  $\mu\text{M}$ ) um 30-50 % reduziert, während die gleiche Konzentration auf die kürzeren Homologen noch keinen Einfluß zeigte. Damit ging die durch Metazachlor herbeigeführte Wachsreduktion vor allem auf den Rückgang dieser besonders langkettigen Fettsäuren, Alkohole (C26-C34) und Alkane (C25-C33) zurück.

### 3.4.3 *In vivo* Einbau von [ $^{14}\text{C}$ ]Malonat in Wachskomponenten

Nachdem die Wirkung von Metazachlor auf eine bereits existierende Menge epicuticularen Wachses untersucht wurde, wurde mittels  $^{14}\text{C}$ -markiertem Acetat und -Malonat der Einfluß auf die *de novo* Markierung der Wachskomponenten analysiert (Table 13).

Die Aufnahme des exogenen [ $^{14}\text{C}$ ]Malonat in die Chloroform-lösliche Fraktion der Wachse war mit 1,8 % des applizierten [ $^{14}\text{C}$ ]Malonats ca. 4mal höher als der Einbau von [ $^{14}\text{C}$ ]Acetat. Mikromolare Konzentrationen von Metazachlor hemmten den Einbau der aus beiden Vorläufern stammenden Radioaktivität in die Wachsfraktion nahezu vollständig. Eine 50 %ige Hemmung der radioaktiven Markierung der Wachsfraktion durch [ $^{14}\text{C}$ ]Malonat wurde mit etwa 10 nM Metazachlor erreicht.

Table 13: Effect of metazachlor on incorporation of [ $^{14}\text{C}$ ]malonate into wax components.

Cotyledons of 6-day old seedlings were incubated for 24 h with increasing concentrations of metazachlor and 188 kBq [ $^{14}\text{C}$ ]malonate (23  $\mu\text{M}$ ) or 227 kBq [ $^{14}\text{C}$ ]acetate (28  $\mu\text{M}$ ), respectively. Epicuticular wax was extracted with chloroform and subjected to transmethylation. The mixture including fatty acid methyl esters, alcohols and hydrocarbons was separated by radio-HPLC according to the chain length of the components.

Metazachlor	Labelling of purified wax extract		Labelling of identified VLCFAs	
	$10^2 \times \text{Bq/ sample}$	% of control	$10^2 \times \text{Bq/ sample}$	% of control
Incorporation of [ $^{14}\text{C}$ ]malonate				
Control	$27 \pm 2$	100	$14 \pm 3$	100
$10^{-9}$ M	$21 \pm 0$	79	$16 \pm 0$	119
$10^{-8}$ M	$11 \pm 2$	40	$6 \pm 1$	47
$10^{-7}$ M	$4 \pm 1$	13	$1 \pm 0$	7
$10^{-6}$ M	$2 \pm 1$	9	$0 \pm 0$	0
Incorporation of [ $^{14}\text{C}$ ]acetate				
Control	$9 \pm 3$	100	$4 \pm 2$	100
$10^{-6}$ M	$2 \pm 1$	32	$0 \pm 0$	0

Durch die flüssigchromatographische Trennung der radioaktiv markierten Wachskomponenten (Figure 22, S. 61) konnten insgesamt 9 Metabolite separiert werden, von denen 5 Metabolite den sehr langkettigen Fettsäuren 20:0, 22:0, 24:0 und 26:0 zugeordnet werden konnten. C16- und C18-Fettsäuren koeluierten unter den Laufbedingungen, weitere 3 Metabolite konnten noch nicht identifiziert werden. Aufgrund der im vorhergehenden Kapitel untersuchten Wachszusammensetzung muß davon ausgegangen werden, daß sowohl Fettsäuren, Alkohole und Alkane markiert wurden, die aufgrund der Trenneigenschaften des Systems mit zunehmender Kettenlänge (ko)eluierten.

In Gegenwart von Metazachlor gehen die (unbekannten) unpolaren Metabolite stärker zurück als die identifizierten VLCFAs Metabolite. Dieser Befund entspricht der mit steigender Kettenlänge zunehmenden Hemmung durch Metazachlor, welche anhand der Untersuchung unmarkierter Wachskomponenten nachgewiesen wurde (Abschnitt 3.4.2, S. 56).

---

Figure 22 (next page): Radio-HPLC analysis of  $^{14}\text{C}$ -labelled wax components.

Cotyledons of 6-day old seedlings were incubated with 188 kBq [ $^{14}\text{C}$ ]malonate (20  $\mu\text{M}$ ) and increasing concentrations of metazachlor for 24 h. Epicuticular wax was extracted with chloroform and subjected to transmethylation. The mixture including fatty acid methyl esters, alcohols and hydrocarbons was separated by radio-HPLC according to the chain length of the components. Components were identified by standard [ $^{14}\text{C}$ ]fatty acid methyl esters up to C26 chain length. Hydrocarbons (CH) presumably elute last because of their apolar nature, alcohols may coelute with their acid homologues (not yet identified).

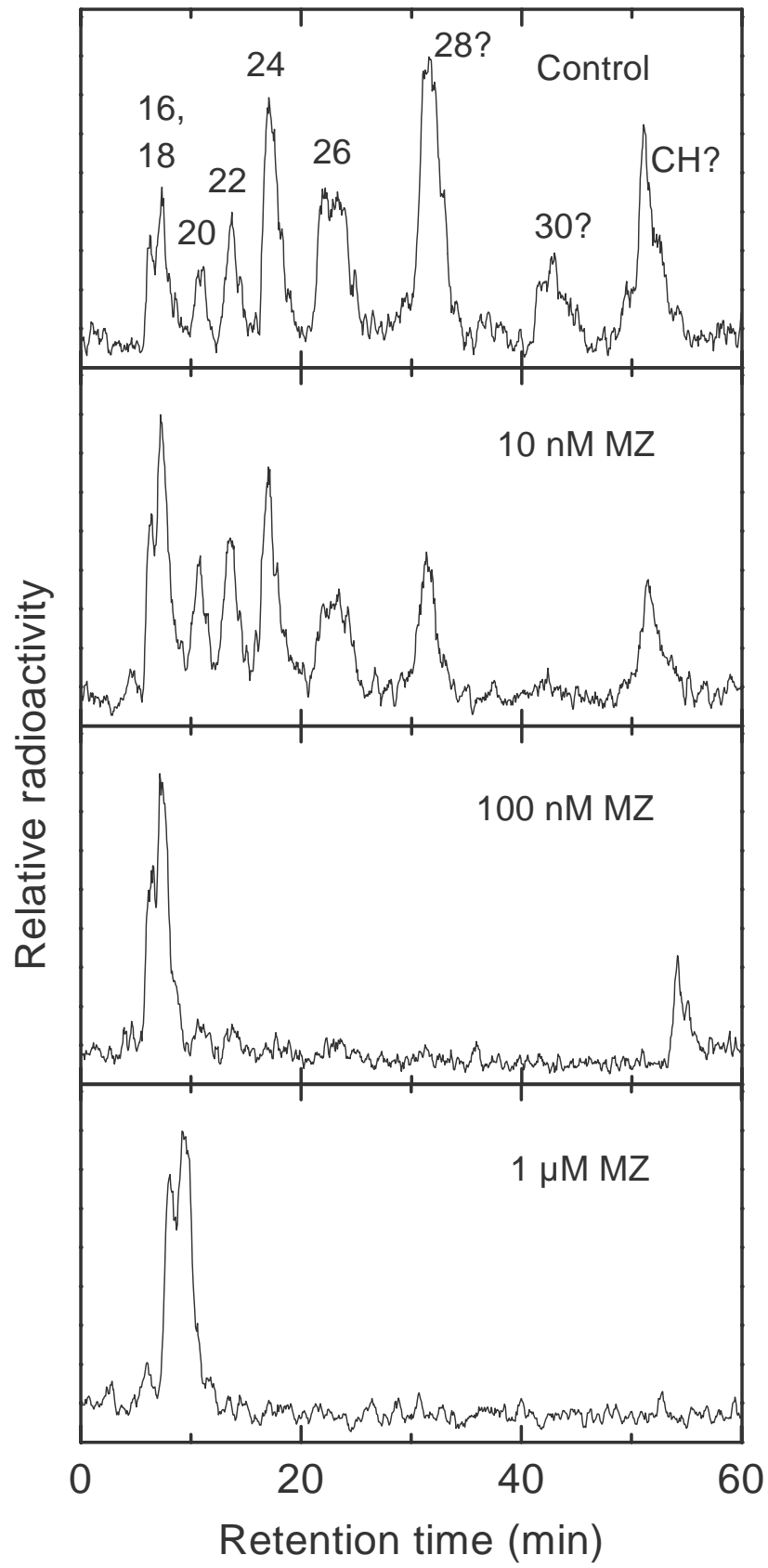


Figure 22

### 3.5 Rückgang der Plasmamembran-VLCFAs

Die durch den Einsatz von Chloracetamiden bedingte Reduktion der VLCFAs wurde nachgewiesen, indem der VLCFA-Gehalt des Gesamtorganismus bzw. die mikrosomale VLCFA-Biosynthese untersucht wurde. Um die Auswirkungen der gehemmten VLCFA-Biosynthese auf die Zusammensetzung der Membran-Fettsäuren zu untersuchen, wurden die Mikrosomen durch 2-Phasen-Verteilung in eine Fraktion der Plasmamembran und eine Fraktion der Endomembranen subfraktioniert, die beide auf ihren VLCFA-Gehalt hin untersucht wurden. Die Endomembranen enthalten v.a. die Membranen der Plastidhülle, der Mitochondrien, ER und Golgi-Apparat.

Der Gehalt sehr langkettiger Fettsäuren relativ zu den Fettsäuren des gesamten Keimlings war klein (1,4 %), gleiches gilt für die Fraktion der Chloroplasten, in der mehr als die Hälfte der in Membranen gebundenen Fettsäuren enthalten war (Table 14). In allen Kompartimenten waren Palmitin- (16:0), Öl- (18:1) und Linolsäure (18:2) die Hauptkomponenten. Die größten Unterschiede in der Fettsäure-Zusammensetzung bestanden im Sättigungsgrad und im VLCFA-Gehalt. Dieser war in der Plasmamembran 3-4mal höher als in den Endomembranen, verbunden mit einem vergleichsweise kleinen Ölsäuregehalt. Die Plasmamembran wies den höchsten Sättigungsgrad auf und war, mit bis zu 10 % gesättigten C20-C26-Fettsäuren, die VLCFA-reichste Membran. Die plastidären Fettsäuren besaßen aufgrund des etwa doppelt so hohen Linolensäure-(18:3) Gehalts den niedrigsten Sättigungsgrad der untersuchten Membranen.

Table 14: Fatty acid composition in membranes of *Cucumis sativus* seedlings.

Membrane fractions were isolated by means of two-phase-partitioning. Lipids were hydrolysed and resulting fatty acids were determined by gas chromatography. The contence of saturated very-long-chain fatty acids (C20-C26) was highest in the plasma membrane (PM). Endomembranes (EM) contain endoplasmatic reticulum, Golgi apparatus, mitochondria etc. Saturation was calculated as ratio of saturated fatty acids to unsaturated fatty acids.

	Fatty acids ( $\mu\text{mol/g fw}$ )	Saturation (ratio)	Fatty acid composition (%)					
			16:0	18:0	18:1	18:2	18:3	VLCFAs
Seedling <sup>a</sup>	9.70 $\pm$ 0.57	0.27	15.1	4.5	79.0	- <sup>b</sup>	- <sup>b</sup>	1.4
Plastid	5.67 $\pm$ 1.18	0.31	15.4	7.6	8.2	37.1	31.0	0.7
EM	0.41 $\pm$ 0.20	0.86	29.1	14.8	11.9	26.2	15.6	2.4
PM	0.36 $\pm$ 0.08	1.07	33.1	9.9	2.7	26.9	18.8	8.6

fw, fresh weight, <sup>a</sup> without roots, <sup>b</sup> these fatty acids are included in the 18:1 fraction

### 3.5.1 Charakterisierung der Plasmamembran- und Endomembran-Fractionen

Die 2-Phasen-Verteilung resultierte in einer nahezu Chlorophyll-freien oberen Phase (Plasmamembran) und einer stark grün gefärbten unteren (Endomembran-) Phase. Die Reinheit der Präparation wurde durch Analyse der Pigmente und Lipide (vgl. Table 15; S. 65), sowie der Immunreaktion eines Marker-Enzyms der Plasmamembran, einer Isoform der  $H^+$ -ATPase, nachgewiesen (Figure 23).

Dazu wurden die in den Membranfraktionen enthaltenen Proteine durch denaturierende Gelelektrophorese getrennt und mit dem gegen die Plasmamembran- $H^+$ -ATPase aus Mais (100 kDa) entwickelten monoklonalen Antikörper inkubiert. Eine positive Immunreaktion wurde nur mit der 100 kDa-Fraktion der Plasmamembran-Proteine gefunden, die Endomembran-Proteine enthielten max. 5 % der in den Mikrosomen insgesamt detektierten Menge des Enzyms.

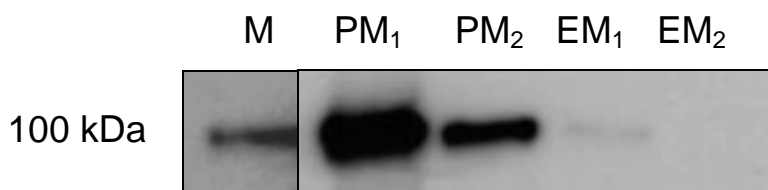


Figure 23: Immunoreaction of plasma membrane- $H^+$ -ATPase from *Cucumis sativus*.

Plasma membranes (PM) and Endomembranes (EM) were obtained by two-phase partition from 6-day-old seedlings. Proteins were separated by chromatography (SDS-PAGE). Protein content was 20  $\mu$ g (PM<sub>1</sub>, EM<sub>1</sub>) or 7  $\mu$ g (PM<sub>2</sub>, EM<sub>2</sub>), respectively. Immunoreaction was performed after dilution (1:10,000) of the monoclonal antibody (developed for maize  $H^+$ -ATPase) and determined by chemiluminescence. 10  $\mu$ g raw maize protein was used as a reference (M).

### 3.5.2 Charakterisierung der Membranlipide

Zur Untersuchung der Membranlipide wurden die isolierten Fraktionen der Plasmamembran und der Endomembranen mit einem Gemisch von Chloroform, Methanol und Wasser (modifiziert nach Bligh und Dyer, 1959) extrahiert und die enthaltenen Lipide durch Dünnschichtchromatographie getrennt. Die aufgetrennten Komponenten wurden durch Oxidation mit Schwefelsäure sichtbar gemacht und durch Vergleich der  $R_f$ -Werte mit Lipidstandards identifiziert. Diese Methode erlaubt den semiquantitativen Vergleich zwischen den aufgetragenen Proben.

Ein Aliquot der Lipide wurde jeweils einer milden alkalischen Hydrolyse unterzogen, um die unter diesen Bedingungen stabilen Cerebroside nachzuweisen. Die Phospholipide wurden quantitativ hydrolysiert und verblieben als polare Spaltprodukte in der wäßrigen Phase; die Chloroform-Phase enthielt neben den Cerebroside die aus den Phospholipiden freigesetzten Fettsäuren (Figure 24).

Die Plasmamembran enthielt praktisch keine Pigmente (Chlorophyll und Carotinoide) und enthielt bei einem 4fach höheren Proteingehalt etwa doppelt so viele Sterole wie die Fraktion der Endomembranen (Table 15, S. 65). Die Glycero- und Sphingolipide wurden anhand ihres Fettsäuregehaltes quantifiziert. Dazu wurden die entsprechenden Lipide nach randständiger Anfärbung und Vergleich der  $R_f$ -Werte mit Standardlipiden aus der Dünnschichtfolie resolvtisiert, transmethyliert und per Gaschromatographie analysiert (Table 16, S. 65).

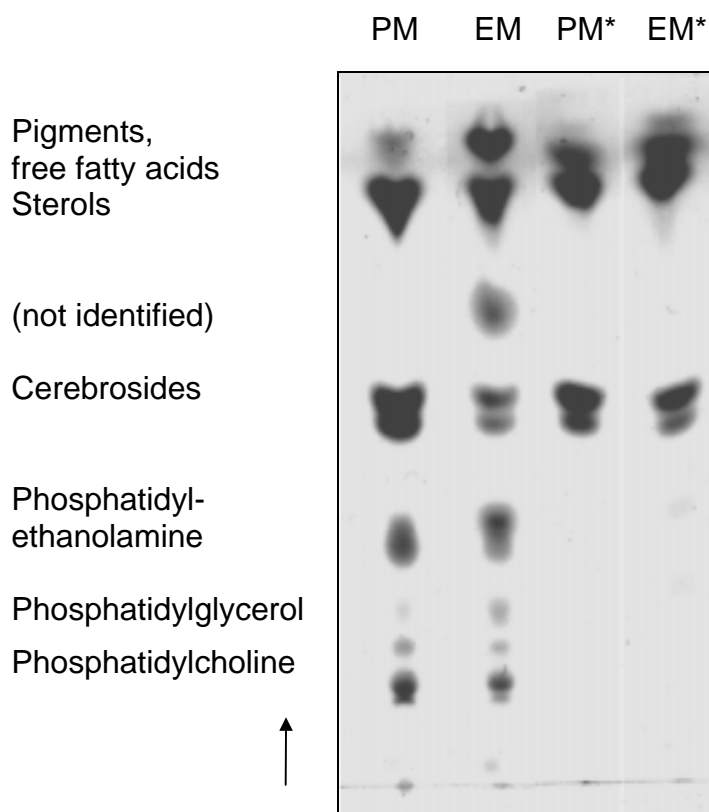


Figure 24: TLC analysis of membrane lipids of *Cucumis sativus* seedlings.

Plasma membranes (PM) and endomembranes (EM) were obtained after two-phase partition. Lipids were extracted and analysed using  $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}:\text{H}_2\text{O}$  (65:25:4, v/v) on Silica Gel 60. Lipids were visualized with 10 %  $\text{H}_2\text{SO}_4$  and identified by standards. An aliquot was subjected to mild alkaline hydrolysis (shown by asterisks) yielding non-saponifiable cerebroside only.



In beiden Membranfraktionen waren die Lipid-Fettsäuren zu etwa 80 % in Phosphatidylcholin (PC), -ethanolamin (PE) und -glycerol gebunden, außerdem waren Fettsäuren auch in Cerebrosiden, d.h. Sphingolipiden, enthalten. Aufgrund der schwer hydrolysierbaren Fettsäure-Amidbindung wurden die in Cerebrosiden enthaltenen Fettsäuren nur partiell hydrolysiert, diese Daten sind daher nicht quantitativ zu betrachten. Vorhandene Hydroxy-VLCFAs (Cahoon und Lynch, 1991) wurden nicht analysiert (vgl. Diskussion). Die Ergebnisse zeigen, daß VLCFAs jeweils in den Hauptkomponenten aller Membranlipide enthalten waren, ihr relativer Anteil war in den Cerebrosiden am höchsten. In der Plasmamembran war der Cerebrosid-Anteil mit bis zu 10 % etwa doppelt so groß wie in den Endomembranen, außerdem war in den Plasmamembran-Cerebrosiden der VLCFA-Anteil 4mal so groß.

Table 15: Data showing the purity of plasma membrane preparation.

Membrane fractions were obtained from 6-day old *Cucumis sativus* seedlings by two-phase partition. Endomembranes (EM) contain endoplasmatic reticulum, Golgi apparatus, mitochondria etc.

	Plasma membrane	Endomembranes
Protein (mg/g fresh weight)	0.11 ± 0.03	0.42 ± 0.14
Presence of H <sup>+</sup> -ATPase (% distribution)	> 95	< 5
Sterols (in % of lipids separated by TLC))	45 ± 12	25 ± 8
Chlorophyll content (% distribution)	3 ± 2	97 ± 3
VLCFA content (nmol/g fresh weight)	30 ± 4	8 ± 2

Table 16: Fatty acid composition of cucumber membrane lipids.

Membrane fractions were obtained from 6-day old *Cucumis sativus* seedlings by two-phase partition. Lipid-bound fatty acids were analysed after TLC separation of lipids followed by alkaline and acid hydrolysis of lipids and fatty acid analysis by GC/FID.

Lipid class	Endomembranes		Plasma membrane	
	Fatty acids	VLCFAs	Fatty acids	VLCFAs
	mol %		mol %	
Phosphatidylcholine <sup>a</sup>	43 ± 5	1.6 ± 0.8	44 ± 4	3.7 ± 1.0
Phosphatidylethanolamine	32 ± 6	1.3 ± 0.6	39 ± 6	4.6 ± 0.6
Cerebrosides <sup>b</sup>	4 ± 1	0.4 ± 0.1	8 ± 3	1.7 ± 0.7
not identified	21 ± 5	0.6 ± 0.1	11 ± 3	1.0 ± 0.2

<sup>a</sup> including some (< 20 %) Phosphatidylglycerol, -inositol not separated under these conditions, <sup>b</sup> qualitative data, hydroxy-VLCFAs not included

### 3.5.3 Wirkung von Metazachlor auf die Plasmamembran-Fettsäuren

Da die Plasmamembran die VLCFA-reichste Membran innerhalb der Zelle war, wurde insbesondere der Einfluß der Chloracetamide auf deren VLCFA-Gehalt untersucht. Auf der Basis der 2-Phasen-Verteilung konnten die Plasmamembran-Fettsäuren von mit steigenden Herbizidkonzentrationen angezogenen Pflanzenchargen miteinander verglichen werden. Dazu wurden die Pflanzen nach 3 Tagen Keimung weitere 3 Tage mit Herbizid angezogen, ehe die Keimlinge (ohne Wurzeln) geerntet und die Membranfraktionen isoliert wurden.

Figure 25 (S. 67) zeigt die gaschromatographische Analyse der in den Lipiden der Plasma- bzw. der Endomembranen enthaltenen Fettsäuren. Metazachlor zeigte in Konzentrationen von 1-100  $\mu\text{M}$  keinen Einfluß auf die Gesamtmenge der Membran-Fettsäuren, der Gehalt sowie der Sättigungsgrad der Hauptkomponenten (C16- und C18-Fettsäuren) wurde auch durch die höchste Herbizidkonzentration (100  $\mu\text{M}$ ) nicht beeinflusst.

Metazachlor reduzierte spezifisch den Gehalt sehr langkettiger gesättigter Fettsäuren der Plasmamembran, wobei eine 50 %ige Reduktion mit ca. 10  $\mu\text{M}$  erreicht wurde. Wie aus Figure 25 (S. 67) ersichtlich, wurde Arachinsäure (20:0) nicht reduziert, der Gehalt längerer C22-C26-Homologe wurde, unabhängig von der VLCFA-Kettenlänge, mit steigenden Konzentrationen Metazachlor empfindlich gesenkt. Diese Herbizidwirkung war gleichermaßen mit VLCFAs ungerader Kettenlänge (23:0 und 25:0), deren Anteil an den Gesamt-VLCFA ca. 15 % betrug, zu beobachten. Die Metazachlor-abhängige Reduktion der VLCFAs wurde tendenziell auch in den Endomembranen gefunden, wobei die niedrigere Empfindlichkeit vor allem auf den höheren Gehalt der nicht hemmbaren Arachinsäure (20:0) zurückzuführen ist. Der Gehalt der Homologen  $> \text{C}20$  sinkt durch 100  $\mu\text{M}$  Metazachlor von 1,6 % auf 0,7 %.

---

Figure 25 (next page): Effect of metazachlor upon membrane fatty acids of cucumber.

Cucumber seedlings germinated 3 days before metazachlor (MZ) was applied for another 3 days. Plasma membranes (PM) and endomembranes (EM) were obtained by two-phase partition using a microsomal fraction. Fatty acids and very-long-chain fatty acids (VLCFA) were analysed by gas chromatography after lipid hydrolysis and extraction into hexane.

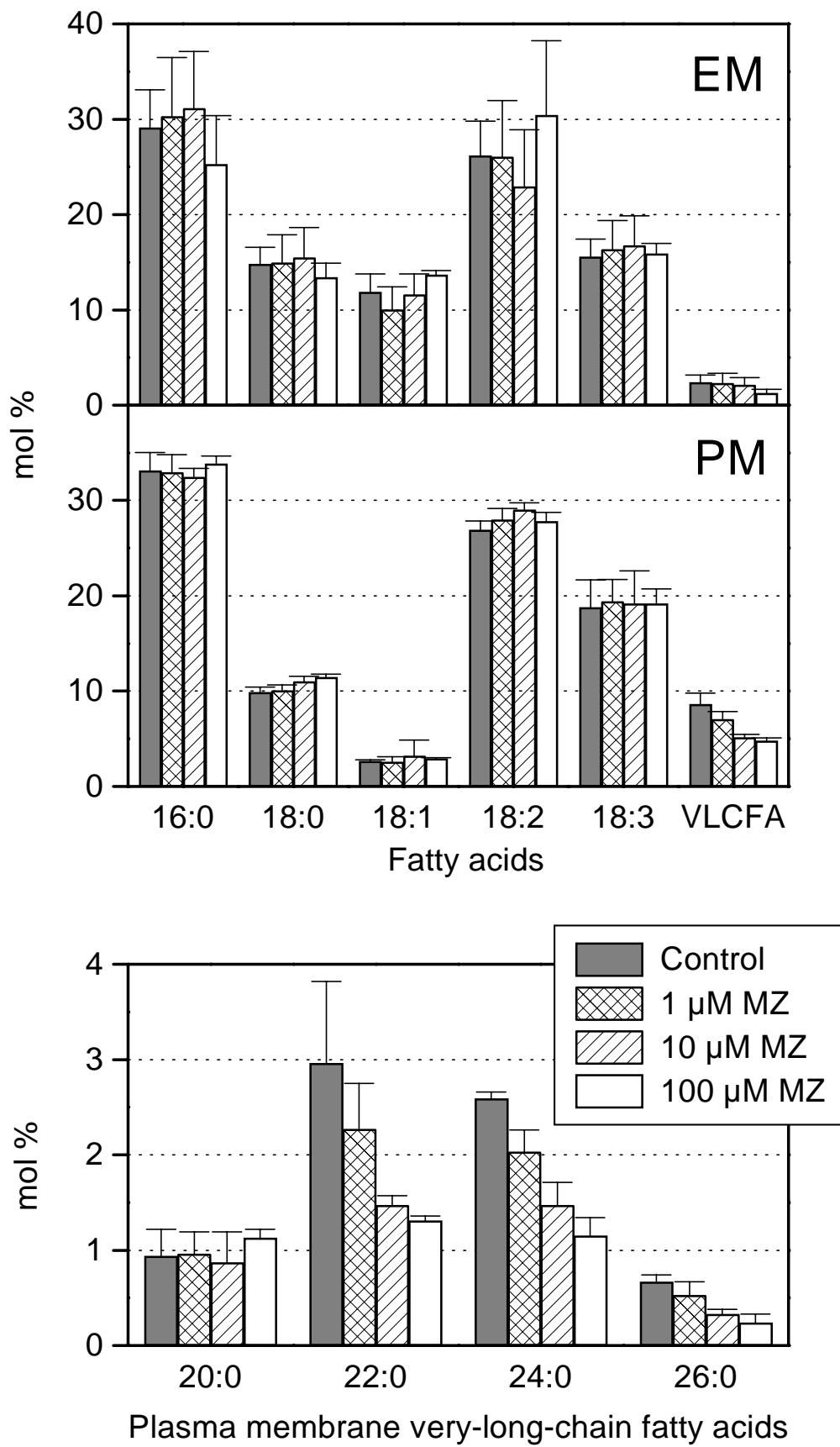


Figure 25

### 3.5.4 *In vivo* Einbau von [ $^{14}\text{C}$ ]Malonat in Plasmamembran-VLCFAs

Der Rückgang *endogener* Plasmamembran-VLCFAs durch Metazachlor war im Vergleich zur VLCFA-Reduktion in *FAE1*-transformierter Hefe und Sojazellen mit einem  $I_{50}$  von ca.  $100\ \mu\text{M}$  wenig empfindlich. Um die Neubildung bzw. den Transport von VLCFAs zur Plasmamembran unter dem Einfluß von Chloracetamiden zu untersuchen, wurde die radioaktive Markierung der VLCFAs durch exogenes [ $^{14}\text{C}$ ]Malonat in Gegenwart von Metazachlor verfolgt. Nach 24 h Inkubation wurden max. 1 % des angebotenen [ $^{14}\text{C}$ ]Malonats in Fettsäuren der Plasmamembran inkorporiert. Wie die flüssigchromatographische Trennung der markierten Fettsäuren (Figure 26) zeigt, wurde exogenes Malonat in C16-C24-Fettsäuren inkorporiert, in Gegenwart von  $1\ \mu\text{M}$  Metazachlor unterblieb die Markierung der VLCFAs selektiv und vollständig.

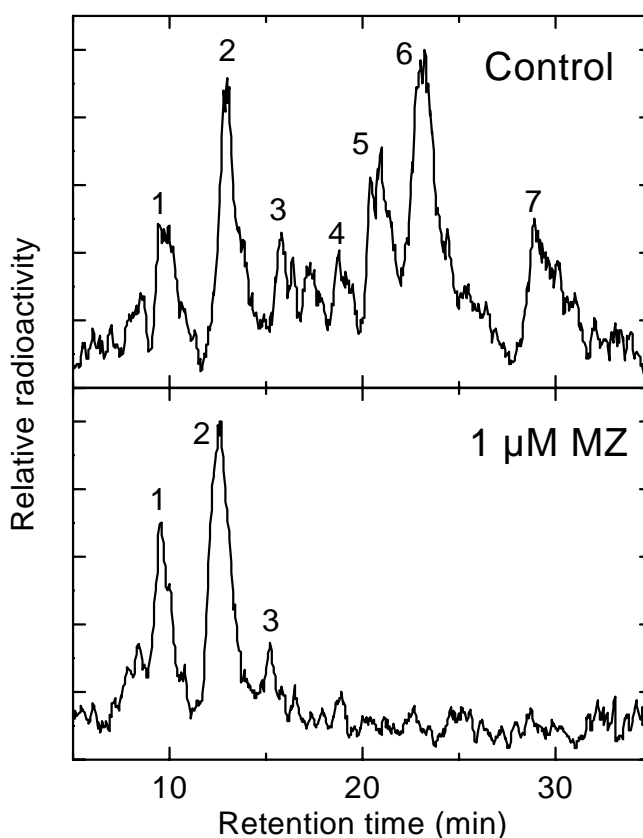


Figure 26: Radio-HPLC analysis of  $^{14}\text{C}$ -labelled plasma membrane fatty acids.

Cucumber seedlings grew 7 days before leaf tissue was allowed to incorporate  $1\ \mu\text{M}$  metazachlor and  $16\ \mu\text{M}$  [ $^{14}\text{C}$ ]malonate for 24 h. Plasma membranes were obtained by two-phase partition and fatty acids were analysed by radio-HPLC after lipid hydrolysis and extraction into hexane. Labelled 18:2 (1), 18:1+16:0 (2), 18:0 (3), 20:0 (4), 22:0 (6) und 24:0 (7) were identified by [ $^{14}\text{C}$ ]standards. Peak (5) was not identified.

Der durch Metazachlor bedingte VLCFA-Rückgang war sowohl in der Plasmamembran als auch in den Endomembranen in Abhängigkeit der Herbizidkonzentration zu beobachten (Figure 27). In der Plasmamembran war die inkorporierte Radioaktivität zu ca. 70 % auf VLCFAs konzentriert, während in den Endomembranen langkettige und sehr langkettige Fettsäuren etwa im Verhältnis 1:1 markiert wurden. In beiden Membranfraktionen gingen die VLCFAs mit 10-100 nM Metazachlor um die Hälfte zurück, wobei die Wirkung in der Plasmamembran, im Hinblick auf die Wirkstoffkonzentration, tendenziell unempfindlicher war. Somit reagierte die anhand des [ $^{14}\text{C}$ ]Malonat-Einbaus untersuchte Hemmung der VLCFA-Neubildung ca. 100mal empfindlicher als die in den Keimlingen bestimmte Reduktion *endogener* VLCFAs.

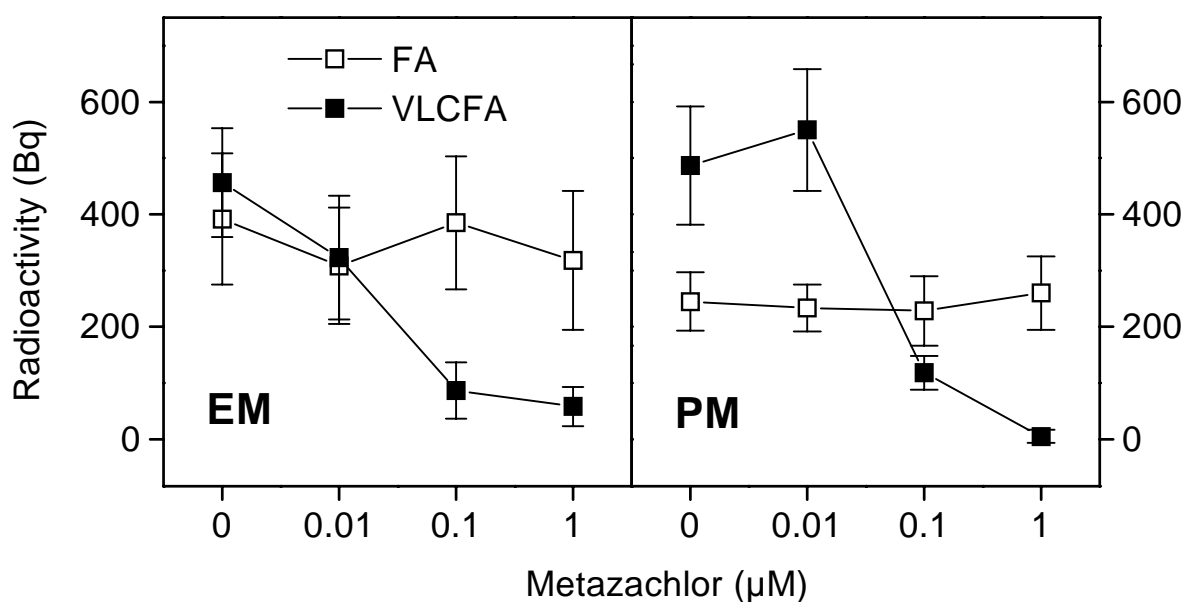


Figure 27: Effect of metazachlor on labelling of membrane fatty acids.

Cucumber seedlings grew 7 days before leaf tissue was allowed to incorporate 1 µM metazachlor and 16 µM [ $^{14}\text{C}$ ]malonate for 24 h. Endomembranes (EM) and plasma membranes (PM) were obtained by two-phase partition and fatty acids were analysed by radio-HPLC after lipid hydrolysis and extraction into hexane. Metabolites determined by radio-HPLC are distinguished in very-long-chain fatty acids (VLCFA) and C16-C18 fatty acids (FA).

### 3.6 Herbizid-Test

Die mit 1  $\mu\text{M}$  Metazachlor beobachtete Hemmung der VLCFA-Bildung wurde in gleicher Weise mit anderen Chloracetamiden (Butachlor, Metolachlor) sowie dem Oxyacetamid Flufenacet gefunden (Table 17).

*Rac*-Metolachlor senkte den VLCFA-Gehalt weniger stark (60 % statt > 90 %), allein wirksam war das *S*-Enantiomer. Im Gegensatz dazu hemmten beide Enantiomere des Phosphinosulfonats sehr wirksam die VLCFA-Bildung, ebenso das Triazol Cafenstrol, das Tetrazolinon Fentrazamid und das Benzosulfonat Ethofumesat, die eine mit Chloracetamiden nicht vergleichbare Molekülstruktur besitzen (Strukturen s. Figure 4, S. 15). Das Thiocarbamat EPTC sowie das als Ionophor wirkende Monensin hatten in der applizierten Konzentration von 1  $\mu\text{M}$  keinen signifikanten Einfluß auf den VLCFA-Gehalt.

Table 17: Inhibition of VLCFA synthesis with different herbicides.

Cotyledons of 5-day old *Cucumis sativus* seedlings were incubated with 2  $\mu\text{M}$  [ $^{14}\text{C}$ ]malonate and 1  $\mu\text{M}$  herbicide for 6 h. Labelling of total VLCFA content was quantified by radio-HPLC. For examination of plasma membrane VLCFAs, leaf tissue was incubated with 16  $\mu\text{M}$  [ $^{14}\text{C}$ ]malonate and 1  $\mu\text{M}$  herbicide for 24 h. Plasma membranes were obtained by two-phase partition and fatty acids determined by radio-HPLC.

Herbicide class	Herbicide applied (each 1 $\mu\text{M}$ )	% Inhibition of VLCFA-synthesis	% reduction of plasma membrane VLCFAs
Oxyacetamide	Flufenacet	95 $\pm$ 3	-
Chloroacetamide	Metazachlor	89 $\pm$ 1	97 $\pm$ 6
	Butachlor	87 $\pm$ 4	-
	<i>S</i> -Metolachlor	64 $\pm$ 3	69 $\pm$ 10
	<i>rac</i> -Metolachlor	60 $\pm$ 2	-
	<i>R</i> -Metolachlor	1 $\pm$ 6	-5 $\pm$ 6
Phosphinosulfonate	RH-4642 (-)	87 $\pm$ 1	-
	RH-4641 (+)	82 $\pm$ 1	-
Triazole	Cafenstrol (CH-900)	84 $\pm$ 4	96 $\pm$ 5
Tetrazolinone	Fentrazamide	83 $\pm$ 3	83 $\pm$ 7
Benzosulfonate	Ethofumesate	63 $\pm$ 4	-
Thiocarbamate	EPTC	18 $\pm$ 4	-
	Monensin	10 $\pm$ 9	20 $\pm$ 7

(-), not examined

Diese Ergebnisse wurden sowohl für die VLCFA-Neusynthese, gemessen anhand des Einbaus von [ $^{14}\text{C}$ ]Stearinsäure in Blattscheiben aus Keimblättern, als auch für den VLCFA-Gehalt der Plasmamembran, gemessen anhand der Markierung von Plasmamembran-VLCFAs durch [ $^{14}\text{C}$ ]Malonat, gefunden.

Mit dem für die rekombinante Fettsäureelongase aus Hefe entwickelten Testsystem wurde die Aktivität des chiralen Chloracetamids Metolachlor, dem Triazol Cafenstrol und dem Thiocarbamat EPTC überprüft (Table 18, Strukturen s. Figure 4, S. 15).

Am empfindlichsten wirkte Cafenstrol, mit einem  $I_{50}$ -Wert im nanomolaren Bereich, dies bedeutet gegenüber dem bisher getesteten Metazachlor eine etwa 100fach höhere Hemmaktivität. Metolachlor wirkte ausschließlich als *S*-Enantiomer mit einem dem Metazachlor vergleichbaren  $I_{50}$ -Wert von ca.  $1\ \mu\text{M}$ , *R*-Metolachlor beeinflusste auch in höheren Konzentrationen die 18:1-Elongation nicht oder nur sehr schwach. Das getestete Thiocarbamat, EPTC, zeigte gleichfalls nur in sehr hoher Dosierung eine tendenzielle Wirkung auf die Fettsäure-Elongation.

Table 18: Inhibition of recombinant fatty acid elongase *in vitro*.

Microsomal proteins of *FAE1* yeast were preincubated with different herbicides for 90 min at  $14^\circ\text{C}$ . Fatty acid elongation was determined by processing of  $15\ \mu\text{M}$  [ $^{14}\text{C}$ ]oleoyl-CoA and  $100\ \mu\text{M}$  malonyl-CoA within 20 min at  $30^\circ\text{C}$  yielding  $^{14}\text{C}$ -labelled 20:1.

Herbicide	$10^{-9}\ \text{M}$	$10^{-8}\ \text{M}$	$10^{-7}\ \text{M}$	$10^{-6}\ \text{M}$	$10^{-5}\ \text{M}$	$10^{-4}\ \text{M}$
	Elongation of [ $^{14}\text{C}$ ]Oleoyl-CoA (% of control)					
Metazachlor			$77 \pm 6$	$17 \pm 10$	$4 \pm 4$	
<i>S</i> -Metolachlor			$74 \pm 6$	$69 \pm 11$	$10 \pm 5$	
<i>R</i> -Metolachlor					$101 \pm 11$	$73 \pm 10$
Cafenstrole	$82 \pm 16$	$26 \pm 15$	$0 \pm 0$			
EPTC					$98 \pm 8$	$71 \pm 9$

## 4 DISKUSSION

### 4.1 Wirkungsweise der Chloracetamide *in vivo*

Ausgangspunkt der Untersuchungen zur Biosynthese sehr langkettiger Fettsäuren (VLCFAs) und ihrer Hemmung durch Chloracetamide waren einerseits die Arbeiten von Ebert und Ramsteiner (1984) und Tevini und Steinmüller (1987), die von einer Reduktion sehr langkettiger Komponenten epicuticularer Wachse berichteten. Andererseits war der einzige konkrete Hinweis auf eine Hemmung der zugrundeliegenden VLCFA-Biosynthese, gefunden in der Grünalge *Scenedesmus acutus* (Schmalfuß *et al.*, 1998), zu Beginn der Arbeit noch nicht gesichert.

#### 4.1.1 VLCFA-Markierung durch verschiedene exogene [ $^{14}\text{C}$ ]Vorläufer

Um den in *S. acutus* zunächst gewonnenen Befund, die Chloracetamid-induzierte Hemmung unpolarer Ölsäuremetabolite, auf höhere Pflanzen zu übertragen, wurde die Metabolisierung  $^{14}\text{C}$ -markierter exogener Fettsäuren und Fettsäure-Vorläufer in Blattstücken aus *Cucumis sativus* untersucht (Table 7, S. 38).

Mit dem Ziel, eine möglichst vollständige Solubilisierung der inkorporierten Radioaktivität zu erreichen, wurde der basischen Hydrolyse von Phospholipiden eine saure Hydrolyse nachgeschaltet, die auch teilweise ether- und amidartige Bindungen möglicher Fettsäuremetabolite spaltet. Die hier angewandte saure Hydrolyse durch Dioxan/HCl (ersetzbar durch wäßrige HCl) wurde ursprünglich zur Solubilisierung von Zellwandbestandteilen eingesetzt (Langebartels und Harms, 1985), da Fettsäuren aus chemisch resistenten pflanzlichen Biopolymeren wie Cutin, Suberin und Sporopollenin hiermit (teilweise) gelöst werden können. Daneben werden durch die saure Hydrolyse insbesondere in Membranen enthaltene Sphingolipide gespalten (Hechtberger *et al.*, 1994), deren Fettsäure-Rest durch eine Amidbindung an den Grundkörper Sphingosin (ein C18-Aminoalkohol) gebunden ist.

Während VLCFAs in der Grünalge *S. acutus* nur im sauren Hydrolysat gefunden wurden (Mayer, 1997) und somit Sphingolipiden bzw. Zellwandlipiden zuzuordnen sind, bilden VLCFAs in höheren Pflanzen die Acyl-Komponenten von Phospho- und Sphingolipiden (Moreau *et al.*, 1998). Dementsprechend wurden in beiden Hydrolysaten VLCFAs gefunden



(Table 8, S. 39), was durch die Lipidanalyse der zellulären Membranen bestätigt werden konnte (Table 16, S. 65).

Durch die Markierungsexperimenten und die Lipidanalyse wird deutlich, daß die Gurke-VLCFAs zum größeren Teil aus den basisch hydrolysierbaren Phospholipiden stammen. Die saure Hydrolyse löste jedoch (abhängig von eingesetzten VLCFA-Vorläufer) etwa ein Drittel der markierten VLCFAs aus den Zellresten, das ist mehr, als aufgrund einer Nachextraktion zu erwarten wäre. Darüberhinaus wurde durch die saure Hydrolyse anteilig mehr VLCFAs freigesetzt als durch basische Hydrolyse, entsprechend ihrer Beteiligung am Aufbau von Sphingolipiden (Cahoon und Lynch, 1991) und Cuticula-Lipiden (von Wettstein-Knowles, 1993). Da anhaftende epicuticulare Wachse durch Waschen der Keimlinge mit Chloroform entfernt wurden, repräsentiert der erhaltene Fettsäure-Extrakt somit die Summe aller intrazellulären, insbesondere in Membranen gebundenen Fettsäuren.

Die Identifizierung der VLCFAs erfolgte durch markierte Standard-FSMEs (Figure 9, S. 40) und wurde durch den Vergleich der Retentionszeiten mit HPLC-MS-identifizierten Algen-VLCFAs (Mayer, 1997) bestätigt. Der Einbau der unmittelbaren Edukte der VLCFA-Biosynthese, Acetat, Malonat und Stearinsäure (Table 8, S. 39), nicht aber des Carotinoid-Vorläufers Mevalonat (Table 7, S. 38), belegt die Identität der VLCFAs zusätzlich.

Obwohl der Anteil endogener VLCFAs an den Gesamtfettsäuren der Zelle mit ca. 1 % sehr klein ist (vgl. Table 14, S. 62), werden exogene Vorläufer, insbesondere Malonat (vgl. Harwood, 1998), überproportional in VLCFAs eingebaut. Dies ist als eine Folge der schnelleren Verfügbarkeit des exogenen Malonats im Cytosol, wo es ausschließlich der Fettsäure-Elongation als Substrat dient, zu sehen (vgl. Abschnitt 4.1.3, S. 75). Bedingt durch den sequentiellen Charakter der Fettsäure-Elongation werden die Fettsäure-Acyketten mehrfach durch [ $^{14}\text{C}$ ]Malonat markiert, wodurch sich die VLCFA-Markierung zusätzlich erhöht.

#### 4.1.2 *In vivo* Hemmung der VLCFA-Biosynthese

Zunächst konnte auf der Basis eines Kurzzeit-Experiments, der Analyse von markierten Gesamt-Fettsäuren nach Inkubation von Gurken-Kotyledonen in Gegenwart von  $^{14}\text{C}$ -markiertem Substrat und Metazachlor, der Einfluß auf den Fettsäure-Metabolismus nachgewiesen werden (Matthes *et al.*, 1998; vgl. Table 8, S. 39). Metazachlor hemmte den Einbau von Acetat, Malonat und Stearinsäure in gesättigte sehr langkettige (C20-C24)

Fettsäuren mit hoher Empfindlichkeit ( $I_{50}$  ca. 10-100 nM). Da insbesondere Malonat und Stearinsäure unmittelbare Substrate für die Bildung von Arachinsäure (20:0) sind, muß der zugrundeliegende Stoffwechselschritt, d.h. die Prozessierung von 18:0 zu 20:0 (und 22:0, 24:0), gehemmt sein. Die Spezifität der Hemmung wird dadurch bestätigt, daß alle drei verwendeten Vorläufer die gleiche Hemmintensität zeigen und die Bildung der gesättigten und ungesättigten C16-C18 Fettsäuren aus Acetat oder Stearinsäure nicht beeinflusst wird.

In nachfolgenden *in vivo* Untersuchungen mit Gerste, Mais (Figure 11, S. 42), Soja-Zellkulturen (Table 9, S. 47) und transgener Hefe wurde ebenfalls eine gleichermaßen empfindliche Hemmung der VLCFA-Biosynthese gefunden (vgl. Übersicht Table 19, S. 75). In Mais war die Sensitivität deutlich geringer (vgl. Figure 11, S. 42), was durch eine weniger sensitive Fettsäure-Elongation oder eine bessere Detoxifizierung erklärt werden könnte.

Obwohl die Hemmung der VLCFA-Biosynthese trotz eines vorhandenen VLCFA-Hintergrunds in nichtmarkierten Lipiden meßbar ist, wird die Wirkung anhand der Neusynthese markierter VLCFAs sehr viel deutlicher (Table 19, S. 75). Im ersten Fall wurde eine 50%ige VLCFA-Reduktion mit ca. 10  $\mu$ M Metazachlor festgestellt, im zweiten Fall wurde diese Hemmung mit z.T. nanomolaren Wirkstoffkonzentrationen beobachtet. Hier wurden nur die VLCFAs bestimmt, die trotz der gleichzeitigen Hemmung der VLCFA-Biosynthese noch synthetisiert werden können, während im ersten Fall die Erweiterung eines unbekanntem VLCFA-Vorrats durch die *nachträgliche* Herbizidgabe (vgl. Material und Methoden) reduziert wird.

In den Untersuchungen mit Soja-Zellkulturen kommt dies dadurch zum Ausdruck, daß die Hemmung durch steigende Metazachlor-Konzentrationen um nicht mehr als 50 % erhöht werden kann (vgl. Table 9, S. 47). Da sich die Zellen während der Behandlungsperiode etwa verdoppelten, kann man von einer mehr als 50 %igen Hemmung der in diesem Zeitraum neusynthetisierten VLCFAs ausgehen. Die gefundene hohe Empfindlichkeit der Soja-VLCFA-Biosynthese ist somit eine Folge der Datenaufnahme nach der Wachstumsperiode, wahrscheinlich begleitet von einer im Vergleich zu Keimlingen verbesserten Aufnahme des Wirkstoffs in Suspensions-Zellkultur.

Die empfindliche Hemmung der pflanzlichen VLCFA-Biosynthese stimmt sehr gut mit der in der Grünalge gefundenen VLCFA-Reduktion überein (Matthes, 1996; Mayer, 1997, Schmalfuß *et al.*, 1998). Im Gegensatz zu den ungesättigten Sporopollenin-VLCFAs der Grünalge sind die pflanzlichen VLCFAs grundsätzlich gesättigt und sind auch Bestandteil (leicht löslicher) Membranlipide (vgl. vorhergehender Abschnitt). Sowohl in der Grünalge

(Couderchet *et al.*, 1998) als auch in Gurken- und Gersten-Keimlingen (vgl. Table 6, S. 37; Figure 8, S. 39) war die Hemmung der Fettsäure-Elongation von einer Wachstumshemmung begleitet. Somit ist die schnelle, sensitive und generelle Hemmung der VLCFA-Biosynthese, im Zusammenhang mit der phytotoxischen Wirkung in Feld, als primärer Angriffspunkt der Chloracetamide zu sehen.

Table 19: Inhibition of very-long-chain fatty acid biosynthesis by metazachlor.

Organism tested	Formation of endogenous VLCFAs	<sup>14</sup> C-labelling of neosynthesized VLCFAs
	50 % inhibition (µM)	
Cucumber (cotyledons)	-	0.01 - 0.1
Plasma membrane	10	0.01 - 0.1
Epicuticular wax	10	0.01
Soybean (cell culture)	0.1	-
Barley	-	0.01 - 0.1
Maize	-	1
Recombinant <i>FAE1</i>	10	0.1 - 100 <sup>c</sup>
Green alga <sup>a</sup>	-	0.01 - 0.1
Leek (whole seedlings)	-	0.01 - 0.1
Leek microsomes <sup>b</sup>	-	0.01 - 1 <sup>c</sup>

(-), not determined, <sup>a,b</sup> Data from Schmalfuß *et al.*, 1998, 2000, <sup>c</sup> depending on preincubation (see text)

#### 4.1.3 Abhängigkeit der Hemmung von der Kettenlänge

Die Biosynthese der gesättigten VLCFAs findet in den cytosolischen Membranen des ER und GA statt. Dabei läuft, ausgehend von 16:0-CoA oder 18:0-CoA, eine vierstufige Reaktionsfolge ab, bei der a) Malonyl-CoA unter CO<sub>2</sub>-Abspaltung addiert wird, b) das entstandene β-Ketoacyl-CoA reduziert, c) dehydratisiert und d) die entstandene trans-Doppelbindung hydriert wird (Figure 28, S. 77). Die vier für den Prozeß notwendigen Enzyme wurden teilweise charakterisiert und nach derzeitigem Wissenstand wird angenommen, daß diese in einem gemeinsamen Enzym-Komplex, der Fettsäure-Elongase, organisiert sind (Domergue *et al.*, 1998).

In Lauch-Mikrosomen wurden bisher zwei Fettsäure-Elongasen unterschieden, die im ER und GA lokalisiert sind und Substrate spezifischer Kettenlänge (18:0-CoA bzw. 20:0-CoA und

länger) umsetzen (Lessire *et al.*, 1985). Schmalfuß *et al.* (2000) berichteten für die verschiedenen Elongationsschritte *in vitro* Umsatzraten von 5-8 nmol mg<sup>-1</sup>Protein h<sup>-1</sup> und stellten für Metazachlor I<sub>50</sub>-Werte im mikromolaren Bereich fest. Obwohl die Elongationssysteme per se mit vergleichbarer Empfindlichkeit auf den Inhibitor reagieren, ist die tatsächliche Hemmung (*in vivo*) umso größer, je länger die Kettenlänge der Fettsäure ist. Dieses Prinzip wurde übereinstimmend für Gurke (Figure 10, S. 42), Soja (Figure 14, S. 46) und Lauch festgestellt (Schmalfuß *et al.*, 2000). Je nach Inkubationsmethode und Organismus wurden für eine 50 %ige VLCFA-Reduktion ca. 10 nM (24:0, 26:0), 10-100 nM (22:0) bzw. 1 µM (20:0) Metazachlor benötigt.

Die mit der Kettenlänge zunehmende Wirkung der Chloracetamide auf die VLCFA-Biosynthese kann damit begründet werden, daß die Fettsäure-Elongation schrittweise erfolgt, so daß eine im 1. Schritt gehemmte Produktbildung umso weniger Substrat für den 2. Schritt, der wiederum gehemmt wird, liefert (usw.). Da sich die Hemmintensität bezüglich des ersten und letzten Elongationsschrittes um etwa den Faktor 100 ändert, kann dies nicht allein durch die wiederholte Hemmung der Elongationsschritte begründet werden.

In der lebenden Zelle wird die Umsatzrate des Fettsäure-Katabolismus durch die Konzentrationen verfügbaren Substrats, des Acyl-CoAs, reguliert (Figure 29, S. 77). Ohlrogge und Jaworski (1997) diskutieren die Hemmung der ACCase durch Acyl-CoAs, Lessire *et al.* (1982) fanden die durch 18:0-CoA-Synthase katalysierte Bereitstellung des Elongase-Substrats 18:0-CoA durch Acyl-CoAs gehemmt und Schmalfuß *et al.* (2000) konnten zeigen, daß die Umsatzrate der Fettsäure-Elongase ebenfalls durch Acyl-CoAs reguliert wird. In den beiden letztgenannten Fällen wurde der Umsatz durch höhere Konzentrationen der jeweiligen Edukt-Acyl-CoAs gehemmt („Retro-Inhibierung“).

Darüberhinaus stellten die Autoren fest, daß gerade bei kleinen Acyl-CoA-Konzentration (also bei hoher Enzymaktivität) eine hohe Hemmung durch Chloracetamide erzielt wird. Die Hemmung der Fettsäure-Elongase sank hingegen mit zunehmender Substratkonzentration.

Es wird angenommen, daß im Cytosol der lebenden Zelle submikromolare Acyl-CoA-Konzentrationen vorliegen (Ohlrogge und Jaworski, 1997), entsprechend einer maximalen Umsatzrate der Fettsäure-Elongase. Andererseits wurden 0,1-0,7 µM Metazachlor in Blättern behandelter Weizenkeimlingen gefunden (Fuerst *et al.*, 1991), die nach den vorliegenden Untersuchungen für die fast vollständige Unterdrückung der VLCFA-Biosynthese ausreichen.

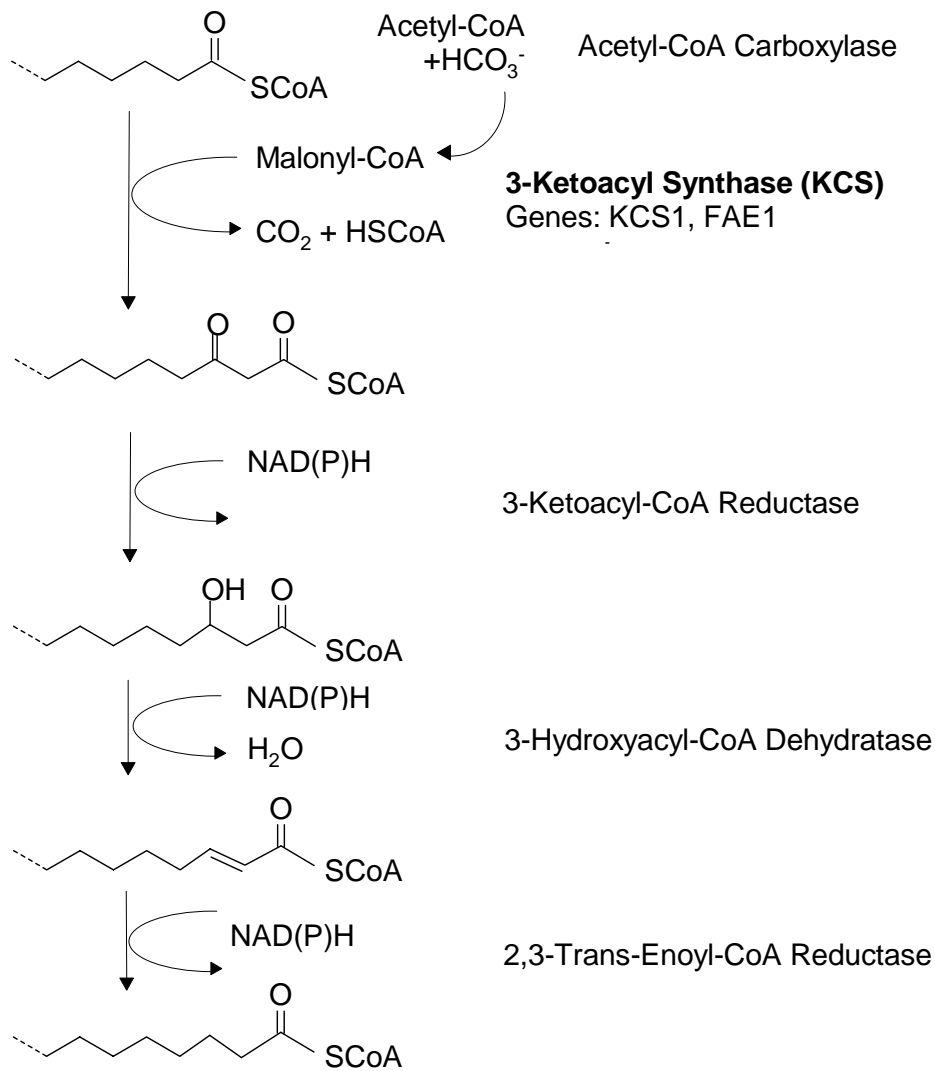


Figure 28: Four-step mechanism of fatty acid elongation (adapted from Cook, 1996).

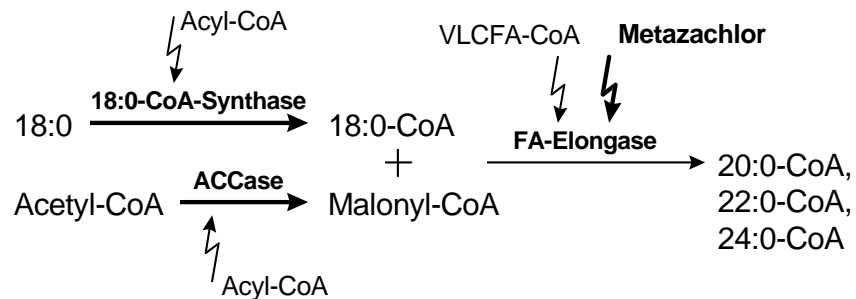


Figure 29: Acyl-CoA-regulated enzymes instrumental in fatty acid elongation.

Abbreviations: ACCase, Acetyl-CoA Carboxylase; FA, fatty acid; VLCFA, very-long-chain fatty acid.

In Gegenwart von Metazachlor akkumuliert sich somit einerseits (nicht umgesetztes) 18:0-CoA, was infolge der Retro-Inhibierung zu einer verringerten Elongase-Aktivität führt, gleichzeitig werden dadurch VLCFA-CoAs reduziert und konkurrieren mit dem vergleichsweise hochkonzentrierten Inhibitor. Dies führt, neben dem eingangs beschriebenen kumulativen Effekt, zu der gefundenen hohen Hemmintensität der Gesamt-VLCFA-Synthese.

#### 4.1.4 Abgrenzung zu *de novo* Fettsäure-Synthese und Desaturierung

Eine besondere Rolle kommt dem Verlängerungsschritt von Palmitin- (16:0) zu Stearinsäure (18:0) zu. Dieser Biosyntheseschritt kann sowohl von der Fettsäure-Synthase im Chloroplasten als auch von der cytosolischen Fettsäure-Elongase katalysiert werden (Harwood, 1996; von Wettstein-Knowles, 1994). Aus diesem Grund sind die Beobachtungen hinsichtlich des Stearinsäuregehalts in Abhängigkeit der Behandlung mit Metazachlor scheinbar widersprüchlich: Einerseits akkumuliert sich Stearinsäure infolge der Hemmung der Elongation längerkettiger Homologe, wie deutlich anhand der Prozessierung exogener [ $^{14}\text{C}$ ]Stearinsäure gezeigt wurde (Table 8, S. 39). Dieser Effekt wurde tendenziell auch in nicht-markierten Fettsäuren der Soja-Zellkultur (Figure 14, S. 46) und der transgenen Hefe (Figure 17, S. 51) gefunden. Andererseits war der Stearinsäuregehalt, gemessen anhand des [ $^{14}\text{C}$ ]Malonat-Einbaus, durch Metazachlor gehemmt. *In vitro* war die Hemmung sogar genauso groß wie für die folgenden Elongationsschritte (Schmalfuß, 2000), während *in vivo* die 18:0-Synthese nicht so effektiv und insbesondere nicht vollständig reduziert wurde (vgl. Figure 10, S. 42).

Wie Harwood (1996) anhand der Markierung von Gerste-Fettsäuren durch [ $^{14}\text{C}$ ]Acetat und [ $^{14}\text{C}$ ]Malonat diskutiert, verbleibt exogenes Malonat aufgrund der Undurchlässigkeit des Chloroplasten überwiegend im Cytosol, Acetat kann hingegen in den Chloroplasten transportiert werden. Demnach markiert Malonat vorwiegend die Produkte der cytosolischen VLCFA-Biosynthese (Malonat-markierte 18:0), während der Acetateinbau ein Maß für die plastidäre *de novo* Synthese von Fettsäuren ist (Acetat-markierte 18:0). Entsprechend wurde der Gehalt [ $^{14}\text{C}$ ]Acetat-markierter Stearinsäure durch Metazachlor nicht beeinflusst (Table 8, S. 39), wohingegen der in den [ $^{14}\text{C}$ ]Malonat-markierten Gesamtfettsäuren gefundene reduzierte 18:0-Gehalt eine teilweise gehemmte Produktbildung widerspiegelt.

Die überwiegende Menge der Fettsäuren ist in grünen Pflanzen am Aufbau der plastidären Membranen beteiligt, für die ein hoher Gehalt mehrfach ungesättigter C18-Fettsäuren typisch

ist (Ohlrogge und Jaworski, 1997). In den Gurke-Fettsäuren waren es, übereinstimmend mit Keppler und Novacky (1989), mehr als drei Viertel aller (erfaßbaren) Fettsäuren (vgl. Table 12, S. 56). Da der Stofffluß von Substraten durch die plastidäre *de novo* Synthese den der Chloracetamid-sensitiven Elongation von Fettsäuren also bei weitem übertrifft, wird der *Gesamt-Einbau* exogener Fettsäure-Vorläufer, gemessen als in Fettsäuren oder Lipiden enthaltene Radioaktivität, wenig beeinträchtigt. Eine Ausnahme bildete der im vorhergehenden Abschnitt diskutierte Malonateinbau in Gurke-Fettsäuren. Dieser Befund wird ebenfalls durch frühere Arbeiten unterstützt, in denen Chloracetamide den Fettsäurespiegel insgesamt nicht beeinflußten (Wu *et al.*, 2000) bzw. die Neusynthese von Lipiden, beobachtet als Einbau markierter Vorläufer, nicht generell reduziert war. Effekte wurden erst nach längerer Inkubationszeit, hohen Herbizidkonzentrationen oder nicht einheitlich in verschiedenen Organismen beobachtet. So fanden beispielsweise Mellis *et al.* (1982) die Aufnahme exogenen Acetats und Malonats in Lipide aus Baumwolle nicht gehemmt, während der Einbau von [<sup>14</sup>C]Malonat in Hanf-Lipide bereits mit mikromolaren Chloracetamid-Konzentrationen gehemmt wurde. Bezeichnenderweise erhielten Mann und Pu (1968) diesen Befund nach Inkubation von Hypokotylen in der Petrischale, verwendeten also einen methodisch sehr ähnlichen Weg mit einem Ergebnis, das dem der ca. 50 %igen Hemmung des Malonateinbaus in Gurke-Fettsäuren (Table 8, S. 39) entspricht.

Wie der Metabolismus exogener Stearinsäure (Figure 12, S. 43) in Gurke-Kotyledonen zeigt, erfolgt die Elongation exogener Stearinsäure schneller als ihre Desaturierung, wobei die spezifische Hemmung der VLCFA-Biosynthese durch Metazachlor innerhalb sehr kurzer Zeit (meßbar nach 2 h) eintritt. Auch in Sojazellen wurde, übereinstimmend mit Couderchet *et al.* (1994), keine Beeinflussung der Fettsäure-Desaturierung gefunden. Dies gilt nach heutigem Kenntnisstand für viele höhere Pflanzen (Wu *et al.*, 2000), obwohl in Reis (Couderchet *et al.*, 1994), Raps (Möllers und Albrecht, 1994) und der Grünalge *Scenedesmus acutus* (Couderchet und Böger, 1993b) eine gehemmte Bildung mehrfach ungesättigter C18-Fettsäuren gefunden wurde. In diesen Untersuchungen wurden Keimlinge stets mehrere Tage mit höheren Konzentrationen Metazachlor behandelt (5-100 µM). Vor dem Hintergrund einer VLCFA-Reduktion könnte dieser langfristige Rückgang desaturierter Fettsäuren eine physiologische Folgewirkung darstellen, die den mangels VLCFAs gestörten Aufbau von Membranen kompensiert (s.a. Abschnitt 4.4.2, S. 93).

#### 4.1.5 Verschiedene Inhibitoren der VLCFA-Biosynthese

Die Inkubation von Gurke-Blattstücken *in vivo* und der Test auf Elongase-Aktivität mit rekombinanter Elongase *in vitro* waren eine methodische Grundlage zum Vergleich der herbizidalen Aktivitäten verschiedener Chloracetamide sowie weiterer strukturell unterschiedlicher Modellverbindungen.

Alle getesteten Chloracetamide (Metazachlor  $\approx$  Butachlor  $>$  Metolachlor) sowie das Oxyacetamid Flufenacet waren wirksame Inhibitoren der Fettsäure-Elongation (vgl. Table 17, S. 70; Table 18, S. 71). Wiederholt war das *S*-Enantiomer des chiralen Chloracetamids Metolachlor das alleine wirksame Stereoisomer im Test. Der Befund stimmt sowohl mit den phytotoxischen Eigenschaften der Enantiomere überein (Moser und Sauter, 1982; O'Connell *et al.*, 1998) als auch mit der stereoselektiven Hemmung der Fettsäure-Elongation in Lauch und der Grünalge *Scenedesmus acutus* (Schmalfuß, 2000; Couderchet *et al.*, 1998).

Obwohl Thiocarbamate als Inhibitoren der Fettsäure-Elongation und der Bildung epicuticularer Wachse beschrieben wurden (Still *et al.*, 1970; Abulnaja und Harwood, 1991), hatte EPTC im Test nur eine geringe Reduktion des VLCFA-Gehalts zur Folge – *in vitro* war EPTC praktisch unwirksam. Dies ist auch darauf zurückzuführen, daß nicht die oxidierte Form, das EPTC-Sulfoxid, eingesetzt wurde, welches eine höhere herbizidale Wirksamkeit besitzt (Kern *et al.*, 1997). Ethofumesat, ein weiterer bekannter Hemmstoff der VLCFA-Biosynthese, zeigte hingegen in Gurke sogar eine ca. 100fach höhere Aktivität als in Erbse und Gerste (Abulnaja *et al.*, 1992).

Daneben waren strukturell völlig unterschiedliche Substanzen gleichermaßen wirksame Inhibitoren der VLCFA-Biosynthese (Cafenstrol  $\geq$  Fentrazamid  $\geq$  *R,S*-Phosphinosulfonat), wobei die Enantiomere des Phosphinosulfonats beide etwa gleich aktiv waren. Da die Stereospezifität ein Hinweis auf die Stereospezifität des primären Wirkorts (Substratbindestelle der Fettsäure-Elongase?) ist, läßt sich daraus schließen, daß das chirale Zentrum des Phosphinosulfonats – im Gegensatz zu *R,S*-Metolachlor – sterisch nicht mit der potentiellen Bindungsstelle wechselwirkt.

Obwohl *in vivo* mit der Aktivität von Metazachlor vergleichbar, wirkte das Triazol Cafenstrol *in vitro* (nach Vorinkubation) sogar in nanomolaren Konzentrationen. Dies deutet auf eine besonders hohe Affinität zwischen Inhibitor und Enzym hin, die allerdings auch durch eine bessere Verfügbarkeit des Inhibitors unter den Testbedingungen verursacht werden könnte.



Die Hierarchie und Aktivität der einzelnen Hemmstoffe ist in den unterschiedlichen Testsystemen vergleichbar, dies gilt insbesondere für die gefundene Hemmwirkung auf die VLCFA-Biosynthese in Lauch (Schmalfuß, 2000) und die Hemmung des Ölsäureeinbaus in Sporopollenin der Grünalge *S. acutus* (Couderchet *et al.*, 1998).

Insgesamt gesehen, haben die getesteten Wirkstoffe chemisch völlig unterschiedlicher Struktur ein gemeinsames primäres Angriffsziel, die Fettsäure-Elongation. Daher ist es nicht überraschend, daß anhand des Algenstamms *Clamydomonas reinhardtii* Kreuzresistenzen gegen verschiedene Inhibitoren der VLCFA-Biosynthese beobachtet wurden. Fedtke *et al.* (1998) stellten fest, daß eine gegen das Oxyacetamid Flufenacet resistente Mutante nicht nur gegen andere Chlor- und Oxyacetamide resistent war, sondern gleichfalls gegen das Triazol Cafenstrol und das Tetrazolinon Fentrazamid.

Die Aktivität dieser Verbindungen hängt demnach *nicht* primär von einem gemeinsamen Strukturelement ab, etwa der für Chloracetamide diskutierten *N,N*-Aryl-Alkyl-Substitution. Über die Wirksamkeit der Verbindungen entscheidet vielmehr die Reaktivität hinsichtlich einer nukleophilen Substitution, die eine kovalente Bindung an das Zielenzym ermöglichen könnte (Böger *et al.*, 2000). Genauen Aufschluß über diese Hypothese soll künftig die Untersuchung der Enzym-Inhibitor-Wechselwirkung an gereinigtem Enzym liefern.

## 4.2 Wirkungsweise der Chloracetamide *in vitro*

### 4.2.1 Hemmung des Kondensationsschrittes der Fettsäure-Elongation

Die in Gurke, Gerste, Mais und Soja durchgeführten Experimente zeigen die Hemmung der VLCFA-Biosynthese durch Chloracetamide *in vivo*. Unter diesen Bedingungen reagieren die Intermediate der Fettsäure-Elongation ( $\beta$ -Keto-Acyl-CoA,  $\beta$ -Hydroxy-Acyl-CoA und 2,3-*trans*-Enoyl-CoA, vgl. Figure 28, S. 77), aufgrund der Organisation des Elongasekomplexes und der Gegenwart der Reduktionsäquivalente (NADH, NADPH) vollständig zum Endprodukt (Domergue *et al.*, 1998).

Eine sichere Antwort auf die Frage, welcher Teilschritt der Reaktionssequenz durch Chloracetamide gehemmt wird, kann nur erfolgen, wenn die gehemmte Prozessierung der vier (Zwischen)produkte untersucht wird. Allerdings sind die Zwischenprodukte aufgrund ihrer Instabilität nicht käuflich und, obwohl *in vitro* durch Fehling und Mukherjee (1991) und

Lessire *et al.* (1993) in Abwesenheit von NADH und NADPH an *Lunaria annua* und *Allium porrum* nachgewiesen, in unserem Labor bisher nicht gefunden worden.

Verschiedene Autoren postulieren (Domergue *et al.*, 1998; Harwood, 1996; Millar und Kunst, 1997), daß gerade der erste Schritt der Elongationssequenz, die Kondensation der beiden Substrate Malonyl-CoA und Fettsäure-CoA, der geschwindigkeits-bestimmende Teilschritt der Gesamtreaktion ist. Hinweise darauf sind die vergleichbare Kinetik der Bildung von  $\beta$ -Keto-Acyl-CoA und VLCFA-CoA (Fehling und Mukherjee, 1991) sowie die im Vergleich zum Kondensationsschritt mehrfach höheren Umsatzraten der Folgeschritte (Lessire *et al.*, 1993). Auf der Basis dieser biochemischen Hinweise wurde das aus *Arabidopsis*-Samen stammende Gen des Kondensationsschrittes (fatty acid elongation, *FAE1*, James *et al.*, 1995) in Hefe exprimiert (Millar und Kunst, 1997). Die Expression der exogenen Samen-Elongase führt zu einer Synthese von bis zu 10 % ungesättigten VLCFAs (vor allem 20:1 und 22:1) in der Transformante. Im Hefe-Wildtyp sind diese nicht (Millar und Kunst, 1997) oder nur in Spuren vorhanden (vgl. Figure 16, S. 49).

Metazachlor hemmt die Bildung dieser Fremd-VLCFAs sowohl *in vivo* als auch *in vitro* (vgl. Figures 17 u. 18, S. 51 f), die (Hemmung der) Produktbildung hängt demnach allein von der Kondensationsreaktion als limitierenden und essentiellen Schritt der Fettsäure-Elongation ab. Dafür spricht weiter, daß durch die Radio-HPLC-Analyse nur VLCFA-Endprodukte gefunden wurden, jedoch keine zusätzlichen markierten Zwischenprodukte der Fettsäureelongation, deren Akkumulation aufgrund der Hemmung eines Folgeschrittes zu erwarten gewesen wäre. Da der Hefe-Wildtyp gesättigte VLCFAs enthält, muß der Organismus ein vollständiges endogenes Fettsäure-Elongase-System besitzen (Todd *et al.*, 1999). Die durch *FAE1* gebildeten ungesättigten 3-Keto-Intermediate (vgl. Figure 28, S. 77) könnten somit entweder durch diese endogenen Enzyme, oder sogar durch ubiquitäre Reduktasen und Dehydratasen geringerer Substratspezifität weiterprozessiert werden (Millar und Kunst, 1997).

Die nachgewiesene Hemmung der *FAE1*-codierten *Arabidopsis*-Elongase zeigt weiter, daß Chloracetamide nicht nur die Elongation *gesättigter* Fettsäuren durch Blatt-Elongasen, sondern ebenfalls die Elongation *ungesättigter* Fettsäuren hemmt. Diese sind in Pflanzen vor allem im Samen enthalten, entsprechend wurde 18:1 in Gurke-Kotyledonen nicht elongiert (vgl. Table 7, S. 38). Auch Todd *et al.* (1999) fanden in einer Fraktion mikrosomaler Proteine aus Lauch die ausschließliche Elongation gesättigter Substrate.

Im Experiment wurde festgestellt, daß die Hemmung der Elongaseaktivität umso höher ist, je länger die Mikrosomen mit dem Herbizid vorinkubiert wurden (Table 11, S. 54). Dies deutet darauf hin, daß solange Herbizid an das Enzym gebunden wird, bis eine Sättigung der möglichen Bindestellen erreicht wird. Gegenüber dem Enzymtest ohne Vorinkubation ist somit die Hemmwirkung infolge der geringeren Ausgangsmenge an aktiver Elongase größer. Wie für eine chemische Reaktion zu erwarten ist, ist die Reaktion von der Zeit und der Temperatur abhängig. Die Charakterisierung der Hemmwirkung auf Elongase aus Lauch bestätigt diesen Befund, und die Bindung von [<sup>14</sup>C]Metazachlor an Lauch-Elongase kann durch Gelelektrophorese nachgewiesen werden (unveröffentlichte Ergebnisse unseres Labors). Diese Befunde deuten an, daß das Enzym durch kovalente und irreversible Bindung des Inhibitors inaktiviert wird.

Die übereinstimmende Hemmcharakteristik der Elongase aus Lauch und der rekombinanten Elongase aus *Arabidopsis*-Samen legen einen gemeinsamen molekularen Wirkungsmechanismus nahe. Gleichzeitig sind die zugrundeliegenden Gene der Kondensationsreaktion homolog, innerhalb des mutmaßlich aktiven Zentrums ist eine Cystein-haltige Sequenz konserviert (Todd *et al.*, 1999). Nach dem momentanen Wissensstand muß davon ausgegangen werden, daß Chloracetamide durch nukleophile Substitution am  $\alpha$ -C-Atom einen Cystein-Rest im aktiven Zentrum des kondensierenden Enzyms blockieren (Böger *et al.*, 2000), wodurch die für die Kondensation notwendige Bindung und Aktivierung des Acyl-CoA-Esters verhindert wird (vgl. Schema der Kondensationsreaktion, (Figure 30, S. 84).

Demnach ist nicht auszuschließen, daß Chloracetamide über die Fettsäure-Elongation hinaus noch weitere Kondensationsreaktionen diesen Typs in der Zelle hemmen. So berichten James *et al.* (1995) und Schröder (1999) von Homologien zwischen Genen, die für (ebenfalls Cystein-regulierte) Kondensationsreaktionen verschiedener Prozesse des Phenolstoffwechsels codieren. Untersuchungen zur Hemmung der Chalkon-Synthase und der Stilben-Synthase werden derzeit in Kooperation mit der Arbeitsgruppe Prof. Dr. J. Schröder (Universität Freiburg) durchgeführt.

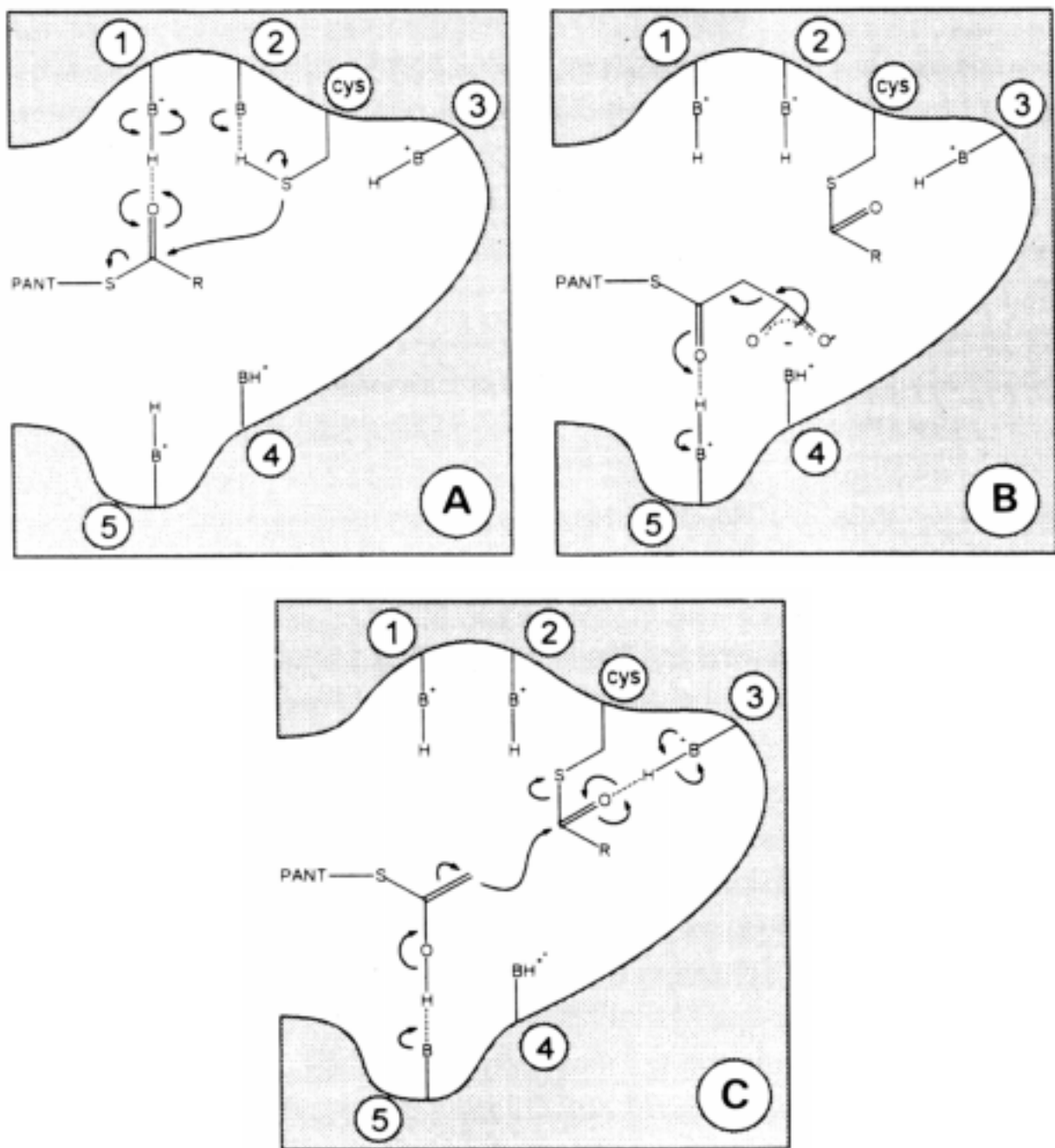


Figure 30: Model for the active site of condensing enzymes (from Harwood, 1996).

(A) Base (1) enhances electrophilicity of the substrate to bind to the cysteine, which is stabilized by base (2). (B) The starter substrate is bound to cysteine and malonyl-CoA is activated by base (5) for decarboxylation. (C) *In situ* generated C2-carbanion intermediate reacts immediately with the substrate, the condensing reaction being probably stabilized by another base (3) to keep the transition state before breaking off the bond to cysteine.

#### 4.2.2 Zusätzliche Effekte der *FAE1*-Expression auf den Fettsäurestoffwechsel

Der *in vitro* Test der Elongase-Aktivität in transgener Hefe wurde nach James *et al.* (1995) und Todd *et al.* (1999) modifiziert, wobei insbesondere auf den Zusatz von Coenzym A und ATP verzichtet wurde. Obwohl die Rolle von ATP in der Fettsäure-Elongation widersprüchlich bewertet wird (Hlousek-Radojicic *et al.*, 1998), berichten Domergue *et al.* (1999) und Schmalfuß (2000) von einer stimulierten Elongation exogener Substrate ohne ATP im *in vitro* Experiment. Übereinstimmend mit diesen experimentellen Befunden, wurde auch die rekombinierte Elongase in Gegenwart von ATP gehemmt (Abschnitt 3.3.5, S. 53).

Die Aktivität der in Hefe heterolog exprimierten *Arabidopsis*-Elongase ist ca. 5-10mal höher ( $40 \text{ nmol h}^{-1} \text{ mg}^{-1} \text{ Protein}$ ) als die der endogenen Elongase aus Hefe, die zur Bildung gesättigter VLCFAs führt (Todd *et al.*, 1999). Im Vergleich zu ihrer ursprünglichen Aktivität in *Arabidopsis*-Samen (Todd *et al.*, 1999; Katavic *et al.*, 1995) ist die Aktivität in Hefe etwa 10fach höher, was auch dem gefundenen 10fach erhöhten VLCFA-Gesamtgehalt in der *FAE1*-Hefe entspricht.

Gleichzeitig ist jedoch der Gehalt an C12-C16-Fettsäuren in der Transformante erhöht. Da vom Umsatz kurzkettiger Acyl-CoAs durch Elongasen berichtet wurde (Todd *et al.*, 1999; Agrawal *et al.*, 1985; Sandager und Stymne, 2000), ist dies als Nebeneffekt der exogenen Elongaseaktivität zu sehen. Dafür spricht auch, daß durch Metazachlor die Transformantentypischen C14-Fettsäuren ebenfalls reduziert werden.

Andererseits akkumulieren in Gegenwart von Metazachlor C16- und C18-Fettsäuren in höherem Maße, als aufgrund des Rückstaus infolge der gehemmten VLCFA-Biosynthese zu erklären ist (Figure 17, S. 51). Dies spricht für eine veränderte Regulation des gesamten Fettsäuremetabolismus, begleitet von einer Zunahme ungesättigter Fettsäuren in der Zelle. Wie schon angesprochen (Abschnitt 4.1.4, S. 78), könnte die Zelle damit auf die infolge des VLCFA-Mangels gestörten Membraneigenschaften reagieren (vgl. Abschnitt 4.4.2, S. 93).

Als eine weiteres Merkmal der in *FAE1*-Hefe gebildeten Fremd-VLCFAs muß angeführt werden, daß ungesättigte VLCFAs der transgenen Hefe in *cis*- und *trans*-Konformation gefunden wurden. Die Isomere waren durch Gaschromatographie trennbar und koeluierten mit den *cis*-/ *trans*-Standard-Fettsäuremethylestern. Die Massenspektren der Isomere waren identisch, da ungesättigte Fettsäuren unter den Analysebedingungen (Elektronenbeschuß mit 70 eV) isomerisieren (Gurvitz, 1998). Über das Vorkommen ungesättigter *cis*-/ *trans*-

VLCFAs im Wildtyp kann aufgrund des geringen VLCFA-Gehalts (noch) keine Aussage gemacht werden.

Weil durch Desaturasen infolge einer *syn*-Eliminierung nur *cis*-Isomere gebildet werden können (Kawaguchi *et al.*, 1999), müssen *trans*-Fettsäuren durch chemische oder enzymatische Isomerisierung entstehen. In Hefe ist eine *cis/trans* Isomerase als Hilfsenzym der Fettsäure- $\beta$ -Oxidation bekannt (Gurvitz, 1998), die insbesondere in Anwesenheit exogener ungesättigter Fettsäuren aktiv ist. Die Klärung der Frage, ob die *trans*-VLCFAs durch unvollständige Elongation *gesättigter* Vorläufer (bis zum 3. Schritt der Fettsäure-Elongation, vgl. Figure 28, S. 77) oder durch Isomerisierung entstehen, bedarf einer (im Rahmen dieser Arbeit nicht durchgeführten) Bestimmung von Position und Geometrie der Doppelbindung (Gutnikov, 1995).

### 4.3 Wirkung der Chloracetamide auf epicuticulare Wachse

#### 4.3.1 Hemmung der Wachsbildung

Die Schicht der epicuticularen Wachse ist der letzte Adressat des VLCFA-Transports in epidermalen Zellen und damit ebenfalls ein unmittelbarer Wirkort der Chloracetamide. Es ist bekannt, daß Wachse vor allem während der ersten Wachstumsphase gebildet und sekretiert werden, also in der Periode, in der sich auch die phytotoxische Wirkung der Chloracetamide entfaltet. Innerhalb dieser Phase verändert sich die Zusammensetzung der Wachse noch, meist in der Tendenz zur Bildung längerer Kohlenstoffketten (Bianchi, 1994; Jenks *et al.*, 1996).

Die Wachs-Zusammensetzung ist aber nicht nur vom Entwicklungsstadium und den äußeren Bedingungen abhängig, sondern sehr artspezifisch: während in vielen monokotylen Spezies gesättigte primäre Alkohole einer bestimmten Kettenlänge mehr als drei Viertel des Gesamtwachses ausmachen, z.B. C26-Alkohol in Gerste, C32-Alkohol in Mais (Bianchi *et al.*, 1977; Giese, 1974; Harr *et al.*, 1991), sind die Wachskomponenten der (dikotylen) Familie der *Cucurbitaceae* hinsichtlich der Stoffklassen und der Kettenlängen breiter gestreut (Bianchi, 1994). In epicuticularen Wachsen von Gurke-Keimlingen fanden Steinmüller und Tevini (1985) sehr langkettige Fettsäuren, Alkohole, Aldehyde und Alkane.

Somit waren Gurkenkeimlinge der ideale Organismus, um einen Zusammenhang zwischen der Hemmung der VLCFA-Biosynthese und der Biosynthese epicuticularer Wachse, deren C-Gerüste über die im Zellinneren gefunden C26 hinausgehen (vgl. Figure 20, S. 57), zu

untersuchen. Dabei war es nicht das Ziel der Studie, die native Wachs-Zusammensetzung von Gurkekotyledonen vollständig und quantitativ zu analysieren. Vielmehr wurde ein analytisches Vorgehen gewählt, das es erlaubt, anhand eines in wenigen Arbeitsschritten modifizierten Rohextraktes die Herbizidwirkung auf die monomeren Hauptkomponenten (Fettsäuren, Alkohole und Alkane) schnell und zuverlässig zu charakterisieren (vgl. Chromatogramm, Figure 19, S. 55).

In Abhängigkeit von Metazachlor wurde eine Reduktion der epicuticularen Wachse insgesamt beobachtet, der auf den Rückgang der wachs-bildenden sehr langkettigen Fettsäuren, Alkohole und Alkane basiert. Für diesen Effekt sind drei Hauptmerkmale charakteristisch: (i) er betrifft nahezu gleichmäßig Fettsäuren, Alkohole und Alkane, (ii) die Hemmung ist für Komponenten > C26 besonders hoch und (iii), gemessen am Einbau markierten Malonats, wird die Neusynthese der Wachskomponenten noch empfindlicher gehemmt als die VLCFA-Synthese innerhalb der Zelle.

In Gegenwart von Metazachlor ist die cytosolische Fettsäure-Elongation nachweislich gehemmt (vgl. Abschnitt 4.1.2, S. 73) und dadurch der intrazelluläre VLCFA-Transport vom Syntheseort (ER und GA) zur Plasmamembran reduziert (Figure 27, S. 69). Gleichzeitig ist die Biogenese der Wachse zeitlich eng mit der Aktivität der Fettsäure-Elongation gekoppelt (Rhee *et al.*, 1998), somit äußert sich die verminderte Bereitstellung von VLCFA-Vorläufern für die weitere Elongation und Wachs-Synthese im gleichzeitigen Rückgang der Wachskomponenten. Die Autoren beobachteten eine maximale Aktivität der Fettsäure-Elongase, sobald die Wachs-Produktion einsetzte, während in älteren Blättern die Aktivität aller Elongationssysteme zurückging.

Die weitere Elongation der VLCFAs über C26 hinaus vermutet man in den Kompartimenten der Plasmamembran und des ER (Cassagne *et al.*, 1994; Moreau *et al.*, 1998). Anhand der Untersuchung von *Arabidopsis*-Mutanten diskutiert von von Wettstein-Knowles (1994) die Notwendigkeit der Aktivität von mindestens drei weiteren Elongasen, welche die Bildung von C26-, C28- und C30-VLCFAs katalysieren. Millar *et al.* (1999) wiesen nach, daß die Expression des kondensierenden Enzyms auch für die Biosynthese von Wachskomponenten > C26 essentiell war. Da gerade diese Komponenten durch Metazachlor besonders stark reduziert werden (vgl. Figure 20, S. 57), muß von einer zusätzlichen Hemmung dieser Elongationsschritte durch Metazachlor ausgegangen werden.

Gemäß der Biosynthese der Wachse sind VLCFAs wiederum Vorläufer der Alkohole sowie der (n-1) Alkane (vgl. Figure 3, S. 9), somit ist der gleichzeitige Rückgang von Alkoholen und Alkanen (Figure 20, S. 57) als eine weitere Folge der durch Metazachlor gehemmten Fettsäure-Elongation zu sehen. Gestützt wird diese Vorstellung auch dadurch, daß der Metazachlor-bedingte Rückgang von Alkoholen und Alkanen nicht größer ist als der der Fettsäure-Homologen, wie bei einer (zusätzlichen) Hemmung der Fettsäure-Reduktion zu Alkoholen und Alkanen zu erwarten wäre.

Komponenten ungeradzahlicher C-Kettenlängen sind von der Hemmung gleichfalls betroffen; sie entstehen durch Elongation  $\infty$ -oxidierter Fettsäuren (Saffert *et al.*, 2000; Borge *et al.*, 1999). Geringe Mengen von Fettsäuren, Alkoholen und Aldehyden ungerader Kettenlänge sowie Alkanen geradzahlicher Kettenlängen wurden in verschiedenen pflanzlichen Wachsen nachgewiesen (Avato *et al.*, 1980; Gülz, 1980), ebenso wurde der Einbau von [ $^{14}\text{C}$ ]Acetat in solche Komponenten nachgewiesen (von Wettstein-Knowles, 1985).

Während die Neusynthese aller (markierten) Wachskomponenten durch 0,1  $\mu\text{M}$  Metazachlor vollständig gehemmt wird (vgl. Radiochromatogramm Figure 22, S. 61), ist der Einfluß auf die Zusammensetzung des Gesamt-Waxes geringer. Im letzten Fall wurde die Veränderung der Wachszusammensetzung durch eine 2tägige Metazachlor-Behandlung 4 Tage alter Keimlinge beobachtet, also auf der Grundlage einer bereits *bestehenden* Wachs-Beladung charakterisiert. Der  $I_{50}$  ist infolgedessen um Größenordnungen geringer (Table 19, S. 75). Darüberhinaus ist die Hemmwirkung erst ab einer Kettenlänge  $> \text{C}26$  sichtbar, kürzerkettige Komponenten akkumulieren sogar. Einen analogen Befund, die Hemmung von Komponenten  $> \text{C}26$  zugunsten einer Akkumulierung von Komponenten  $\leq \text{C}26$ , erhielten Ebert und Ramsteiner (1984), nachdem Hirse mit Metolachlor behandelt wurde. Dies kann durch mehrere Faktoren begründet werden:

- (i) Während des Wachstums verändert der Keimling seine Wachszusammensetzung zu längeren Kettenlängen hin, gegenüber dem gesunden Keimling bleibt somit der (zur weiteren Wachssynthese unfähige) behandelte Keimling auf einem früheren, durch kürzerkettige Wachskomponenten charakterisiertem Entwicklungsstadium stehen.
- (ii) Verglichen mit der Hemmung der bekannten, cytosolischen Fettsäure-Elongation ( $I_{50}$  ca. 10-100 nM) ist die Hemmung der *de novo* Wachs-Synthese ( $I_{50}$  ca. 1-10 nM) um etwa eine Größenordnung empfindlicher, mithin ein Hinweis auf die Hemmung einer weiteren (unbekannten) Elongase (s. vorhergehender Abschnitt).



(iii) Sowohl die mikrosomale VLCFA-Biosynthese (bis C26) als auch die Bildung der WachsvLCFAs  $> C26$  wird durch Metazachlor umso stärker gehemmt, je länger das C-Gerüst der Fettsäure ist. Die Hemmung der unpolarsten, d.h. mutmaßlich besonders langkettigen ( $> C26$ ) Wachskomponenten mit nanomolaren Wirkstoffkonzentrationen (vgl. Figure 22, S. 61) ist somit auch eine Folge der kumulativen Hemmung (vgl. Abschnitt 4.1.1, S. 72).

(iv) Es sei angenommen, daß die Elongationsschritte  $\leq C26$  (I) und  $> C26$  (II) kompartimentär unabhängig arbeiten, und daß die Passage der VLCFAs durch die Plasmamembran in Richtung der Cuticula verläuft. In diesem Fall würde aufgrund der gehemmten mikrosomalen VLCFA-Biosynthese (I) sehr wenige C20-C26-VLCFAs für die weitere Elongation (II) zur Verfügung stehen. Da auch diese weitere Elongation gehemmt ist, akkumulieren die bereits passierten bzw. sekretierten VLCFAs in der Wachsschicht.

(v) Die Aktivität der mikrosomalen Fettsäure-Elongase wird in starkem Maße von der Acyl-CoA-Konzentration reguliert (vgl. Figure 29, S. 77). Da die Hemmung der Fettsäure-Elongation durch Chloracetamid zu einer Akkumulation der Edukt-Acyl-CoAs führt, könnte eine Retro-Inhibierung den herbizidalen Effekt noch verstärken.

#### 4.3.2 Beitrag zur phytotoxischen Wirkung

Der erste Hinweis auf eine Herbizid-bedingte Reduktion epicuticularer Wachse wurde von der Wirkstoffgruppe der Thiocarbamate berichtet (Still *et al.*, 1970). Im Vergleich zu Metazachlor hemmten (sub)millimolare EPTC-Konzentrationen (Wilmesmeier und Wiermann, 1995), Triallat (Kern *et al.*, 1997) und dem Benzofuran Ethofumesat (Abulnaja *et al.*, 1992) die Wachsbiosynthese jedoch nur schwach. Dies entspricht auch der im *in vivo* Test gefundenen geringeren Hemmung der VLCFA-Biosynthese durch diese Komponenten.

Gleichzeitig beeinflussen sowohl EPTC (Wilmesmeier und Wiermann, 1995) als auch Chloracetamide (Schmalfuß *et al.*, 1998) den Aufbau von Sporopollenin. Darüberhinaus hemmen mikromolare EPTC-Konzentrationen den Einbau von C22- und C24-Fettsäuren in Cutin und Suberin aus Baumwolle, die ein Biopolymer der Cuticula darstellen (Schmutz *et al.*, 1996). Diese (schwerlöslichen) Bestandteile der Cuticula wurden in dieser Arbeit nicht untersucht. Da die Cuticula jedoch insbesondere hydroxylierte (Di)carbonsäuren (C16-C24) enthält, die auf der Grundlage der Fettsäure-Elongation entstehen (von Wettstein-Knowles, 1993), kann von einem Metazachlor-induzierten Rückgang der gesamten cuticulären VLCFAs, einschließlich Cutin, Suberin und epicuticularer Wachse, ausgegangen werden. Die

Folgen einer destabilisierten Cuticula infolge gehemmter VLCFA-Biosynthese hält Lemieux (1996) für letal.

Nach Riederer und Schreiber (1994) entspricht die Dicke der Wachsschicht etwa der Dimension der langkettigsten Wachskomponenten. Auf molekularer Ebene erfüllen die besonders langkettigen Komponenten der Wachse prinzipiell die gleiche Funktion wie VLCFAs in der Plasmamembran (vgl. Abschnitt 4.4.2, S. 93), entsprechend einer Verankerung zwischen benachbarten, kristallinen Bereichen der Wachsschicht. Unter VLCFA-Mangel verkleinert sich somit die Ausdehnung solcher Bereiche, die Zonen amorphen Wachses erweitern sich. Damit werden die Hydrophilie und die gesamte Integrität der Wachsschicht verändert, und in der Folge ihre Funktion bezüglich des Verdunstungsschutzes, der Permeabilität, der Pathogenabwehr und des Strahlungsschutzes beeinträchtigt (Kerstiens, 1996).

Infolge der steigenden Permeabilität werden Xenobiotika in der Wachsschicht innerhalb kurzer Zeit absorbiert und aufgenommen (Schreiber und Schönherr, 1992), wie Ebert (1982) auch nach Applikation von Metolachlor beobachtete. Somit katalysieren Chloracetamide ihre weitere Aufnahme durch die Cuticula, sobald sie ihre Wirkung in der Zelle entfaltet haben. Durch eine Ausdünnung der Wachsschicht wird die Reflexion der UV-Strahlung durch kristalline Bereiche vermindert, was z.B. anhand des Anstiegs der Xanthophyllzyklus-Pigmente beobachtet wurde (Robinson *et al.*, 1993). Da im UV-Licht, auch meßbar bei der Exposition von Keimlingen in Freilandkultur, die Wachs-Zusammensetzung zugunsten längerer Komponenten verschoben wird (Steinmüller und Tevini, 1985), der Einsatz von Metolachlor jedoch entgegengesetzt wirkt (Tevini und Steinmüller, 1987), kann man von einem verminderten UV-Schutz nach Chloracetamid-Behandlung ausgehen.

Millar *et al.* (1999) beobachteten anhand einer *Arabidopsis*-Mutante, in der die Expression eines Elongase-Gens (*CUT1*) unterdrückt war, eine Hemmung der Fettsäure-Elongation > C24. Die Folge waren ein Phänotyp mit „nackter“ Hypokotyle aufgrund der nahezu vollständigen Unterdrückung der Wachsbiosynthese, begleitet von vermindertem Wuchs und Sterilität der Samen.

Dennoch werden für Mutanten mit veränderter Wachszusammensetzung, anders als für Hefe-Mutanten mit veränderter Membranlipid-Zusammensetzung, keine unmittelbaren letalen Effekte berichtet. In Lauch fanden Rhee *et al.* (1998) keinen direkten Zusammenhang zwischen Wachsbiosynthese, Zellteilung und Zellwachstum. Dies legt den Schluß nahe, daß die Hemmung der Wachsbiosynthese trotz ihrer hohen Empfindlichkeit nicht allein für die

Phytotoxizität der Chloracetamide verantwortlich ist. Vielmehr verstärkt der Wachsverlust die Herbizidwirkung, indem der Keimling zusätzlichen biotischen und abiotischen Streßfaktoren ausgeliefert wird.

#### 4.4 Wirkung der Chloracetamide auf die Plasmamembran

##### 4.4.1 VLCFA-Mangel in Membranlipiden

Der Plasmamembran kommt aufgrund ihrer Exposition als äußerste physiologische Membranbarriere der Zelle eine funktionelle Sonderrolle zu, was auch durch ihre spezielle Lipid-Zusammensetzung zum Ausdruck kommt (Table 15 und Table 16, S. 65), die sie von allen anderen zellulären Membranen (Endomembranen) abgrenzt (Larsson *et al.*, 1990; Schneiter *et al.*, 1999). Aus molekularer Sicht sind ein besonders hoher Gehalt an Sterolen, Sphingolipiden und VLCFAs charakteristisch für die Zusammensetzung der Plasmamembran. In Gurke sind Sterole und Sphingolipide 2fach, VLCFAs sogar 4fach in der Plasmamembran angereichert, wie anhand der Präparation und Charakterisierung der Plasmamembran sowie einer Fraktion von Endomembranen (insbesondere Bestandteile von ER, GA, Mitochondrien und anderen nicht-plastidären Membranen) nachgewiesen wurde (

Figure 24, S. 64; Table 16, S. 65). Vergleichbare Daten werden beispielsweise von Lauch (Moreau *et al.*, 1988), Gerste, Blumenkohl und Spinat berichtet (Rochester *et al.*, 1987).

Trotz der hohen VLCFA-Konzentration wird eine Beteiligung der Plasmamembran an der VLCFA-Biosynthese bisher ausgeschlossen. Dennoch werden durch [<sup>14</sup>C]Malonat markierte VLCFAs sowohl in der Plasmamembran als auch in den Endomembranen gefunden (Figure 27, S. 69), wobei die Markierung in kurzer Zeit (30 min; Moreau *et al.*, 1985) und, im Vergleich zum Gehalt an Gesamtfettsäuren, überproportional in VLCFAs detektiert wurde – ein Hinweis auf einen hohen VLCFA-Umsatz in den beteiligten Membranen (Moreau *et al.*, 1985). Demgegenüber betrug die Inkubationszeit in den hier beschriebenen Experimenten 24 h, wodurch der Gehalt markierter VLCFAs in beiden Membran-Typen etwa gleich hoch und die inkorporierte Radioaktivität für die Fettsäure-Analytik ausreichend war.

Der Einbau der so markierten VLCFAs fand sich in beiden Membran-Typen durch Chloracetamide gehemmt, somit muß der VLCFA-Mangel der Plasmamembran auf die Chloracetamid-induzierte Hemmung der VLCFA-Biosynthese in ER und GA zurückzuführen sein. Weiter zeigt sich der VLCFA-Mangel tendenziell stärker am Syntheseort als in der

Plasmamembran (vgl. Sensitivität mit  $10^{-8}$  M Metazachlor, Figure 27, S. 69), entsprechend einer indirekten, durch den intrazellulären Lipidtransport vermittelten reduzierten VLCFA-Versorgung. Mehrere Untersuchungen belegen einen vesikulären Transport von VLCFAs (gebunden als VLCFA-Diacylglycerid) von ihren Syntheseort (ER und GA) zur Plasmamembran, der auch anhand des zeitverzögerten Einbaus verschiedener VLCFA-Phospholipide in ER bzw. PM nachgewiesen werden kann (zusammengefaßt in Moreau *et al.*, 1998).

Um eine mögliche (zusätzliche) Hemmung des VLCFA-Transports durch Chloracetamide auszuschließen, wurde als Vergleichsubstanz das Ionophor Monensin eingesetzt, das durch seine Lipophilie und seine chelatisierenden Eigenschaften mit Membranen wechselwirkt (Produktinformation der Herstellerfirma). Während in Lauch durch Monensin selektiv der VLCFA-Transport von ER und GA zur Plasmamembran unterbunden wurde (Bertho *et al.*, 1991), war der Effekt auf den VLCFA-Einbau in die Gurke-Plasmamembran gering (Table 17, S. 70). Dieser Befund zeigt, daß der Wirkmechanismus von Monensin nicht mit dem der Chloracetamide zu vergleichen ist, zumal die VLCFA-Biosynthese der Endomembran-Fraktion nicht durch Monensin gehemmt war.

In der Lipid-Doppelschicht der Plasmamembran sind VLCFAs nicht nur in Phospho- und Sphingolipiden, sondern auch in der innen- bzw. außenliegenden Lipidschicht der Plasmamembran unterschiedlich konzentriert. Besonders angereichert sind VLCFAs in exofacialen Sphingolipiden, während Phospholipide vor allem cytofacial orientiert sind (Brown und London, 2000).

Pflanzliche Sphingolipide machen bis zu 30 % der Plasmamembran-Lipide aus (Moreau *et al.*, 1998) und unterscheiden sich von Glycerolipiden durch den Grundkörper Sphingosin, einem einfach ungesättigtem C18-Aminoalkohol, der glykosidisch gebundene Glucose sowie eine als Säureamid gebundene (sehr) langkettige Fettsäure enthält (Cerebrosid). Die Molekülstruktur, Größe und physikalische Eigenschaften sind somit den Diacyl-Glycerolipiden ähnlich (Figure 31, S. 94; Brown, 1998). Pflanzliche Cerebroside enthalten neben den gesättigten VLCFAs zum überwiegenden Teil Hydroxy-VLCFAs (Cahoon und Lynch, 1991; Moreau *et al.*, 1998), die in dieser Arbeit nicht berücksichtigt (und nicht analysiert) wurden, da sie einer aufwendigeren Analytik bedürfen und keine primären Produkte der Fettsäure-Elongation sind. Nach bisherigem Kenntnisstand entstehen Hydroxy-VLCFAs nach Bindung der VLCFA als Cerebrosid durch Cytochrom P 450 - abhängige Hydroxylasen im ER (Cabello-Hurtado *et al.*, 1998).

Soweit bisher für verschiedene pflanzliche, tierische und menschliche Zellen berichtet wurde, ist neben der Ausstattung der Plasmamembran mit VLCFAs der insgesamt hohe Sättigungsgrad der in der Membran gebundenen Fettsäuren charakteristisch. Dieser liegt ebenfalls über dem Niveau anderer zellulärer Membranen (Larsson *et al.*, 1990; Moreau *et al.*, 1998; Schneiter und Kohlwein, 1997). So ist beispielsweise das Verhältnis gesättigte/ungesättigte Fettsäuren in der Plasmamembran von Lauch und Mais etwa ausgeglichen (Moreau *et al.*, 1988; Lessire *et al.*, 1981), vergleichbar mit dem in Gurke gefundenen Wert von 1,1 (Table 14, S. 62).

Demgegenüber überwiegen in den Endomembranen ungesättigte Fettsäuren, da der VLCFA-Gehalt kleiner und der Ölsäure-Anteil höher ist. Dies gilt insbesondere für plastidäre Membranen aus Gurke, die besonders reich an mehrfach ungesättigten Fettsäuren sind (Table 14, S. 62; vgl. Keppler und Novacky, 1989) und gleichzeitig den geringsten VLCFA-Gehalt aufweisen (Table 14, S. 62).

Obschon Sphingolipide nicht quantitativ hydrolysiert wurden, und der Gehalt von Hydroxy-VLCFAs in dieser Arbeit nicht untersucht wurde, konnten im Markierungsexperiment durch eine verlängerte saure Hydrolyse keine weiteren markierten VLCFAs aus den Lipiden freigesetzt werden. Somit ist sehr wahrscheinlich die überwiegende Menge nicht-hydroxylierter, gesättigter VLCFAs in den Phospholipidkomponenten der Plasmamembran, also Phosphatidylcholin und -ethanolamin, gebunden.

#### 4.4.2 *Phytotoxizität durch Einwirkung auf Struktur und Integrität von Membranen*

Der hohe Sättigungsgrad und insbesondere die hohe VLCFA-Konzentration der Plasmamembran bilden aus heutiger Sicht die Grundlagen für die besonderen physikalischen und funktionellen Eigenschaften der Plasmamembran (Brown, 1998; Simons und Ikonen, 1997). Lipid-gebundene sehr langkettige Acylketten (vgl. Figure 31, S. 94) ordnen sich, bedingt durch die (über)langen gesättigten und gerad-kettigen Acylketten, in der Membran parallel an, somit werden die van-der-Waals-Wechselwirkungen zwischen benachbarten Lipiden mit zunehmender VLCFA-Konzentration stärker. Die Folge sind eine dichtere Packung der Membrankomponenten und eine stark abnehmende Desorptionsrate der Membran-Lipide, verbunden mit einer höheren Viskosität der Membran (Hamilton, 2000). Dabei ist noch nicht geklärt, ob die Überlänge der VLCFA-Kohlenstoffkette zu einer Verzahnung mit der gegenüberliegenden Lipidschicht (Boggs und Koshy, 1994) oder, im

Gegenteil, zu einem Herausragen des polaren Lipid-Kopfes aus der Membran-Ebene führt (Simons und Ikonen, 1997).

Demnach würde ein durch Chloracetamide hervorgerufener Mangel an VLCFAs zu einer verminderten Rigidität der Membran führen. Denkbare Folgen wären z.B. eine geringere Belastbarkeit durch den Turgor, eine veränderte Anpassung der Fettsäure-Zusammensetzung an die Temperatur (Lynch und Steponkus, 1987) oder eine veränderte Permeabilität – wie von Chloracetamiden berichtet (Mellis *et al.*, 1982).

Zur Einleitung der Zellteilung müssen sämtliche Membranen dupliziert werden, der Bedarf an Lipiden ist daher sehr groß und bestimmt den gesamten Ablauf des Zyklus (Jackowski, 1996). In Gegenwart von Chloracetamiden jedoch wurde die Neubildung von Membranen unterdrückt, wie elektronenmikroskopische Untersuchungen an Hirse zeigen (Ebert, 1980).

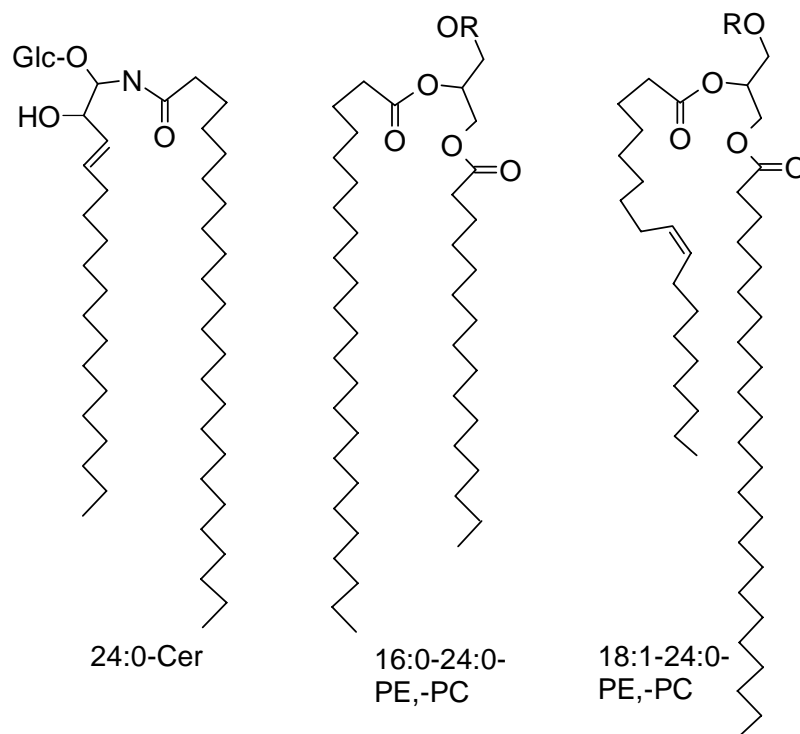


Figure 31: Structural features of VLCFA-containing plasma membrane lipids.

Very-long-chain fatty acids are bound to phosphatidyl choline (PC), phosphatidyl-ethanolamine (PE) and cerebrosides (Cer). Absence of *cis* double bonds leads to linear extended acyl chains exhibiting a stronger binding of membrane components (adapted from Brown, 1998; Moreau *et al.*, 1998).

Diese Untersuchungen legen nahe, daß ein Zusammenhang zwischen dem VLCFA-Gehalt und der beobachteten Wirkung der Chloracetamide als Hemmstoffe des Zellwachstums und der Zellteilung besteht (Deal und Hess, 1980; Fedtke *et al.*, 1998).

Couderchet *et al.* (1995) fanden in einer Metazachlor-resistenten Mutante der Grünalge *Scenedesmus acutus* gegenüber dem Wildtyp eine Vergrößerung der Zellen, die auch bei Behandlung des Wildtyps zu beobachten war. In höheren Pflanzen wird ebenfalls eine Vergrößerung von Zellen, jedoch eine verringerte Zellteilung beobachtet (Ebert, 1980). In Hefezellen ist C26-Fettsäure für Wachstum und Teilung essentiell (Dickson und Lester, 1999), eine vollständige Unterdrückung der VLCFA-Biosynthese ist für *Saccharomyces cerevisiae* sogar letal, wie Ho *et al.* (1996) anhand einer Null-Mutante nachwiesen.

Erklärbar wird dies, wenn Prozesse der Endo- und Exocytose im Zusammenhang mit dem VLCFA-Gehalt stehen, wie Schneiter und Kohlwein (1997) anhand einer Beteiligung von VLCFAs an der Bildung von Membrankrümmungen und -abschnürungen diskutieren. Aktuelle Modelle gehen davon aus, daß infolge der Kettenlänge und des Sättigungsgrads der Plasmamembran-Fettsäuren die Bildung von Lipiddomänen innerhalb der Membran begünstigt wird (Brown, 1998; Simons und Ikonen, 1997). Anhand der Bildung von VLCFA-reichen Domänen können vesikulärer Lipid- und Proteintransport, Verankerung von Membranproteinen und Signalfunktion gegenüber Pathogenen erstmals auf molekularer Basis erklärt werden.

Ein konkreter Zusammenhang zwischen VLCFA-Gehalt und Membranstrukturen wird durch Untersuchungen von Millar *et al.* (2000) aufgezeigt, die infolge einer überexprimierten Fettsäure-Elongase in *Arabidopsis* eine (letale) Deformation von Membranstrukturen VLCFA-reicher Lipide beobachteten. Demnach ist ein VLCFA-Gleichgewicht innerhalb der Zelle entscheidend für die Biogenese von Membranen, stärkere Abweichungen zu höheren (vgl. Millar und Kunst, 1997) oder den durch Chloracetamide herbeigeführten niedrigeren Konzentrationen (vgl. Mellis *et al.*, 1982) sind für den Organismus offenbar letal. Um diesen Zusammenhang nachzuweisen, könnte eine elektronenmikroskopische Untersuchung der Gurke-Plasmamembran im Hinblick auf morphologische Veränderungen weitere Aufklärung verschaffen.

## 5 ZUSAMMENFASSUNG

Die vorliegenden Untersuchungen belegen, daß die extraplastidäre Fettsäure-Elongation der primäre Angriffspunkt herbizidaler Chloracetamide ist. Das Zielenzym dieser Herbizidgruppe und weiterer verwandter Substanzen ist somit die Fettsäure-Elongase. Der Rückgang der Produkte dieses Stoffwechselschrittes, der sehr langkettigen Fettsäuren (VLCFAs, very-long-chain fatty acids), wurde in verschiedenen experimentellen Systemen beobachtet und im Hinblick auf seine Phytotoxizität diskutiert.

1. Die Neubildung von gesättigten VLCFAs aus Gurke-Kotyledonen (C20-C26) kann durch *in vivo* Einbau von [<sup>14</sup>C]Acetat, -Malonat und -Stearinsäure gemessen werden. Die markierten VLCFAs können anhand eigens hergestellter <sup>14</sup>C-markierter Standards durch Radio-HPLC identifiziert werden.

Die VLCFA-Biosynthese in Keimlingen von Gerste, Gurke und Mais, gemessen anhand des Einbaus von [<sup>14</sup>C]Malonat, wird durch Chloracetamide empfindlich gehemmt (50 %ige Hemmung durch 10-100 nM). In Sojazellen erniedrigt dieselbe Dosis den Gehalt *unmarkierter* VLCFAs.

Die Hemmung der Fettsäure-Elongation *in vivo* erhöht sich mit zunehmender Kettenlänge der VLCFA, begründet durch die sequentielle Reaktion und die damit verbundene Hemmung der Folgeschritte. Die zusätzliche Retro-Inhibierung der Fettsäure-Elongation durch akkumulierte Acyl-CoAs wird diskutiert.

2. Die Kondensationreaktion zwischen Acyl-CoA und Malonyl-CoA ist der erste und geschwindigkeits-bestimmende Schritt der 4stufigen VLCFA-Bildung (vgl. Figure 28, S. 77). Diese Reaktion wird in Hefe, die mit dem Gen des kondensierenden Enzyms der Fettsäure-Elongase aus *Arabidopsis*-Samen (*FAE1*) transformiert wurde, durch submikromolare Wirkstoffkonzentrationen gehemmt.

Da keine Zwischenprodukte der Fettsäure-Elongation gefunden wurden, ist dies ein Indiz dafür, daß das kondensierende Enzym, die  $\beta$ -Ketoacyl-Synthase des mikrosomalen Elongase-Komplexes, das mutmaßliche Zielenzym der Chloracetamide darstellt.



3. Die Hemmintensität hängt von Dauer und Temperatur der Vorinkubation (Enzym und Wirkstoff) ab, dies weist auf eine irreversible Bindung des Wirkstoffs an das kondensierende Enzym hin.

Neben den Chlor- und Oxyacetamiden wurden weitere Herbizide mit unterschiedlicher chemischer Struktur als Inhibitoren der Fettsäure-Elongation identifiziert (Cafenstrol, Fentrazamid, Ethofumesat und ein Phosphinosulfonat, Strukturen s. S. 14).

4. Komponenten des epicuticularen Wachses von Gurkekotyledonen, d.h. sehr langkettige Fettsäuren, Alkohole und Alkane gingen nach Behandlung mit Metazachlor ebenfalls zurück. Die Hemmintensität war für alle drei Stoffklassen vergleichbar und für Komponenten > C24 besonders intensiv.

Da die Wachsbiosynthese auf VLCFA-Vorläufern beruht, stellt der Rückgang epicuticularer Wachse eine unmittelbare Folge der gehemmten Fettsäure-Elongation dar. Die *de novo* Synthese der Wachskomponenten wird bereits durch nanomolare Konzentrationen Metazachlor unterdrückt, wie anhand der Analyse [<sup>14</sup>C]Malonat-markierter Wachskomponenten nachgewiesen werden konnte.

Weil epicuticulare Wachse den Keimlings vor Austrocknung, Pathogenbefall und UV-Licht schützen, trägt ihre Reduktion zur phytotoxischen Wirkung der Chloracetamide bei.

5. Innerhalb der Zelle sind VLCFAs in Lipiden der Plasmamembran angereichert, mit einem Anteil von bis zu 10 % der Gesamtfettsäuren. Durch die Analyse endogener bzw. radioaktiv markierter Membranfettsäuren konnte nachgewiesen werden, daß der Rückgang von Plasmamembran-VLCFAs eine unmittelbare Folge der durch Chloracetamide gehemmten VLCFA-Biosynthese ist.

Der Einfluß des VLCFA-Rückgangs auf Struktur und Integrität der Membranen, bedingt durch die stabilisierende Funktion überlanger, geradkettiger VLCFA-Acylreste, wird diskutiert. Ein Zusammenhang zu früher gefundenen sekundären Wirkungen der Chloracetamide, etwa der Hemmung der Zellteilung oder der Membran-Biogenese, macht es sehr wahrscheinlich, daß fehlende Plasmamembran-VLCFAs die phytotoxische Wirkung der Chloracetamide bedingen.

## 6 LITERATURVERZEICHNIS

- Abulnaja KO, Harwood JL (1991), Thiocarbamate herbicides inhibit fatty acid elongation in a variety of monocotyledones. *Phytochemistry* **30**: 1145-1447
- Abulnaja KO, Tighe CR, Harwood JL (1992), Inhibition of fatty acid elongation provides a basis for the action of the herbicide ethofumesate on surface wax formation. *Phytochemistry* **4**: 1155-1159
- Agrawal VP, Lessire R, Stumpf PK (1985), Biosynthesis of very long chain fatty acids in microsomes from epidermal cells of *Allium porrum* L. *Arch Biochem Biophys* **230**: 580-589
- Ausubel FM, Brent R, Kinston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA, Struhl K (1992), *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, New York, USA
- Avato P, Mikkelsen JD, von Wettstein-Knowles PM (1980), Effect of inhibitors on synthesis of fatty acyl chains present in waxes on developing maize leaves. *Carlsberg Res Commun* **45**: 329-347
- Barret PB, Harwood JL (1996), Thiocarbamate action on very long chain fatty acid biosynthesis in plants. In: Kader JC and Mazliak P, eds, *Plant Lipid Metabolism*, Kluwer Academic Publ., Amsterdam, Netherlands, pp 115-117
- Bertho P, Moreau P, Morre DJ, Cassagne C (1991), Monensin blocks the transfer of very long chain fatty acid containing lipids to the plasma membrane of leek seedlings. Evidence for lipid sorting based on fatty acyl chain length. *Biochim Biophys Acta* **1070**: 127-134
- Bianchi G (1994), Plant waxes. In: Hamilton RJ, ed, *Waxes: Chemistry, Molecular Biology and Functions*, The Oily Press, Dundee, UK, pp 175-222
- Bianchi G, Avato P, Bertorelli P, Mariani G (1977), Epicuticular waxes of two *Sorghum* varieties. *Phytochemistry* **17**: 999-1001
- Blaser HU, Spindler F (1997), Enantioselective catalysis for agrochemicals: the case of the Dual Magnum® Herbicide. *Chimia* **51**: 297-299
- Bligh EG, Dyer WJ (1959), A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can J Biochem Physiol* **37**: 911-917
- Blokker P, Schouten S, DeLeeuw JW, Damsté JSS, Van den Ende H (1999), Molecular structure of the resistant biopolymer in zygosporangium cell walls of *Chlamydomonas monoica*. *Planta* **207**: 539-543
- Boggs JM, Koshy KM (1994), Do the long fatty acid chains of sphingolipids interdigitate across the center of a bilayer of shorter chain symmetric phospholipids? *Biochim Biophys Acta* **1189**: 233-241
- Borge GI, Vogt G, Nilsson A (1999), Intermediates and products formed during fatty acid  $\alpha$ -oxidation in cucumber (*Cucumis sativus*). *Lipids* **34**: 661-673

- Böger P (1964), Das Strukturprotein aus Chloroplasten einzelliger Grünalgen und seine Beziehung zum Chlorophyll. *Flora* **154**: 174-211
- 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 MM (1976), A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**: 248-254
- Breaux EJ (1987), Initial metabolism of acetochlor in tolerant and susceptible seedlings. *Weed Sci* **35**: 463-468
- Brown DA, London E (2000), Structure and function of sphingolipid- and cholesterol-rich membrane rafts. *J Biol Chem* **275**: 17221-17224
- Brown RB (1998), Sphingolipid organization in biomembranes: what physical studies of model membranes reveal. *J Cell Sci* **111**: 1-9
- Budziszewski GJ, Kevan PC, Hildebrand DF (1996), Uses of biotechnology in modifying plant lipids. *Lipids* **31**: 557-569
- Burnet MWM, Baar AR, Powles SB (1994), Chloroacetamide resistance in rigid ryegrass (*Lolium rigidum*). *Weed Sci* **42**: 153-157
- Cabello-Hurtado F, Batard Y, Salaun JP, Durst F, Pinot F, Werck-Reichhart D (1998), Cloning, expression in yeast, and functional characterization of CYP81B1, a plant cytochrome P450 that catalyzes in-chain hydroxylation of fatty acids. *J Biol Chem* **273**: 7260-7267
- Cahoon EB, Lynch DV (1991), Analysis of glucocerebrosides of rye (*Secale cereale* L.cv Puma) leaf and plasma membrane. *Plant Physiol* **95**: 58-68
- Cassagne C, Lessire R, Bessoule JJ, Moreau P, Creach A, Schneider F, Sturbois B (1994), Biosynthesis of very long chain fatty acids in higher plants. *Prog Lipid Res* **33**: 55-69
- Cook HW (1994) Fatty acid desaturation and chain elongation in eukaryotes. In: Vance DE and Vance JE, eds, *Biochemistry of Lipids, Lipoproteins and Membranes*, Elsevier Science Publ., Amsterdam, Netherlands, pp 129-152
- Couderchet M, Bocion PF, Chollet R, Seckinger K, Böger P (1997), Biological activity of two stereoisomers of the *N*-thienyl chloroacetamide herbicide dimethenamid. *Pestic Sci* **50**: 221-227
- Couderchet M., Böger P (1993a), Changes in fatty acid profile induced by herbicides. In: Böger P and Sandmann G, eds, *Target Assays for Modern Herbicides and Related Compounds*, Lewis Publ., Chelsea, Michigan, USA, pp 175-181
- Couderchet M, Böger P (1993b), Chloroacetamide-induced reduction of fatty acid desaturation. *Pest Biochem Physiol* **45**: 91-97

- Couderchet M, Brozio B, Böger P (1994), Effect and metabolism of the chloroacetamide herbicide metazachlor: comparison of plant cell suspension cultures and seedlings. *Pestic Sci* **19**: 127-135
- Couderchet M, Rumbolz J, Kring F, Böger P (1995), Characteristics of a metazachlor-resistant *Scenedesmus acutus* cell line. *Pest Biochem Physiol* **52**: 222-233
- Couderchet M, Schmalfuß J, Böger P (1996), Incorporation of oleic acid into sporopollenin and its inhibition by the chloroacetamide herbicide metazachlor. *Pest Biochem Physiol* **55**: 489-199
- Couderchet M, Schmalfuß J, Böger P (1998), A specific and sensitive assay to quantify the herbicidal activity of chloroacetamides. *Pestic Sci* **52**: 381-387
- Coupland D (1991) The role of compartmentation of herbicides and their metabolites in resistance mechanisms. *In*: Caseley JC, Cussans GW and Atkin RK, eds, *Herbicide Resistance in Weeds and Crops*, Butterworth-Heinemann, Oxford, UK, pp 187-198
- Deal LM, Hess FD (1980), An analysis of the growth inhibitory characteristics of alachlor and metolachlor. *Weed Sci* **28**: 468-175
- Dickson CD, Lester LL (1999), Metabolism and selected functions of sphingolipids in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim Biophys Acta* **1438**: 305-321
- Domergue F, Besoule JJ, Moreau P, Lessire R, Cassagne C (1998), Recent advances in plant fatty acid elongation. *In*: Harwood JL, ed, *Plant Lipid Biosynthesis: Fundamentals and Agricultural Applications*, Cambridge University Press, Cambridge, UK, pp 185-220
- Domergue F, Chevalier S, Santarelli X, Cassagne C, Lessire R (1999), Evidence that oleoyl-CoA and ATP-dependent elongations coexist in rapeseed (*Brassica napus* L.). *Eur J Biochem* **263**: 464-470
- Durner J, Böger P (1990), Oligomeric forms of plant acetolactate synthase depend on flavin adenine dinucleotide. *Plant Physiol* **93**: 1027-1031
- Ebert E (1980), Herbicidal effects of metolachlor (2-Chloro-*N*-[2-ethyl-6-methyl-phenyl]-*N*-[2-methoxy-1-methylethyl]acetamide) at a cellular level in sorghum. *Pest Biochem Physiol* **13**: 227-236
- Ebert E (1982), The role of waxes in the uptake of metolachlor into sorghum in relation to the protectant CGA 43089. *Weed Res* **22**: 305-311
- Ebert E, Ramsteiner K (1984), Influence of metolachlor and the metolachlor protectant CGA 43089 on the biosynthesis of epicuticular waxes on the primary leaves of *Sorghum bicolor* Moench. *Weed Res* **24**: 383-389
- Fedtke C (1991), Mode of action studies with mefenacet. *Pestic Sci* **33**: 421-426
- Fedtke C, Schmalfuß J, Couderchet M (1998), Chloroacetanilides, oxyacetamides, tetrazolinones: mode of action. - 1. cross resistance and oleic acid incorporation in algal model systems. 9th IUPAC Congress Pesticide Chemistry, The Food-Environment Challenge, Roy. Soc. London, UK, Poster 4A-011

- Fehling E, Mukherjee KD (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
- Fuerst EP (1987), Understanding the mode of action of chloroacetamide and thiocarbamate herbicides. *Weed Technol* **1**: 270-277
- Fuerst EP, Gronwald JW (1986), Induction of rapid metabolism of metolachlor in Sorghum (*Sorghum bicolor*) shoots by GGA-92194 and other antidotes. *Weed Sci* **34**: 354-361
- Fuerst EP, Lamoureux GL, Ahrens WH (1991), Mode of action of the dichloroacetamide antidote BAS 145-138 in corn. *Pest Biochem Physiol* **42**: 78-87
- Giese BN (1974), Effects of light and temperature on the composition of epicuticular wax of barley leaves. *Phytochemistry* **14**: 921-929
- Gronwald JW (1991), Lipid biosynthesis inhibitors. *Weed Sci* **39**: 435-449
- Gurvitz A (1998), Peroxisomal delta3-cis-delta2-trans-enoyl-CoA isomerase encoded by ECII is required for growth of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* on unsaturated fatty acids. *J Biol Chem* **273**: 31366-31377
- Gutnikov G (1995), Fatty acid profiles of lipid samples. *J Chrom* **671**: 71-89
- Gülz PG (1980), Alkanes and alkenes in the epicuticular waxes from *Cistus* plants. In: Mazliak P, ed, Biogenesis and Function of Plant Lipids, Elsevier Science Publ., Amsterdam, Netherlands, pp 275-279
- Hamilton JA (2000), Fatty acid transport: difficult or easy? *J Lipid Res* **39**: 467-481
- Hamilton RJ (1994), Analysis of Waxes. In: Hamilton RJ, ed, Waxes: Chemistry, Molecular Biology and Functions, The Oily Press, Dundee, UK, 1994, pp 311-342
- Hamm PC (1974), Discovery, development, and current status of the chloroacetamide herbicides. *Weed Sci* **22**: 541-545
- Harr J, Guggenheim R, Schulke G, Falk RH (1991), *The Leaf Surface of Major Weeds*. Sandoz Agro Ltd, Fricker Publ., Basel, Switzerland
- Harwood JL (1996), Recent advances in the biosynthesis of plant fatty acids. *Biochim Biophys Acta* **1301**: 7-56
- Harwood JL (1998), Environmental effects on plant lipid biochemistry. In: Harwood JL, ed, Plant Lipid Biosynthesis: Fundamentals and Agricultural Applications, Cambridge University Press, Cambridge, UK, pp 305-350
- Hatzios KK (1991), An overview of the mechanisms of action of herbicide safeners. *Z Naturforsch* **46c**: 819-827
- Heap IM (1997), The occurrence of herbicide-resistant weeds worldwide. *Pestic Sci* **51**: 235-243

- Hechtberger P, Zinser E, Saf R, Hummel K, Paltauf F, Daum G (1994), Characterization, quantification and subcellular localization of inositol-containing sphingolipids of the yeast, *Saccharomyces cerevisiae*. *Eur J Biochem* **225**: 641-649
- Hess FD, Holmsen JD, Fedtke C (1980), The influence of the herbicide mefenacet on cell division and cell enlargement in plants. *Weed Res* **30**: 21-27
- Hlousek-Radojicic A, Evenson KJ, Jaworski JG, Post-Beittenmiller D (1998), Fatty acid elongation is independent of Acyl-Coenzyme A synthetase activities in leek and *Brassica napus*. *Plant Physiol* **116**: 251-258
- Ho JK, Moser H, Kishimoto Y, Hamilton JA (1996), Interactions of a very long chain fatty acid with model membranes and serum albumin. Implications for the pathogenesis of adrenoleukodystrophy. *J Clin Invest* 1455-1463
- Houtz B, Falcone D, Wagner G, Hildebrand D (2000), Lipids - introduction, synthesis of fatty acids, waxes and cutin. Lecture in Plant Biochemistry, University of Kentucky, USA, [www.uky.edu/~dhild/biochem/14/lect14.html](http://www.uky.edu/~dhild/biochem/14/lect14.html)
- Huang B, Gressel J (1997), Barnyardgrass (*Echinochloa crus-galli*) resistance to both metolachlor and thiobencarb in China. *Resistance Pest Management* **9**: 5-7
- Jablonkai I., Dutka F (1989), Structure, alkylating reactivity and phytotoxicity relationships of chloroacetamides. *In: Proceedings, Brighton Crop Protection Conference - Weeds - 1989*, pp 455-462
- Jackowski S (1996), Cell cycle regulation of membrane phospholipid metabolism. *J Biol Chem* **271**: 20219-20222
- James DW, Lim E, Keller J, Plooy I, Ralston E, Dooner HK (1995), Direct tagging of the *Arabidopsis* fatty acid elongation (*FAE1*) gene with the maize transposon activator. *Plant Cell* **7**: 309-319
- Jaworski EJ (1956), Biochemical action of CDAA, a new herbicide. *Science* **123**: 847-848
- Jenks MA, Tuttle HA, Feldmann KA (1996), Changes in epicuticular waxes on wildtype and *eceriferum* mutants in *Arabidopsis* during development. *Phytochemistry* **42**: 29-34
- Katavic V, Reed DW, Taylor DC, Giblin EM, Barton DL, Zou J, McKenzie SL, Covello PS, Kunst L (1995), Alteration of seed fatty acid composition by an ethyl methanesulfonate-induced mutation in *Arabidopsis thaliana* affecting diacylglycerol acyltransferase activity. *Plant Physiol* **108**: 399-409
- Kawaguchi A, Iwamoto-Kihara A, Sato N (1999), Biosynthesis and degradation of fatty acids. *In: Barton D, Nakanishi K and Meth-Cohn O, eds, Comprehensive Natural Products Chemistry, Elsevier Publ., Amsterdam, Netherlands, Vol 1, pp 23-58*
- Kepler LD, Novacky A (1989), Changes in cucumber cotyledon membrane lipid fatty acids during paraquat treatment and a bacteria-induced hypersensitive reaction. *Phytopathology* **79**: 705-708

- Kern AJ, Jackson LJ, Dyer WE (1997), Fatty acid and wax biosynthesis in susceptible and triallate-resistant *Avena fatua* L. *Pestic Sci* **51**: 21-26
- Kerstiens G (1996), Signalling across the divide: a wider perspective of cuticular structure-function relationships. *Trends Plant Sci* **1**: 125-129
- Kjellbom P, Larsson C (1984), Preparation and polypeptide composition of chlorophyll-free plasma membranes from leaves of light-grown spinach and barley. *Physiol Plant* **62**: 501-509
- Knörzer OC, Durner J, Böger P (1996), Alterations in the antioxidative system of suspension-cultured soybean cells (*Glycine max*) induced by oxidative stress. *Physiol Plant* **97**: 388-396
- Kring F, Couderchet M, Böger P (1995), Inhibition of oleic acid incorporation into a non-lipid fraction by chloroacetamide herbicides. *Physiol Plant* **95**: 551-558
- Kuksis A, Myher JJ (1989), Lipids. In: Lawson AM, ed, Mass Spectrometry, Walter de Gruyter, Berlin, Germany, pp 267-354
- Lamoureux GL, Rusness DG (1989), Propachlor metabolism in soybean plants, excised soybean tissues, and soil. *Pest Biochem Physiol* **34**: 187-204
- Langebartels C, Harms H (1985), Analysis of nonextractable (bound) residues of pentachlorophenol in plant cells using a cell wall fractionation procedure. *Ecotoxicol Environ Safety* **10**: 268-279
- Larsson C, Møller IM, Widell S (1990), An introduction to the plant plasma membrane - its molecular composition and organization. In: Larsson C and Møller IM, eds, The Plant Plasma Membrane, Springer Publ., Berlin, Germany, pp 1-15
- Lämmli UK (1970), Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-684
- Leavitt JRC, Penner D (1979), In vitro conjugation of glutathione with acetanilide herbicides and EPTC sulfoxide and the action of the herbicide antidote R-25788. *J Agric Food Chem* **27**: 533-536
- LeBaron HM, McFarland JE, Simoneux BJ (1988), Metolachlor. In: Kearney PC, Kaufman DD, eds, Herbicides: Chemistry, Degradation and Mode of Action, Marcel Dekker, New York, USA, pp 335-382 .
- Lemieux B (1996), Molecular genetics of epicuticular wax biosynthesis. *Trends Plant Sci* **1**: 312-318
- Lessire R, Bessoule JJ, Cassagne C (1985), Solubilization of C18-CoA and C20-CoA elongases from *Allium porrum* L. epidermal leek microsomes. *FEBS Lett* **187**: 314-320
- Lessire R, Bessoule JJ, Cook L, Cinti DL, Cassagne C (1993), Occurrence and characterization of a dehydratase enzyme in the leek icosanoyl-CoA synthase complex. *Biochim Biophys Acta* **1169**: 243-249

- Lessire R, Hartmann-Bouillon MA, Cassagne C (1981), Very long chain fatty acids: occurrence and biosynthesis in membrane fractions from etiolated maize coleoptiles. *Phytochemistry* **21**: 55-59
- Lessire R, Moreau P, Cassagne C (1982), Retro-inhibition of stearyl-CoA synthetase by stearyl-CoA in *Allium porrum* epidermal cell microsomes. In: Wintermans JFGM and Kuiper PJC, eds, *Biochemistry and Metabolism of Plant Lipids*, Elsevier Biomedical Press B.V., Amsterdam, Netherlands, pp 83-86
- Lynch DV, Steponkus PL (1987), Plasma membrane lipid alterations associated with cold acclimation of winter rye seedlings (*Secale cereale* L.cv Puma). *J Plant Physiol* **83**: 761-767
- Mann JD, Pu M (1968), Inhibition of lipid biosynthesis by certain herbicides. *Weed Sci* **22**: 197-198
- Matthes B (1996), Hemmung des Einbaus von Fettsäuren in Sporopollenin der Grünalge *Scenedesmus acutus* durch Chloracetamide. *Diplomarbeit, Universität Konstanz*
- 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
- Mayer P (1997), Charakterisierung von unpolaren Fettsäure-Metaboliten einer Zellwandfraktion von *Scenedesmus acutus*: Zur Wirkungsweise von Chloroacetamiden. *Diplomarbeit, Universität Konstanz*
- McFarland JE, Hess FD (1984), Chloroacetamide herbicides alkylate plant proteins. *Plant Physiol* **75** : 49
- Mellis JM, Pillai P, Davis DE, Truelove B (1982), Metolachlor and alachlor effects on membrane permeability and lipid synthesis. *Weed Sci* **30**: 399-404
- Millar AA, Clemens S, Zachgo S, Giblin EM, Taylor DC, 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 AA, Kunst L (1997), Very-long-chain fatty acid biosynthesis is controlled through the expression and specificity of the condensing enzyme. *Plant J* **12**: 121-131
- Millar AA, Smith MA, Kunst L (2000), All fatty acids are not equal: discrimination in plant membrane lipids. *Trends Plant Sci* **5**: 95-101
- Molin WT, Anderson EJ, Porter CA (1986), Effects of alachlor on anthocyanin and lignin synthesis in etiolated sorghum (*Sorghum bicolor* (L.) Moench) mesocotyls. *Pest Biochem Physiol* **25**: 105-111
- Moreau P, Bessoule S, Mongrand S, Testet P, Cassagne C (1998), Lipid trafficking in plant cells. *Prog Lipid Res* **37**: 371-391
- Moreau P, Hugelin H, Lessire R, Cassagne C (1988), Plasma membrane biogenesis in higher plants: *In vivo* transfer of lipids to the plasma membrane. *Phytochemistry* **27**: 1631-1638



- Moreau P, Jugelin H, Lessire R, Cassagne C (1985), Intermembrane transfer of long chain fatty acid synthesized by etiolated leek seedlings. *Phytochemistry* **25**: 387-391
- Moser H, Sauter H (1982), Der Einfluß von Atropisomerie und chiralem Zentrum auf die biologische Aktivität des Metolachlor. *Z Naturforsch* **37b**: 451-462
- Möllers C, Albrecht S (1994), Screening herbicide effects on lipid metabolism of storage lipids in *in vitro* culture of microspore-derived embryoids of *Brassica napus*. *J Plant Physiol* **144**: 376-384
- Murphy DJ (1999), Production of novel oils in plants. *Curr Opin Biotechnol* **10**: 175-180
- Narsaiah DB, Harvey RG (1977), Alachlor placement in the soil as related to phytotoxicity to maize (*Zea mays* L.) seedlings. *Weed Res* **17**: 163-168
- Nemet Alla MM, Younis ME (1995), Herbicide effects on phenolic metabolism in maize (*Zea mays* L.) and soybean (*Glycine max.* L.) seedlings. *J Exp Botany* **46**: 1731-1736
- O'Connell KM, Breaux EJ, Fraley RT (1988), Different rates of metabolism of two chloroacetanilide herbicides in Pioneer 3320 corn. *Plant Physiol* **86**: 359-363
- O'Connell PJ, Harms CT, Allen JFR (1998), Metolachlor, S-metolachlor, and their role within sustainable weed management. *Crop Prot.* **17**: 207-212
- Ohlrogge JB, Jaworski JG (1997), Regulation of fatty acid synthesis. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **48**: 109-136
- Post-Beittenmiller D (1996), Biochemistry and molecular biology of wax production in plants. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **47**: 405-430
- Powles SB, Preston C, Jutsum AR (1997), Herbicide resistance: impact and management. *Adv Agron* **58**: 57-93
- Renault S, Shukla A, Giblin M, MacKenzie SL, Devine MD (1997), Plasma membrane lipid composition and herbicide effects on lipoxygenase activity do not contribute to differential membrane responses in herbicide-resistant and -susceptible wild oat (*Avena fatua* L.) biotypes. *J Agric Food Chem* **45**: 3269-3275
- Rendina AR, Felts JM (1988), Cyclohexanedione herbicides are selective and potent inhibitors of acetyl-CoA carboxylase from grasses. *Plant Physiol* **86**: 983-986
- Rhee Y, Hlousek-Radojic A, Ponsamuel J, Liu D, Post-Beittenmiller D (1998), Epicuticular wax accumulation and fatty acid elongation activities are induced during leaf development of leek. *Plant Physiol* **116**: 901-911
- Ridley SM, Ellio AC, Yeung M, Youle D (1998), High-throughput screening as a tool for agrochemical discovery: automated synthesis, compound input, assay design and process management. *Pestic Sci* **54**: 327-337
- Riederer M, Schreiber L (1994), Waxes - the transport barriers of plant cuticles. *In*: Hamilton RJ, ed, Waxes: Chemistry, Molecular Biology and Functions, The Oily Press, Dundee, UK, 1994, pp 131-156

- Robinson SA, Lovelock CE, Osmond CB (1993), Wax as a mechanism for protection against photoinhibition - a study of *Cotyledon orbiculata*. *Bot Acta* **106**: 307-312
- Rochester CP, Kjellbom P, Andersson B, Larsson C (1987), Lipid composition of plasma membranes isolated from light-grown barley (*Hordeum vulgare*) leaves: Identification of cerebroside as a major component. *Arch Biochem Biophys* **255**: 385-391
- Saffert A, Hartmann-Schreier J, Schön A, Schreier P (2000), A dual function  $\alpha$ -dioxygenase-peroxidase and NAD<sup>+</sup> oxidoreductase active enzyme from germinating pea rationalizing  $\alpha$ -oxidation of fatty acids in plants. *Plant Physiol* **123**: 1545-1551
- Sandager L, Stymne S (2000), Characterization of enzymes determining fatty acid chain length in developing seeds of *Limnanthes douglasii*. *J Plant Physiol* **156**: 617-622
- Scarponi L, Perucci P, Martinetti L (1991), Conjugation of 2-chloroacetanilide herbicides with glutathione: role of molecular structures and of glutathione-S-transferase enzymes. *J Agric Food Chem* **37**: 2010-2013
- Schmalfuß J (2000), Die Wirkungsweise der herbizidalen Chloracetamide. *Dissertation, Universität Konstanz*
- Schmalfuß J, Matthes B, 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
- Schmutz A, Buchala AJ, Ryser U (1996), Changing the dimensions of suberin lamellae of green cotton fibers with a specific inhibitor of the endoplasmatic reticulum-associated fatty acid elongases. *Plant Physiol* **110**: 403-411
- Schneiter R (1999), Brave little yeast, please guide us to Thebes: Sphingolipid function in *S. cerevisiae*. *BioEssays* **21**: 1004-1010
- Schneiter R, Brügger B, Sandhoff R, Zellnig G, Leber A, Lampl M, Athenstaedt K, Hrastnik C, Daum G, Eder S, Paltauf F, Wieland FT, Kohlwein SD (1999), Electrospray ionization tandem mass spectrometry (ESI-MS/MS) analysis of the lipid molecular composition of yeast subcellular membranes reveals acyl-chain-based sorting/ remodeling of distinct molecular species *en route* to the plasma membrane. *J Cell Biol* **146**: 741-754
- Schneiter R, Kohlwein SD (1997), Organelle structure, function, an inheritance in yeast: a role for fatty acid synthesis? *Cell* **88**: 431-434
- Schreiber L, Schönherr J (1992), Analysis of foliar uptake of pesticides in barley leaves: role of epicuticular waxes and compartmentation. *Pestic Sci* **36**: 213-221
- Schröder G (1999), Polyketide synthesis. *In*: Barton D, Nakanishi K and Meth-Cohn O, eds, Comprehensive Natural Products Chemistry, Elsevier Publ., Amsterdam, Netherlands, Vol 1, pp 749-771

- Scott RJ (1994), Pollen exine - the sporopollenin enigma and the physics of pattern. *In*: Scott RJ and Stead MA, ed, *Molecular and Cellular Aspects of Plant Reproduction*, Society for Experimental Biology, Cambridge University Press, Cambridge, UK, pp 49-81
- Simons K, Ikonen E (1997), Functional rafts in cell membranes. *Nature* **387**: 569-572
- Sloan ME, Camper ND (1985), Effects of alachlor and metolachlor on cucumber seedlings. *Environ Exp Bot* **26**: 1-7
- Sommerville C, Browse J (1995), Plant Lipids: Metabolism, mutants, and membranes. *Science* **252**: 80-86
- Stamper DM, Tuovinen OH (1998), Biodegradation of the acetanilide herbicides alachlor, metolachlor, and propachlor. *Crit Rev Microbiol* **24**: 1-22
- Steinmüller D, Tevini M (1985), Action of ultraviolet radiation (UV-B) upon cuticular waxes in some crop plants. *Planta* **164**: 557-564
- Still GG, Davis DG, Zander GL (1970), Plant epicuticular lipids: alteration by herbicidal carbamates. *Plant Physiol* **46**: 307-314
- Tevini M, Steinmüller D (1987), Influence of light, UV-B radiation, and herbicides on wax biosynthesis of cucumber seedlings. *J Plant Physiol* **131**: 111-121
- Todd J, Post-Beittenmiller D, Jaworski JG (1999), *KCSI* encodes a fatty acid elongase 3-ketoacyl-CoA synthase affecting wax biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* **17**: 119-130
- von Wettstein-Knowles PM (1985), Effects of inhibitors on synthesis of esterified alkan-2-ols in barley spike epicuticular wax. *Carlsberg Res Commun* **50**: 239-262
- von Wettstein-Knowles PM (1993), Waxes, cutin, and suberin. *In*: Moore TS, ed, *Lipid Metabolism in Plants*, CRC Press, Boca Raton, pp 127-166
- von Wettstein-Knowles PM (1994), Biosynthesis and genetics of waxes. *In*: Hamilton RJ, ed, *Waxes: Chemistry, Molecular Biology and Functions*, The Oily Press, Dundee, UK, pp 91-129
- Weisshaar H, Böger P (1987), Primary effects of chloroacetamides. *Pest Biochem Physiol* **28**: 286-293
- Weisshaar H, Böger P (1991), Further effects of chloroacetamides and evidence for inhibition of acetylation of DNA-associated protein. *Pest Biochem Physiol* **39**: 20-26
- Wilkinson RE (1981), Metolachlor influence on growth and terpenoid synthesis. *Pest Biochem Physiol* **16**: 63-71
- Wilmesmeier S, Wiermann R (1995), Influence of EPTC (*S*-ethyl-dipropyl-thiocarbamate) on the composition of surface waxes and sporopollenin structure in *Zea mays*. *J Plant Physiol* **146**: 22-28

- 
- Wu J, Hwang I-T, Hatzios KK (2000), Effects of chloroacetanilide herbicides on membrane fatty acid desaturation and lipid composition in rice, maize, and sorghum. *Pest Biochem Physiol* **66**: 161-169
- Zama P, Hatzios KK (1987), Interactions between the herbicide metolachlor and the safener CGA-92194 at the levels of uptake and macromolecular synthesis in sorghum leaf protoplasts. *Pest Biochem Physiol* **27**: 86-96

## DANK

Herrn Prof. Dr. Peter Böger danke ich für das spannende Thema, die Bereitstellung des Arbeitsplatzes und die anregende Unterstützung.

Herrn Prof. Dr. K. W. Mendgen danke ich für die Übernahme des Zweitgutachtens.

Bei Herrn Prof. Dr. C. Larsson und Frau I. Karlsson (Universität Lund, Schweden) möchte ich mich für den Aufenthalt in ihrem Labor bedanken, wo ich die Methode der 2-Phasen-Verteilung erlernen konnte.

Herrn Dr. W. Michalke (Universität Freiburg) danke ich für die Überlassung des Antiserums gegen die Plasmamembran-ATPase aus Mais sowie für die Unterstützung in technischen Fragen.

Prof. Dr. L. Kunst (University of British Columbia, Vancouver, Canada) danke ich für die Bereitstellung transformierter Hefezellen.

Für die Unterstützung in GC/MS-Analysen bedanke ich mich bei Frau Gudrun von Schewen und Prof. Dr. V. Ullrich sowie Frau Malin Bein und Prof. Dr. U. Groth.

Besonders bedanken möchte ich mich bei meinen Kollegen Dr. Jochen Schmalfuß, Barbara Lederer, Peter Mayer und Dr. Oliver Knörzer, auf deren konstruktive Kritik und moralische Unterstützung ich stets zählen konnte. Für die hilfreiche praktische Unterstützung bedanke mich herzlich bei den Studenten Christian Behrens, Jutta Hager, Melanie Martini, Ulrike Bauer und Cathrin Müller. Allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe möchte ich für die kollegiale Arbeitsatmosphäre danken.

Den größten Dank schulde ich meinen Eltern, die mir in meiner gesamten Ausbildungszeit immer ihr Vertrauen geschenkt und mich unterstützt haben.