

**Funktionelle Charakterisierung von *PaLACS2*
und *PaATT1* aus dem Kutinbiosyntheseweg der
Süßkirsche (*Prunus avium* L.)**

Von der Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover
zur Erlangung des Grades

Doktorin der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

genehmigte Dissertation

von

M.Sc. Myriam Géraldine Declercq

geboren am 27. Januar 1984, in Kehl

2014

Referent: Prof. Dr. agr. Moritz Knoche

Korreferent: Prof. Dr. rer. nat. Thomas Debener

Tag der Promotion: 28. 05.2014

Zusammenfassung

Die Kutikularmembran (CM) in Früchten der Süßkirsche (*Prunus avium* L.) ist im Verlauf der Fruchtentwicklung Dehnungen ausgesetzt, die zu Mikrorissen und zum Platzen der Früchte führen können. Die Dehnungen entstehen durch eine Diskrepanz zwischen der Oberflächenzunahme der Frucht und einer Stagnation der CM-Deposition in der frühen Fruchtentwicklung. Letzteres wird möglicherweise durch eine Herunterregulation von Genen der CM-Bildung verursacht. Zwei Kandidatengene der Kutinbiosynthese, *PaLACS2* und *PaATT1*, wurden im Rahmen dieser Arbeit funktionell untersucht.

Eine Sequenzmotivanalyse auf Proteinebene und ein multiples Alignment mit homologen Sequenzen zeigten, dass *PaLACS2* und *PaATT1* jeweils konservierte Motive besitzen, die charakteristisch für die Familie der Acyl-CoA-Synthetasen und ω -Hydroxy-Monooxygenasen sind. Phylogenetische Analysen bestätigten, dass beide Gene eng mit den jeweiligen Homologen der *Rosaceae* verwandt sind.

PaLACS2 und *PaATT1* wurden in *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh Wildtyplinien überexprimiert und entsprechende Mutantenlinien komplementiert. Die Effekte der ektopischen Expression wurden auf molekulargenetischer, chemischer und physiologischer Ebene dokumentiert. Die Expression der endogenen Gene *LACS2*, *ATT1* und *LACS1* wurden untersucht. Die Expression von *PaLACS2* erhöhte generell die Kutinmenge pro Flächeneinheit und verminderte zum Teil die Menge an Wachsmonomeren in den komplementierten Linien. Die Expression von *PaATT1* erhöhte die Kutinmenge in den komplementierten Linien, wobei die Wachsfraktion unverändert blieb. Die Expression beider Gene reduzierte in den komplementierten Linien die Permeabilität der Kutikula gegenüber Wasser und Toluidinblau.

Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass (1) *PaLACS2* und *PaATT1*, exprimiert in *Arabidopsis*, in der Kutinsynthese agieren, (2) *PaLACS2* für eine Acyl-CoA-Synthetase aus der LACS-Familie kodiert, (3) *PaATT1* für eine Monooxygenase aus der Cytochrom P450-Familie kodiert und (4) beide Gene an der Kutinsynthese in der Süßkirsche beteiligt sind.

Schlüsselwörter: Kutikula, Genexpression, *Prunus avium*

Abstract

The cuticular membrane (CM) of the developing sweet cherry (*Prunus avium* L.) fruit is under stress, which can lead to microscopic cracks and water induced cracking of the fruits. Strain results from a mismatch between the fruit surface expansion and the cessation of CM deposition in early fruit development. The latter is possibly caused by a downregulation of genes involved in CM synthesis. Two candidate genes involved in cutin synthesis, *PaLACS2* and *PaATT1*, were functionally characterised in this thesis.

The analysis of sequence motifs on protein level and a multiple alignment with homologous sequences showed that *PaLACS2* and *PaATT1* each have conservative motifs, which were characteristic for the family of the acyl-CoA synthetases and ω -hydroxy monooxygenases, respectively. The phylogenetic analysis confirmed that both genes were closely related to their corresponding homologues of the *Rosaceae*.

PaLACS2 and *PaATT1* were overexpressed in *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh wild-type lines and complemented the corresponding knockout mutant lines. The effect of the ectopic expression was documented on the molecular, chemical and physiological level. The expression of the endogenous genes *LACS2*, *ATT1* and *LACS1* was analysed. The expression of *PaLACS2* generally increased the amount of cutin per surface unit and partially reduced the amount of wax in the complemented lines. The expression of *PaATT1* increased the amount of cutin in the complemented lines whereas the wax fraction remained unchanged. The expression of both genes decreased the permeability of the cuticle towards water and toluidine blue in the complemented lines.

These results suggest that (1) *PaLACS2* and *PaATT1* expressed in *Arabidopsis* function in the cutin synthesis, (2) *PaLACS2* codes for a long-chain fatty acid-CoA synthetase, (3) *PaATT1* encodes a cytochrome P450 monooxygenase and, (4) both genes are involved in cutin synthesis in sweet cherry.

Keywords: Cuticle, gene expression, *Prunus avium*

Inhalt

Zusammenfassung	ii
Abstract	iii
Inhalt	iv
Abkürzungsverzeichnis.....	vii
1. Allgemeine Einleitung.....	1
1.1. Die Kutikula.....	1
1.2. Die CM im Verlauf der Fruchtentwicklung von Süßkirschen	2
1.3. Die Kutin- und Wachsbiosynthesewege	4
1.4. Vergleich der Zusammensetzung der Kutikula von Süßkirsche und <i>Arabidopsis</i>	5
1.5. Expression von möglichen Genen der Kutinsynthese in der Süßkirsche.....	7
1.6. Zielsetzung	8
2. Bioinformatische Charakterisierung von <i>PaLACS2</i> und <i>PaATT1</i>	9
2.1. Einleitung	9
2.2. Material & Methoden.....	10
2.2.1. Proteinsequenzanalyse	10
2.2.2. Phylogenetische Untersuchungen	10
2.3. Ergebnisse	10
2.3.1. <i>PaLACS2</i> und <i>PaATT1</i> besitzen konservierte Proteinmotive	10
2.3.2. Phylogenetische Verwandtschaftsverhältnisse von <i>PaLACS2</i> und <i>PaATT1</i> ...	12
2.4. Diskussion.....	14
2.4.1. <i>PaLACS2</i> und <i>PaATT1</i> besitzen charakteristische Proteinmotive	14
2.4.2. <i>PaLACS2</i> und <i>PaATT1</i> sind eng verwandt mit Homologen der <i>Rosaceae</i>	16
2.5. Schlussfolgerung	16
2.6. Ergänzende Daten	17
3. Funktionelle Charakterisierung von <i>PaLACS2</i> und <i>PaATT1</i>	19

3.1.	Abstract	19
3.2.	Introduction.....	20
3.3.	Materials and methods	22
3.3.1.	Plant material	22
3.3.2.	Cloning and transformation	22
3.3.3.	Molecular analysis	23
3.3.4.	Analysis of cutin and wax composition	24
3.3.5.	Transpiration assay	25
3.3.6.	Toluidine blue staining.....	25
3.3.7.	Data analysis	26
3.4.	Results.....	26
3.4.1.	Molecular characterisation.....	26
3.4.2.	Cutin and wax composition	28
3.4.3.	Physiological characterisation.....	31
3.5.	Discussion	34
3.5.1.	Cutin and wax deposition.....	34
3.5.2.	Permeability of the cuticle	35
3.5.3.	Potential consequences of modifying cutin and wax deposition for fruit cracking	36
3.6.	Conclusion	37
3.7.	Acknowledgements.....	37
3.8.	Data archiving statement.....	37
3.9.	Supplemental Data	38
3.9.1.	Online Resource 1	38
3.9.2.	Online Resource 2.....	39
3.9.3.	Online Resource 3	40

3.9.4. Online Resource 4	41
3.9.5. Online Resource 5	42
3.9.6. Online Resource 6	43
4. Allgemeine Diskussion	46
4.1. Die molekulargenetische Ebene - Gene & Proteine.....	46
4.2. Die biochemische Ebene - Kutin & Wachs	48
4.3. Die Kutikula und das Platzen der Kirschen	51
5. Ausblick	54
Literaturverzeichnis	56
Danksagung	69
Lebenslauf.....	71
Publikationen und Poster	72

Abkürzungsverzeichnis

α	alpha	alpha
A	surface area	Oberfläche
AMP	Adenosine monophosphate	Adenosinmonophosphat, Adenylat
ATP	Adenosine triphosphate	Adenosintriphosphat
ATT1	Aberrant induction of type three 1	
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool	
bp	base pair	Basenpaare
BSTFA	N,O-Bis(trimethylsilyl)- trifluoroacetamide	N,O-Bis-(trimethylsilyl)- trifluoroacetamid
cDNA	complementary DNA	komplementäre DNA
CDS	coding sequence	kodierende Sequenz
ClaI	Bsu15I from <i>Bacillus subtilis</i> 15, Type II restriction enzyme	Bsu15I aus <i>Bacillus subtilis</i> 15, Typ II Restriktionsenzym
CM	cuticular membrane	Kutikularmembran
CoA	coenzyme A	Koenzym A
CPR	cytochrome P450 reductase	Cytochrom P450-Reduktase
DAFB	days after full bloom	Tage nach Vollblüte
DNA	deoxyribonucleic acid	Desoxyribonukleinsäure
EI-MS	electron ionization mass spectrometry	Massenspektrometrie mit Elektronenstoßionisation
ER	endoplasmic reticulum	Endoplasmatisches Retikulum
FACS	fatty acid acyl-CoA synthetase	Fettsäure-Acyl-CoA-Synthetase
FID	flame ionization detector	Flammenionisationsdetektor
FTIR	Fourier transform infrared spectroscopy	Fourier-Transformations- Infrarotspektroskopie
GC	gas chromatography	Gaschromatographie
GPAT	glycerol-3-phosphate acyltransferase	Glycerin-3-phosphat- Acyltransferase
HCl	hydrochloric acid	Salzsäure
J	flux in transpiration	Transpirationsfluss

LACS	Long-chain acyl-CoA synthetase	Synthetase für langkettige Acyl-CoAs
M (stat.)	expression stability value	Wert für die Stabilität der Genexpression
M (chem.)	molar concentration	Stoffmengenkonzentration
<i>n</i>	number (samples)	(Proben-)Anzahl
NaCl	sodium chloride	Natriumchlorid
NaClO	sodium hypochlorite	Natriumhypochlorit
NADPH	Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate	Nicotinamidadenindinukleotid-phosphat
NMR	nuclear magnetic resonance spectroscopy	Kernspinresonanzspektroskopie
ω	omega	omega
<i>p</i>	probability level	Signifikanzwert
PCR	polymerase chain reaction	Polymerasenkettenreaktion
QTL	quantitative trait locus	
RNA	ribonucleic acid	Ribonukleinsäure
RT-qPCR	reverse transcriptase quantitative PCR	Reverse Transkriptase quantitative PCR
SE	standard error	Standardfehler
SNP	single nucleotide polymorphism	Einzelnukleotid-Polymorphismus
<i>t</i>	time	Zeit
TB	toluidine blue	Toluidinblau
T-DNA	transfer DNA	Transfer-DNA
TMS	trimethylsilyl	Trimethylsilyl
UV	ultraviolet	ultraviolett
v/v	volume per volume	Volumen per Volumen
VLCFA	very long chain fatty acid	sehr langkettige Fettsäuren
<i>W</i>	mass of water transpired	Masse des transpirierten Wassers
w/w	weight per weight	Masse per Masse

1. Allgemeine Einleitung

1.1. Die Kutikula

Die Besiedelung der Kontinente durch höhere Pflanzen begann vor etwa 400 Millionen Jahren (Edwards et al. 1996). Dieser neue Lebensraum bot einerseits ein größeres Maß an Licht und Kohlendioxid für die Photosynthese, andererseits wirkten neue Umweltfaktoren auf die Pflanzen ein. Im Vergleich mit den vormals aquatischen Habitaten, stand nun die geringe Luftfeuchte der Atmosphäre den mit Wasser gesättigten pflanzlichen Geweben gegenüber. Ein daraus resultierender Gradient bedrohte die Pflanzen durch unkontrollierte Wasserverluste in Form von Transpiration (Riederer 1991). Als Schutzmechanismus entwickelten die Pflanzen physiologische, anatomische und morphologische Anpassungen, darunter auch die Kutikula (Riederer und Schreiber 2001).

Die Kutikula ist eine hydrophobe Grenzfläche und bedeckt die äußerste Zellschicht aller oberirdischen Pflanzenorgane im primären Zustand. Sie dient als Barriere gegen unkontrolliertem Wasser- und Gasaustausch und trägt damit zu einer geregelten Transpiration der Pflanzen bei. Weitere Funktionen der Kutikula sind der Schutz vor biotischen (Pathogene, Insekten) und abiotischen Stressfaktoren (UV-Strahlung) (Riederer 2006).

Die Kutikularmembran (CM, cuticular membrane) ist heterogen aufgebaut (Abb. 1). Sie besitzt eine zellulosereiche Kutikularschicht, gefolgt von der Kutikula und aufgelagerten Wachsen. Die Kutikularschicht besteht aus Zellwandschichten, die neben Kutin und Wachsen auch Zellulose enthalten. Die Kutikula ist der Kutikularschicht aufgelagert und besteht aus einer Kutinmatrix mit eingebetteten Wachsen (Pollard et al. 2008).

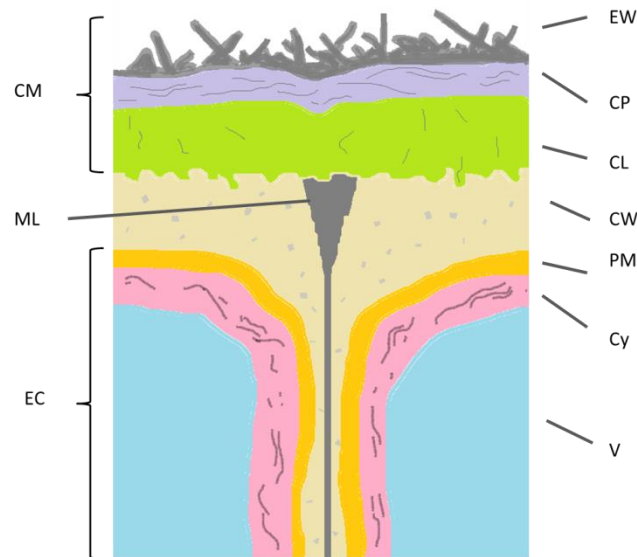


Abb. 1 Schematische Zeichnung epidermaler Zellen (EC, epidermal cell) deren Zellwand (CW, cell wall) von einer Kutikularmembran (CM, cuticular membrane) bedeckt ist. Die CM besteht aus Kutikularschicht (CL, cuticular layer), Kutikula (CP, cuticle proper) und aufgelagerten Wachsen (EW, epicuticular waxes). Die Kutikularschicht besteht aus Kutin, eingebetteten Wachsen sowie Polysacchariden aus der Zellwand. Die Kutikula setzt sich aus einer Kutinmatrix mit eingebetteten Wachsen zusammen. Cy, Zytoplasma (cytoplasm); ML, Mittellamelle; PM, Plasmamembran; V, Vakuole (Modifiziert nach Taiz und Zeiger 2002).

1.2. Die CM im Verlauf der Fruchtentwicklung von Süßkirschen

Das Wachstum der Süßkirschen-Frucht lässt sich von der Blüte bis zur Reife in drei Phasen unterteilen und folgt einem doppelt sigmoiden Kurvenverlauf (Lilleland und Newsome, 1934). In Phase I erfährt die Frucht eine Zunahme der Oberfläche, die in Phase II verzögert wird (Abb. 2). Phase III wird charakterisiert durch eine finale Oberflächenzunahme, die zur Fruchtreife hin stagniert (Knoche et al. 2001).

Die Bildung der CM ist nach Phase I der Fruchtentwicklung nahezu abgeschlossen (Knoche et al. 2004). Durch die unzureichende Neubildung wird die CM im weiteren Verlauf (Phase II und III) stetig dünner. Diese Diskrepanz zwischen CM-Deposition und Oberflächenzunahme der Frucht führt zu plastischen und elastischen Dehnungen in der CM (Knoche et al. 2004; Peschel und Knoche 2005; Grimm et al. 2012). Die Dehnungen leiten die Bildung von Mikrorissen in der CM ein, die wiederum eine erhöhte Wasseraufnahme der Fruchthaut begünstigen (Peschel und Knoche 2005; Knoche und Peschel 2006). Das wasserinduzierte Platzen der Süßkirschen vor und

während der Fruchtreife und die damit verbundenen Qualitätseinbußen führen weltweit zu wirtschaftlichen Verlusten (Simon 2006).

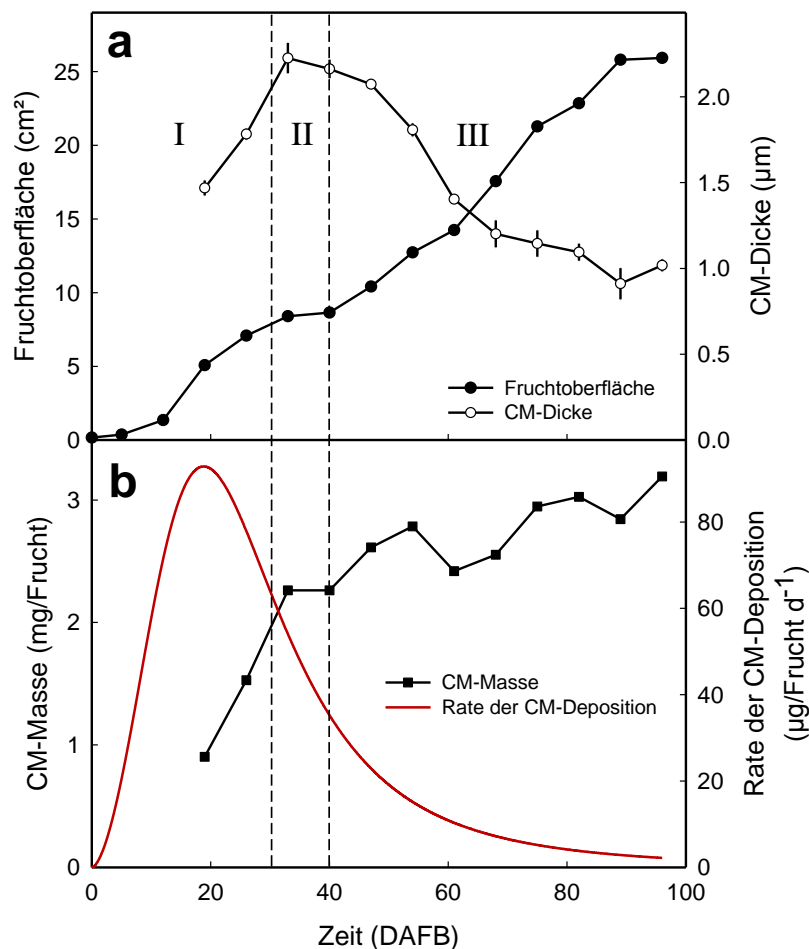


Abb. 2 Fruchtwachstum und Desposition der Kutikularmembran (CM) in der sich entwickelnden Süßkirsche. **a** Zusammenhang zwischen Fruchtoberfläche (schwarze Punkte) und Dicke der CM (weiße Punkte). Mit Zunahme der Fruchtoberfläche wird die CM ab Phase II der Fruchtentwicklung dünner. **b** Masse der CM pro Frucht (schwarze Rechtecke) und berechnete Rate der CM-Deposition (rote Linie). Die Neubildungsrate der CM erreicht ihren Höhepunkt in Phase I am Tag 20 nach Vollblüte (DAFB, days after full bloom) und nimmt in Phase II und III stetig ab. Bezogen auf die ganze Frucht bleibt die Masse der CM in Phase III nahezu konstant (Daten aus Alkio et al. 2012).

Die Bildung von Mikrorissen in der Frucht von Süßkirschen und die daraus resultierenden Folgen sind ein Ergebnis der Diskrepanz zwischen Oberflächenzunahme der Frucht und Stagnation der CM-Deposition. Während über die Funktion, den Aufbau und die chemische Zusammensetzung der CM in Süßkirschen bereits umfangreiches Wissen vorliegt (Knoche et al. 2001; Knoche et al. 2004; Peschel et al. 2005; Peschel et al. 2007), ist über die CM-Deposition, insbesondere auf molekularer Ebene, wenig bekannt.

1.3. Die Kutin- und Wachsbiosynthesewege

Die Kutinbiosynthese bildet zusammen mit der Wachsbiosynthese die Grundlage für die Bildung der CM. Bisher sind diese Synthesewege auf molekularer Ebene nur für die Modellpflanze *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh weitreichend untersucht worden (Li-Beisson et al. 2013). In *Arabidopsis* findet die Kutin- und Wachsbiosynthese im Endoplasmatischen Retikulum (ER) der Epidermiszellen statt (Samuels et al. 2008; Pollard et al. 2008). Ausgangspunkt für die Synthese von Wachs- und Kutinbestandteilen für die CM sind freie Fettsäuren im Cytosol (Abb. 3).

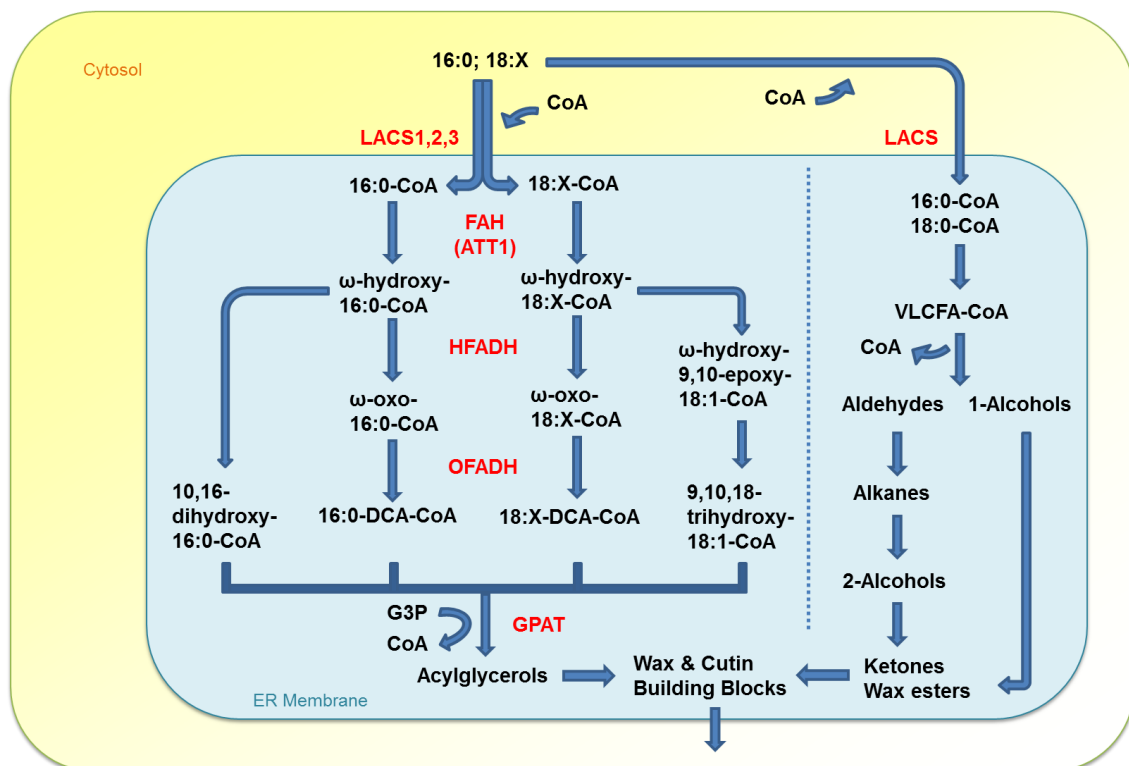


Abb. 3 Schema für die vorgeschlagenen Synthesewege zur Bildung der Kutin- und Wachsgrundbausteine im endoplasmatischen Retikulum (ER, hellblaue Fläche), beginnend mit freien 16:0 und 18:X Fettsäuren aus dem Cytosol. Involvierte Enzyme wurden im Syntheseweg am Ort ihrer möglichen Beteiligung vermerkt (rot). ATT1, ABERRANT INDUCTION OF TYPE THREE 1; CoA, Koenzym A (coenzyme A); DCA, Dicarbonsäure; FAH, Fettsäure-Hydroxylase (fatty acyl ω-hydroxylase); G3P, Glycerin-3-phosphat (glycerol-3-phosphate); GPAT, Glycerin-3-phosphat-Acyltransferase (glycerol-3-phosphate acyl transferase); HFADH, Hydroxyfettsäure-Dehydroxygenase (ω-hydroxy fatty acyl dehydroxygenase); LACS, LONG-CHAIN ACYL-COA SYNTHETASE; OFADH, Oxofettsäure-Dehydroxygenase (ω-oxo fatty acyl dehydroxygenase); VLCFA, sehr langkettige Fettsäure (very long chain fatty acid) (Modifiziert nach Li-Beisson et al. 2013).

In beiden Synthesewegen sind Proteine der LACS-Familie (long-chain acyl-CoA synthase) durch die Veresterung von 16:0 und 18:X Fettsäuren mit Koenzym A (CoA)

an der Aktivierung und dem Transport der resultierenden Acyl-CoAs in das ER beteiligt (Schnurr et al. 2004; Bessire et al. 2007; Lü et al. 2009; Weng et al. 2010; Pulsifer et al. 2012). Für die Kutinbiosynthese werden die 16:0 und 18:X Acyl-CoAs von Oxidasen der Cytochrom P450 CYP86-Familie im ER endständig hydroxyliert (Benveniste et al. 1998; Wellesen et al. 2001; Xiao et al. 2004; Rupasinghe et al. 2007; Li et al. 2010) oder von Hydroxylasen, unter anderen CYP77A6, mittelständig hydroxyliert (Li-Beisson et al. 2009). Acyltransferasen der GPAT-Familie (GPAT, glycerole-3-phosphate acyl transferase) verbinden die Fettsäuren unter Abspaltung des Koenzyms A mit Glycerol zum Weitertransport als Kutinmonomere (Li et al. 2007; Li-Beisson et al. 2009).

Die Wachsbiosynthese beginnt mit einem Elongationszyklus, welcher die Acyl-CoAs zu Molekülketten von 20-36 Kohlenstoffatomen (very long chain fatty acid, VLCFA) verlängert (Joubès et al. 2008), und teilt sich dann in den Acyl-reduzierenden (Rowland et al. 2006) und Alkan-bildenden Syntheseweg (Rowland et al. 2007). Diese Prozesse beinhalten die Bildung von Aldehyden, Alkanen, primären und sekundären Alkoholen. Die Produkte des Prozesses sind Ketone und Wachsester, die als Wachsmomere aus dem ER abtransportiert werden können (Li-Beisson et al. 2013).

Den Abschluss beider Synthesewege bildet der Abtransport der Kutin- und Wachsmomere aus dem ER in Richtung der Zellwand. Wann und wo eine Polymerisierung der Kutinbestandteile stattfindet ist bisher unklar (Pollard et al. 2008; Yeats und Rose 2013).

1.4. Vergleich der Zusammensetzung der Kutikula von Süßkirsche und *Arabidopsis*

Die Zusammensetzung der CM der Süßkirschenfrucht wurde bereits zu zwei Entwicklungszeitpunkten (22 und 85 DAFB) untersucht (Peschel et al. 2007). Untersuchungen zur Zusammensetzung der CM bei *Arabidopsis* umfassen unterschiedliche Pflanzenorgane (Stängel, Blätter, Samen, Petalen) und verschiedene Pflanzenlinien (Franke et al. 2005; Li-Beisson et al. 2009; Li-Beisson et al. 2013).

Der Vergleich von CM-Bestandteilen zwischen Süßkirschenfrüchten und *Arabidopsis*blättern zeigt, dass sich die Zusammensetzungen der Kutinmonomere qualitativ decken (Tabelle 1). In reifen Früchten der Süßkirsche machen die mittelständig oxygenierten Hydroxysäuren den größten Anteil aus; dem gegenüber

bilden die α,ω -Dicarbonsäuren den größten Anteil des Kutins in Arabidopsisblättern. Die Zusammensetzung der kutikularen Wachse stimmt für die Süßkirschenfrucht wie auch für die Arabidopsisblätter weitgehend überein. In beiden Geweben ist die Substanzklasse der Alkane mit hohem Anteil präsent. Bei Fruchtreife dominiert die Substanzklasse der Triterpenen die Zusammensetzung der kutikularen Wachse der Süßkirsche (Peschel et al. 2007).

Tabelle 1 Vergleich der Kutin- und Wachszusammensetzung zwischen Früchten der Süßkirsche und Blättern von *Arabidopsis*. Für die Süßkirsche wurden isolierte Kutikularmembranen 85 Tage nach Vollblüte analysiert, die Arabidopsisblätter stammen von fünf bis sechs Wochen alten Rosetten (Peschel et al. 2007; Li-Beisson et al. 2013). Die Daten zeigen Mittelwerte (\pm Standardfehler).

	<i>Prunus avium</i>		<i>Arabidopsis thaliana</i>	
	$\mu\text{g dm}^{-2}$	% w/w	$\mu\text{g dm}^{-2}$	% w/w
Kutinmonomere				
Fettsäuren	30 (4)	1.0 (0.2)	13.7 (1.1)	12.4 (1.0)
α,ω -Dicarbonsäuren	68 (2)	2.0 (0.2)	82.3 (3.1)	73.3 (2.8)
ω -Hydroxyfettsäuren	123 (11)	3.5 (0.1)	12.4 (0.7)	11.2 (0.6)
Mittelständig oxygenierte Hydroxyfettsäuren	2898 (341)	82.5 (0.1)	4.0 (0.1)	3.6 (0.1)
Unidentifiziert	380 (54)	10.7 (0.4)	-	-
Total	3513 (410)	100	110.7 (9.8)	100
Wachsmonomere				
Alkane	382 (5)	19.1 (0.4)	113.8 (9.2)	75.9 (6.1)
Alkohole	23 (1)	1.2 (0.1)	11.4 (2.9)	7.6 (1.9)
Aldehyde	-	-	5.2 (1.2)	3.5 (0.8)
Fettsäuren	-	-	12.5 (2.2)	8.3(1.5)
Ketone	-	-	0.9 (0.6)	0.6 (0.4)
Triterpene	1521 (69)	75.6 (0.7)	-	-
Unidentifiziert	83 (3)	4.1 (0.3)	3.1 (2.1)	2.1 (1.4)
Total	2009 (72)	100	150.1 (8.2)	100

Die Gegenüberstellung zeigt die Ähnlichkeit der Zusammensetzung der CM von Arabidopsisblättern und Süßkirschenfrüchten auf biochemischer Ebene. Die Substanzklassen der Kutin- und Wachsfraction sind in beiden Geweben qualitativ vergleichbar und lassen auf einen verwandten Biosyntheseweg schließen.

1.5. Expression von möglichen Genen der Kutinsynthese in der Süßkirsche

Der genetische Hintergrund der CM-Deposition wurde in unterschiedlichen Kulturpflanzen untersucht (Matas et al. 2011; Alkio et al. 2012; Albert et al. 2012). Bei der Süßkirsche galt es grundsätzlich zu klären, welche Gene an der CM-Bildung beteiligt sind und wie stark und in welchen Geweben sie exprimiert werden. Durch einen Vergleich bekannter Gene der Kutin- und Wachssynthese in *Arabidopsis* mit Transkriptomdaten der Süßkirschenfrucht wurden potentielle, orthologe Gene identifiziert. Die Gene zeichneten sich durch hohe Expressionsniveaus im Exokarp der Frucht aus. Die Expressionsmuster korrelierten oft mit der Rate der CM-Deposition (Alkio et al. 2012).

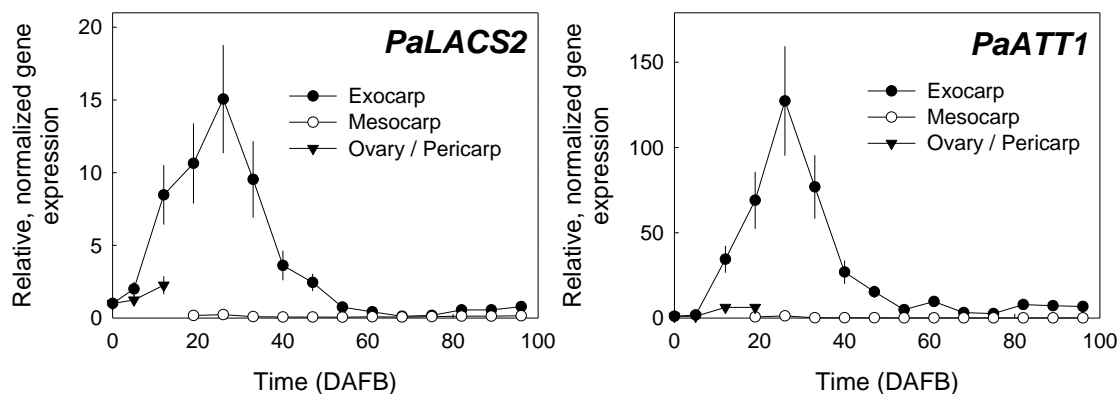


Abb. 4 Verlauf der Expression von *PaLACS2* und *PaATT1* während der Entwicklung der Fruchthaut (Exokarp) und des Fruchtfleisches (Mesokarp) abhängig von der Zeit in Tage nach Vollblüte (DAFB). Die Transkriptmenge wurden per RT-qPCR ermittelt, gegen drei Referenzgene normalisiert und relativ zur Probe des Exokarps am Tag der Vollblüte (0 DAFB) verrechnet. Dargestellt sind Mittelwerte (\pm Standardfehler) aus zwei biologischen Wiederholungen jeweils bestehend aus mindestens zwei technischen Wiederholungen (Alkio et al. 2012).

Aus den identifizierten Genen wurden *PaLACS2* und *PaATT1* als Kandidatengene für diese Arbeit ausgewählt (Abb. 4), da (1) beide möglicherweise an der Kutin-Biosynthese der Süßkirschenfrucht beteiligt sind, (2) ihre Expression in Phase I der Fruchtentwicklung herauf reguliert (maximal 120- und 15-fach) war, (3) ihre Expression auf das Exokarp begrenzt war und (4) ihre Expression mit der Rate der CM-Deposition korrelierte.

1.6. Zielsetzung

PaLACS2 und *PaATT1*, zwei Kandidatengene für die Kutin-Biosynthese der Süßkirschenfrucht, sollen auf bioinformatischen Weg analysiert und in entsprechenden Knockout-Mutanten sowie Wildtyp-Hintergrundlinien von *Arabidopsis thaliana* heterolog exprimiert werden. Die Untersuchungen sollen klären, ob

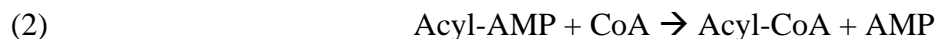
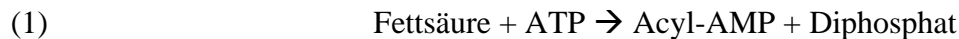
- (1) die bisher nur *in silico* identifizierten Gene als Homologe zu *Arabidopsis* bestätigt werden können,
- (2) die Gene einen Einfluss auf die Zusammensetzung des Kutins in *Arabidopsis* haben,
- (3) sich die Wachsfraction der Kutikula durch die Expression der Gene in *Arabidopsis* verändert und
- (4) die Expression der Gene die Permeabilität der Kutikula in *Arabidopsis* beeinflusst.

2. Bioinformatische Charakterisierung von *PaLACS2* und *PaATT1*

2.1. Einleitung

Alkio et al. (2012) schlugen *PaLACS2* und *PaATT1* als mögliche homologe Gene zur *LACS2* und *ATT1* in *Arabidopsis* vor. In *Arabidopsis* kodieren *LACS2* und *ATT1* für Enzyme, die an der Kutinsynthese beteiligt sind (Li-Beisson et al. 2013).

LACS2 (Q9XIA9) ist eine Acyl-CoA-Synthetase (EC 6.2.1.3.) und bevorzugt langkettige Fettsäuren als Substrat (Magrane und UniProt Consortium 2011). Mit Hilfe von Adenosintriphosphat (ATP) verestert *LACS2* in einer zweistufigen Reaktion freie Fettsäuren mit dem Koenzym A (Shockey et al. 2002):



Für diese Aufgabe besitzt das Enzym eine Bindungsstelle für das Adenosinmonophosphat (AMP) sowie eine Region zur spezifischen Fettsäure-Bindung (Shockey et al. 2002).

ATT1 (O23066) ist in der Familie der Cytochrom P450 das zweite Mitglied der Subfamilie A (CYP86A2; EC 1.14.14.1) und damit eine Cytochrom P450-Monooxygenase (Magrane und UniProt Consortium 2011). Mit Sauerstoff hydroxyliert *ATT1* Fettsäuren endständig (Bak et al. 2011):



Für diese Reaktion benötigt *ATT1* die Versorgung mit Elektronen durch eine Cytochrom P450-Reduktase (Jensen und Møller 2010). Beide Enzyme sind am ER-verankert und bilden zur Reaktion einen Komplex (Hannemann et al. 2007; Omura 2010). *ATT1* besitzt eine Transmembran-Domäne, ein Häm-Komplex als katalytisches Zentrum und Domänen zur Sauerstoffbindung und -aktivierung (Werck-Reichhart und Feyereisen 2000).

Bioinformatische Analysen von *PaLACS2* und *PaATT1* und ihren abgeleiteten Proteinsequenzen ermöglichen erste Rückschlüsse auf die Verwandtschaftsverhältnisse und die Funktionen der Gene. Ziel ist die phylogenetische Einordnung von *PaLACS2*

und *PaATT1* und die Analyse der abgeleiteten Proteine auf konservierte Domänen oder Signalmotive.

2.2. Material & Methoden

2.2.1. Proteinsequenzanalyse

Die kodierenden Sequenzen (CDS) von *PaLACS2* (JU090714.1) und *PaATT1* (JU090723.1) der Süßkirsche (Alkio et al. 2012) wurden von der Datenbank des NCBI bezogen (National Center for Biotechnology Information, www.ncbi.nlm.nih.gov). Die abgeleiteten Proteinsequenzen wurden auf konservierte Motive untersucht. Diese waren bei *PaLACS2* charakteristisch für die AMP-bindenden Acetyl-CoA-Synthetasen und bei *PaATT1* charakteristisch für die Cytochrom P450-Monooxygenasen. Zusätzlich wurden die Proteinsequenzen mit dem Programm InterProScan (Zdobnov und Apweiler 2001; Quevillon et al. 2005) analysiert und mit Hilfe der Programme Phobius (Käll et al. 2004) und SignalP (Petersen et al. 2011) auf Transmembrandomänen und Signalpeptide hin getestet.

2.2.2. Phylogenetische Untersuchungen

Für die phylogenetischen Untersuchungen wurden die CDS von *PaLACS2* und *PaATT1* via BLASTX-Algorithmus (Altschul et al. 1997) mit der Phytozome v9.1-Datenbank (Goodstein et al. 2012) verglichen (aufgerufen am 3. Dezember 2013 für *PaATT1* und am 3. Februar 2014 für *PaLACS2*). Für *PaLACS2* und *PaATT1* wurden, jeweils zusammen mit den entsprechenden BLASTX-Treffern (siehe Tabelle S1 und S2 in den ergänzenden Daten), multiple Sequenzalignments mit dem Programm ClustalX2.1 (Larkin et al. 2007) errechnet. Dies erfolgte bei Standardeinstellung (gap opening cost: 10, gap extension cost: 0.2) unter Verwendung der Gonnet-Matrix. Der phylogenetische Baum wurde mit der Neighbor-Joining-Methode (p-distance-Parameter, 1000 Bootstrap-Replikate) im Programm MEGA5 (Tamura et al. 2011) erstellt.

2.3. Ergebnisse

2.3.1. PaLACS2 und PaATT1 besitzen konservierte Proteinmotive

Erste Rückschlüsse auf die Funktion von *PaLACS2* und *PaATT1* liefert die Motiv- und Strukturanalyse der abgeleiteten Proteinsequenzen. *PaLACS2* besitzt mehrere konservierte Motive (Abb. 5a), charakteristisch für die Superfamilie der ATP-

abhängigen, AMP-bindenden Enzyme und der Familie der Acyl-CoA-Synthetasen. Erstens, das hochkonservierte AMP-Bindungsmotiv (PS00455), IMYTS \overline{G} TTGEPKGV in PaLACS2, (Coe et al. 1999). Zweitens, die konservierten Motive **GYGLTE** und **GEICLRG-x-x-x-FSGY**, die in Enzymen vertreten sind, welche die Aktivierung von Carboxyl-Gruppen an freien Fettsäuren durch die Abspaltung von Diphosphat von ATP katalysieren (Babbitt et al. 1992). Drittens, eine Linker-Domäne, charakteristisch für eukaryotische LACS-Proteine (Shockey et al. 2002). Viertens, beinhaltet PaLACS2 das FACS- (fatty acid-CoA synthetase) sowie das LACS-Motiv (Black et al. 1997; Watkins et al. 1998). Das FACS-Motiv soll für die katalytische Funktion sowie die Substratspezifität verantwortlich sein und dadurch an der Fettsäure-Bindung beteiligt sein (Black et al. 1997; Weimar et al. 2002). Das LACS-Motiv stellt ein Signaturmotiv für die Familie der LACS-Enzyme dar (Watkins et al. 1998). Diese beiden Motive überlappen sich in sieben Aminosäuren in PaLACS2.

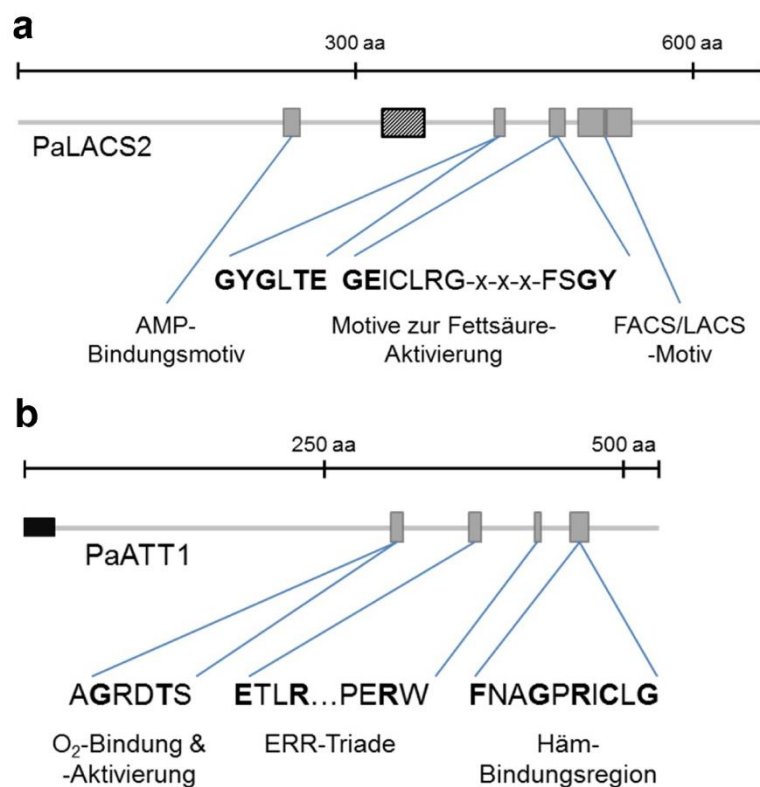


Abb. 5 Konservierte Motive in den Proteinsequenzen von PaLACS2 (a) und PaATT1 (b). In der schematische Abbildung bildet die hellgraue Linie die Proteinsequenz, die dunkelgrauen Boxen markieren konservierte Motive, die schwarz gerahmte Box (a) stellt die Linker-Domäne dar und die schwarze Box (b) die Transmembran-Domäne. Fettgedruckte Buchstaben markieren hochkonservierte Aminosäuren innerhalb von Motiven. aa, Aminosäure.

Zusätzlich wurde PaLACS2 auf Signalpeptide oder Transmembran-Domänen getestet, es konnten jedoch keine vorhergesagt werden. Die InterProScan-Analyse erkannte eine katalytische Funktion als Ligase (GO:0003824) und eine Beteiligung am Fettsäure-Metabolismus (GO:0008152 und PTHR24096:SF46).

Die Analyse von PaATT1 ergab mehrere konservierte Motive (Abb. 5b), die charakteristisch für ER-gebundene Cytochrom P450-Monooxygenasen in Pflanzen sind (Werck-Reichhart und Feyereisen 2000). Erstens, ein Motiv (A/G-G-x-D/E-T-S/T) zur Bindung und Aktivierung des Sauerstoffs (Durst und Nelson 1995). Zweitens, die ERR-Triade bestehend aus dem konservierten Motiv **E-x-x-R** und das darauffolgende Signaturmotiv (PER-x) für pflanzliche P450-Monooxygenasen (Durst und Nelson 1995; Werck-Reichhart et al. 2002). Die ERR-Triade soll an der Stabilisierung der Kernstruktur und der Arretierung des Häm-Produktes beteiligt sein (Hasemann et al. 1995; Bak et al. 2011). Drittens, die Bindungsregion (**F-x-x-G-x-R-x-C-x-G**) des aktiven katalytischen Zentrums (Häm b) (Chapple 1998; Werck-Reichhart et al. 2002).

Des Weiteren wurde für PaATT1 eine Transmembrandomäne von 20 Aminosäuren (Aminosäure 5 bis 24 in der PaATT1-Sequenz) vorausgesagt. Die InterProScan-Analyse sprach PaATT1 eine Beteiligung am Lipid-Metabolismus (GO:0055114 und PTHR 24296:SF0) sowie molekulare Funktionen wie die Bindung von Eisen-Ionen (GO:0005506), der Bindung des Hämkomplexes (GO:0020037) und eine Oxidoreduktase-Aktivität (GO:0016705) zu.

2.3.2. Phylogenetische Verwandtschaftsverhältnisse von PaLACS2 und PaATT1

Der phylogenetische Baum mit PaLACS2 und homologen Sequenzen aus verschiedenen Arten unterteilt sich in mehrere familienabhängige Gruppen (Abb. 6a). So ordnen sich die Mitglieder der Süßgräser und Vertreter der Monokotylen, bestehend aus Homologen des Reis (*Oryza sativa* ssp. *japonica*), Sorghum (*Sorghum bicolor*) und Mais (*Zea mays*), in einer Gruppe an. Weitere Gruppen beinhalten Mitglieder der Familien der *Brassicaceae*, *Solanaceae*, *Fabaceae* und *Rutaceae*. PaLACS2 findet sich in der Gruppe der *Rosaceae* mit Pfirsich (*Prunus persica*) und Apfel (*Malus × domestica*) wieder. Den höchsten Verwandtschaftsgrad besitzt PaLACS2 zur homologen Sequenz des Pfirsichs.

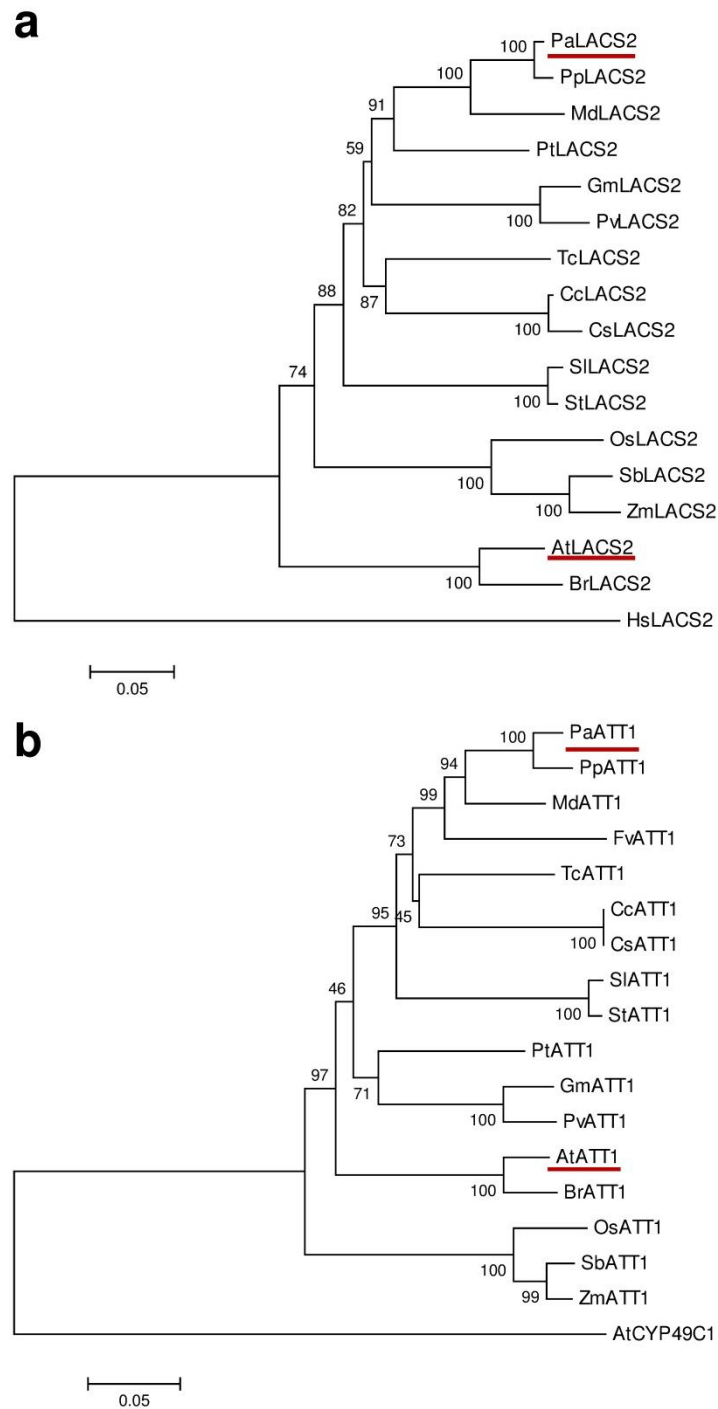


Abb. 6 Phylogenetische Bäume mit PaLACS2 (a) und PaATT1 (b) der Süßkirsche. Die Kladogramme nach Neighbor-Joining-Methode zeigen die Verwandtschaftsverhältnisse von PaLACS2 und PaATT1 zu Homologen anderer Arten auf: *A. thaliana* (At), *B. rapa* (Br), *C. clementina* (Cc), *C. sinensis* (Cs), *F. vesca* (Fv), *G. max* (Gm), *M. domestica* (Md), *O. sativa* (Os), *P. persica* (Pp), *P. trichocarpa* (Pt), *P. vulgaris* (Pv), *S. bicolor* (Sb), *S. lycopersicum* (Sl), *S. tuberosum* (St), *T. cacao* (Tc) und *Z. mays* (Zm). HsLACS2 aus dem Menschen (*H. sapiens*) und AtCYP94C1 aus *Arabidopsis* bilden jeweils die Außengruppe (für Details siehe Text).

Für PaATT1 wurde der phylogenetische Baum ebenfalls aus homologen Sequenzen verschiedener Arten erstellt (Abb. 6b). Der Aufbau des Kladogramms in familienbezogene Gruppen ist mit dem für PaLACS2 vergleichbar. PaATT1 lässt sich in der Gruppe der *Rosaceae* zu Homologen aus Pfirsich (*Prunus persica*), Apfel (*Malus × domestica*) und Erdbeere (*Fragaria vesca*) zuordnen. Hierbei ist PaATT1 am engsten mit der homologen Sequenz des Pfirsichs verwandt.

2.4. Diskussion

2.4.1. PaLACS2 und PaATT1 besitzen charakteristische Proteinmotive

Die Proteinsequenz von *PaLACS2* beinhaltet konservierte Sequenzmotive, die charakteristisch für Enzyme der AMP-bindenden Superfamilie und der Familie der Acyl-CoA-Synthetasen sind: Das AMP-Motiv, die konservierte Motive **GYGLTE** und **GEICLRG-x-x-x-FSGY**, das LACS- und FACS-Motiv (Abb. 5a).

Das streng konservierte AMP-Motiv (PS00455) ist in allen Enzymen vertreten, die ihr Substrat mittels ATP in einem zweistufigen Prozess aktivieren (Schröder 1989; Toh 1991; Babbitt et al. 1992). Fulda et al. (1997) charakterisierte die ersten Acyl-CoA-Synthetasen aus der Pflanze und ergänzt das bereits bekannte AMP-Motiv (Box 1) um Box 2 (**GYG-x-TE-x**) und Box 3 (**GW-x-x-TGD-x-G**), die zusammen die Charakteristika für Enzyme der Acyl-CoA-Synthetasen bilden. Ein konserviertes Tyrosin (Y; Aminosäure 478 in PaLACS2) soll an der Bildung des Adenylats (AMP) beteiligt sein (Fulda et al. 1997). Eine Insertion von 40-50 Aminosäuren (= Linker-Domäne) ist charakteristisch für eukaryotischen Acyl-CoA-Synthetasen. Shockey et al. (2002) charakterisierten die Mitglieder der LACS-Familie in *Arabidopsis* und definierten diese Linker-Domäne als Alleinstellungsmerkmal für eukaryotische LACS-Enzyme. Das Motiv (**GYG-x-TE-x**) konnte als hochkonserviertes ATP/AMP-Signaturmotiv für Fettsäure-CoA-Synthetasen (FACS) bestätigt werden (Weimar et al. 2002). PaLACS2 beinhaltet sowohl das FACS- als auch das LACS-Motiv. Das FACS-Motiv beinhaltet die Sequenz **GW-x-x-TGD-x-G** und wurde bereits durch Black et al. (1997) identifiziert. Diese Sequenz ist ein Signaturmotiv für Fettsäure-CoA-Synthetasen und das darin enthaltenen hochkonservierte **TGD** (Teil des Box 3-Motivs) ist für die Bindung des ATP verantwortlich (Black et al. 1997; Gulick 2009). Watkins et al. (1998) definierte ein LACS-Motiv, welches ebenfalls ein Signaturmotiv für Acyl-CoA-

Synthetasen mit langkettigen Fettsäuren als Substrat darstellt. Dieses Motiv soll an der Katalyse der Fettsäure-Aktivierung beteiligt und für die Substratspezifität verantwortlich sein (Weimar et al. 2002).

Der Eintrag für LACS-Enzyme (EC.6.2.1.3) in der PRIAM-Datenbank (**PR**ofils pour l'**I**dentification **A**utomatique du **M**étabolisme, <http://priam.prabi.fr/>) enthält drei charakteristische Sequenzprofile, aus denen zwei (PRI010299, PRI002715) in allen LACS-Enzyme aus *Arabidopsis* vertreten und auch in PaLACS2 vorhanden sind. Das Vorhandensein der genannten konservierten Sequenzmotive in PaLACS2 lässt schließen, dass PaLACS2 zur Aktivierung von Fettsäuren ATP benötigt, eine Substratspezifität gegenüber langkettigen Fettsäuren besitzt und die Fettsäure-Aktivierung katalysieren kann. Die InterProScan-Analysen bestätigen eine Beteiligung von PaLACS2 am Fettsäure-Metabolismus. Damit zeigen diese Ergebnisse, dass *PaLACS2* für ein Enzym der LACS-Familie kodiert, das durch die Aktivierung von Fettsäuren an der Kutinsynthese der Süßkirsche beteiligt sein kann.

Die zelluläre Lokalisation dieser Enzyme im Rahmen der Kutinbiosynthese ist noch weitgehend unerforscht. LACS2 wurde im ER lokalisiert (Weng et al. 2010). PaLACS2 beinhaltet jedoch keine Signal- oder Transmembranmotive. Damit ist PaLACS2 nicht an die Membran eines zellulären Kompartiments gebunden, kann aber dennoch am bzw. im ER lokalisiert sein. Weitere Untersuchungen sind nötig um die lokale Präsenz dieses Proteins während der Kutinsynthese aufdecken zu können.

Die abgeleitete Proteinsequenz von *PaATT1* wies konservierte Motive auf, die charakteristisch für P450-Enzyme in Pflanzen sind: Die Domäne zur Sauerstoffbindung und -aktivierung, die EER-Triade, die für die Stabilisierung des Häm-Produktes verantwortlich ist, und die Bindungsregion des Häm (Abb. 6a). Diese Motive, vor allem das streng konservierte Cystein (C) in der Häm-Bindungsregion, sind für den Elektronentransfer und die darauf folgende Aktivierung des Sauerstoffs zur Oxidierung des Substrates nötig (Werck-Reichhart und Feyereisen 2000). Die Identifikation einer Transmembran-Domäne deutet darauf hin, dass PaATT1 ein Membran-verankertes Enzym ist. In Pflanzen sind die meisten Monooxygenasen an der cytosolischen Oberfläche des ER verankert (Hannemann et al. 2007; Omura 2010). Dort bilden sie mit den Membran-gebundenen NADPH Cytochrom P450-Reduktasen (CPR) Komplexe.

Die CPR sind elektronenspendende Enzyme, die den Elektronentransfer zur Sauerstoffaktivierung sicherstellen (Jensen und Møller 2010; Bak et al. 2011). Diese Ergebnisse sind mit den InterProScan-Analysen (Version 4.7; Zdobnov und Apweiler 2001) von Alkio et al. (2012) konsistent. Die Untersuchungen mit einer neueren Version des InterProScan (Version 5.2-0.45; Quevillon et al. 2005) bestätigen und ergänzen die bestehenden Informationen um die GO-Annotationen, die PaATT1 eine Beteiligung am Lipid-Metabolismus zusprachen. Diese Ergebnisse zeigen, dass *PaATT1* für eine membrangebundene P450-Monooxygenase kodiert, die Fettsäuresubstrate im Rahmen der Kutinsynthese oxidieren kann.

2.4.2. PaLACS2 und PaATT1 sind eng verwandt mit Homologen der *Rosaceae*

Die phylogenetischen Analysen von PaLACS2 und PaATT1 haben ergeben, dass beide Sequenzen eng mit den entsprechenden Homologen des Pfirsichs und des Apfels verwandt sind (Abb. 6). Dies bestätigt das von Alkio et al. (2012) beschriebene enge Verwandtschaftsverhältnis von PaLACS2 und PaATT1 zu Homologen im Pfirsich. Durch die hohe Sequenzähnlichkeit mit LACS2 und ATT1 aus *Arabidopsis* (Alkio et al. 2012), können PaLACS2 und PaATT1 gleiche Funktionen wie ihre homologen Vertreter innehaben (Schnurr et al. 2004; Xiao et al. 2004).

2.5. Schlussfolgerung

Die bioinformatischen Analysen deuten darauf hin, dass (1) PaLACS2 und PaATT1 eng verwandt mit Homologen aus der Familie der *Rosaceae* sind, (2) PaLACS2 in seiner Funktion vermutlich abhängig von ATP ist und langkettige Fettsäuren aktivieren kann und (3) PaATT1 vermutlich Lipid-Substrate oxidieren kann, an der cytosolischen Oberfläche des ER verankert ist und von einer NADPH Cytochrom P450-Reduktase als Elektronendonator abhängt.

Die *in silico* generierten Ergebnisse weisen damit darauf hin, dass *PaLACS2* für eine langkettige Acyl-CoA-Synthetase und *PaATT1* für eine Cytochrom P450-Monooxygenase in der Süßkirsche kodieren und damit am Prozess der Kutinsynthese beteiligt sein können.

2.6. Ergänzende Daten

Tabelle S1 Homologen Sequenzen zu *PaLACS2*. Alle Sequenzen wurden von der Phytozome-Datenbank bezogen, mit translatierten mRNA-Sequenzen gegengeprüft und für die phylogenetischen Untersuchungen genutzt. Es konnte keine homologe Sequenz aus der Erdbeere identifiziert werden.

Name	Lat. Name	Pflanzenname	Transkript-ID
AtLACS2	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Ackerschmalwand	AT1G49430.1
BrLACS2	<i>Brassica rapa</i>	Rübsen	Bra032284
CcLACS2	<i>Citrus clementina</i>	Clementine	Ciclev10027967m
CsLACS2	<i>Citrus sinensis</i>	Orange	orange1.1g010455m
GmLACS2	<i>Glycine max</i>	Sojabohne	Glyma20g01060.1
MdLACS2	<i>Malus × domestica</i>	Apfel	MDP0000201853
OsLACS2	<i>Oryza sativa</i>	Reis	LOC_Os11g35400.1
PpLACS2	<i>Prunus persica</i>	Pfirsich	ppa002568m
PtLACS2	<i>Populus trichocarpa</i>	Westliche Balsam- Pappel	Potri.009G109900.1
PvLACS2	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Gartenbohne	Phvul.003G010600.1
SbLACS2	<i>Sorghum bicolor</i>	Mohrenhirse	Sb05g021840.1
SILACS2	<i>Solanum lycopersicum</i>	Tomate	Solyc01g109180.2.1
StLACS2	<i>Solanum tuberosum</i>	Kartoffel	PGSC0003DMP400043698
TcLACS2	<i>Theobroma cacao</i>	Kakaobaum	Thecc1EG006299t2
ZmLACS2	<i>Zea mays</i>	Mais	GRMZM2G104847_T01

Tabelle S2 Homologen Sequenzen zu *PaATT1*. Alle Sequenzen wurden von der Phytozome-Datenbank bezogen, mit translatierten mRNA-Sequenzen gegengeprüft und für die phylogenetischen Untersuchungen genutzt.

Name	Lat. Name	Pflanzenname	Transkript-ID
AtATT1	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Ackerschmalwand	AT4G00360.1
BrATT1	<i>Brassica rapa</i>	Rübsen	Bra037336
CcATT1	<i>Citrus clementina</i>	Clementine	Ciclev10019616m
CsATT1	<i>Citrus sinensis</i>	Orange	orange1.1g037522m
FvATT1	<i>Fragaria vesca</i>	Wald-Erdbeere	mrna32514.1-v1.0-hybrid
GmATT1	<i>Glycine max</i>	Sojabohne	Glyma05g37700.1
MdATT1	<i>Malus × domestica</i>	Apfel	MDP0000858983
OsATT1	<i>Oryza sativa</i>	Reis	LOC_Os02g44654.2
PpATT1	<i>Prunus persica</i>	Pfirsich	ppa004078m
PtATT1	<i>Populus trichocarpa</i>	Westliche Balsam- Pappel	Potri.014G085800.1
PvATT1	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Gartenbohne	Phvul.010G099900.1
SbATT1	<i>Sorghum bicolor</i>	Mohrenhirse	Sb04g032410.1
SlATT1	<i>Solanum lycopersicum</i>	Tomate	Solyc08g081220.1.1
StATT1	<i>Solanum tuberosum</i>	Kartoffel	PGSC0003DMP400021569
TcATT1	<i>Theobroma cacao</i>	Kakaobaum	Thecc1EG016281t1
ZmATT1	<i>Zea mays</i>	Mais	GRMZM2G062151_T01

3. Funktionelle Charakterisierung von *PaLACS2* und *PaATT1*

Effect of sweet cherry genes *PaLACS2* and *PaATT1* on cuticle deposition, composition and permeability in *Arabidopsis*

Tree Genetics & Genomes, doi: 10.1007/s11295-014-0791-4

Myriam Declercq, Merianne Alkio, Thorben Sprink, Lukas Schreiber, Moritz Knoche

3.1. Abstract

The cuticular membrane (CM) of sweet cherry (*Prunus avium* L.) fruit is severely strained during development. Strain results from a cessation of CM deposition during early development and is possibly caused by a downregulation of genes involved in CM synthesis. The objectives of our study were to investigate the effects of ectopic expression of two sweet cherry genes, *PaLACS2* (a putative long-chain acyl-CoA synthetase) and *PaATT1* (a putative cytochrome P450 monooxygenase), in *Arabidopsis thaliana* (L.). Effects on the expression of endogenous *LACS2*, *ATT1* and *LACS1* genes, wax and cutin composition, and cuticle permeability were investigated in 13 transgenic lines. Of these, six lines are selected for presentation based on the magnitude of the response. The amount of cutin increased in the *PaLACS2* overexpression line *C-L-29* and in the complemented *lacs2-1* knockout mutant line *l-L-14*, but overexpression had no effect on cutin composition or wax. Wax deposition decreased in the complemented knockout lines *l-L-14* and *l-L-21*. Overexpressing *PaATT1* in *A. thaliana* line *C-A-6* had no significant effect on cutin and wax deposition. In the complemented knockout lines *a-A-7* and *a-A-12*, cutin deposition increased, whereas wax deposition was unaffected. The permeability of the cuticle for water and toluidine blue decreased in the *PaLACS2* and *PaATT1* complemented knockout lines. The results suggest that (1) *PaLACS2* and *PaATT1* expressed in *A. thaliana* are involved in cutin biosynthesis, and (2) their

functions are consistent with those of a typical long-chain acyl-CoA synthetase (*PaLACS2*) and of a cytochrome P450 monooxygenase (*PaATT1*).

Key words:

Prunus avium, Cutin, Wax, Long-chain acyl-CoA synthetase 2 (*LACS2*), Aberrant Induction of Type Three 1 (*ATT1*), Ectopic expression

3.2. Introduction

The cuticular membrane (CM) is a hydrophobic polymer film that covers the outer surface of all primary aerial organs of higher plants (Esau 1977). It serves as a barrier against uncontrolled water loss and gas exchange and protects against biotic and abiotic stresses (Riederer 2006; Schreiber 2010). The CM comprises a cutin matrix and wax embedded in or deposited on the surface of the matrix (Heredia 2003; Jeffree 2006). Cutin is a polyester of cross-linked hydroxy and epoxy fatty acids (Kolattukudy 2001; Pollard et al. 2008). Cuticular wax mainly consists of very long chain aliphatics (Samuels et al. 2008); the fruit wax of *Rosaceae* species often being rich in terpenoids (Belding et al. 1998; Peschel et al. 2007). It is the wax fraction that is thought to form the primary penetration barrier within the cuticle (Reynhardt and Riederer 1994).

An intact CM is essential in maintaining the barrier function. This is particularly important for the CM of fruit that often expands considerably until late in development. In sweet cherry fruit, the CM and underlying cell layers are considerably strained in the course of development (Knoche et al. 2004; Grimm et al. 2012), and strain promotes the formation of microscopic fractures (microcracks) (Peschel and Knoche 2005). Microcracks, in turn, impair the barrier function of the CM causing uncontrolled water transport and an increased incidence of fruit rot (Børve et al. 2000; Riederer 2006). Furthermore, microcracks are considered an early event in rain-induced fruit cracking (Peschel and Knoche 2005; Knoche and Peschel 2006), a serious limitation in sweet cherry production worldwide (Simon 2006).

Strain of the CM results from a mismatch of surface expansion and CM deposition caused by an early cessation of CM deposition while expansion continues (Knoche et al. 2004). To better understand CM deposition in sweet cherry, expression patterns of selected genes potentially involved in cuticle formation were recently analysed in developing fruit (Alkio et al. 2012). Candidate genes were characterised by high

expression levels in the fruit skin compared to the flesh and expression levels that paralleled the rate of CM deposition (Alkio et al. 2012). A downregulation of the candidate genes that coincides with the cessation of CM deposition was regarded as evidence for a role in CM formation.

The sweet cherry genes *PaLACS2* and *PaATT1* represent such candidate genes. First, the corresponding gene in *Arabidopsis*, *LACS2*, a long-chain acyl-CoA synthetase, catalyses the esterification of fatty acids to coenzyme A, an early step in the synthesis of cutin (Schnurr et al. 2004; Li-Beisson et al. 2013). *ATT1*, a cytochrome P450 monooxygenase, oxidises the resulting acyl chains to ω -hydroxy fatty acids that represent monomers of the cutin polymer (Xiao et al. 2004; Bak et al. 2011). Second, the expression of the sweet cherry *PaLACS2* and *PaATT1* is restricted to the fruit skin and closely related to the rate of CM deposition (Alkio et al. 2012). Third, *LACS2* has a substrate specificity for 16:0, 18:X, 20:0 and 24:0 fatty acids (Shockey et al. 2002), with 16:0 and 18:X being primary substrates for cutin synthesis (Kolattukudy 2001). The corresponding hydroxy fatty acids are major constituents of the sweet cherry CM (Peschel et al. 2007). Fourth, studies using *Arabidopsis thaliana* *LACS2* knockout mutants revealed pleiotropic phenotypes (Schnurr et al. 2004; Bessire et al. 2007; Tang et al. 2007; Weng et al. 2010). For example, the *A. thaliana* knockout mutant *lacs2-1* is characterised by decreased cutin, increased wax deposition and reduced growth (Schnurr et al. 2004; Xia et al. 2009). Fifth, *ATT1* has a substrate specificity for 18:X fatty acids (Rupasinghe 2007) and *ATT1* is required for the production of 18:X α,ω -dicarboxylic acids in seeds (Xiao et al. 2004; Molina et al. 2008). Last, the *A. thaliana* knockout mutant *att1-1* is characterised by decreased cutin deposition and sensitivity to water stress (Xiao et al. 2004). Thus, *PaLACS2* and *PaATT1* merit further investigations. To obtain a better understanding of their role in cutin formation in sweet cherry, a functional characterisation in a suitable model system is required.

The aims of this study therefore were to (1) clone and express *PaLACS2* and *PaATT1* from sweet cherry in *A. thaliana*, (2) analyse their effects on cutin and wax deposition and composition, and (3) establish consequences for cuticle permeability.

3.3. Materials and methods

3.3.1. Plant material

Sweet cherry (Regina) fruits from trees grafted on Gisela 5 (*Prunus cerasus* L. x *Prunus canescens* Bois) rootstocks were sampled in a commercial orchard in Gleidingen (52°16'N, 9°50'E), Germany, and processed as described in Alkio et al. (2012).

PaLACS2 was studied in the *A. thaliana* wild-type line Columbia 6 (N8155) and the T-DNA insertion line *lacs2-1* (N19786) (Schnurr et al. 2004). *PaATT1* was studied in the *A. thaliana* wild-type line Columbia 0 (N1093) and the T-DNA insertion line SALK_128714C (N673472) (Alonso et al. 2003). The latter has an insertion in the second exon of the *ATT1* gene and will subsequently be referred to as *att1-3*. All seeds were obtained from the European Arabidopsis Stock Centre (NASC, Nottingham, UK) and their genotypes verified by PCR.

Seeds were surface-sterilized (Clough and Bent 1998), sown into petri dishes and stratified for 3 to 5 days. A half-strength Murashige and Skoog medium including vitamins supplemented with 100 µl l⁻¹ Timentin (ticarcillin disodium/clavulanate potassium, Duchefa Biochemie, Haarlem, The Netherlands) was used for germination. After 10 days plantlets were transferred to soil (Einheitserde Typ Pikier + Perlite, 4:1, Stangenberg, Sinntal, Germany) and cultivated at 20 to 23°C, 65% relative humidity and a day/night cycle of 8/16 h. Four weeks after germination, plants were used for analyses, except for the measurement of the plant size where surface areas were quantified 6 weeks after germination.

3.3.2. Cloning and transformation

Total RNA was isolated from sweet cherry fruit using the InviTrap Spin Plant RNA Mini Kit (RP buffer, Stratec Molecular, Berlin, Germany). This and all other reagents or kits were used according to the manufacturer's instructions. Quantity and quality of the RNA were determined by quantifying the absorbance at 230, 260 and 280 nm (BioPhotometer plus spectrophotometer, Eppendorf, Hamburg, Germany; microliter tray cell, Hellma Analytics, Müllheim, Germany). Total RNA was treated with DNase I (Fermentas Germany, Schwerte, Germany). For first-strand complementary DNA (cDNA) synthesis, an amount of 1,500 ng of total RNA was reverse transcribed using the First Strand cDNA Synthesis Kit (Fisher Scientific Germany, Schwerte, Germany)

with anchored oligo(dT) primers. The coding sequences (CDSs) of *PaLACS2* (JU090714.1) and *PaATT1* (JU090723.1) were amplified from the resulting cDNA using the Phusion polymerase (Finnzymes Germany, Schwerte, Germany) in an Adapter-PCR reaction for *PaLACS2* (Gateway™ Technology, Life Technologies, Darmstadt, Germany) and standard PCR for *PaATT1*. These and all other primers as well as their reaction conditions are listed in Online Resource 1. The CDSs of *PaLACS2* and *PaATT1* were introduced into the entry vector pDONR221 (Life Technologies) and transformed into *Escherichia coli*. The entry vectors were sequenced using the Sanger method (Seqlab Sequence Laboratories, Göttingen, Germany).

PaLACS2 entry vectors always contained single point mutations all over the CDS. Mutagenesis using QuickChange PCR (Agilent Technologies, Böblingen, Germany) eliminated a point mutation at position 1343 within the CDS but produced two silent mutations in the same sequence domain (for details, see Online Resource 2). Further cloning transferred the CDSs of *PaLACS2* and *PaATT1* into the destination vector pGWB2 (Nakagawa et al. 2007). The resulting expression vectors contained either the *PaLACS2* or *PaATT1* CDS under the control of a CaMV 35S promoter and a hygromycin resistance gene.

Expression vectors were transformed into *Agrobacterium tumefaciens* strain GV3101::pMP90. Competent cells were prepared using a modified protocol with calcium chloride (Hanahan et al. 1991; Bloom et al. 1997) and transformed according to the freeze and thaw protocol as described by Hofgen and Willmitzer (1988).

The secondary inflorescences of *A. thaliana* were transformed following the floral dip protocol (Clough and Bent 1998). Seeds of the T₁ generation were sown onto selection medium containing 30 mg l⁻¹ hygromycin B.

3.3.3. Molecular analysis

The isolation of genomic DNA from *A. thaliana* followed the protocol of Doyle and Doyle (1990). For extraction of total RNA, the InviTrap Spin Plant RNA Mini Kit (DCT buffer, Stratec Molecular) was used. The treatment with DNase I and the synthesis of cDNA was performed as described above. Gene-specific primers were designed (Beacon Designer, Premier Biosoft International, Palo Alto, CA, USA) for reverse transcriptase quantitative PCR (RT-qPCR) and synthesized by Eurofins MWG Operon (Ebersberg, Germany). Beside *PaLACS2* and *PaATT1*, further genes involved in

cuticle synthesis in *A. thaliana* were analysed: *LACS2* (At1G49430) and *ATT1* (At4G00360), the homologous genes in *A. thaliana*, and *LACS1* (At2G47240), a gene involved in wax synthesis (Lü et al. 2009). RT-qPCR was performed as described by Alkio et al. (2012) with the following modifications: The 15- μ l reaction mixture contained 1 μ l of cDNA sample corresponding to 75 ng of total RNA. PCR amplification efficiencies were determined from a fivefold serial dilution. The RT-qPCR was performed with two biological replicates consisting of two technical repeats each.

Abundance of transcripts in all lines was normalised against the transcript abundances of At2G28390, At4G34270 and At4G33380 (Czechowski et al. 2005) using qbase^{PLUS} software (Biogazelle, Ghent, Belgium; Vandesompele et al. 2002; Hellemans et al. 2007). Subsequently, the transcript abundances were calculated relative to the Columbia wild-types for *LACS2*, *ATT1* and *LACS1* and relative to the lowest value for *PaLACS2* and *PaATT1*. Expression stability values M of the reference genes were always below the critical threshold of 0.5, indicating a stable expression in the samples analysed (Hellemans et al. 2007).

3.3.4. Analysis of cutin and wax composition

Cutin and wax analyses were performed as described by Höfer et al. (2008) and Franke et al. (2005). Cuticular wax was extracted from *A. thaliana* plants by dipping for 10 s in chloroform. The leaf surface area was determined by image analysis. An aliquot of 10 μ g tetracosane (C₂₄) was added as an internal standard to the chloroform extract (Höfer et al. 2008). Subsequently, the dewaxed leaves were exhaustively extracted at ambient temperature to remove all soluble lipids using chloroform/methanol (1:1, v/v). The extraction solutions were replaced every 24 h for 3 days and the extracted leaves dried. Four biological replicates were prepared per plant line, each consisting of leaves of three to five plants.

CMs were depolymerized by transesterification with 1-2 ml 1 M methanolic HCl for 2 h at 80°C. After addition of 1-2 ml saturated aqueous NaCl and 10 μ g dotriacontane (C₃₂) as internal standard, aliphatic monomers were extracted (three times with 1 ml each) using hexane (Franke et al. 2005). Following evaporation of the solvents in a stream of nitrogen to a final volume \leq 150 μ l, all samples were treated with 20 μ l bis-(N,N,-trimethylsilyl)-tri-fluoroacetamide (BSTFA, Macherey-Nagel, Düren, Germany) and 20

µl pyridine for 40 min at 70°C to convert free hydroxyl and carboxyl groups into their corresponding trimethylsilyl (TMS) ethers and esters.

Cutin monomers were separated by capillary GC (DB-1 column, 30 m × 0.32 mm, 0.1 µm, Agilent Technologies, Böblingen, Germany) using a gas chromatograph (Agilent 6890N, Agilent Technologies) coupled to a quadrupole mass selective detector (Agilent 5973N, Agilent Technologies). The following temperature program was run: on-column injection at 50°C, 2 min at 50°C, 10°C min⁻¹ to 150°C, 1 min at 150°C, 3°C min⁻¹ to 315°C, and 20 min at 315°C. For separation of wax constituents, the following program was: on-column injection at 50°C, 2 min at 50°C, 40°C min⁻¹ to 200°C, 2 min at 200°C, 3°C min⁻¹ to 315°C, and 30 min at 315°C. Monomers were identified based on their EI-MS spectra. Monomers were quantified using an identical GC system equipped with a flame ionization detector. The analyses were conducted with four replicates for each plant line, except for Columbia 0 where the number of replicates was three.

3.3.5. Transpiration assay

Well-watered *A. thaliana* plants were equilibrated in the dark for a minimum of 6 h. Subsequently, entire rosettes were excised above the hypocotyl and held at ambient temperature (21-22°C) and relative humidity (38-41%). Following an initial period of about 20 min to ensure stomatal closure (Kerstiens et al. 2006; Bessire et al. 2007), rosettes were weighed in 20-min intervals for up to 120 min. Thereafter, surface areas of rosettes were determined by image analysis (Kerstiens et al. 2006; Bessire et al. 2007). The number of replications per plant line was five. The flux in transpiration J (kg m⁻² s⁻¹) was calculated as the mass of water transpired ΔW (kg) per unit surface area A (m²) and time Δt (s) using the following equation (Burghardt and Riederer 2006):

$$J = \frac{\Delta W}{\Delta t A}$$

3.3.6. Toluidine blue staining

Plants of *A. thaliana* were submerged for 30 min in 0.05% aqueous toluidine blue following a modified protocol of Tanaka et al. (2004). Thereafter, plants were removed from solution, rinsed, spread on a glass plate and photographed. The minimum number of replicates was four.

3.3.7. Data analysis

Data in figures are presented as means \pm standard error of the means (SigmaPlot 12.3, Systat Software, Erkrath, Germany). Data were subjected to analysis of variance (SAS version 9.1.3, SAS Institute, Cary, NC, USA). Mean separation was performed by comparing the overexpression lines to the Columbia wild-types or the complemented lines to the respective knockout mutants using Dunnett's test ($P \leq 0.05$).

3.4. Results

3.4.1. Molecular characterisation

A total of eight (*PaLACS2*) and five transgenic lines (*PaATT1*) were investigated (see Online Resources 3, 4, 5 and 6). For presentation in the manuscript, one overexpression line of a Columbia wild-type and two complemented knockout mutant lines per gene were selected. This selection was based on (1) the magnitude of the response and (2) the likelihood of identifying effects on the peculiar composition of the *Arabidopsis* cutin (which - unlike cuticles from other species - contains major amounts of 18:2 α,ω -dicarboxylic acids and low amounts of mid-chain hydroxy fatty acids; Franke et al. 2005). In general, all lines responded qualitatively similar, but their quantitative response differed. The genotypes of all transgenic *A. thaliana* lines and the successful insertion of both sweet cherry genes were confirmed by PCR.

The expression level of *PaLACS2* in the complemented knockout line *lacs2-PaLACS2-21* (*l-L-21*) was threefold higher compared to that in the overexpression line Col6-*PaLACS2-29* (*C-L-29*) and *lacs2-PaLACS2-14* (*l-L-14*). No expression of *PaLACS2* was detected in *A. thaliana* Columbia 6 and *lacs2-1* (Fig. 1 and Online Resource 3). Expression of *LACS2* was 1,000-fold lower in *lacs2-1* and the complemented knockout lines as compared to that in Columbia 6 and the overexpression line. *PaLACS2* had no consistent effect on *LACS2* expression. *PaLACS2* increased the expression of *ATT1* in the overexpression line *C-L-29* and decreased it in the complemented knockout lines, including *l-L-14* and *l-L-21*. The expression of *LACS1* was increased in the *A. thaliana* *lacs2-1* mutant and decreased to a varying extent in the complemented lines.

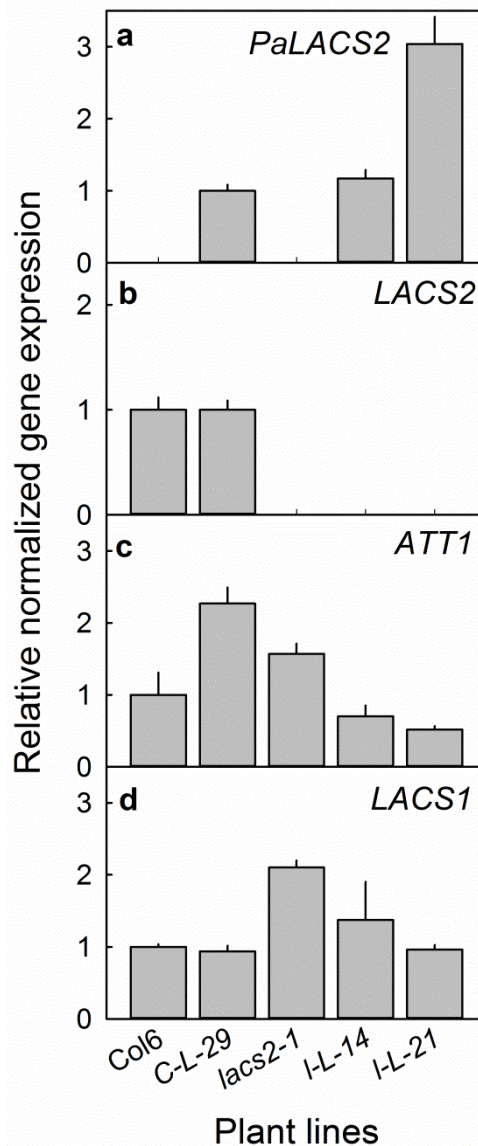


Fig. 1 Relative normalised expression levels for *PaLACS2* (a), *LACS2* (b), *ATT1* (c) and *LACS1* (d) in leaves of *A. thaliana* Columbia 6, the *PaLACS2* overexpression line C-L-29, the *lacs2-1* knockout mutant and the *PaLACS2* complemented knockout lines l-L-14 and l-L-21. Results were normalised using three reference genes. The gene expression was calculated relative to Columbia 6 for *LACS2*, *ATT1* and *LACS1*. Expression of *PaLACS2* was calculated relative to the smallest value. Columbia 6 and *lacs2-1* did not express *PaLACS2*. Bars represent means \pm SE of four replicates

PaATT1 was expressed in the transgenic *A. thaliana* lines with the expression level being 1,000-fold higher in the complemented knockout mutant *att1-PaATT1-7* (a-A-7) than in the overexpression line Col0-*PaATT1-6* (C-A-6) and *att1-PaATT1-12* (a-A-12) (Fig. 2 and Online Resource 4). *PaATT1* decreased the expression of *ATT1* in the complemented knockout lines a-A-7 and a-A-12 and the expression of *LACS2* in the overexpression line C-A-6. It had no consistent effect on the expression of *LACS2* in the

complemented knockout lines *a-A-7* and *a-A-12* when compared to the corresponding background line.

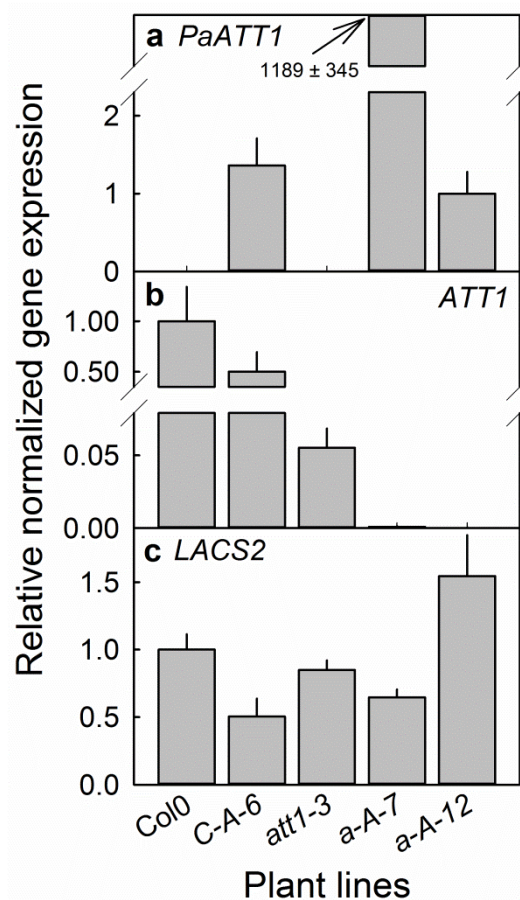


Fig. 2 Relative normalised expression levels for *PaATT1* (a), *ATT1* (b) and *LACS2* (c) in leaves of *A. thaliana* Columbia 0, the *PaATT1* overexpression line *C-A-6*, the *att1-3* knockout mutant and the *PaATT1* complemented knockout lines *a-A-7* and *a-A-12*. Results were normalised using three reference genes. The gene expression was calculated relative to Columbia 0 for *ATT1* and *LACS2* and relative to smallest value for the expression of *PaATT1*. Columbia 0 and *att1-3* did not express *PaATT1*. Bars represent means \pm SE of four replicates

3.4.2. Cutin and wax composition

The amount of cutin per unit area in the *PaLACS2* overexpression line *C-L-29* was increased 2.5-fold compared to that in Columbia 6 (Fig. 3a) whereas the amount of wax remained largely unchanged (Fig. 3b). There were essentially no qualitative changes in cutin or wax composition (Online Resources 5, 6). The complemented knockout line *l-l-14* had more cutin per unit surface area than the *A. thaliana lacs2-1* mutant or Columbia 6 (Fig. 3a). Total amount of cutin was doubled compared to that of Columbia 6 and increased fourfold compared to *lacs2-1*. In contrast, the amount and composition

of cutin in the complemented knockout line *l-L-21* remained largely unchanged. Amounts of total wax and alkanes were significantly reduced in the complemented lines compared to *A. thaliana lacs2-1* (Fig. 3b). The effects on alcohols, aldehydes, and fatty acids were generally not significant. Notably, the *A. thaliana lacs2-1* knockout mutant had less cutin but more wax per unit leaf area - in particular, more alkanes - than Columbia 6 (Fig. 3 and Online Resource 6).

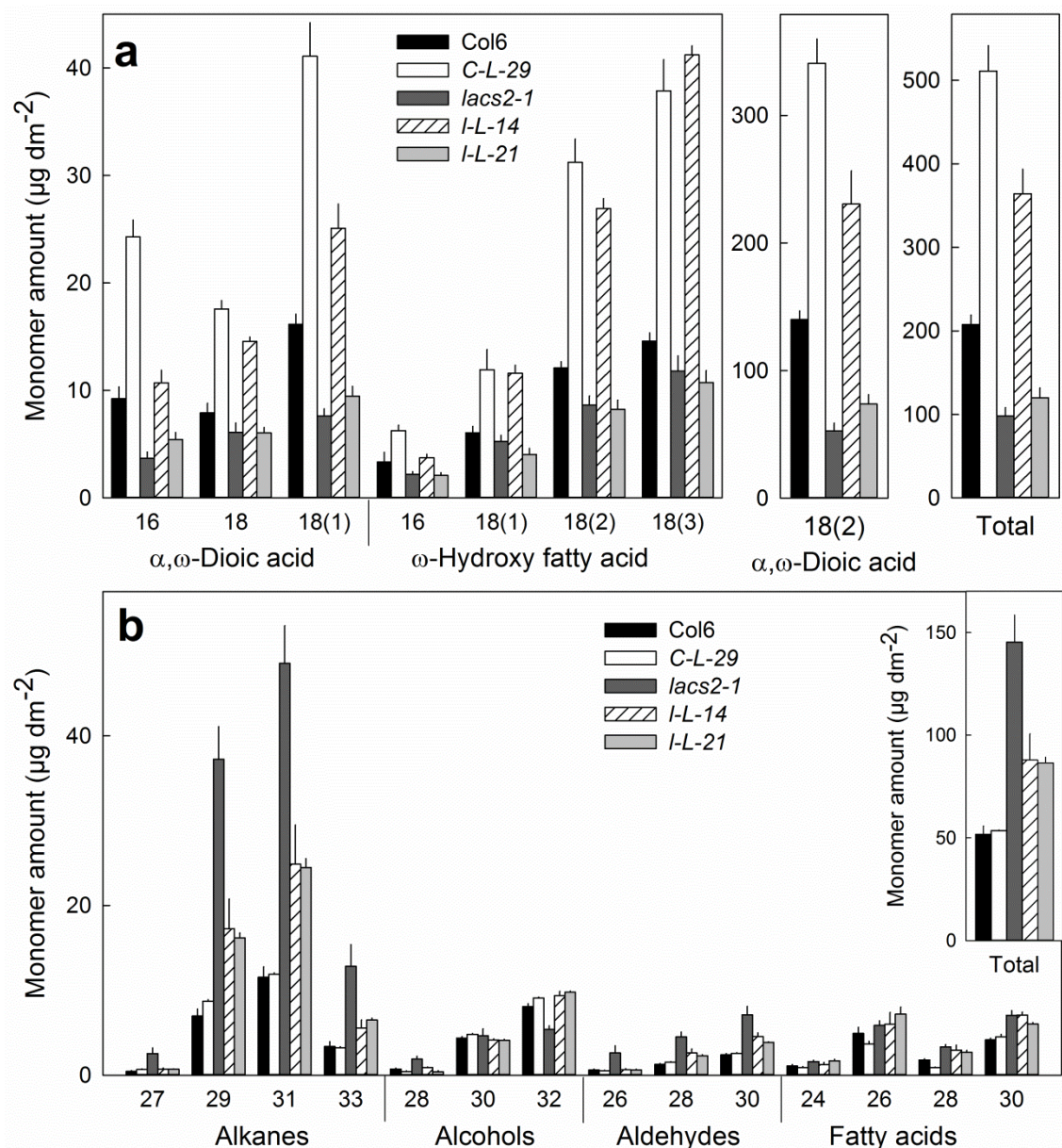


Fig. 3 Major constituents of cutin (**a**) and wax (**b**) in leaves of *A. thaliana* Columbia 6, the *PaLACS2* overexpression line *C-L-29*, the *lacs2-1* knockout mutant and the *PaLACS2* complemented knockout lines *l-L-14* and *l-L-21*. Numbers on x-axis indicate carbon chain lengths. Bars represent means \pm SE of four replicates. α,ω -Dioic acid, α,ω -dicarboxylic acid

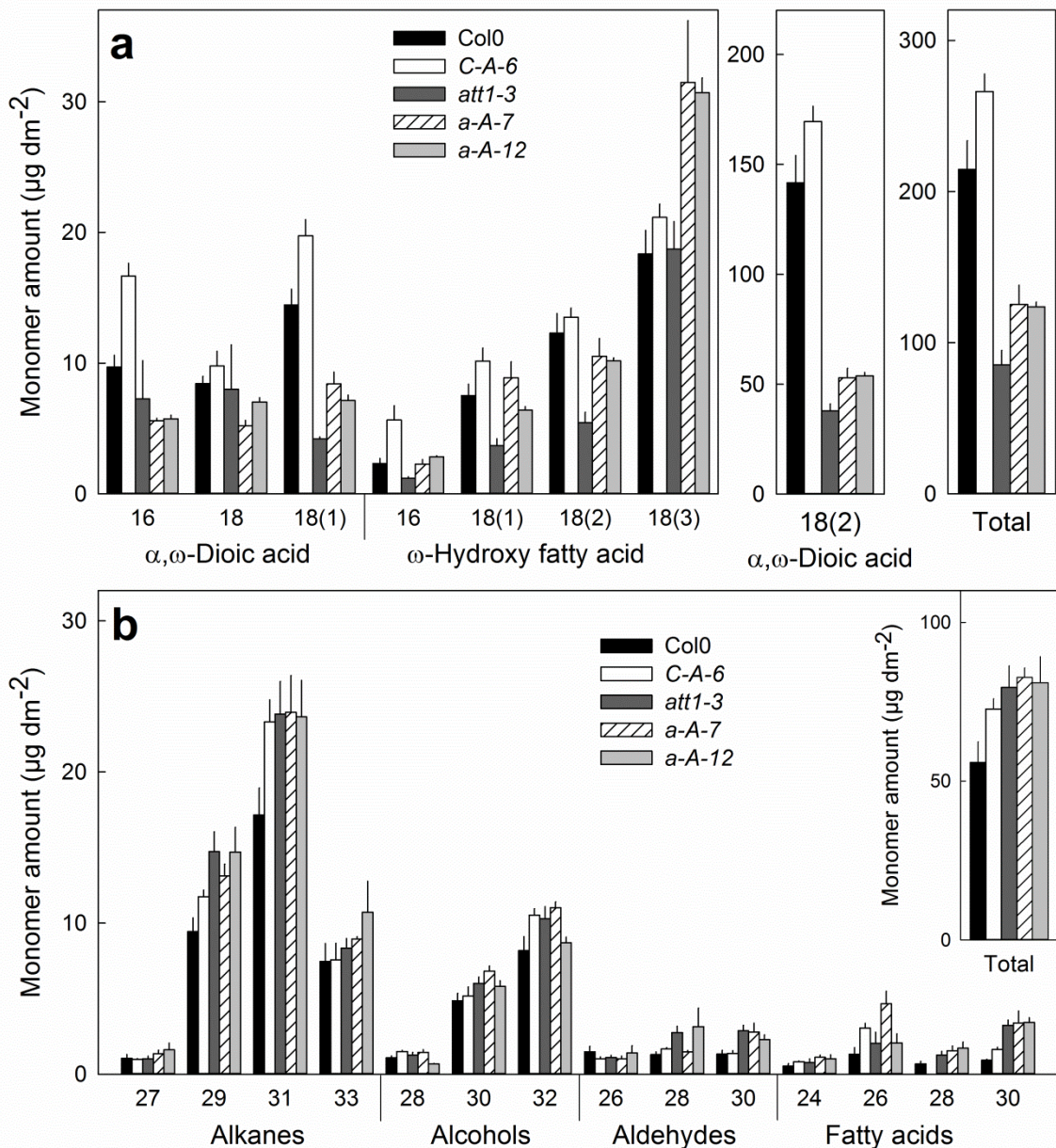


Fig. 4 Major constituents of cutin (a) and wax (b) in leaves of *A. thaliana* Columbia 0, the *PaATT1* overexpression line *C-A-6*, the *att1-3* knockout mutant and the *PaATT1* complemented knockout lines *a-A-7* and *a-A-12*. Numbers on x-axis indicate carbon chain length. Bars are means \pm SE of four replicates except for Columbia 0 where three replicates were analysed. α,ω -Dioic acid, α,ω -dicarboxylic acid

In the *PaATT1* overexpression line *C-A-6*, total amounts of cutin (+28%) and wax (+24%) tended to increase compared to those of Columbia 0 (Fig. 4); the cutin and wax compositions, however, remained unaffected (Online Resources 5, 6). The total amount of cutin per unit area was increased in the complemented knockout lines *a-A-7* and *a-A-12* compared to the *A. thaliana att1-3* mutant (Fig. 4a). In particular, the amounts of 18:1, 18:2 and 18:3 ω -hydroxy fatty acids as well as of the 18:1 and 18:2 α,ω -

dicarboxylic acids were higher in the complemented knockout lines *a-A-7* and *a-A-12* compared to those in the *A. thaliana att1-3* mutant. There was no effect on amount and composition of wax (Fig. 4b).

3.4.3. Physiological characterisation

The *A. thaliana lacs2-1* plants ($6 \pm 1 \text{ cm}^2$) were small compared to those of Columbia 6 ($32 \pm 3 \text{ cm}^2$) and leaves were darker and more curled (Fig. 5a). Flowering began earlier. Plants of the *PaLACS2* overexpression line *C-L-29* were similar in size ($33 \pm 2 \text{ cm}^2$) to those of Columbia 6, but more compact. The plants of the *PaLACS2* complemented knockout lines *l-L-14* ($12 \pm 1 \text{ cm}^2$) and *l-L-21* ($19 \pm 2 \text{ cm}^2$) were larger and less curled compared to the *A. thaliana lacs2-1* knockout mutant.

Plants of *A. thaliana att1-3* ($28 \pm 3 \text{ cm}^2$) were, on average, smaller compared to those of Columbia 0 ($44 \pm 2 \text{ cm}^2$) and their leaves were shorter (Fig. 5c). Also, individual plants within the population of *att1-3* varied in size. Plants of the *PaATT1* overexpression line *C-A-6* ($41 \pm 2 \text{ cm}^2$) were morphologically similar to those of Columbia 0; those of the complemented knockout lines *a-A-7* ($30 \pm 2 \text{ cm}^2$) and *a-A-12* ($39 \pm 4 \text{ cm}^2$) were similar in size to the *A. thaliana att1-3* mutant. Plants of *a-A-7* and *a-A-12* were more uniform than those of the *A. thaliana att1-3* mutant.

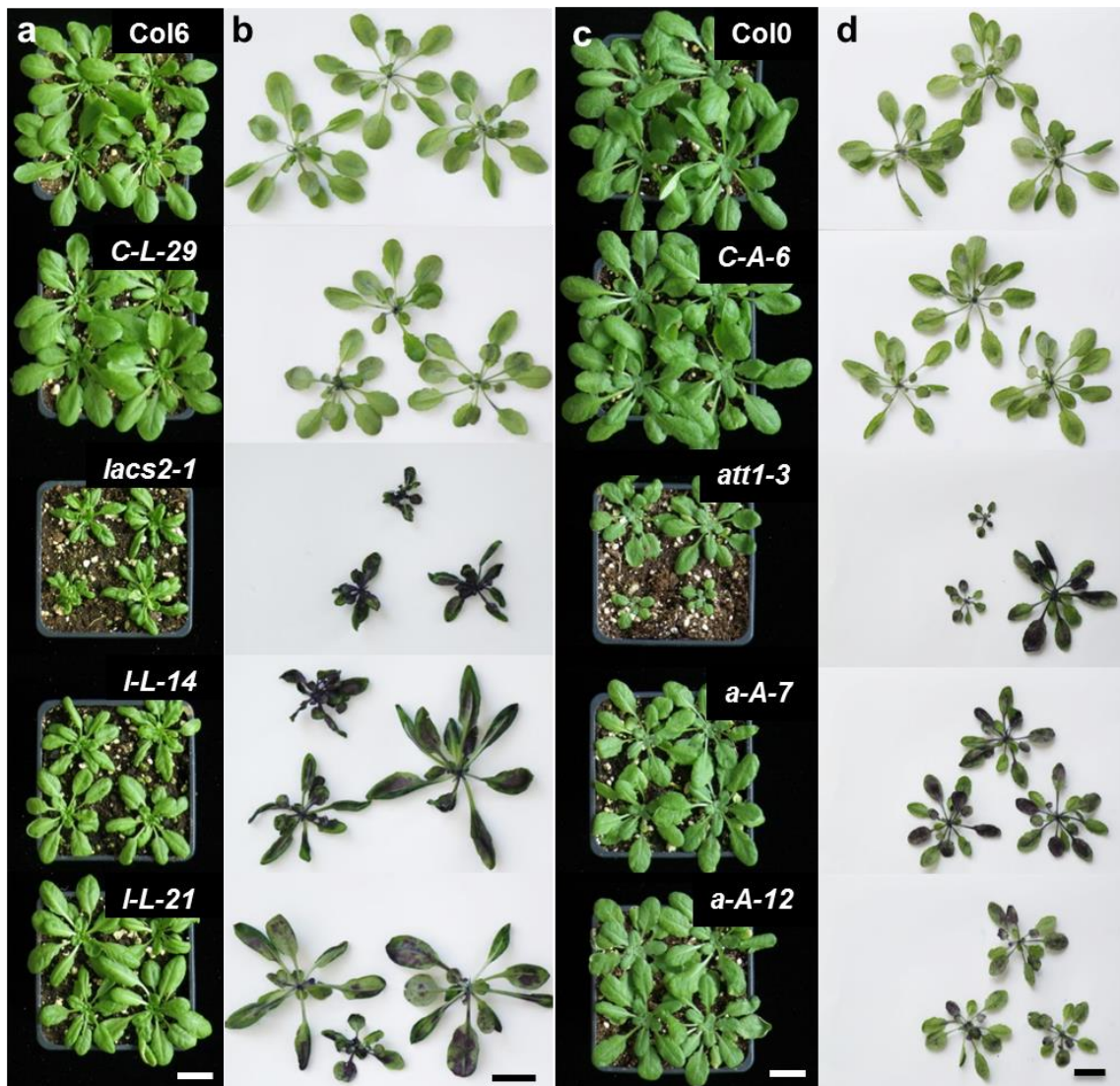


Fig. 5 Habitus of *A.thaliana* plants in top view without (**a, c**) and with (**b, d**) toluidine blue staining (0.05% for 30 min). Column **a** and **b** from *top* to *bottom*: Columbia 6, the *PaLACS2* overexpression line *C-L-29*, the *lacs2-1* knockout mutant, and the *PaLACS2* complemented knockout lines *l-L-14* and *l-L-21*. Column **c** and **d** from *top* to *bottom*: Columbia 0, the *PaATT1* overexpression line *C-A-6*, the *att1-3* knockout mutant, and the *PaATT1* complemented knockout lines *a-A-7* and *a-A-12*. Images taken 4 weeks after germination

Plants of Columbia 6 and of the *PaLACS2* overexpression line *C-L-29* did not stain with toluidine blue (Fig. 5b). In the complemented knockout lines *l-L-14* and *l-L-21*, plants stained in a patchy pattern, whereas those of the *lacs2-1* knockout mutant were completely stained. Similar data were obtained for *PaATT1* where plants of Columbia 0 and those of the *PaATT1* overexpression line *C-A-6* did not stain with toluidine blue, but those of the *A. thaliana att1-3* mutant and – to a somewhat lesser extent – the complemented knockout lines *a-A-7* and *a-A-12* stained in a patchy pattern (Fig. 5d).

Flux in transpiration decreased with time in all lines (Fig. 6 and Online Resource 5). There was no difference in transpiration between Columbia 6 and the *PaLACS2* overexpression line *C-L-29* (Fig. 6a). Transpiration of the *A. thaliana lacs2-1* mutant was higher compared to that of Columbia 6, but decreased in the complemented knockout lines *l-L-14* and *l-L-21*. There was no effect of overexpressing *PaATT1* in line *C-A-6* as compared to Columbia 0. However, the complemented knockout lines *a-A-7* and *a-A-12* had a decreased transpiration flux as compared to the *A. thaliana att1-3* mutant (Fig. 6b).

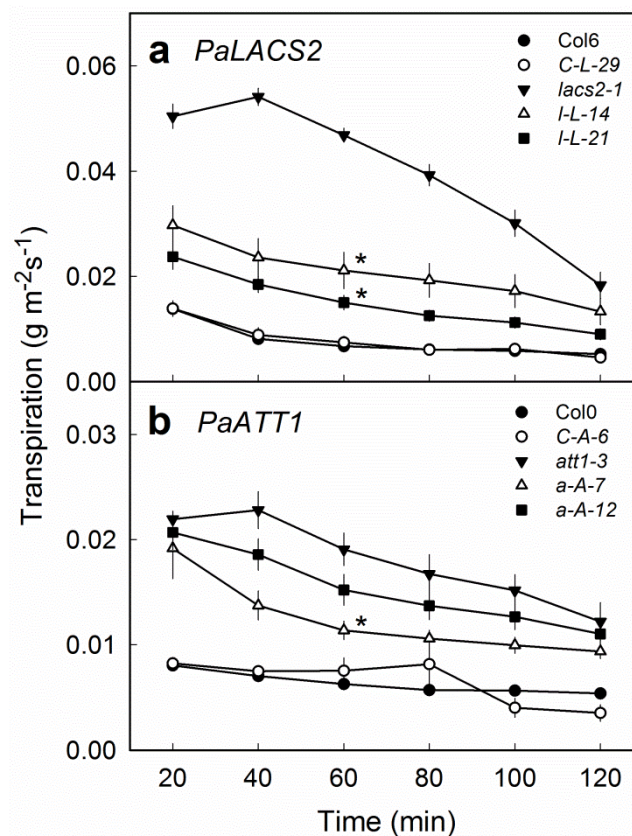


Fig. 6 Effect of *PaLACS2* (a) and *PaATT1* (b) on flux in transpiration of *A. thaliana* plants. **a** Columbia 6, the *PaLACS2* overexpression line *C-L-29*, the *lacs2-1* knockout mutant, and the *PaLACS2* complemented knockout lines *l-L-14* and *l-L-21*. **b** Columbia 0, the *PaATT1* overexpression line *C-A-6*, the *att1-3* knockout mutant, and the *PaATT1* complemented knockout lines *a-A-7* and *a-A-12*. The flux in transpiration was calculated as the amount of water lost per unit leaf surface area and time. Data points represent means \pm SE of five replicates. Asterisk (*) indicates significant differences when comparing the overexpression lines to the Columbia wild-type lines or the complemented knockout lines to the respective knockout mutants at 60 min, Dunnett's test, $P \leq 0.05$

3.5. Discussion

The data presented demonstrate that expressing *PaLACS2* and *PaATT1* in *A. thaliana* generally (1) increased cutin deposition, (2) had no effect on or decreased wax deposition, and (3) decreased cuticle permeability in the complemented mutant lines, but not in the respective overexpression lines.

3.5.1. Cutin and wax deposition

Constitutive expression of *PaLACS2* and *PaATT1* resulted in increased amounts of cutin monomers in 12 out of 13 transgenic *A. thaliana* lines (Fig. 3a and 4a and Online Resource 5, 6). For 6 of the 12 lines, this effect was significant at the 5% level. These observations indicate that *PaLACS2* and *PaATT1* can increase cutin biosynthesis. The only exception was the lack of an effect of *PaLACS2* on the amount and/or composition of cutin in the overexpression line *C-L-15* (Online Resources 5, 6). Because cutin deposition was increased in all other *PaLACS2* transgenic lines including the overexpression line *C-L-29*, and both, *C-L-15* and *C-L-29*, originated from the same *A. thaliana* wild-type Columbia 6, the presence or absence of an effect of *PaLACS2* might be related to the site of the T-DNA integration in the genome (Butaye et al. 2005; De Buck et al. 2013).

Comparing the effects of *PaLACS2* and *PaATT1* on cutin composition of *A. thaliana* revealed that *PaLACS2* increased the individual constituents to a largely similar extent (Fig. 3a and Online Resource 6). In contrast, *PaATT1* resulted in an increase particularly of the 18:1, 18:2 and 18:3 ω -hydroxy fatty acids and the 18:1 and 18:2 α,ω -dicarboxylic acids (Fig. 4a and Online Resource 6). These effects are consistent with the functions assigned to *LACS2* and *ATT1* in *A. thaliana*. *LACS2* catalyses the esterification of fatty acid precursors for the cutin synthesis, whereas *ATT1* encodes a cytochrome P450 monooxygenase catalysing the ω -hydroxylation of fatty acids in the cutin synthesis pathway (Schnurr et al. 2004; Xiao et al. 2004). The increase of 18:1 and 18:2 α,ω -dicarboxylic acids caused by *PaATT1* may be viewed as an indirect effect, since the α,ω -dicarboxylic acids are derived from the corresponding ω -hydroxy fatty acids (Kolattukudy 2001; Rupasinghe et al. 2007). Furthermore, increased amounts of the 18:3 ω -hydroxy fatty acids in the *PaATT1* complemented knockout lines imply a wider substrate specificity for *PaATT1* than that known for *ATT1*. Similar effects have been described for *CYP77A4* in *A. thaliana* (Sauveplane et al. 2009) and *CYP704B2* in

rice (Li et al. 2010). This specific function of *PaATT1* may also explain the absence of a significant effect on amount and composition of wax in the *PaATT1* transgenic lines (Online Resources 5, 6).

Expression of *PaLACS2* had no effect on wax deposition and composition in the overexpression line *C-L-29* and the complemented knockout lines *l-L-2*, *l-L-3*, *l-L-6* and *l-L-7*, but in the complemented knockout lines *l-L-14* and *l-L-21*, wax deposition was decreased relative to the *A. thaliana lacs2-1* mutant (Fig. 3b and Online Resource 5, 6). The absence of an effect of *PaLACS2* on wax in the overexpression line *C-L-29* may simply result from the absence of defects in cutin and/or wax synthesis in Columbia 6. Also, like *LACS2* in *Arabidopsis*, *PaLACS2* is assumed to be primarily involved in cutin rather than wax synthesis (Schnurr et al. 2004; Online Resource 6).

The decreased amounts of wax constituents in the *PaLACS2* complemented knockout mutant lines *l-L-14* and *l-L-21* deserve some further comment (Fig. 3b). The decreased wax deposition partly reversed the increased wax deposition in the *A. thaliana lacs2-1* knockout mutant. Both the decrease of wax deposition in the *PaLACS2* complemented knockout lines and the increase of wax deposition in the *lacs2-1* mutant may be accounted for by a redistribution of precursors between the cutin and wax synthesis pathways depending on the extent of inhibition of cutin synthesis (Jenks et al. 2002; Goodwin et al. 2005; Lü et al. 2009; Wang et al. 2011). The cutin and wax synthesis pathways share 16:0 and 18:X fatty acids and corresponding acyl-CoAs as common precursors (Li-Beisson et al. 2013). Further support for this hypothesis comes from the increased expression of *LACS1* observed in the *A. thaliana lacs2-1* mutant as compared to that in Columbia 6 (Fig. 1d). *LACS1* modifies very long chain fatty acids for wax synthesis (Lü et al. 2009; Weng et al. 2010) and has overlapping functions with *LACS2* in cutin biosynthesis in *A. thaliana* (Lü et al. 2009).

Expression of *PaATT1* had generally no effect on wax deposition and composition (Fig. 4b and Online Resources 5, 6).

3.5.2. Permeability of the cuticle

The permeability of the cuticle decreased in complemented knockout lines expressing *PaLACS2* or *PaATT1* as indexed by toluidine blue staining (Fig. 5) and the transpiration assay (Fig. 6). This decrease was significant in five of ten complemented lines (Online Resource 5). This finding suggests that the barrier function of the cuticle was partially

restored by *PaLACS2* and *PaATT1* when expressed in the corresponding *A. thaliana* knockout mutants. That the decreased permeability, however, was accompanied by the lack of an effect on or even a decrease in wax deposition in the complemented knockout mutants was somewhat surprising (Fig. 3b and 4b and Online Resources 5, 6). However, similar effects were also reported earlier for *Arabidopsis* (Jenks et al. 2002; Kurdyukov et al. 2006; MacGregor et al. 2008; Wang et al. 2011). For a homogenous membrane, one would expect decreased CM permeability to be caused by increased wax deposition (Riederer and Schreiber 2001). A lack of a close relationship between permeability and wax deposition may result from one or several of the following factors. First, the cuticle is a complex heterogeneous membrane, and therefore, its permeability is not a simple function of the amounts of wax present (Riederer and Schreiber 2001). Second, within the wax fraction, the crystalline portion of the embedded wax is considered to be impermeable to water (Reynhardt and Riederer 1994), and crystalline wax may not simply be a function of the total amount present. That implies that the observed effect on the permeability is likely to be the net effect of increased cutin deposition, an unaffected or decreased wax deposition, and any possible changes in wax crystallinity associated with them.

3.5.3. Potential consequences of modifying cutin and wax deposition for fruit cracking

The objective in studying the molecular background of cuticle deposition in sweet cherry is ultimately to reduce fruit cracking. Cuticle deposition and cracking may be related in several ways. First and most importantly, we expect to reduce strain and stress in the cuticle by synchronizing cuticle deposition and surface expansion. Earlier studies have established that cuticle deposition essentially ceases within 4 weeks after full bloom, whereas most surface expansion occurs thereafter (Knoche et al. 2004). The cessation of cuticle deposition causes stress, strain, and, consequently, formation of microcracks in the cuticle (Peschel and Knoche 2005). Microcracks impair the barrier function of the cuticle (Knoche and Peschel 2006) and therefore are an important determinant of its water permeability. Second, continuing wax deposition in the cutin network on the expanding fruit surface fixes strain (Khanal et al. 2013). This strain fixation reduces stress and, hence, could reduce microcracking. Also, in apple, wax deposition fills microcracks, thereby restoring the cuticle's barrier function. Whether this also holds for sweet cherry is currently unknown. Third, amounts and composition

of cutin and wax may affect the permeability of the cuticle. However, it is important to note that because the cuticle is heterogeneous, relationships between permeability and composition or amounts of constituents will not be a simple function of the amount of its constituents. Finally, we would like to point out that effects on mechanical properties of the fruit skin such as fracture strains, fracture pressures or the modulus of elasticity are unlikely to result from altering cuticle deposition. In sweet cherry, the epidermal and hypodermal cell layers and not the cuticle form the structural backbone of the fruit skin (Brüggenwirth et al. 2014). Unfortunately, sweet cherry is not easy to transform, and therefore, our studies - at present - are limited to the *Arabidopsis* model where only some of these strategies can be investigated.

3.6. Conclusion

PaLACS2 and *PaATT1* are involved in the biosynthesis of cutin when expressed in *A. thaliana*. This and the high sequence similarity with peach [*Prunus persica* (L.) Batsch] and *A. thaliana* (Alkio et al. 2012) suggest that *PaLACS2* presumably codes for a long-chain acyl-CoA synthetase that catalyses the esterification of fatty acid precursors whereas *PaATT1* likely encodes a cytochrome P450 monooxygenase which catalyses the ω -hydroxylation of fatty acids in cutin biosynthesis in sweet cherry.

3.7. Acknowledgements

We thank Uwe Jonas and Friederike Schröder for technical support and Herbert Geyer and his team for cultivating the *Arabidopsis* plants. This work was supported in part by grants from the Deutsche Forschungsgemeinschaft (grant numbers AL1373/1-1 and SCHR506/11-1).

3.8. Data archiving statement

PaLACS2 (accession number JU090714.1) and *PaATT1* (accession number JU090723.1) cDNA sequences were previously deposited in GeneBank (Alkio et al. 2012).

3.9. Supplemental Data

3.9.1. Online Resource 1

Online Resource 1
Table with oligonucleotides used in this study. Underlined sequences are the gene-specific parts of the primers 419, 422, 452 and 453.

Primer no.	Primer name	Sequence (5' to 3')	Purpose
419	Pa_ATT1_attB1_S	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTAATGGAGGCATCAACGGCT	Cloning
422	Pa_ATT1_attB2_2	GGGGACCACITTTGTACAAGAAAGCTGGGTACTAAGCAATCCAGCCACCACCATCTCA	Cloning
452	PaLACS2_attB1_short	AAAAAGCAGGTAIGGATTTTATAGTGAAGTTG	Cloning
453	PaLACS2_attB2_short	AGAAAGCTGGTTCATACCCCTTGCTTCCCTTTGCTTC	Cloning
454	attB1	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCT	Cloning
455	attB2	GGGGACCACITTTGTACAAGAAAGCTGGGT	Cloning
397	#1-ATT1-LP	GGTTCATGGGATGATGTGTC	Genotyping
398	#1-ATT1-RP	GCTCCGTTCTGATTGAGACAC	Genotyping
405	LBb1.3-BP	ATTTTGCCGATTTCCGGAAC	Genotyping
406	#6-LACS2-LP-1	TGTGACAGGATTGACTGAGAGTTGTGG	Genotyping
407	#6-LACS2-RP-1	CATCTTTTGCCATTCTCCAATATCTCCTA	Genotyping
408	ZR2_T-DNA	TGGAAAACCTGGCGTTACCCAACTTAAT	Genotyping
492	PaLACS2_g344a_SE	CTATTGAAACAAGGCTTGAGTCAGTGCCAGAAATGGG	Mutagenesis
493	PaLACS2_g344a_AS	CCCATTTCTGGCACTGACTCAAGCCTTGTTTCAATAG	Mutagenesis
258	PA_LACS2_like1_F	ATACTGTTGCTGGTGCTG	RT-qPCR
259	PA_LACS2_like1_R	CACTGACTCAAGCCTTGT	RT-qPCR
262	PA_ATT1_like2_F	CCGAAAGCCAAACCCACAATG	RT-qPCR
263	PA_ATT1_like2_R	CGTAAGACCCGCCACTG	RT-qPCR
575	A.t.h_SAND_fa_S	AACTCTATGCAGCATTGTGATCCACT	RT-qPCR
576	A.t.h_SAND_fa_AS	TGATTGCATATCTTTATCGCCATC	RT-qPCR
577	A.th_TIP41_I_S	GTGAAAACCTGTTGGAGAGAAGCAA	RT-qPCR
578	A.th_TIP41_I_AS	TCAACTGGATACCCCTTTGCGCA	RT-qPCR
587	Ath_LACS1_SE	TCCTCCGATTGATTCTGA	RT-qPCR
588	Ath_LACS1_AS	GCCATCCAAGCATATTATTG	RT-qPCR
601	A.t.ATT1_NI_S	GTACCCAAAGAGAGAACGACG	RT-qPCR
602	A.t.ATT1_NI_A	GCCACAGCCGCATTAACG	RT-qPCR
609	A.t.LACS2_NI_S	CCGCTGACGTGCCGAGAG	RT-qPCR
610	A.t.LACS2_NI_A	CTCCTGTGTGGAACCATCCATCGA	RT-qPCR
621	Ai4g33380_SE	TTGAAAATTGGAGTACCCGTACCAA	RT-qPCR
622	Ai4g33380_AS	TCCCTCGTATACATCTGGCCA	RT-qPCR
631	PaLACS2-A_314_SE	ACTAATGGAGCAATTAATGGCAGAA	RT-qPCR
632	PaLACS2-A_314_AS	AACAGGCTTCTCCTCAACAC	RT-qPCR

3.9.2. Online Resource 2

Online Resource 2 Table outlining the sequence variation of cloned *PaLACS2* gene compared to the submitted *PaLACS2* cDNA sequence (accession number JU090714.1) in GeneBank. SNP, single nucleotide polymorphism

Position in JU090714.1	Sequence variation	Type of variation
517	T → C	SNP
628	C → T	SNP
666	G → T	SNP
772	A → G	SNP
802	G → A	SNP
934	C → T	silent mutation
943	A → G	silent mutation
1081	C → A	SNP
1090	T → C	SNP
1394	C → G	SNP
1402	G → A	SNP
1474	A → G	SNP
1732	C → A	SNP
1743	A → T	SNP
1756	A → G	SNP
1955	G → C	SNP
2028	T → G	SNP

3.9.3. Online Resource 3

Online Resource 3 Relative normalized expression levels for *PaLACS2* overexpression lines (*C-L-15*, *C-L-29*) and complemented knockout lines (*l-L-2*, *l-L-3*, *l-L-6*, *l-L-7*, *l-L-14*, *l-L-21*). Expression was analysed for sweet cherry *PaLACS2* and *A. thaliana* genes *LACS2*, *ATT1*, and *LACS1*. *A. thaliana* wild-type line Columbia 6 and the knockout mutant line *lacs2-1* (all bold) served as background lines, transgenic lines are printed in italics. Data for underlined transgenic lines are presented in the manuscript. Data are means \pm standard errors (SE). For details see text.

Plant lines	<i>PaLACS2</i>	<i>LACS2</i>	<i>ATT1</i>	<i>LACS1</i>
Col6	n/a	1.000000 \pm 0.118405	1.00 \pm 0.31	1.00 \pm 0.04
<i>C-L-15</i>	5.5 \pm 1.4	0.891277 \pm 0.078693	1.27 \pm 0.14	0.82 \pm 0.11
<u><i>C-L-29</i></u>	12.3 \pm 1.1	0.999755 \pm 0.089111	2.27 \pm 0.23	0.94 \pm 0.08
<i>lacs2-1</i>	n/a	0.000186 \pm 0.000035	1.57 \pm 0.14	2.10 \pm 0.10
<i>l-L-2</i>	12.6 \pm 1.6	0.000567 \pm 0.000062	0.92 \pm 0.24	2.08 \pm 0.46
<i>l-L-3</i>	1.0 \pm 0.2	0.000369 \pm 0.000044	0.69 \pm 0.27	2.29 \pm 0.43
<i>l-L-6</i>	16.3 \pm 2.6	0.000331 \pm 0.000054	0.86 \pm 0.17	1.36 \pm 0.15
<i>l-L-7</i>	n/a	0.000215 \pm 0.000166	0.22 \pm 0.11	0.29 \pm 0.28
<u><i>l-L-14</i></u>	14.4 \pm 1.4	0.000093 \pm 0.000027	0.70 \pm 0.15	1.38 \pm 0.53
<u><i>l-L-21</i></u>	37.2 \pm 4.6	0.000129 \pm 0.000061	0.52 \pm 0.05	0.96 \pm 0.07

3.9.4. Online Resource 4

Online Resource 4 Relative normalized expression levels for *PaATT1* overexpression line (*C-A-6*) and complemented knockout lines (*a-A-7*, *a-A-11*, *a-A-12*, *a-A-16*). Expression was analysed for sweet cherry *PaATT1* and *A. thaliana* genes *ATT1* and *LACS1*. *A. thaliana* wild-type line Columbia 0 and the knockout mutant line *att1-3* (all bold) served as background lines, transgenic lines are printed in italics. Data for underlined transgenic lines are presented in the manuscript. Data are means \pm standard errors (SE). For details see text.

Plant lines	<i>PaATT1</i>	<i>ATT1</i>	<i>LACS2</i>
Col0	n/a	1.00000 \pm 0.33994	1.00 \pm 0.11
<i><u>C-A-6</u></i>	9.3 \pm 0.3	0.50318 \pm 0.19101	0.50 \pm 0.13
<i>att1-3</i>	n/a	0.00103 \pm 0.00043	0.85 \pm 0.07
<i><u>a-A-7</u></i>	8111.8 \pm 345.1	0.00046 \pm 0.00015	0.65 \pm 0.06
<i>a-A-11</i>	1.0 \pm 0.0	0.00039 \pm 0.00024	0.98 \pm 0.12
<i><u>a-A-12</u></i>	6.8 \pm 0.3	0.00034 \pm 0.00015	1.55 \pm 0.30
<i>a-A-16</i>	457.4 \pm 14.5	0.05528 \pm 0.01313	1.18 \pm 0.24

3.9.5. Online Resource 5

Online Resource 5 Selected properties of *PaLACS2* and *PaATT1* overexpression (*C-L-15*, *C-L-29*, *C-A-6*) and complemented knockout lines (*l-L-2*, *l-L-3*, *l-L-6*, *l-L-7*, *l-L-14*, *l-L-21*, *a-A-7*, *a-A-11*, *a-A-12*, *a-A-16*) used in analyses of cutin and wax amount and composition, and a transpiration assay. *A. thaliana* wild-type lines Columbia 6 and Columbia 0 and the knockout mutant lines *lacs2-1* and *att1-3* (all bold) served as background lines, transgenic lines are printed in italics. Data for underlined transgenic lines are presented in the manuscript. Data are means \pm standard errors (SE). For details see text.

Plant lines	Amounts ($\mu\text{g dm}^{-2}$)			Transpiration at 60 min (mg m^{-2})	
	α,ω -Dioic acids	ω -Hydroxy fatty acids	Total cutin	Total wax	
<i>PaLACS2</i> lines					
Col6	171.3 \pm 8.9	36.1 \pm 2.6	207.4 \pm 11.5	51.7 \pm 4.0	6.8 \pm 0.5
<i>C-L-15</i>	136.0 \pm 1.8	28.8 \pm 1.2	164.8 \pm 2.8	55.4 \pm 1.2	11.0 \pm 2.1
<u><i>C-L-29</i></u>	423.8 \pm 23.2*	87.3 \pm 7.3*	511.1 \pm 30.4*	53.5 \pm 0.3	7.5 \pm 1.2
<i>lacs2-1</i>	70.2 \pm 7.5	27.9 \pm 2.7	98.1 \pm 10.0	145.2 \pm 13.1	46.8 \pm 1.3
<i>l-L-2</i>	95.7 \pm 3.2	31.7 \pm 1.6	127.4 \pm 4.4	118.5 \pm 5.9	31.4 \pm 6.2*
<i>l-L-3</i>	207.1 \pm 26.8*	76.6 \pm 7.2*	283.7 \pm 34.0*	136.0 \pm 13.5	36.1 \pm 2.0
<i>l-L-6</i>	119.0 \pm 9.5	33.8 \pm 1.8	152.8 \pm 10.0	130.7 \pm 11.3	23.3 \pm 2.4*
<i>l-L-7</i>	99.3 \pm 5.7	32.7 \pm 2.5	132.0 \pm 7.8	165.3 \pm 12.5	35.5 \pm 1.8
<u><i>l-L-14</i></u>	280.8 \pm 28.6*	83.5 \pm 0.9*	364.3 \pm 29.4*	87.9 \pm 12.7*	21.1 \pm 3.5*
<u><i>l-L-21</i></u>	94.7 \pm 9.4	25.1 \pm 2.6	119.8 \pm 11.9	86.5 \pm 2.8*	15.0 \pm 1.4*
<i>PaATT1</i> lines					
Col0	174.3 \pm 14.5	30.4 \pm 10.6	214.8 \pm 18.8	55.7 \pm 6.5	6.3 \pm 0.3
<u><i>C-A-6</i></u>	215.7 \pm 9.8	50.5 \pm 2.3	266.2 \pm 11.6	72.7 \pm 3.2	7.5 \pm 1.2
<i>att1-3</i>	56.3 \pm 5.9	29.1 \pm 2.7	85.4 \pm 8.3	79.5 \pm 6.8	19.1 \pm 1.5
<u><i>a-A-7</i></u>	72.2 \pm 5.4	53.2 \pm 7.3*	125.4 \pm 12.8*	82.6 \pm 3.0	11.4 \pm 0.9*
<i>a-A-11</i>	61.5 \pm 3.00	42.6 \pm 2.9	104.1 \pm 5.9	83.1 \pm 7.0	20.0 \pm 0.7
<u><i>a-A-12</i></u>	73.7 \pm 1.8*	50.1 \pm 1.4*	123.8 \pm 3.0*	81.0 \pm 8.2	15.2 \pm 1.5
<i>a-A-16</i>	76.9 \pm 4.4*	56.3 \pm 3.7*	133.2 \pm 7.5*	81.8 \pm 6.6	18.6 \pm 2.5

* Asterisk indicates significant difference when comparing the overexpression lines to the Columbia wild-types or the complemented knockout lines to the knockout mutants, Dunnett's test, $P \leq 0.05$.

3.9.6. Online Resource 6

Online Resource 6 Amounts of cutin and wax monomers for the PaLACS2 and PaATT1 overexpression (C-L-15, C-L-29, C-A-6) and complemented knockout lines (*I-L-2*, *I-L-3*, *I-L-6*, *I-L-7*, *I-L-14*, *I-L-21*, *a-A-7*, *a-A-11*, *a-A-12*, *a-A-16*). *A. thaliana* wild type Columbia 6 and Columbia 0 and the knockout mutant lines *lacs2-1* and *att1-3* (all bold) served as background lines, transgenic lines are printed in italics. Data for underlined transgenic lines are presented in this manuscript. Data are means \pm standard errors (SE). Asterisk (*) indicates significant difference when comparing the overexpression lines to the Columbia wild types or the complemented knockout lines to the knockout mutants, Dunnett's test, $P \leq 0.05$. For details see text

PaLACS2 lines

Plant lines	Cutin		ω -Hydroxy fatty acids													
	α, ω -Dioic acids		16		18		18:1		18:2		18:3		18:3			
	16	SE	16	SE	18	SE	18:1	SE	18:1	SE	18:2	SE	18:2	SE	18:3	SE
Col6	9.2	1.1	7.9	1.0	16.2	0.9	140.0	6.7	3.4	0.9	6.1	0.6	12.1	0.6	14.6	0.8
<i>C-L-15</i>	8.4	0.6	6.2	1.0	12.5	0.4	108.9	0.7	2.1	0.1	3.9	0.6	11.5	0.5	11.4	0.4
<i>C-L-29</i>	24.3	1.6*	17.6	0.8*	41.1*	3.1*	340.8	19.1*	6.3	0.5*	11.9	1.9*	31.2	2.2*	37.9	2.9*
<i>lacs2</i>	3.7	0.6	6.1	0.9	7.6	0.7	52.7	6.0	2.2	0.2	5.3	0.6	8.6	0.9	11.8	1.4
<i>I-L-2</i>	4.9	0.2	8.0	0.5	10.2	0.5	72.5	3.1	2.9	0.7	6.1	0.2	9.6	0.4	13.0	0.2
<i>I-L-3</i>	8.0	1.3*	14.4	1.4*	18.0	2.8*	166.7	22.9*	4.0	0.9	10.1	1.6*	20.9	2.6*	41.6	2.5*
<i>I-L-6</i>	5.9	0.2	7.8	0.6	13.5	1.2	91.8	8.3	2.8	0.1	6.4	0.7	10.1	0.7	14.5	0.7
<i>I-L-7</i>	5.7	0.8	8.1	0.9	8.9	0.4	76.5	4.1	3.1	0.4	6.7	0.6	9.5	0.5	13.5	1.0
<i>I-L-14</i>	10.7	1.2*	14.6	0.4*	25.1	2.3*	230.4	26.0*	3.7	0.3	11.6	0.7*	26.9	0.9*	41.2	0.8*
<i>I-L-21</i>	5.4	0.7	6.1	0.5	9.5	0.9	73.7	7.4	2.1	0.2	4.0	0.6	8.2	0.8	10.7	1.1

PaATT1 lines

Plant lines	Cutin		ω -Hydroxy fatty acids													
	α, ω -Dioic acids		16		18		18:1		18:2		18:3		18:3			
	16	SE	16	SE	18	SE	18:1	SE	18:1	SE	18:2	SE	18:2	SE	18:3	SE
Col0	9.7	0.9	8.4	0.6	14.5	1.2	141.6	12.4	2.3	0.4	7.5	0.9	12.3	1.5	18.4	1.8
<i>C-A-6</i>	16.7	1.0*	9.8	1.1	19.7	1.2*	169.5	7.0	5.6	1.1	10.2	1.0	13.5	0.7	21.2	1.0
<i>att1</i>	7.3	2.5	8.0	2.9	4.2	0.2	37.9	2.8	1.2	0.1	3.7	0.5	5.5	0.7	18.7	1.8
<i>a-A-7</i>	5.6	0.2	5.2	0.4	8.4	0.9*	53.0	4.3*	2.3	0.4	8.9	1.2*	10.5	1.4*	31.5	4.7*
<i>a-A-11</i>	4.3	0.5	7.0	2.3	5.2	0.3	44.9	1.8	1.8	0.3	6.6	1.4	8.6	0.4*	25.5	1.1
<i>a-A-12</i>	5.7	0.3	7.0	0.3	7.1	0.4*	53.8	1.6*	2.8	0.1	6.4	0.3	10.2	0.2*	30.7	1.1*
<i>a-A-16</i>	5.6	0.5	8.7	2.7	7.5	0.6*	55.1	1.6*	4.4	1.3*	6.6	1.2	11.7	0.7*	36.5	1.1*

PaLACS2 lines

Plant lines	Alcohols																	
	C27		C29		C31		C33		C28		C30		C32		Total			
	SE	SE	SE	SE	SE	SE	SE	SE	SE	SE	SE	SE	SE	SE	SE	SE		
Col6	0.4	0.1	7.0	0.8	11.5	1.2	3.4	0.6	22.3	2.7	0.7	0.1	4.4	0.2	8.1	0.3	13.2	0.6
<i>C-L-15</i>	0.8	0.2	8.5	0.4	11.1	0.4	3.4	0.2	23.9	1.0	0.4	0.0*	5.0	0.1*	9.5	0.2*	15.0	0.2*
<i>C-L-29</i>	0.7	0.1	8.7	0.2	11.9	0.2	3.2	0.1	24.5	0.2	0.4	0.1*	4.8	0.1	9.1	0.1*	14.3	0.3
lacs2	2.6	0.7	37.2	3.9	48.6	4.4	12.8	2.6	101.2	10.1	1.9	0.3	4.6	0.8	5.4	0.4	11.9	1.4
<i>I-L-2</i>	1.7	0.5	28.5	1.0	37.7	0.4	10.3	2.1	61.6	14.0*	1.8	0.5	5.6	1.4	9.9	1.7	17.3	3.6
<i>I-L-3</i>	3.0	0.8	38.3	3.4	44.8	4.0	13.6	3.0	99.7	11.1	0.7	0.1*	3.6	0.3	7.3	0.4	11.6	0.7
<i>I-L-6</i>	1.1	0.2	28.4	3.3	38.2	5.1	8.8	1.4	76.5	9.7	1.7	0.3	5.7	0.2	11.2	0.7*	18.6	1.0
<i>I-L-7</i>	1.7	0.1	36.6	2.0	48.5	4.5	13.1	1.9	100.0	8.0	1.5	0.2	5.6	0.8	11.2	1.5*	13.7	4.8
<i>I-L-14</i>	0.7	0.1*	17.3	3.5*	24.9	4.6*	5.6	0.9	48.4	9.2*	0.9	0.1	4.1	0.1	9.4	0.5*	14.4	0.5
<i>I-L-21</i>	0.7	0.1*	16.2	0.6*	24.5	1.1*	6.5	0.2	47.9	1.8*	0.4	0.1*	4.1	0.1	9.8	0.1*	14.3	0.3

PaATT1 lines

Plant lines	Alcohols																	
	C27		C29		C31		C33		C28		C30		C32		Total			
	SE	SE	SE	SE	SE	SE	SE	SE	SE	SE	SE	SE	SE	SE	SE	SE		
Col0	1.1	0.3	9.4	0.9	17.2	1.8	7.5	1.2	35.1	4.0	1.1	0.1	4.9	0.5	8.2	0.9	14.1	1.5
<i>C-A-6</i>	1.0	0.1	11.7	0.4	23.3	1.5*	7.6	1.1	43.6	1.0	1.5	0.0	5.2	0.6	10.5	0.4	17.2	0.2
att1	1.0	0.2	14.7	1.3	23.8	2.2	8.4	0.6	47.9	4.2	1.3	0.2	6.0	0.4	10.3	0.8	17.5	1.4
<i>a-A-Z</i>	1.3	0.2	13.1	0.8	23.9	2.5	8.9	0.2	47.3	3.1	1.4	0.2	6.8	0.4	11.0	0.4	19.3	0.8
<i>a-A-11</i>	1.1	0.1	14.7	1.4	27.5	2.2	8.5	0.3	51.8	3.8	1.2	0.1	7.3	0.6	10.3	0.7	18.8	0.7
<i>a-A-12</i>	1.6	0.5	14.7	1.6	23.6	2.4	10.7	2.0	50.7	6.4	0.7	0.0*	5.8	0.4	8.7	0.4	15.2	0.7
<i>a-A-16</i>	1.1	0.3	13.9	0.9	26.3	1.3	9.6	1.3	50.9	3.5	1.0	0.1	5.9	0.4	9.7	0.8	16.6	1.3

PaLACS2 lines

Plant lines	Wax		Fatty acids																	
	Aldehydes		C26		C28		C30		Total		C24		C26		C28		C30		Total	
	SE		SE		SE		SE	Total	SE	C24	SE	C26	SE	C28	SE	C30	SE	Total	SE	
Col6	0.6	0.1	1.3	0.1	1.3	0.1	2.4	0.1	4.3	0.3	1.1	0.2	4.9	0.7	1.8	0.1	4.2	0.2	12.0	0.9
<i>C-L-15</i>	1.2	0.3	1.7	0.0 *	3.0	0.2 *	3.0	0.2 *	5.9	0.2 *	0.9	0.2	3.6	0.8	0.8	0.1 *	5.3	0.5	10.6	1.2
<i>C-L-29</i>	0.5	0.1	1.5	0.1 *	2.6	0.1	2.6	0.1	4.6	0.2	0.9	0.1	3.7	0.3	0.9	0.1 *	4.5	0.3	10.0	0.3
<i>lacs2</i>	2.6	0.8	4.5	0.6	7.1	1.0	14.2	2.3	14.2	2.3	1.6	0.2	5.9	0.5	3.3	0.3	7.1	0.6	17.9	0.7
<i>I-L-2</i>	0.8	0.1	5.6	1.3	7.7	1.2	14.2	2.6	14.2	2.6	2.1	0.3	9.4	1.3	5.1	0.6 *	8.8	1.0	25.4	3.0 *
<i>I-L-3</i>	2.2	1.0	4.7	0.6	4.5	0.3	11.4	1.9	11.4	1.9	1.2	0.2	4.7	0.8	2.3	0.4	5.1	0.5	13.3	0.7
<i>I-L-6</i>	0.8	0.1	3.7	0.4	6.3	0.4	10.8	0.9	10.8	0.9	2.2	0.1	9.6	0.6	5.0	0.3	8.0	0.6	24.8	1.3
<i>I-L-7</i>	1.4	0.2	4.9	0.3	7.2	0.7	13.5	0.8	13.5	0.8	3.1	0.3 *	14.7	1.8 *	6.6	0.7 *	9.2	0.6	33.6	3.0 *
<i>I-L-14</i>	0.6	0.1	2.6	0.5	4.5	0.4	7.8	1.0	7.8	1.0	1.2	0.3	6.0	1.4	3.0	0.6	7.1	0.3	17.3	2.5
<i>I-L-21</i>	0.6	0.1	2.3	0.1	3.9	0.1 *	6.8	0.2 *	6.8	0.2 *	1.7	0.2	7.2	0.8	2.7	0.2	6.0	0.2	17.6	1.3

PaATT1 lines

Plant lines	Wax		Fatty acids																	
	Aldehydes		C26		C28		C30		Total		C24		C26		C28		C30		Total	
	SE		SE		SE		SE	Total	SE	C24	SE	C26	SE	C28	SE	C30	SE	Total	SE	
Col0	1.5	0.4	1.3	0.3	1.3	0.3	1.3	0.9	3.1	0.9	0.5	0.2	1.3	0.4	0.7	0.2	0.9	0.1	3.3	0.8
<i>C-A-6</i>	1.0	0.1	1.7	0.1	1.4	0.2	4.1	0.2	4.1	0.2	0.8	0.1	3.1	0.3 *	9.3	n/a *	1.6	0.1 *	7.8	2.6
<i>att1</i>	1.1	0.2	2.8	0.4	2.9	0.4	6.7	0.9	6.7	0.9	0.8	0.3	2.0	0.7	1.3	0.3	3.2	0.4	7.3	1.4
<i>a-A-7</i>	1.0	0.2	1.5	0.1	2.8	0.6	5.3	0.8	5.3	0.8	1.1	0.2	4.7	0.8	1.5	0.3	3.4	0.8	10.7	1.5
<i>a-A-11</i>	1.3	0.3	2.0	0.3	3.0	0.5	6.3	0.9	6.3	0.9	0.5	0.1	1.8	0.4	1.0	0.1	3.5	0.5	6.3	1.2
<i>a-A-12</i>	1.4	0.5	3.1	1.2	2.3	0.3	6.8	1.6	6.8	1.6	1.0	0.3	2.1	0.6	1.7	0.4	3.4	0.3	8.2	0.7
<i>a-A-16</i>	0.9	0.3	1.4	0.1	1.7	0.2	4.0	0.2	4.0	0.2	1.2	0.3	4.6	1.1	2.2	0.5	2.3	0.1	10.3	1.8

4. Allgemeine Diskussion

Die vorliegende Arbeit liefert folgende neue Forschungsergebnisse:

1. PaLACS2 und PaATT1 besitzen konservierte Proteinmotive, die für die LACS-Familie beziehungsweise die Familie der Cytochrom P450-Monooxygenasen charakteristisch sind.
2. Die Expression von *PaLACS2* wie auch *PaATT1* in *Arabidopsis thaliana* bewirkt generell eine Erhöhung der Menge an Kutinmonomeren.
3. Die Expression von *PaLACS2* wie auch *PaATT1* in *Arabidopsis thaliana* führt zu einer geringen Permeabilität der Kutikula gegenüber Wasser und Toluidinblau.

Aus den genannten Punkten lässt sich schließen, dass *PaLACS2* für eine Acyl-CoA-Synthetase und *PaATT1* für eine Monooxygenase kodieren und beide Gene an der Kutinbiosynthese in der Süßkirsche beteiligt sind.

Das Platzen von Früchten stellt ein Phänomen mit schwerwiegenden wirtschaftlichen Folgen im Anbau dar und ist im Fall der Süßkirsche Inhalt von anhaltender Forschung. In den vergangenen Jahren konnte eine Diskrepanz zwischen Oberflächenzunahme und CM-Deposition während der Fruchtentwicklung als Initiator für das wasserinduzierte Platzen von Süßkirschenfrüchten aufgedeckt werden (Knoche et al. 2004). Neuere Forschungsarbeiten befassen sich mit dem molekulargenetischen Hintergrund der CM-Deposition in Süßkirschenfrüchten und konnten, basierend auf der Homologie *in silico* generierter Gensequenzen zu *Arabidopsis*, mögliche Kandidatengene der CM-Deposition identifizieren (Alkio et al. 2012). In dieser Arbeit wurden diese Forschungsbestrebungen aufgegriffen und weitergeführt. Dafür wurden *PaLACS2* und *PaATT1*, zwei Kandidatengene der Kutinbiosynthese in der Süßkirsche, auf Proteinebene *in silico* analysiert, die kodierende Sequenz kloniert, sequenziert und schließlich zur funktionellen Charakterisierung in *Arabidopsis* exprimiert.

4.1. Die molekulargenetische Ebene - Gene & Proteine

Die Analyse von *PaLACS2* und *PaATT1* auf Proteinebene konnte die Sequenzhomologie zu *LACS2* und *ATT1* aus der Kutinbiosynthese in *Arabidopsis* bestätigen. Zudem zeigte die Sequenzhomologie der jeweiligen Kirschproteinsequenzen

zu Pfirsich und Apfel (Alkio et al. 2012; Kapitel 2) den hohen Grad an Sequenzkonservierung zwischen den Genen unterschiedlicher Arten und das enge Verwandtschaftsverhältnis innerhalb der Familie der *Rosaceae* (Jung et al. 2012).

Durch die hohe Sequenzkonservierung und die engen Verwandtschaftsverhältnissen können bereits identifizierte Gene bestätigt werden. Hier bieten sich Vertreter aus der gleichen Genfamilie, z.B. *LACS*-Gene aus Raps oder der Sojabohne (Yu et al. 2010; Tan et al. 2014), oder der gleichen Pflanzenfamilie, z.B. potentielle Gene der CM-Deposition im Apfel (Albert et al. 2012), an. Auch in der Weinbeere konnten durch gewebevergleichende Transkriptomanalysen bereits Kandidatengene aus den Familien der CYP86A- und *LACS*-Proteine identifiziert werden (Lijavetzky, 2012). Da die Weinbeere ebenfalls zum wasserinduzierten Platzen neigt (Becker und Knoche 2012a; Becker und Knoche 2012b), kann die Verifikation von *PaATT1* und *PaLACS2* gemeinsam mit ihrer funktionellen Beschreibung einen Startpunkt für Untersuchungen dieses Phänomens auf molekularer Ebene bilden. Weiterführende Studien zur Validierung der an der CM-Deposition beteiligten Gene in der Süßkirsche auf der Basis von Sequenzanalysen und funktioneller Charakterisierung sind anstreben.

Die neusten Untersuchungen an der sich entwickelnden Süßkirschenfrucht lieferten kürzlich eine umfassende Transkriptom-Datenbank mit einer gewebespezifischen Auflösung im zeitlichen Verlauf der Fruchtentwicklung (Alkio et al. 2014). Dieser Datensatz ermöglicht Koexpressionsstudien basierend auf analogen Expressionsmustern während der Fruchtentwicklung. Regulatorische Zusammenhänge der Kutinbiosynthese können dann mit Hilfe von *PaLACS2* und *PaATT1* auf der Genexpressionsebene offen gelegt werden. Weitere Forschungsarbeiten nähern sich dem Thema des Platzens über *quantitative trait loci* (QTL), mit dem Ziel phänotypische Merkmale einem genetischen Locus zuordnen zu können (Klagges et al. 2013). So wurde in Versuchen an der Süßkirsche nach Platzresistenz und Anbaubedingung (Freiland und Folientunnel) differenziert (Balbontín et al. 2013). Die Identifizierung genetischer Loci anhand phänotypischer Merkmale kann neue Gene aufdecken oder bereits bekannte in einen neuen funktionellen Zusammenhang setzen. Mit Blick auf die Platzresistenz können zu den naheliegenden Einflussfaktoren (z.B. Wasser; Knoche et al. 2006) neue hinzukommen (z.B. Expansine während der Zellelongation). Bisher bestätigten diese Untersuchungen nur, dass das Platzen der Süßkirschen unterschiedliche genetische Mechanismen beinhaltet (Balbontín et al. 2013). Die noch ausstehende, vollständige

Sequenzierung des Süßkirschengenoms (Balbontín et al. 2013), wird nach ihrem Abschluss neue Forschungsansätze eröffnen. So ließen sich die Koexpressionsstudien an Transkriptom-Datensätzen auf Promotorstudien am vollständigen Genom ausweiten (Duan und Schuler 2005). Dies würde die Identifikation und Validierung von neuen Genen mit einer Funktion bei der CM-Deposition in der Süßkirsche beschleunigen und Hinweise zur Vernetzung der einzelnen genetischen Mechanismen liefern.

Nach den rein deskriptiven und komparativen bioinformatischen Analysen wurden *PaLACS2* und *PaATT1* kloniert und sequenziert, um ihre funktionelle Charakterisierung mittels *Arabidopsis* zu ermöglichen. Die Expression der beiden Gene in einer Wildtyp-Linie und einer entsprechenden Mutanten-Linie lieferte Rückschlüsse auf die Genfunktion im Kontext der Kutinbiosynthese und Kutikula.

4.2. Die biochemische Ebene - Kutin & Wachs

Die Biosynthese von Kutin- und Wachsmonomeren liefert Bausteine für die CM-Deposition und zum Aufbau der Kutikula. In *Arabidopsis* bilden die 16:0 und 18:X Fettsäuren den Ausgangspunkt für die Kutin- und Wachssynthese (Li-Beisson et al. 2013). Die gängige Vorstellung zur Reihenfolge einzelner Syntheseschritte in der Kutinsynthese in *Arabidopsis* sieht zuerst eine Veresterung freier Fettsäuren mit Koenzym A durch Mitglieder der LACS-Familie vor (Abb. 7). Anschließend hydroxylieren Mitglieder der CYP86A-Subfamilie die entstandenen Acyl-CoAs endständig (Xiao et al. 2004; Li-Beisson et al. 2009). Weitere Syntheseschritte, unter der Beteiligung von Mitgliedern der CYP77A-Subfamilie, führen zur Ausbildung einer Säuregruppe oder weiteren OH-Gruppen an den ω OH-Acyl-CoAs (Sauveplane et al. 2009; Li-Beisson et al. 2009; Li-Beisson et al. 2013). Abschließend werden die ω OH-Acyl-CoAs von Acyltransferasen der GPAT-Familie mit Glycerol verbunden (Yang et al. 2012) und sind zum Aufbau der Kutikula verfügbar.



Abb. 7 Vereinfachte Reihenfolge der Syntheseschritte in der Kutinsynthese von *Arabidopsis* beginnend mit freien Fettsäuren (FFA) aus den Plastiden. Diese werden durch LACS-Enzyme zu Acyl-CoAs verestert. Mitglieder der CYP86A-Subfamilie hydroxylieren die Acyl-CoAs endständig (ω OH-Acyl-CoA). Den Abschluss des Syntheseweges ist die Bildung von ω OH-Acyl-Glycerol, katalysiert durch Glycerol-3-phosphat-Transferasen (GPAT).

Die Expression von *PaLACS2* führte in sieben von acht transgenen Linien zu einer Zunahme der Kutinfraktion (Kapitel 3). Dies spricht für eine Beteiligung von *PaLACS2* an der Kutinsynthese in *Arabidopsis*. Unter Berücksichtigung des Modells ersetzt *PaLACS2* das ausgeschaltete *LACS2* bei der Veresterung freier Fettsäuren (Abb. 7). Dies ermöglicht die Versorgung der anschließenden Syntheseschritte mit Acyl-CoA und die Bildung von Kutinmonomeren. Die, zum Teil, verringerte Menge an Wachsen in der komplementierten *lacs2-1* Mutante deutet auf eine Reduktion der zuvor stattgefundenen Umverteilung von Substratvorstufen vom Kutin- zum Wachssyntheseweg hin (Kapitel 3). Damit kann *PaLACS2* durch die Veresterung von freien Fettsäuren eine allgemeine Funktion einnehmen, die sowohl die Kutin- als auch die Wachssynthese beeinflussen kann.

Die Expression von *PaATT1* bewirkte eine Zunahme von 18:X ω -Hydroxyfettsäuren und 18:X α,ω -Dicarbonsäuren (Kapitel 3). Dies deutet auf eine Funktion von *PaATT1* in der ω -Hydroxylierung von Acyl-CoA und auf eine Substratspezifität gegenüber 18:X-Fettsäuren. Damit beteiligt sich *PaATT1* mit einer spezifischen Funktion an der Kutinsynthese in *Arabidopsis*.

Die Ergebnisse aus der Charakterisierung von *PaLACS2* und *PaATT1* bestätigen das vorgeschlagene Modell der Kutinsynthese (Abb. 7). Die allgemeine Funktion der Aktivierung von Fettsäuren durch *PaLACS2* sowie die Beeinflussung beider Synthesewege impliziert eine Positionierung am Anfang des Syntheseweges. Die spezifischere Funktion von *PaATT1* und seine Effekte auf die Substanzklassen der ω -Hydroxyfettsäuren sowie α,ω -Dicarbonsäuren lassen auf eine Beteiligung an der Kutinsynthese im Anschluss an *LACS2* schließen. Diese Ergebnisse basieren auf dem aktuellen Modell der Kutin- und Wachssynthese in *Arabidopsis* (Abb.3; Li-Beisson et al. 2013). In *Arabidopsis* sind aber noch nicht alle Gene bekannt, die an diesen Synthesewegen beteiligt sind (Li-Beisson et al. 2013). Damit kann nicht ausgeschlossen

werden, dass andere Gene zusätzlich zu *PaLACS2* und *PaATT1* an diesen Effekten beteiligt waren. Es bleibt auch zu klären, ob sich die Aussage zur Funktion von *PaLACS2* und *PaATT1*, basierend auf der ektopischen Expression in *Arabidopsis*, direkt auf die Süßkirsche übertragen lässt.

Die Effekte der Expression von *PaLACS2* und *PaATT1* auf die Kutinfraktion wurden in dieser Arbeit auf biochemischer Ebene untersucht. Die Zusammensetzung der Kutinfraktion in der Süßkirschenfrucht ist mit der von Arabidopsisblättern qualitativ vergleichbar, wie in Tabelle 1 ersichtlich wurde. Dies ermöglichte eine Analyse der Kutinmonomere in den Blättern von *Arabidopsis* und eine Untersuchung des Effekts der Expression von *PaLACS2* oder *PaATT1* auf einzelne Substanzklassen. Arabidopsisblätter besitzen aber auch eine quantitativ abweichende Zusammensetzung der Kutinmonomere (siehe Tabelle 1) mit einem hohen Anteil an α,ω -Dicarbonsäuren (Li-Beisson et al. 2013). Die mengenmäßig dominierenden Substanzklassen in der Kutinfraktion der Süßkirschenfrucht sind jedoch mittelständig oxygenierten Hydroxyfettsäuren (Peschel et al. 2007). Der Einfluss der Expression von *PaLACS2* und *PaATT1* auf die mittelständig oxygenierten Hydroxyfettsäuren lässt sich auch in *Arabidopsis* untersuchen. Hierfür eignen sich die Blütenblätter (Petalen), deren qualitative sowie quantitative Kutinzusammensetzung mit vielen Früchten und Blättern anderer Spezies vergleichbar ist (Holloway 1982; Li-Beisson et al. 2009). Als schwierig gestalten sich dabei jedoch die chemischen Analysen. Eine kürzlich von Mazurek (2013) beschriebene Methode ermöglicht die Ermittlung des Kutingehaltes in den Petalen von *Arabidopsis* mittels Fourier-Transformations-Infrarotspektrometer (FTIR-Spektrometer). Wie auch in dieser Arbeit, wurde hier eine *lacs2* Mutante eingesetzt und ihr verringerter Kutingehalt im Vergleich zum Wildtyp bestätigt. Mit dieser Methode ließen sich die, in dieser Arbeit beschriebenen, transgenen Linien auf den Kutingehalt der Petalen hin untersuchen und der Effekt der Expression von *PaLACS2* und *PaATT1* auf ein Gewebe mit klassischer Kutinfraktion beobachten und quantifizieren.

Die Auswirkungen der Expression von *PaLACS2* und *PaATT1* auf die intermolekulare Struktur und den Aufbau der Kutinmatrix sind nicht bekannt. Erschwerend kommt hinzu, dass die endgültige Struktur der Kutinmatrix selbst für *Arabidopsis* noch unklar

ist (Domínguez et al. 2011). Es wird angenommen, dass sie einen linearen, verästelten oder vernetzen Aufbau besitzt (Yeats and Rose 2013). Die Kernspinresonanzspektroskopie (NMR, *nuclear magnetic resonance*) liefert hier einen Ansatzpunkt, da sie eine nichtinvasive Untersuchung funktioneller Gruppen und des molekularen Aufbaus in pflanzlichen Biopolyester ermöglicht (Isaacson et al. 2009; Serra et al. 2012).

Durch die Expression von *PaLACS2* und *PaATT1* konnte die Zusammensetzung der Kutikula in *Arabidopsis* verändert werden (Kapitel 3). Dass zwei völlig unterschiedliche Gene bei einem gleichen Wirkungsort (Kutinbiosyntheseweg) vergleichbare Effekte hervorrufen, beweist die artübergreifenden, primären Mechanismen der Kutin- und Wachsbiosynthese in Pflanzen (Raven 1984; Riederer 2006). Durch eine Untersuchung der intermolekularen Struktur der Kutinmatrix und ihre Interaktion mit anderen Komponenten wie Wachsen, Polysacchariden oder Kutan, kann eine tiefgreifende Vernetzung der Ergebnisse erlangt werden. Dabei können weitere Erkenntnisse über den Zusammenhang zwischen biochemischer Zusammensetzung und dem dreidimensionalen Aufbau der Kutinmatrix sowie die Auswirkungen auf die physiologische Funktion der Kutikula aufgedeckt werden.

4.3. Die Kutikula und das Platzen der Kirschen

Der Effekt von *PaLACS2* und *PaATT1* in *Arabidopsis* wurde auf verschiedenen Ebenen untersucht und lieferte Hinweise auf ihre mögliche Funktion in der CM-Deposition der Süßkirsche. Mit dem Einsatz von *Arabidopsis* als Modellpflanze, liefert diese Arbeit die erste funktionelle Charakterisierung von zwei Genen aus dem Kutinbiosyntheseweg der Süßkirsche. Die Herunterregulierung von *PaLACS2* und *PaATT1* im Verlauf der Fruchtentwicklung ist im Zusammenhang mit ihrer vermutlichen Funktion als Acyl-CoA-Synthetase beziehungsweise ω OH-Monooxygenase von großer Bedeutung (wie in Abb. 2 und 4 sichtbar). Sie liefert Erklärungsansätze für die Abnahme der CM-Masse und die Auswirkungen auf die physiologische Funktion der Kutikula.

Die Menge und Zusammensetzung der Kutin- und Wachsfraktionen korreliert nicht direkt mit der Permeabilität der Kutikula. Dies bestätigen die Ergebnisse sowie entsprechende Literatur einstimmig (Riederer und Schneider 1990; Geyer und Schönherr 1990; Riederer und Schreiber 2001). Der Fokus auf zwei Gene der

Kutinsynthese und der Effekt ihrer Expression auf die Kutin- und Wachsfraktionen und die Permeabilität der Kutikula betrachtet nur einen Teilaspekt des Ganzen. Beim Platzen der Kirschen handelt es sich aber um ein Zusammenspiel von mehreren Faktoren (Sekse 1998, Balbontín et al. 2013). So beeinflusst auch der strukturelle Aufbau der Kutinmatrix sowie die Form und Verteilung der intrakutikularen Wachse die Architektur und die Funktion der Kutikula. Auf der Ebene der Kirschfrucht müssen ebenso weitere Einflussfaktoren berücksichtigt werden (Abb. 8).

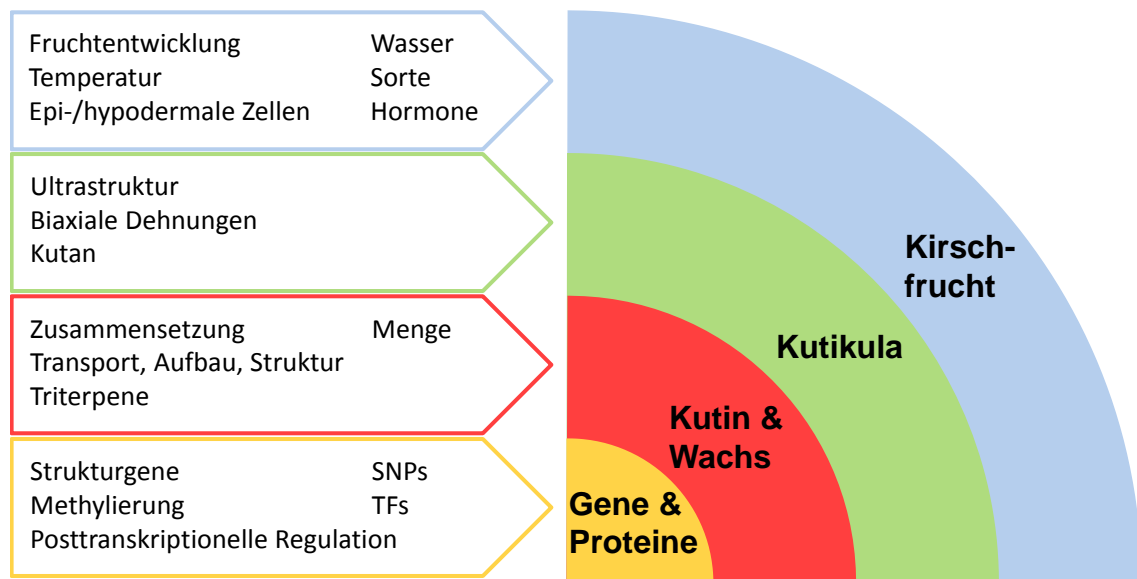


Abb. 8 Übersicht möglicher Einflussfaktoren für das Platzen der Süßkirsche. Die Faktoren sind nach unterschiedlichen Betrachtungsebenen geordnet. SNPs, Einzelnukleotid-Polymorphismen, TFs, Transkriptionsfaktoren (Knoche et al. 2004; Simon 2006; Knoche und Peschel 2007; Peschel et al. 2007; Sekse 2008; Folta und Gardiner 2009; Knoche et al. 2011; Grimm et al. 2012; Balbontín et al. 2013; Carrasco et al. 2013; Yeats und Rose 2013; Brüggewirth et al. 2014).

Als weiterer Einflussfaktor können Transkriptionsfaktoren genannt werden, da sie auf der molekulargenetischen Ebene auch in der CM-Deposition eine maßgebliche regulatorische Rolle spielen (Nakano et al. 2006, Dubos et al. 2010, Borisjuk et al. 2014). Als Beispiel können hier *WAX INDUCER1/SHINE1 (WIN1/SHN1)*, *SHN2* und *SHN3* aus der Familie der AP2/EREBP-Transkriptionsfaktoren in *Arabidopsis* genannt werden (Aharoni et al. 2004; Kannangara et al. 2007), deren mögliche Homologe, *PaWINA* und *PaWINB*, aus der Süßkirsche bereits identifiziert worden sind (Alkio et al. 2012). Der Transkriptionsfaktor *WIN1* reguliert die Kutin- und Wachsbiosynthese, beeinflusst damit die Permeabilität der Kutikula und steigert die Trockenresistenz (Aharoni et al. 2004; Kannangara et al. 2007). Die Expression zahlreicher Gene der Kutinbiosynthese korreliert mit der Expression von *WIN1* und *WIN1* aktiviert direkt den

Promotor von *LACS2*. In einem nachfolgenden Schritt wird indirekt die Expression von Genen aus der Wachsbiosynthese reguliert (Kannangara et al. 2007). Expressionsstudien an allen drei Mitgliedern der *SHINE*-Familie deckten weitere Mechanismen zur Bildung der Kutikula auf (Shi et al. 2011). So beinhaltet die Regulation dieser Transkriptionsfaktoren neben Genen der Kutin- und Wachsbiosynthese auch Pektin-modifizierende Gene aus der Zellwand-Synthese (Shi et al. 2011). Diese Erkenntnisse können, zusammen mit den hochaufgelösten Transkriptomdaten aus der sich entwickelnden Süßkirschenfrucht (Alkio et al. 2014), für Koexpressionsstudien genutzt werden, die einen tieferen Einblick in die Regulation der Kutin- und Wachsbiosynthese zulassen.

Neuste Forschungen identifizierten die epi- und hypodermalen Zellen in der Fruchthaut der Süßkirschen als stabilisierendes Rückgrat und damit als wichtige Einflussfaktoren für das Platzen der Früchte (Grimm et al. 2012; Brüggewirth et al. 2014). So zeigen Analysen an Exokarp-Segmenten, dass dieses Gewebe viskoelastische Eigenschaften besitzt, darin plastische und elastische Dehnungen herrschen und die elastische Dehnung in Phase III der Fruchtentwicklung zunimmt (Grimm et al. 2012). Die Dehnung der Fruchthaut ist nicht von den in der CM herrschenden Dehnungen beeinflusst. Demzufolge scheinen die epidermalen und hypodermalen Zellen und nicht die CM strukturgebende und stabilisierende Eigenschaften innezuhaben. Ergebnisse aus biaxialen Zugtests an Exokarp-Segmenten unterstützen diese These und sprechen den Zellwänden der Epidermis und Hypodermis eine grundlegende Rolle in der mechanischen Stabilität der Fruchthaut bei Süßkirschen zu (Brüggewirth et al. 2014). Vergleichbare Ergebnisse wurden auch bei Untersuchungen am Apfel erlangt (Khanal und Knoche 2014). Weiterführende Untersuchungen am Exokarp von Süßkirschenfrüchten können die strukturgebende Rolle der Epidermis- und Hypodermiszellen möglicherweise präzisieren und damit den Fokus molekulargenetischer Analysen auf interzelluläre Prozesse der Zellwandbildung im Exokarp während der späten Fruchtentwicklung richten. Auch hier liefert die Transkriptom-Studie von Alkio et al. (2014) eine Grundlage, da mögliche Gene des Zellwand-Metabolismus und ihre exokarpspezifische Expression im Verlauf der Fruchtentwicklung bereits beschrieben wurden.

Abschließend kann gesagt werden, dass diese Arbeit das Zusammenspiel von molekularen, chemischen und physiologischen Mechanismen der Kutikula aufzeigt und der Fokus auf zwei Gene der Süßkirsche einen punktuellen Einblick in das vielschichtige Gesamtbild ihrer Biosynthese und Funktion liefert.

5. Ausblick

Die Barriere-Funktion der Kutikula wird von einer komplexen Genregulation, ihrer Zusammensetzung und ihrem strukturellen Aufbau beeinflusst. Ob in diesem vielschichtigen System auf molekulargenetischem Weg eine Lösung für die späte Stagnation der CM-Deposition gefunden werden kann, ist in weiterführenden Versuchen zu klären. Diese Arbeit liefert die erste funktionelle Beschreibung von *PaLACS2* und *PaATT1*, zwei Genen aus der Kutinsynthese, in *Arabidopsis*. Die direkte Bestätigung ihrer Funktion als Acyl-CoA-Synthetase aus der LACS-Familie beziehungsweise Monooxygenase aus der Cytochrom P450-Familie sowie ihr Einfluss auf die CM und damit das Platzverhalten der Früchte, liefert nur eine Untersuchung in der Süßkirsche direkt. Auf Grund der langen juvenilen Phase, Selbstinkompatibilität und ineffizienten Transformationsraten gestaltet sich diese Arbeit jedoch als schwierig und langwierig (Winter 2002; Folta und Gardiner 2009). Einen nächsten Schritt ermöglicht die Tomate, die sich in den letzten Jahren erfolgreich als Modellpflanzen für Untersuchungen an Früchten etabliert hat (Dan et al. 2006; Barone et al. 2008; Campos 2010; Saito et al. 2011). Der Aufbau und die Zusammensetzung der Kutikula in Tomatenfrüchten ähneln denen der Süßkirschenfrucht (Leide et al. 2007; Peschel et al. 2007). So werden die mengenmäßigen Hauptbestandteile der Kutinfraktion in beiden Spezies aus den mittelständig oxygenierten Hydroxyfettsäuren gebildet. Die Wachsfraction wird mengenmäßig von den Triterpenen dominiert (Leide et al. 2007; Peschel et al. 2007; Kosma et al. 2010). Zusätzlich sind für die Tomate bereits frucht- und epidermisspezifische Promotoren identifiziert worden (Bruno und Wetzler 2004; Fernandez et al. 2009), die eine zielgerichtete Expression ermöglichen. Damit kann eine Expression von *PaLACS2* und *PaATT1* in der Tomate die funktionelle Charakterisierung der Gene weiterführen und neue fruchtspezifischere Erkenntnisse über den Zusammenhang von Aufbau, Zusammensetzung und Funktion der Kutikula liefern.

Neben Untersuchungen im Bereich der funktionellen Genomik kann das Platzen der Kirschen auch aus Sicht der komparativen Genomik betrachtet werden. Als Beispiel kann hier ein Transkriptomvergleich von Kirschsornten mit unterschiedlicher Sensibilität gegenüber wasserinduziertem Platzen genannt werden. Da die Platzanfälligkeit an den Genotyp gekoppelt ist (Greco et al. 2008; Balbontín et al. 2013), können genetische Unterschiede zwischen einer platzfreudigen (z.B. ‘Bing‘) und einer platzresistenten Kirschsorte (z.B. ‘Regina‘) Hinweise zu involvierten Genen oder regulatorischen Prozessen liefern und Korrelationen zu morphologischen oder physiologischen Eigenschaften der Kutikula aufdecken.

Das Platzen der Kirschen beinhaltet auch physikalische Prozesse, die weiterhin Bestandteil der Forschung sind (Grimm et al. 2012; Grimm et al. 2013; Brüggewirth et al. 2014). Parallel geführte molekulargenetischen Ansätze können Erkenntnisse über interzelluläre Mechanismen und entsprechende Genregulation gewinnen und an einem Punkt zusammen mit den mechanischen und chemischen Erkenntnissen ein Gesamtbild zeichnen.

Literaturverzeichnis

- Aharoni A, Dixit S, Jetter R, Thoenes E, van Arkel G, Pereira A (2004) The SHINE clade of AP2 domain transcription factors activates wax biosynthesis, alters cuticle properties, and confers drought tolerance when overexpressed in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 16:2463–2480. doi:10.1105/tpc.104.022897.1
- Albert Z, Ivanics B, Molnár A, Miskó A, Tóth M, Papp I (2013) Candidate genes of cuticle formation show characteristic expression in the fruit skin of apple. *Plant Growth Regul* 70:71–78. doi:10.1007/s10725-012-9779-y
- Alkio M, Jonas U, Sprink T, van Nocker S, Knoche M (2012) Identification of putative candidate genes involved in cuticle formation in *Prunus avium* (sweet cherry) fruit. *Ann Bot* 110:101–112. doi:10.1093/aob/mcs087
- Alkio M, Jonas U, Declercq M, van Nocker S, Knoche M (2014) Transcriptional dynamics of the developing sweet cherry (*Prunus avium* L.) fruit: sequencing, annotation and expression profiling of exocarp-associated genes. *Horticulture Research* 1, 11. doi:10.1038/hortres.2014.11
- Alonso JM, Stepanova AN, Leisse TJ, Kim CJ, Chen H, Shinn P, Stevenson DK, Zimmerman J, Barajas P, Cheuk R et al (2003) Genome-wide insertional mutagenesis of *Arabidopsis thaliana*. *Science* 301:653–657. doi:10.1126/science.1086391
- Altschul SF, Madden TL, Schäffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* 25:3389–3402
- Babbitt PC, Kenyon GL, Martin BM, Charest H, Slyvestre M, Scholten JD, Chang K-H, Liang P-H, Dunaway-Mariano D (1992) Ancestry of the 4-chlorobenzoate dehalogenase: analysis of amino acid sequence identities among families of acyl:adenyl ligases, enoyl-CoA hydratases/isomerases, and acyl-CoA thioesterases. *Biochemistry* 31:5594–5604
- Bak S, Beisson F, Bishop G, Hamberger B, Höfer R, Paquette S, Werck-Reichhart D (2011) Cytochromes P450. *The Arabidopsis Book* 9:e0144. doi:10.1199/tab.0144
- Balbontín C, Ayala H, Bastías RM, Tapia G, Ellena M, Torres C, Yuri JA, Quero-García J, Ríos JC, Silva H (2013) Cracking in sweet cherries : A comprehensive review from a physiological, molecular, and genomic perspective. *Chil. J. Agric. Res.* 73:66-72. doi:10.4067/S0718-58392013000100010

- Barone A, Chiusano ML, Ercolano MR, Giuliano G, Grandillo S, Frusciante L (2008) Structural and functional genomics of tomato. *Int J Plant Genomics* 2008:820274. doi:10.1155/2008/820274
- Becker T, Knoche M (2012a) Deposition, strain, and microcracking of the cuticle in developing 'Riesling' grape berries. *Vitis* 51:1–6
- Becker T, Knoche M (2012b) Water induces microcracks in the grape berry cuticle. *Vitis* 51:141–142
- Belding RD, Blankenship SM, Young E, Leidy RB (1998) Composition and variability of epicuticular waxes in apple cultivars. *J Am Soc Hortic Sci* 123:348–356
- Benveniste I, Tijet N, Adas F, Philipps G, Salaün J-P, Durst F (1998) CYP86A1 from *Arabidopsis thaliana* encodes a cytochrome P450-dependent fatty acid omega-hydroxylase. *Biochem Biophys Res Commun* 243:688–693. doi:10.1006/bbrc.1998.8156
- Bessire M, Chassot C, Jacquat A-C, Humphry M, Borel S, Petétot J, Métraux J-P, Nawrath C (2007) A permeable cuticle in *Arabidopsis* leads to a strong resistance to *Botrytis cinerea*. *EMBO J* 26:2158–2168. doi:10.1038/sj.emboj.7601658
- Black PN, Zhang Q, Weimar JD, DiRusso CC (1997) Mutational Analysis of a Fatty Acyl-Coenzyme A Synthetase Signature Motif Identifies Seven Amino Acid Residues That Modulate Fatty Acid Substrate Specificity. *J Biol Chem* 272:4896–4903. doi:10.1074/jbc.272.8.4896
- Bloom F, Kuo J, Lin J, Ma J (1997) Method for increasing viability and transformation efficiency of bacteria during storage at low temperatures. WIPO Pat. No. 1997036613
- Borisjuk N, Hrmova M, Lopato S (2014) Transcriptional regulation of cuticle biosynthesis. *Biotechnol Adv.* 32:536–540. doi:10.1016/j.biotechadv.2014.01.005
- Børve J, Sekse L, Stensvand A (2000) Cuticular fractures promote postharvest fruit rot in sweet cherries. *Plant Dis* 84:1180–1184. doi:10.1094/PDIS.2000.84.11.1180
- Brüggenwirth M, Fricke H, Knoche M (2014) Biaxial tensile tests identify epidermis and hypodermis as the main structural elements of sweet cherry skin. *AoB Plants* 6:plu019. doi:10.1093/aobpla/plu019
- Bruno AK, Wetzel CM (2004) The early light-inducible protein (*ELIP*) gene is expressed during the chloroplast-to-chromoplast transition in ripening tomato fruit. *J Exp Bot* 55:2541–2548. doi: 10.1093/jxb/erh273

- Burghardt M, Riederer M (2006) Cuticular transpiration. In: Riederer M, Müller C (eds) *Biology of the Plant Cuticle*. Blackwell Publishing, Oxford, pp 292–311
- Butaye KM, Cammue BP, Delauré SL, De Bolle MF (2005) Approaches to minimize variation of transgene expression in plants. *Mol Breed* 16:79–91.
doi:10.1007/s11032-005-4929-9
- Campos ML, Carvalho RF, Benedito VA, Pereira Peres LE (2010) Small and remarkable: the Micro-Tom model system as a tool to discover novel hormonal functions and interactions. *Plant Signal Behav* 5:267–270.
doi:10.1093/jxb/erp270.ormones
- Carrasco B, Meisel L, Gebauer M, Garcia-Gonzales R, Silva H (2013) Breeding in peach, cherry and plum: from a tissue culture, genetic, transcriptomic and genomic perspective. *Biol Res* 46:219–230. doi:10.4067/S0716-97602013000300001
- Chapple C (1998) Molecular-genetic analysis of plant cytochrome P450-dependent monooxygenases. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 49:311–343.
doi:10.1146/annurev.arplant.49.1.311
- Clough SJ, Bent AF (1998) Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* 16:735–743
- Coe NR, Smith AJ, Frohnert BI, Watkins PA, Bernlohr DA (1999) The fatty acid transport protein (FATP1) is a very long chain acyl-CoA synthetase. *J Biol Chem* 274:36300–36304. doi:10.1074/jbc.274.51.36300
- Czechowski T, Stitt M, Altmann T, Udvardi MK, Scheible W-R (2005) Genome-wide identification and testing of superior reference genes for transcript normalization in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 139:5–17. doi:10.1104/pp.105.063743.1
- Dan Y, Yan H, Munyikwa T, Dong J, Zhang Y, Armstrong CL (2006) MicroTom – a high-throughput model transformation system for functional genomics. *Plant Cell Rep* 25:432–441. doi:10.1007/s00299-005-0084-3
- De Buck S, De Paepe A, Depicker A (2013) Transgene Expression in Plants, Control of. In: Christou P, Savin R, Costa-Pierce BA, Misztal I, Whitelaw B (eds) *Sustain. Food Prod.* Springer Science + Business Media, New York, pp 1570–1827.
doi:10.1007/978-1-4614-5797-8
- Domínguez E, Heredia-Guerrero JA, Heredia A (2011) The biophysical design of plant cuticles: an overview. *New Phytol* 189:938–949. doi:10.1111/j.1469-8137.2010.03553.x
- Doyle JJ, Doyle JL (1990) Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus* 12:13–15

- Duan H, Schuler MA (2005) Differential expression and evolution of the Arabidopsis CYP86A subfamily. *Plant Physiol* 137:1067–1081.
doi:10.1104/pp.104.055715.lian
- Dubos C, Stracke R, Grotewold E, Weisshaar B, Martin C, Lepiniec L (2010) MYB transcription factors in *Arabidopsis*. *Trends Plant Sci* 15:573–581.
doi:10.1016/j.tplants.2010.06.005
- Durst F, Nelson DR (1995) Diversity and evolution of plant P450 and P450-reductases. *Drug Metabol Drug Interact* 12:189–206
- Edwards D, Abbott GD, Raven JA (1996) Cuticles of early land plants: a palaeoecophysiological evaluation. In: Kerstiens G (ed) *Plant cuticles: an integrated functional approach*. BIOS Scientific Publishers Ltd., Oxford, pp 1–31
- Esau K (1977) *Anatomy of Seed Plants*, 2nd edn. John Wiley & Sons, New York
- Fernandez AI, Viron N, Alhagdow M, Karimi M, Jones M, Amsellem Z, Sicard A, Czerednik A, Angenent G, Grierson D et al (2009) Flexible tools for gene expression and silencing in tomato. *Plant Physiol* 151:1729–1740.
doi:10.1104/pp.109.147546
- Folta KM, Gardiner SE (2009) *Genetics and Genomics of Rosaceae*. Springer Science + Business Media, New York. doi:10.1007/978-0-387-77491-6
- Franke R, Briesen I, Wojciechowski T, Faust A, Yephremov A, Nawrath C, Schreiber L (2005) Apoplastic polyesters in *Arabidopsis* surface tissues - a typical suberin and a particular cutin. *Phytochemistry* 66:2643–2658.
doi:10.1016/j.phytochem.2005.09.027
- Fulda M, Heinz E, Wolter FP (1997) *Brassica napus* cDNAs encoding fatty acyl-CoA synthetase. *Plant Mol Biol* 33:911–922
- Geyer U, Schönherr J (1990) The effect of the environment on the permeability and composition of *Citrus* leaf cuticles. *Planta* 180:147–153. doi:10.1007/BF00193989
- Goodstein DM, Shu S, Howson R, Neupane R, Hayes RD, Fazo J, Mitros T, Dirks W, Hellsten U, Putnam N et al (2012) Phytozome: a comparative platform for green plant genomics. *Nucleic Acids Res* 40:D1178–D1186. doi:10.1093/nar/gkr944
- Goodwin SM, Rashotte AM, Rahman M, Feldmann KA, Jenks MA (2005) Wax constituents on the inflorescence stems of double *eceriferum* mutants in *Arabidopsis* reveal complex gene interactions. *Phytochemistry* 66:771–780.
doi:10.1016/j.phytochem.2005.02.001

- Greco P, Palasciano M, Mariani R, Pacifico A, Godini A (2008) Susceptibility to cracking of thirty sweet cherry cultivars. *Acta Hort* 795:379–382
- Grimm E, Peschel S, Becker T, Knoche M (2012) Stress and Strain in the Sweet Cherry Skin. *J Am Soc Hortic Sci* 137:383–390
- Grimm E, Peschel S, Knoche M (2013) Mottling on Sweet Cherry Fruit is caused by Exocarp Strain. *J Am Soc Hortic Sci* 138:18-23
- Gulick AM (2009) Conformational dynamics in the Acyl-CoA synthetases, adenylation domains of non-ribosomal peptide synthetases, and firefly luciferase. *ACS Chem Biol* 4:811–827. doi:10.1021/cb900156h
- Hanahan D, Jessee J, Bloom FR (1991) Plasmid transformation of *Escherichia coli* and other bacteria. *Methods Enzymol* 204:63–113
- Hannemann F, Bichet A, Ewen KM, Bernhardt R (2007) Cytochrome P450 systems--biological variations of electron transport chains. *Biochim Biophys Acta* 1770:330–344. doi: 10.1016/j.bbagen.2006.07.017
- Hasemann CA, Kurumbail RG, Boddupalli SS, Peterson JA, Deisenhofer J (1995) Structure and function of cytochromes P450: a comparative analysis of three crystal structures. *Structure* 2:41–62
- Hellemans J, Mortier G, De Paepe A, Speleman F, Vandesompele J (2007) qBase relative quantification framework and software for management and automated analysis of real-time quantitative PCR data. *Genome Biol* 8:R19. doi:10.1186/gb-2007-8-2-r19
- Heredia A (2003) Biophysical and biochemical characteristics of cutin, a plant barrier biopolymer. *Biochim Biophys Acta* 1620:1–7. doi:10.1016/S0304-4165(02)00510-X
- Höfer R, Briesen I, Beck M, Pinot F, Schreiber L, Franke R (2008) The *Arabidopsis* cytochrome P450 *CYP86A1* encodes a fatty acid omega-hydroxylase involved in suberin monomer biosynthesis. *J Exp Bot* 59:2347–2360. doi:10.1093/jxb/ern101
- Hofgen R, Willmitzer L (1988) Storage of competent cells for *Agrobacterium* transformation. *Nucleic Acids Res* 16:9877
- Holloway P (1982) The chemical constitution of plant cutins. In: Cutler DF, Alvin KL, Price C (eds) *The plant cuticle*. Academic Press, London, pp 45–85
- Isaacson T, Kosma DK, Matas AJ, Buda GJ, He Y, Yu B, Pravitasari A, Batteas JD, Stark RE, Jenks MA et al (2009) Cutin deficiency in the tomato fruit cuticle

- consistently affects resistance to microbial infection and biomechanical properties, but not transpirational water loss. *Plant J* 60:363–377. doi:10.1111/j.1365-313X.2009.03969.x
- Jeffree CE (2006) The fine structure of the plant cuticle. In: Riederer M, Müller C (eds) *Biology of the Plant Cuticle*. Blackwell Publishing, Oxford, pp 11–125
- Jenks MA, Eigenbrode SD, Lemieux B (2002) Cuticular waxes of *Arabidopsis*. The *Arabidopsis Book* 1:e0016. doi:10.1199/tab.0016
- Jensen K, Møller BL (2010) Plant NADPH-cytochrome P450 oxidoreductases. *Phytochemistry* 71:132–141. doi:10.1016/j.phytochem.2009.10.017
- Joubès J, Raffaele S, Bourdenx B, Garcia C, Laroche-Traineau J, Moreau P, Domergue F, Lessire R (2008) The VLCFA elongase gene family in *Arabidopsis thaliana*: phylogenetic analysis, 3D modelling and expression profiling. *Plant Mol Biol* 67:547–566. doi:10.1007/s11103-008-9339-z
- Jung S, Cestaro A, Troglio M, Main D, Zheng P, Cho I, Folta KM, Sosinski B, Abbott A, Celton J-M et al (2012) Whole genome comparisons of *Fragaria*, *Prunus* and *Malus* reveal different modes of evolution between Rosaceous subfamilies. *BMC Genomics* 13:129. doi: 10.1186/1471-2164-13-129
- Käll L, Krogh A, Sonnhammer EL (2004) A combined transmembrane topology and signal peptide prediction method. *J Mol Biol* 338:1027–1036. doi:10.1016/j.jmb.2004.03.016
- Kandel S, Sauveplane V, Olry A, Diss L, Beneviste I, Pinot F (2006) Cytochrome P450-dependent fatty acid hydroxylases in plants. *Phytochem Rev* 5:359–372. doi:10.1007/s11101-006-9041-1
- Kannangara R, Branigan C, Liu Y, Penfield T, Rao V, Mouille G, Höfte H, Pauly M, Riechmann JL, Broun P (2007) The transcription factor WIN1/SHN1 regulates Cutin biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell* 19:1278–1294. doi:10.1105/tpc.106.047076
- Kerstiens G, Schreiber L, Lenzian KJ (2006) Quantification of cuticular permeability in genetically modified plants. *J Exp Bot* 57:2547–2552. doi:10.1093/jxb/erl015
- Khanal BP, Grimm E, Finger S, Blume A, Knoche M (2013) Intracuticular wax fixes and restricts strain in leaf and fruit cuticles. *New Phytol* 200:134–143. doi:10.1111/nph.12355
- Khanal BP, Knoche M (2014) Mechanical properties of apple skin are determined by epidermis and hypodermis. *J Am Soc Hortic Sci* 139:139–147

- Klagges C, Campoy JA, Quero-García J, Guzmán A, Mansur L, Gratacós E, Silva H, Rosyara UR, Iezzoni A, Meissel LE et al (2013) Construction and comparative analyses of highly dense linkage maps of two sweet cherry intra-specific progenies of commercial cultivars. *PLoS One* 8:e54743. doi:10.1371/journal.pone.0054743
- Knoche M, Peschel S, Hinz M, Bukovac MJ (2001) Studies on water transport through the sweet cherry fruit surface: II. Conductance of the cuticle in relation to fruit development. *Planta* 213:927–936. doi:10.1007/s004250100568
- Knoche M, Beyer M, Peschel S, Oparlakov B, Bukovac MJ (2004) Changes in strain and deposition of cuticle in developing sweet cherry fruit. *Physiol Plant* 120:667–677. doi:10.1111/j.0031-9317.2004.0285.x
- Knoche M, Peschel S (2006) Water on the surface aggravates microscopic cracking of the sweet cherry fruit cuticle. *J Am Soc Hortic Sci* 131:192–200
- Knoche M, Peschel S (2007) Gibberellins increase cuticle deposition in developing tomato fruit. *Plant Growth Regul* 51:1–10. doi:10.1007/s10725-006-9107-5
- Knoche M, Khanal B, Stopar M (2011) Russetting and microcracking of “Golden Delicious” apple fruit concomitantly decline due to gibberellin A₄₊₇ application. *J Am Soc Hortic Sci* 136:159–164
- Kolattukudy PE (2001) Polyesters in higher plants. *Adv Biochem Eng Biotechnol* 71:1–49
- Kosma DK, Parsons EP, Isaacson T, Lü S, Rose JK, Jenks MA (2010) Fruit cuticle lipid composition during development in tomato ripening mutants. *Physiol Plant* 139:107–117. doi:10.1111/j.1399-3054.2009.01342.x
- Kurdyukov S, Faust A, Nawrath C, Bär S, Voisin D, Efremova N, Franke R, Schreiber L, Saedler H, Métraux J-P et al (2006) The epidermis-specific extracellular BODYGUARD controls cuticle development and morphogenesis in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 18:321–339. doi:10.1105/tpc.105.036079.1
- Larkin MA, Blackshields G, Brown NP, Chenna R, McGettigan PA, McWilliam H, Valentin F, Wallace IM, Wilm A, Lopez R et al (2007) Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics* 23:2947–2948. doi:10.1093/bioinformatics/btm404
- Leide J, Hildebrandt U, Reussing K, Riederer M, Vogg G (2007) The developmental pattern of tomato fruit wax accumulation and its impact on cuticular transpiration barrier properties: effects of a deficiency in a β -ketoacyl-coenzyme A synthase (LeCER6). *Plant Physiol* 144:1667–1679. doi:10.1104/pp.107.099481

- Li H, Pinot F, Sauveplane V, Werck-Reichhart D, Diehl P, Schreiber L, Franke R, Zhang P, Chen L, Gao Y et al (2010) Cytochrome P450 family member CYP704B2 catalyzes the ω -hydroxylation of fatty acids and is required for anther cutin biosynthesis and pollen exine formation in rice. *Plant Cell* 22:173–190. doi:10.1105/tpc.109.070326
- Li Y, Beisson F, Koo AJ, Molina I, Pollard M, Ohlrogge J (2007) Identification of acyltransferases required for cutin biosynthesis and production of cutin with suberin-like monomers. *Proc Natl Acad Sci USA* 104:18339–18344. doi:10.1073/pnas.0706984104
- Li-Beisson Y, Pollard M, Sauveplane V, Pinot F, Ohlrogge J, Beisson F (2009) Nanoridges that characterize the surface morphology of flowers require the synthesis of cutin polyester. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106:22008–22013. doi:10.1073/pnas.0909090106
- Li-Beisson Y, Shorrosh B, Beisson F, Andersson MX, Arondel V, Bates PD, Baud S, Bird D, DeBono A, Durrett TP et al (2013) Acyl-Lipid Metabolism. *The Arabidopsis Book* 11:e0161. doi:10.1199/tab.0161
- Lilleland O, Newsome L (1934) A growth study of the cherry fruit. *Proc Am Soc Hortic Sci* 32:291–299
- Lü S, Song T, Kosma DK, Parsons EP, Rowland O, Jenks MA (2009) *Arabidopsis CER8* encodes long-chain acyl-CoA synthetase 1 (LACS1) that has overlapping functions with LACS2 in plant wax and cutin synthesis. *Plant J* 59:553–564. doi:10.1111/j.1365-313X.2009.03892.x
- MacGregor DR, Deak KI, Ingram PA, Malamy JE (2008) Root system architecture in *Arabidopsis* grown in culture is regulated by sucrose uptake in the aerial tissues. *Plant Cell* 20:2643–2660. doi:10.1105/tpc.107.055475
- Magrane M, UniProt Consortium (2011) UniProt Knowledgebase: a hub of integrated protein data. *Database* 2011:bar009. doi:10.1093/database/bar009
- Matas AJ, Yeats TH, Buda GJ, Zheng Y, Chatterjee S, Tohge T, Ponnala L, Adat A, Aharoni A, Stark R et al (2011) Tissue- and cell-type specific transcriptome profiling of expanding tomato fruit provides insights into metabolic and regulatory specialization and cuticle formation. *Plant Cell* 23:3893–3910. doi:10.1105/tpc.111.091173
- Molina I, Ohlrogge JB, Pollard M (2008) Deposition and localization of lipid polyester in developing seeds of *Brassica napus* and *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* 53:437–449. doi:10.1111/j.1365-313X.2007.03348.x

- Nakagawa T, Kurose T, Hino T, Tanaka K, Kawamukai M, Niwa Y, Toyooka K, Matsuoka K, Jinbo T, Kimura T (2007) Development of series of gateway binary vectors, pGWBs, for realizing efficient construction of fusion genes for plant transformation. *J Biosci Bioeng* 104:34–41. doi:10.1263/jbb.104.34
- Nakano T, Suzuki K, Fujimura T, Shinshi H (2006) Genome-wide analysis of the ERF gene family in *Arabidopsis* and rice. *Plant Physiol* 140:411–432. doi:10.1104/pp.105.073783
- Omura T (2010) Structural diversity of cytochrome P450 enzyme system. *J Biochem* 147:297–306. doi:10.1093/jb/mvq001
- Peschel S, Knoche M (2005) Characterization of microcracks in the cuticle of developing sweet cherry fruit. *J Am Soc Hortic Sci* 130:487–495
- Peschel S, Franke R, Schreiber L, Knoche M (2007) Composition of the cuticle of developing sweet cherry fruit. *Phytochemistry* 68:1017–1025. doi:10.1016/j.phytochem.2007.01.008
- Petersen TN, Brunak S, von Heijne G, Nielsen H (2011) SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions. *Nat Methods* 8:785–786. doi:10.1038/nmeth.1701
- Pollard M, Beisson F, Li Y, Ohlrogge JB (2008) Building lipid barriers: biosynthesis of cutin and suberin. *Trends Plant Sci* 13:236–246. doi:10.1016/j.tplants.2008.03.003
- Pulsifer IP, Kluge S, Rowland O (2012) *Arabidopsis* long-chain acyl-CoA synthetase 1 (LACS1), LACS2, and LACS3 facilitate fatty acid uptake in yeast. *Plant Physiol Biochem* 51:31–39. doi:10.1016/j.plaphy.2011.10.003
- Quevillon E, Silventoinen V, Pillai S, Harte N, Mulder N, Apweiler R, Lopez R (2005) InterProScan: protein domains identifier. *Nucleic Acids Res* 33:W116–W120. doi:10.1093/nar/gki442
- Raven JA (1984) Physiological correlates of the morphology of early vascular plants. *Bot J Linn Soc* 88:105–126
- Reynhardt EC, Riederer M (1994) Structures and molecular dynamics of plant waxes. *Eur Biophys J* 23:59–70
- Riederer M (1991) Die Kutikula als Barriere zwischen terrestrischen Pflanzen und der Atmosphäre. *Naturwissenschaften* 208:201–208
- Riederer M (2006) Introduction: biology of the plant cuticle. In: Riederer M, Müller C (eds) *Biology of the Plant Cuticle*. Blackwell Publishing, Oxford, pp 1–10

- Riederer M, Schneider G (1990) The effect of the environment on the permeability and composition of *Citrus* leaf cuticles. *Planta* 180:154–165
- Riederer M, Schreiber L (2001) Protecting against water loss: analysis of the barrier properties of plant cuticles. *J Exp Bot* 52:2023–2032.
doi:10.1093/jexbot/52.363.2023
- Rowland O, Lee R, Franke R, Schreiber L, Kunst L (2007) The *CER3* wax biosynthetic gene from *Arabidopsis thaliana* is allelic to *WAX2/YRE/FLP1*. *FEBS Lett* 581:3538–3544. doi:10.1016/j.febslet.2007.06.065
- Rowland O, Zheng H, Hepworth SR, Lam P, Jetter R, Kunst L (2006) *CER4* encodes an alcohol-forming fatty acyl-coenzyme A reductase involved in cuticular wax production in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 142:866–877. doi:10.1104/pp.106.086785
- Rupasinghe SG, Duan H, Schuler MA (2007) Molecular definitions of fatty acid hydroxylases in *Arabidopsis thaliana*. *Proteins* 68:279–293. doi:10.1002/prot
- Saito T, Ariizumi T, Okabe Y, Asamizu E, Hiwasa-Tanase K, Fukuda N, Mizoguchi T, Yamazaki Y, Aoki K, Ezura H (2011) TOMATOMA: a novel tomato mutant database distributing Micro-Tom mutant collections. *Plant Cell Physiol* 52:283–296. doi:10.1093/pcp/pcr004
- Samuels L, Kunst L, Jetter R (2008) Sealing plant surfaces: cuticular wax formation by epidermal cells. *Annu Rev Plant Biol* 59:683–707.
doi:10.1146/annurev.arplant.59.103006.093219
- Sauveplane V, Kandel S, Kastner P-E, Ehlting J, Compagnon V, Werck-Reichhart D, Pinot F (2009) *Arabidopsis thaliana* CYP77A4 is the first cytochrome P450 able to catalyze the epoxidation of free fatty acids in plants. *FEBS J* 276:719–735.
doi:10.1111/j.1742-4658.2008.06819.x
- Schnurr J, Shockey J, Browse J (2004) The acyl-CoA synthetase encoded by *LACS2* is essential for normal cuticle development in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 16:629–642.
doi:10.1105/tpc.017608.2
- Schreiber L (2010) Transport barriers made of cutin, suberin and associated waxes. *Trends Plant Sci* 15:546–553. doi:10.1016/j.tplants.2010.06.004
- Schröder J (1989) Protein sequence homology between plant 4-coumarate:CoA ligase and firefly luciferase. *Nucleic Acids Res* 17:460
- Sekse L (2008) Fruit Cracking in Sweet Cherries – Some Recent Advances. *Acta Hort* 795:615–624

- Seo M-S, Takahashi S, Kadowaki K, Kawamukai M, Takahara M, Takamizo T (2011) Expression of CoQ10-producing *ddsA* transgene by efficient *Agrobacterium*-mediated transformation in *Panicum meyerianum*. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 107:325–332. doi:10.1007/s11240-011-9984-9
- Serra O, Chatterjee S, Huang W, Stark RE (2012) Mini-review: What nuclear magnetic resonance can tell us about protective tissues. *Plant Sci* 195:120–124. doi:10.1016/j.plantsci.2012.06.013
- Shi JX, Malitsky S, De Oliveira S, Branigan C, Franke R, Schreiber L, Aharoni A (2011) SHINE transcription factors act redundantly to pattern the archetypal surface of Arabidopsis flower organs. *PLoS Genet* 7:e1001388. doi:10.1371/journal.pgen.1001388
- Shockey JM, Fulda MS, Browse JA (2002) Arabidopsis contains nine long-chain acyl-coenzyme A synthetase genes that participate in fatty acid and glycerolipid metabolism. *Plant Physiol* 129:1710–1722. doi:10.1104/pp.003269.anticipatory
- Simon G (2006) Review on rain induced fruit cracking of sweet cherries (*Prunus avium* L.), its causes and the possibilities of prevention. *Int J Horticult Sci* 12:27–35
- Taiz L, Zeiger E (2002) *Plant Physiology*, 3rd ed. Sinauer Associates Inc. Publishers, Massachusetts
- Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S (2011) MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol Biol Evol* 28:2731–2739. doi:10.1093/molbev/msr121
- Tan X, Zheng X, Zhang Z, Wang Z, Xia H, Lu C, Gu S (2014) Long chain acyl-Coenzyme A synthetase 4 (*BnLACS4*) gene from *Brassica napus* enhances the yeast lipid contents. *J Integr Agric* 13:54–62. doi:10.1016/S2095-3119(13)60583-3
- Tanaka T, Tanaka H, Machida C, Watanabe M, Machida Y (2004) A new method for rapid visualization of defects in leaf cuticle reveals five intrinsic patterns of surface defects in *Arabidopsis*. *Plant J* 37:139–146. doi:10.1046/j.1365-3113.2003.01946.x
- Tang D, Simonich MT, Innes RW (2007) Mutations in *LACS2*, a long-chain acyl-coenzyme A synthetase, enhance susceptibility to avirulent *Pseudomonas syringae* but confer resistance to *Botrytis cinerea* in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 144:1093–1103. doi:10.1104/pp.106.094318

- Tiwari S, Mishra DK, Chandrasekhar K, Singh PK, Tuli R (2011) Expression of δ -endotoxin Cry1EC from an inducible promoter confers insect protection in peanut (*Arachis hypogaea* L.) plants. *Pest Manag Sci* 67:137–145. doi:10.1002/ps.2041
- Toh H (1991) Sequence analysis of firefly luciferase family reveals a conservative sequence motif. *Protein Seq Data Anal* 4:111–117
- Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A, Speleman F (2002) Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol* 3:research0034.1–research0034.11. doi:10.1186/gb-2002-3-7-research0034
- Wang Z-Y, Xiong L, Li W, Zhu J-K, Zhu J (2011) The plant cuticle is required for osmotic stress regulation of abscisic acid biosynthesis and osmotic stress tolerance in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 23:1971–1984. doi:10.1105/tpc.110.081943
- Watkins PA, Lu J-F, Steinberg SJ, Gould SJ, Smith KD, Braiterman LT (1998) Disruption of the *Saccharomyces cerevisiae* *FAT1* gene decreases very long-chain fatty acyl-CoA synthetase activity and elevates intracellular very long-chain fatty acid concentrations. *J Biol Chem* 273:18210–18219. doi:10.1074/jbc.273.29.18210
- Weimar JD, DiRusso CC, Delio R, Black PN (2002) Functional role of fatty acyl-coenzyme A synthetase in the transmembrane movement and activation of exogenous long-chain fatty acids. *J Biol Chem* 277:29369–29376. doi:10.1074/jbc.M107022200
- Wellesen K, Durst F, Pinot F, Beneviste I, Nettesheim K, Wisman E, Steiner-Lange S, Saedler H, Yephremov A (2001) Functional analysis of the *LACERATA* gene of *Arabidopsis* provides evidence for different roles of fatty acid ω -hydroxylation in development. *Proc Natl Acad Sci USA* 98:9694–9699. doi:10.1073/pnas.171285998
- Weng H, Molina I, Shockey J, Browse J (2010) Organ fusion and defective cuticle function in a *lacs1lacs2* double mutant of *Arabidopsis*. *Planta* 231:1089–1100. doi:10.1007/s00425-010-1110-4
- Werck-Reichhart D, Feyereisen R (2000) Cytochromes P450: a success story. *Genome Biol* 1:reviews3003.1–reviews3003.9. doi:10.1186/gb-2000-1-6-reviews3003
- Werck-Reichhart D, Bak S, Paquette S (2002) Cytochromes P450. *The Arabidopsis Book* 1:e0028. doi:10.1199/tab.0028
- Winter F, Link H (2002) Lucas' Anleitung zum Obstbau, 32nd ed. Ulmer, Stuttgart

- Xia Y, Gao Q-M, Yu K, Lapchyk L, Navarre D, Hildebrand D, Kachroo A, Kachroo P (2009) An intact cuticle in distal tissues is essential for the induction of systemic acquired resistance in plants. *Cell Host Microbe* 5:151–165.
doi:10.1016/j.chom.2009.01.001
- Xiao F, Goodwin SM, Xiao Y, Sun Z, Baker D, Tang X, Jenks MA, Zhou J-M (2004) *Arabidopsis CYP86A2* represses *Pseudomonas syringae* type III genes and is required for cuticle development. *EMBO J* 23:2903–2913.
doi:10.1038/sj.emboj.7600290
- Yang W, Simpson JP, Li-Beisson Y, Beisson F, Pollard M, Ohlrogge JB (2012) A land-plant-specific glycerol-3-phosphate acyltransferase family in *Arabidopsis*: substrate specificity, *sn*-2 preference, and evolution. *Plant Physiol* 160:638–652.
doi:10.1104/pp.112.201996
- Yang J, Tian L, Sun M-X, Huang X-Y, Zhu J, Guan Y-F, Jia Q-S, Yang Z-N (2013) AUXIN RESPONSE FACTOR17 is essential for pollen wall pattern formation in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 162:720–731. doi:10.1104/pp.113.214940
- Yeats TH, Rose JK (2013) The Formation and Function of Plant Cuticles. *Plant Physiol* 163:5–20. doi:10.1104/pp.113.222737
- Yu L, Tan X, Yuan W, Zhu F (2010) *In silicon* cloning and analysis of a *LACS* gene from *Glycine Max* (L.). *Int J Biol* 2:111–116
- Zdobnov EM, Apweiler R (2001) InterProScan—an integration platform for the signature-recognition methods in InterPro. *Bioinformatics* 17:847–848.
doi:10.1093/bioinformatics/17.9.847

Danksagung

Die letzten dreieinhalb Jahre waren für mich eine sehr lehr- und ereignisreiche Zeit, in der ich wertvolle Erfahrungen sammeln konnte. Ich habe Kollegen, Mitarbeiter und Studenten kennengelernt und fand gute Freunde. An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken:

Herrn **Prof. Dr. Moritz Knoche** danke ich für die gute Betreuung meiner Dissertation, die strukturgebenden und konstruktiven Diskussionen und die Geduld sowie die Ausdauer mit mir dem Platzen der Kirsche auf molekulargenetischen Weg auf den Grund zu gehen.

Frau **Dr. Merianne Alkio** danke ich für das Vertrauen und die Freiheiten, die sie mir für meine Arbeiten gegeben hat, ihre Betreuung aus der Nähe wie aus der Ferne und die zahlreichen Gespräche zu fachlichen, beruflichen und privaten Themen. Kiitos!

Alle derzeitigen und ehemaligen **Kollegen im Obstbau** danke ich für ihre Hilfe und Unterstützung bei meiner Arbeit, die wertvollen Tipps und Tricks beim Umgang mit der Verwaltung, Computern, Mikroskopen oder Autoklaven und für den ein oder anderen spontanen Grillabend.

Herrn **Prof. Dr. Thomas Debener** danke ich für die Übernahme des Korreferats bei meiner Promotion und das offene Ohr bei spezifischen Fragen zur Genetik.

Herrn **Prof. Dr. Edgar Maiss** danke ich für das bedingungslose Einspringen als Projektleiter, die Übernahme der Stelle des dritten Prüfers und die allzeit offen stehende Tür. Der **AG Virologie** danke ich für spontane Hilfeleistungen, den wachsamen Blick auf die Labore und die Unterstützungen unterschiedlichster Art.

Dieser Dank gilt auch allen **Kollegen** in den anderen Abteilungen und Instituten auf dem Campus Herrenhausen.

Herrn **Prof. Dr. Lukas Schreiber** danke ich für die Möglichkeit meine Analysen in seiner Arbeitsgruppe durchzuführen und seine bedingungslose Unterstützung dafür.

Fritz Waßmann danke ich, stellvertretend für die Kollegen der AG Ökophysiologie des IZMB, für die herzliche Aufnahme, den Platz in seinem Büro und die Unterstützung bei den Laborarbeiten. Es hat mich gefreut mit Josef und Maria arbeiten zu dürfen.

Herr Geyer und **Jens-Peter Barth**, stellvertretend für die Mitarbeiter der Zentralen Versuchsanlage, danke ich für ihre Unterstützung bei der Anzucht und Pflege der Pflanzen, die Unmengen an vorbereiteten Töpfen und ihrem unermüdlichen Kampf gegen Thrips, Tospovirus und Trockenheit.

Ein ganz besonderer Dank gilt **meiner Familie**. Ich danke ihnen für ihren Glauben an mich und ihren Rückhalt in allen Lebenslagen. Durch sie wurde dieser Weg in jeglicher Hinsicht unbeschwerter. Ihre Faszination und ihr Staunen gaben meiner Arbeit Motivation. Merci beaucoup à vous tous.

Er war immer für mich da und fand stets aufmunternde Worte, selbst aus der Ferne. **Daniel**, ich danke dir von ganzem Herzen für deine Geduld und deine liebevolle Unterstützung.

Finanziert durch



und



Lebenslauf

Persönliche Daten

Myriam Géraldine Declercq

geboren am 27. Januar 1984 in Kehl

Studium und Schulausbildung

09/1994 – 07/2003 Allgemeines Abitur, Oken-Gymnasium, Offenburg

09/2005 – 02/2009 Studium zum B.Sc. Gartenbau-Management, Hochschule Rhein-
Main, Geisenheim

03/2009 – 07/2010 Studium zum M.Sc. Gartenbauwissenschaften, Hochschule Rhein-
Main, Geisenheim

11/2010 – heute Promotion an der Naturwissenschaftlichen Fakultät, Leibniz
Universität Hannover

Berufstätigkeit

09/2003 – 08/2005 Baumschule Hopp GmbH, Offenburg
Ausbildung zur Gärtnerin

03/2008 – 08/2008 Leibniz-Institut für Pflanzengenetik und Kulturpflanzenzüchtung,
Abteilung Genbank, Gatersleben
Praktikantin im Praxissemester

11/2010 – 10/2013 Leibniz Universität Hannover, Institut für Gartenbauliche
Produktionssysteme, Abteilung Obstbau, Hannover
Wissenschaftliche Mitarbeiterin

Stipendium

11/2013 – 04/2014 Promotionsabschlussstipendium der Graduiertenakademie der
Leibniz Universität Hannover

Publikationen und Poster

Lohwasser U, Declercq M, Börner A, Struckmeyer T, Budahn H, Krüger H, Ulrich D, Marthe F (2010) The German Parsley Germplasm Collection - Interaction of Morphological, Molecular and Phytochemical Characters. *Acta Horticulturae* 860: 235-240

Declercq M, Sprink T, Alkio M, Knoche M (2012) Functional analysis of genes involved in cutin synthesis in sweet cherry fruit using *Arabidopsis* as a model plant. Poster presented at Plant Biology Congress 2012. 2012 July 29 – August 3; Freiburg, Germany

Alkio M, Jonas U, Declercq M, Van Nocker S, Knoche M (2014) Transcriptional dynamics of the developing sweet cherry (*Prunus avium* L.) fruit: sequencing, annotation and expression profiling of exocarp-associated genes. *Horticulture Research* 1. doi:10.1038/hortres.2014.11

Declercq M, Alkio M, Sprink T, Schreiber L, Knoche M (2014) Effect of sweet cherry genes *PaLACS2* and *PaATT1* on cuticle deposition, composition, and permeability in *Arabidopsis*. *Tree Genomes & Genetics*. doi: 10.1007/s11295-014-0791-4