

Identifikation von Phytoplasma-Transkripten und - Proteinen via RNA-Sequenzierung und Massenspektrometrie

Masterarbeit

Im Master-Studiengang Biotechnologie /
Biotechnology
der Beuth Hochschule für Technik Berlin
- University of Applied Sciences –

zur Erlangung des akademischen Grades eines
Master of Science (M.Sc.)

vorgelegt von

Toni Luge

November 2011

Die vorliegende Arbeit wurde am Max Planck Institut für molekulare Genetik Berlin in der Arbeitsgruppe „Nutrigenomics and Gene Regulation“ angefertigt.

Gutachter: Prof. Dr.-Ing. Roza Maria Kamp, Dr. rer. nat. Sascha Sauer

1. Inhaltsverzeichnis

1 Inhaltsverzeichnis.....	1
2 Abkürzungsverzeichnis	4
3 Abbildungsverzeichnis	6
4 Tabellenverzeichnis.....	8
5 Einleitung	9
5.1 Die Gattung „ <i>Candidatus</i> Phytoplasma“ und die genetischen Eigenschaften von Phytoplasmen.....	9
5.2 Phytoplasmen und ihre Wirte.....	12
5.3 Apfeltriebsucht und „ <i>Candidatus</i> Phytoplasma mali“	15
5.4 Phytoplasmaeffektoren.....	16
5.5 Das Konzept des Phytoplasmametabolismus	18
5.6 Valisierung der Genomannotation.....	19
5.6.1 <i>RNA-Seq</i>	20
5.6.2 <i>Massenspektrometrie</i>	21
5.7 Pflanze/Phytoplasma-Interaktion	24
4.6.1 <i>Veränderungen auf Transkriptomebene</i>	24
4.6.2 <i>Veränderungen auf Proteomebene</i>	25
4.6.3 <i>Quantitative Massenspektrometrie</i>	25
5.8 Zielstellung.....	28
6 Material	30
6.1 Geräte und Materialien.....	30
6.2 Chemikalien und Zusammensetzungen verwendeter Lösungen	32
7 Methoden.....	35
7.1 Pflanzliches Untersuchungsmaterial	35
7.2 DNA-Analysen.....	36
7.2.1 <i>Extraktion von DNA</i>	36
7.2.2 <i>Nukleinsäure Konzentrationsbestimmung</i>	36
7.2.3 <i>P1/P7-PCR</i>	37
7.2.4 <i>TBE-Agarose-Gelelektrophorese</i>	38
7.3 RNA- Analysen	38
7.3.1 <i>Solution D-RNA-Extraktion</i>	38
7.3.2 <i>rDNase-Verdau</i>	39

7.3.3 Entfernung pflanzlicher ribosomaler RNAs	40
7.3.4 "On Chip"-Kapillarelektrophorese	41
7.3.5 RNA-Seq	41
7.4 Datenanalyse RNA-Seq.....	42
7.5 Proteinanalysen	43
7.5.1 Proteinisolation	45
7.5.2 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	47
7.5.3 Coomassie-Färbung der Gele	48
7.5.4 Spaltung der Proteine und Extraktion der Peptide	48
7.5.5 Dimethyl Labeling	49
7.5.6 BSA-Verdau und Labeling.....	50
7.5.7 Umkehrphasen-HPLC	51
7.5.8 Massenspektrometrie.....	52
7.6 Datenanalyse Massenspektrometrie	54
7.6.1 Datenbanken.....	54
7.6.2 MaxQuant-Software	55
7.6.3 Erzeugen von Ausschlusslisten.....	57
7.6.4 Analyse der Datensätze der qualitativen Proteomanalyse.....	57
7.6.5 Ermittlung der Labelingeffizienz.....	58
7.6.6 Bestimmung der Schwellenwerte für eine signifikante Proteinregulation	58
7.6.7 Analyse der Datensätze der quantitativen Proteomanalyse.....	59
8 Ergebnisse	61
8.1 Infektion von <i>Nicotiana occidentalis</i> -Pflanzen mit „ <i>Candidatus</i> Phytoplasma mali“ Stamm AT.....	61
8.2 Transkriptomanalyse	63
7.2.1 Probenvorbereitung	63
7.2.2 RNA-Seq	64
8.3 Qualitative Proteomanalyse.....	66
8.3.1 Diskontinuierliche gelelektrophoretische Auftrennung der Proben	66
8.3.2 Identifizierte Proteine	67
8.4 Vergleich zwischen Transkriptomanalyse und qualitativer Proteomanalyse.....	69
8.5 Quantitative Proteomanalyse.....	70
8.5.1 Diskontinuierliche gelelektrophoretische Auftrennung der Proben	71
8.5.2 Dynamischer Bereich des Dimethyl Labelings	72

8.5.3 Schwellenwerte für eine signifikante Proteinregulation	73
8.5.4 Identifizierte Proteine	74
8.5.5 Identifizierte differentiell exprimierte Proteine	76
9 Diskussion	79
9.1 Identifikation der Genprodukte von „ <i>Candidatus</i> Phytoplasma mali“ Stamm AT... ..	79
9.2 Antwort des pflanzlichen Wirtes auf eine Infektion	87
9.3 Schlussfolgerungen und Ausblick	93
10 Zusammenfassung	97
11 Summary	98
12 Literaturverzeichnis	99
13 Anhang	105

Tab.A1. Liste der durch RNA-Seq identifizierten Phytoplasmagene

Tab.A2. Liste der durch qualitative Proteomanalyse identifizierten Phytoplasmaproteine

Tab.A3. Liste der durch quantitative Proteomanalyse identifizierten *Nicotiana*-Proteine

Tab.A4. Liste der durch quantitative Proteomanalyse lediglich im Forward Labeling identifizierten
Nicotiana-Proteine

Tab.A5. Liste der durch quantitative Proteomanalyse lediglich im Reverse Labeling identifizierten
Nicotiana-Proteine

Tab.A6. Liste der durch quantitative Proteomanalyse identifizierten *Nicotiana*- Proteine deren
Expressionswerte in Forward und Reverse Labeling nicht konsistent waren

Tab.A7. Datensatz zur Bestimmung der Labelingeffizienz in den einzelnen Versuchen

Abb.A1. Labelingeffizienz des Dimethyl Labelings im Versuch zur Ermittlung des dynamischen
Bereiches des Labelings

Abb.A2. Labelingeffizienz des Dimethyl Labelings im Versuch zur Ermittlung der Schwellenwerte
für eine signifikante Proteinregulation

Abb.A3. Labelingeffizienz des Dimethyl Labelings im Versuch zur Ermittlung der in Folge einer
Phytoplasmainfektion differentiell exprimierten pflanzlichen Proteine – Forward Labeling

Abb.A4. Labelingeffizienz des Dimethyl Labelings im Versuch zur Ermittlung der in Folge einer
Phytoplasmainfektion differentiell exprimierten pflanzlichen Proteine – Reverse Labeling

Danksagung

Eidesstattliche Erklärung

2. Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
Tab.	Tabelle
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Masse pro Volumen
RT	Raumtemperatur (17°C)
PCR	Polymerasekettenreaktion
q-RT-PCR	quantitative realtime PCR
UV	ultraviolett
ORF	Open Reading Frame
NGS	Next Generation Sequencing
CCD	Charge-coupled Device
MS	Massenspektrum/spektrometer
MS/MS	Tandemmassenspektrum/spektrometer
LTQ	linear trap quadrupole
ESI	elektrosprayionisation
MALDI	matrixunterstützte Laserdesorptions-Ionisation
TOF	time of flight
LC	liquid chromatography
HPLC	high performance liquid chromatography
RP	reverse phase
CID	collision induced fragmentation
PEP	posterior error probability
FDR	false discovery rate
IPI	international protein index
SILAC	stable isotope labeling of amino acids in cell culture
ICAT	isotope-coded affinity tag
ph ⁺	„ <i>Candidatus</i> Phytoplasma mali“ Stamm AT-positiv
ph ⁻	„ <i>Candidatus</i> Phytoplasma mali“ Stamm AT-negativ
ph ⁺ - <i>N. Oc.</i> Nr. 1-3	„ <i>Candidatus</i> Phytoplasma mali“ Stamm AT-positive <i>Nicotiana occidentalis</i> -Pflanze Nr. 1-3
ph ⁻ - <i>N. Oc.</i> Nr. 1-3	„ <i>Candidatus</i> Phytoplasma mali“ Stamm AT-negative <i>Nicotiana occidentalis</i> -Pflanze Nr. 1-3
<i>Ca. P.</i>	<i>Candidatus</i> Phytoplasma
NLS	nuclear localisation signal
SAP11	secreted AY-WB protein 11
PAMP	pathogen-associated molecular pattern
ROS	reactive oxygen species
RuBisCO	Ribulose-1,5-bisphosphat-carboxylase/-oxygenase
TIR-NB-LRR	Toll-IL-1 receptor-nucleotide binding-leucine-rich repeat

BSA	bovines Serumalbumin
DTT	Dithiothreitol
FA	formic acid (Ameisensäure)
ACN	Acetonitril
TFA	Trifluoressigsäure
TEAB	Triethylamoniumbicarbonat
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
TEMED	Tetramethylethyldiamin
APS	Ammoniumperoxidsulfat
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylenglycoltetraessigsäure
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
TBE	TRIS-Borat-EDTA

3. Abbildungsverzeichnis

Abb.1. Phylogenetischer Baum der Gattung „ <i>Candidatus Phytoplasma</i> “	10
Abb.2. Der Wirtswechsel der Phytoplasmen.....	13
Abb.3. Phytoplasmen geben Effektorproteine über den Sec-abhängigen Translokationsweg getrieben durch die protonenmotorische Kraft (PMF) ab	17
Abb.4. Der massenspektrometrische Arbeitsablauf.....	22
Abb.5. Dimethyl Labeling.....	26
Abb.6. Übersicht Zielstellung der Arbeit	29
Abb.7. PCR-Temperaturprofil	37
Abb.8. Proteinanalysen im Überblick	44
Abb.9. Versuchsablauf zur Bestimmung des linearen dynamischen Bereiches im Dimethyl Labeling.....	51
Abb.10. Das LTQ Orbitrap XL ETD™-System (Thermo Scientific) des Max Planck Instituts für molekulare Genetik Berlin.....	53
Abb.11. Analyseablauf zur Auswertung der quantitativen Proteomdaten	60
Abb.12. Pflanzliches Untersuchungsmaterial.....	61
Abb.13. TBE-Agarosegelelektrophorese der P1/P7-PCR-Produkte.....	62
Abb.14. Elektropherogramme der RNA-Seq-Proben	63
Abb.15. Funktionelle Kategorien repräsentiert durch 117 der mittels RNA-Seq identifizierten proteincodierenden Gene von „ <i>Candidatus Phytoplasma mali</i> “ Stamm AT	65
Abb.16. SDS-PAGE der Proben zur qualitativen Proteomanalyse	66
Abb.17. Verteilung der mittels qualitativer Massenspektrometrie identifizierten Phytoplasmaproteine	67
Abb.18. Funktionelle Kategorien der 105 durch Massenspektrometrie identifizierten Proteine von „ <i>Candidatus Phytoplasma mali</i> “ Stamm AT basierend auf ihrer Verbindung mit KEGG-Pathways.....	68

Abb.19. Vergleich der Methoden zur Bestimmung der exprimierten protein-codierenden Gene von „ <i>Candidatus Phytoplasma mali</i> “ Stamm AT.....	69
Abb.20. SDS-PAGE der Proben zur quantitativen Proteomanalyse.....	71
Abb.21. Dynamischer Bereich des Dimethyl Labelings.....	72
Abb.22. Streuung der normalisierten Heavy (H)/Light (L)-Ratios unregulierter Proteine im Dimethyl Labeling.....	73
Abb.23. Korrelation zwischen Forward und Reverse Labeling	75
Abb.24. Ein Ausschnitt der Verteilung der durch quantitative Massenspektrometrie identifizierten <i>Nicotiana</i> -Proteine entlang funktioneller Kategorien.....	77
Abb.25. Die Lipoxygenase wird durch eine Infektion von <i>Nicotiana occidentalis</i> mit „ <i>Candidatus Phytoplasma mali</i> “ Stamm AT heraufreguliert	78
Abb.26. Validierte Gene von „ <i>Candidatus Phytoplasma mali</i> “ Stamm AT	79
Abb.27. Validierung des postulierten Kohlenhydratmetabolismus von „ <i>Candidatus Phytoplasma mali</i> “ Stamm AT	81
Abb.28. Jasmonsäurebiosynthese in Pflanzen und Regulation der Genexpression.....	89
Abb.29. Aus im Methyleritriholphosphat- und Mevalonat-Stoffwechsel entstehenden Produkten erfolgt die Biosynthese von (<i>E</i>)- β -Caryophyllen.....	92
Abb.30. Der erweiterte Phytoplasma/Pflanze/Insekt-Kreislauf	95

4. Tabellenverzeichnis

Tab.1. Genetische Eigenschaften der vier sequenzierten Phytoplasmastämme	11
Tab.2. Benutzte Geräte.....	30
Tab.3. Benutzte Materialien.	31
Tab.4. Benutzte Substanzen	32
Tab.5. <i>Nicotiana occidentalis</i> -Pflanzen und deren Einsatz in verschiedenen Analysen	35
Tab.6. Zusammensetzung des PCR-Mastermixes für einen Reaktionsansatz.....	37
Tab.7. Proteinisolationmethoden.....	45
Tab.8. Elutionsprofil der RP-HPLC zur Fraktionierung der Peptide.....	52
Tab.9. Elutionsprofil der RP-HPLC zur Fraktionierung der BSA-Peptide.....	52
Tab.10. Überblick Messmethoden	54
Tab.11. Ausgewählte MaxQuant-Softwareparameter.....	56
Tab.12. Ergebnis der DNA-Isolation	62
Tab.13. Proteincodierende Gene von „Candidatus Phytoplasma mali“ Stamm AT deren Expression sowohl auf Transkriptom- als auch auf Proteomebene nachgewiesen werden konnte.....	70
Tab.14. In quantitativen Proteomanalysen identifizierte Proteine von „Candidatus Phytoplasma mali“ Stamm AT	76

5. Einleitung

5.1. Die Gattung „*Candidatus Phytoplasma*“ und die genetischen Eigenschaften von Phytoplasmen

Als man sich in den 1920er Jahren auf die Suche nach dem Grund für die durch Insekten verbreitete Pflanzenkrankheit „Yellows Disease“ der Aster begab, eine Krankheit die Anbaupflanzen, Obstplantagen und Zierpflanzen zerstört und erstmalig 1902 beschrieben wurde [1], vermutete man zunächst Viren als Auslöser [2]. Einige Krankheitssymptome, wie z.B. die nicht saisonal verursachte Gelbfärbung, ähnelten denen, ausgelöst durch virale Infektionen [2]. Erst 1967 entdeckten Yoji Doi und seine Kollegen an der Universität von Tokio, in Folge von elektronenmikroskopischen Untersuchungen, Strukturen in Geweben von solchen vermutlich virusinfizierten Pflanzen, die den Bakterien der Klasse *Mollicutes* glichen [3]. Fortan wurden viele weitere dieser als „mycoplasma like organisms (MLOs)“ bezeichneten Bakterien mit Pflanzenkrankheiten in Verbindung gebracht [4]. In den späten 80er- und frühen 90er-Jahren zeigte sich in Folge von 16S-rRNA-Genanalysen das diese Bakterien eine große monophyletische Gruppe in der Klasse *Mollicutes* im Phylum *Tenericutes* bilden (Abb.1) [5-9]. 1992, auf dem 9. Kongress der „International Organization of Mycoplasmaology“, ist die Bezeichnung „Phytoplasma“ zur Benennung der Bakterien dieser Gruppe eingeführt worden [10]. Bis heute ist es nicht gelungen Phytoplasmen außerhalb ihres Wirtes in zellfreien Medien zu kultivieren [11]. Gemäß den bisher angewendeten taxonomischen Vorschriften, sind unkultivierte Organismen als „*Candidatus*“ auszuweisen [12, 13]. Deshalb wurde 2004 die bis heute gültige Gattungsbezeichnung „*Candidatus Phytoplasma*“ eingeführt [14]. 30 verschiedene Spezies sind dieser Gattung zugeordnet. Neben der Pflanzenkrankheit „Yellows Disease“ der Aster, ausgelöst durch Phytoplasmen der „Aster Yellows“-Gruppe [15], gibt es eine Vielzahl weiterer Krankheiten wie z.B. die Hülsenfruchtkrankheit „mulberry dwarf“. Die Krankheit „grapevine yellows“ der Weinstöcke ist in Europa und Australien verbreitet. Die „apple proliferation“-Krankheit führt zu Verlusten im Frischobstanbau von Äpfeln in Europa [15]. Infizierte Pflanzen zeigen eine Vielfalt an Symptomen, die stark vom Phytoplasma und vom betrachteten Zeitpunkt nach der Infektion abhängen [15]. Dazu gehören die Entwicklung von grünen Blüten und Verlust der normalen Blütenpigmente (Vergrünung, „virescence“), Sterilität von Blüten, abnormal kleine Blätter („little leaf“), freie Verzweigung („Hexenbesen“-Erscheinung, „witches“

broom“), abnormales Wachstum vieler Sprossachsen („proliferation“), generelle Unterentwicklung („stunting“), Verlaubung von Blüten („phyllody“), buschiges Wachstum am Ende der Sprossachse („bunchy top“), Absterben von Ästen („dieback“) und nicht saisonal verursachte Gelb- („yellowing“) oder Rotfärbung („redening“) von Blättern [15]. Die Symptome, hervorgerufen durch Phytoplasmainfektionen, führen zu großen Verlusten in der Produktion von pflanzlichen Erzeugnissen in der ganzen Welt [4, 16].

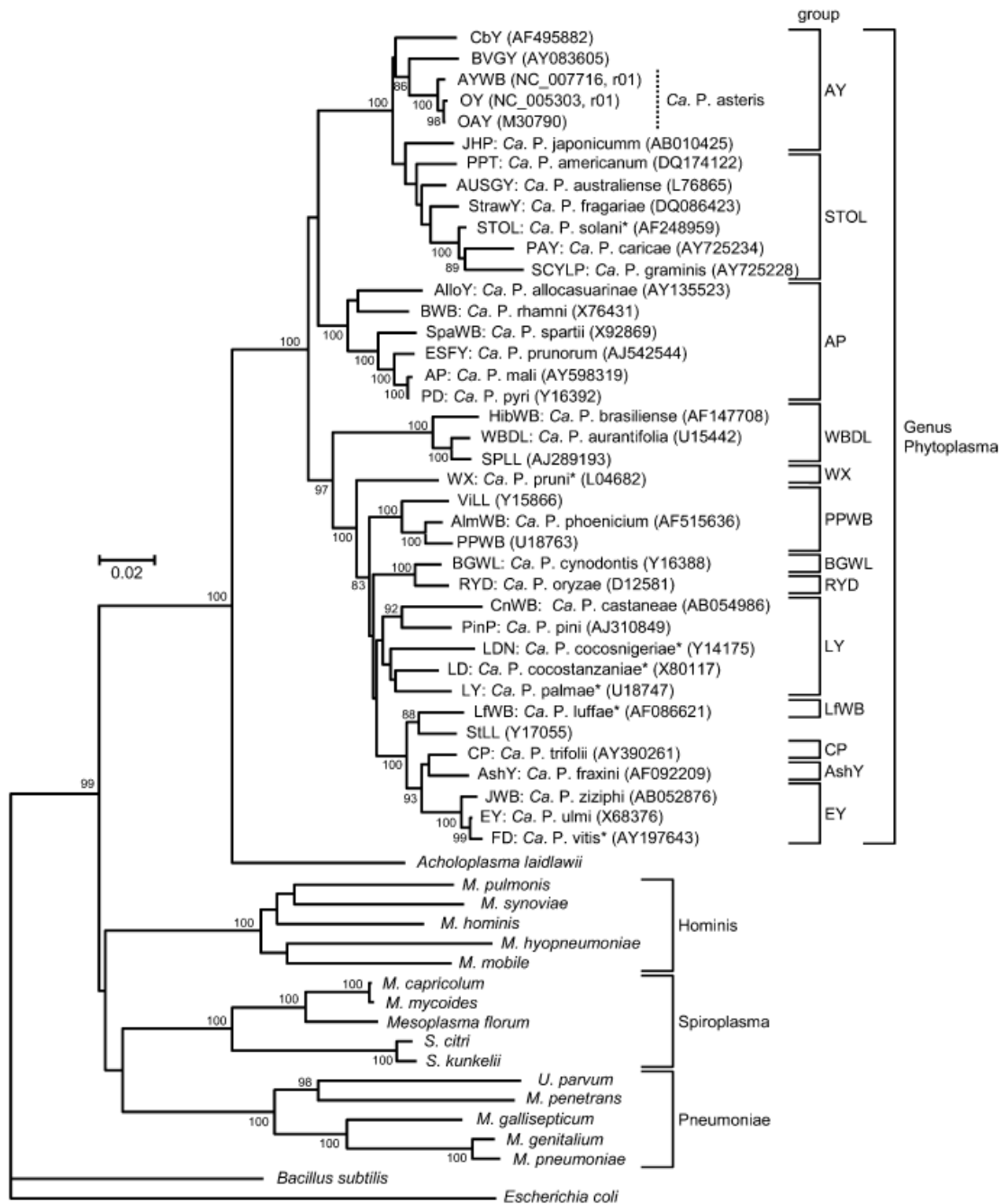


Abb.1. Phylogenetischer Baum der Gattung “Candidatus Phytoplasma”. Konstruiert nach der „neighbour-joining“-Methode unter Verwendung der 16S-rRNA-Gensequenzen der Phytoplasmen, Acholeplasmenn Mycoplasmen, Spiroplasmenn, Mesoplasma florum, Ureaplasma parvum, Bacillus subtilis und Escherichia coli. Nummern auf den Zweigen sind „bootstrap values“. Abbildung entnommen aus [17].

Die genetischen Eigenschaften von Phytoplasmen wurden anhand aufgereinigter bzw. angereicherter Präparationen, gewonnen aus infizierten Pflanzen, untersucht [15]. Neimark und Kollegen berichten, das die Größe des Phytoplasmagenomes deutlich von 530 bis 1350 kbp schwankt [18]. Der G/C-Gehalt ist mit 21-33 % gering [19]. Mit 530 kbp besitzt das „Bermuda grass white leaf“- Phytoplasma das kleinste bis heute in Phytoplasmen gefundene Genom [20]. Es repräsentiert weiterhin eines der kleinsten Chromosomen einer lebenden Zelle [20-22]. Bis heute konnten mit den „*Candidatus* Phytoplasma asteris“ Stämmen OY-M sowie AYWB, „*Candidatus* Phytoplasma australiense“ und „*Candidatus* Phytoplasma mali“ Stamm AT lediglich vier Phytoplasmenstämme vollständig sequenziert und die Genomdaten veröffentlicht sowie in vergleichenden Studien analysiert werden (Tab.1) [23-27].

Tab.1. Genetische Eigenschaften der vier sequenzierten Phytoplasmastämme. Mit „*Candidatus* Phytoplasma asteris“ Stamm OY-M sowie AYWB, „*Candidatus* Phytoplasma australiense“ und „*Candidatus* Phytoplasma mali“ Stamm AT sind bis heute die Genome von vier Vertretern der Gattung „*Candidatus* Phytoplasma“ sequenziert. Die phylogenetisch von den Phytoplasmen abgegrenzten Spezies *Mycoplasma genitalium* und *Escherichia coli* sollen dem Vergleich dienen.

	„Ca. P. asteris“ OY-M	„Ca. P. asteris“ AYWB	„Ca. P. australiense“	„Ca. P. mali“, AT	<i>M. genitalium</i> G37	<i>E. coli</i> K12 MG1655
phylogenetische Klassifikation	Bacteria, Tenericutes, Mollicutes, Acholeplasmatales, Candidatus Phytoplasma				Bacteria, Tenericutes, Mollicutes, Mycoplasmatales, Mycoplasma	Bacteria, Proteobacteria, Gamma-proteobacteria, Enterobacteriales, Escherichia
Chromosomen- größe [b]	860.631	706.569	879.324	601.943	580.076	4.639.675
Chromosom- organisation	Zirkulär	Zirkulär	Zirkulär	Linear	Zirkulär	Zirkulär
G/C-Gehalt [%]	27,7	26,9	27	21,4	31	50
kodierend [%]	72	73	64	76	90	85
Gene	788	708	882	536	524	4496
proteincodierende Gene	750	671	684	479	475	4146
hypothetische Proteine [%]	43,2	45,8	37,8	29,7	19,6	9,2

Alle Genome, bis auf das lineare Chromosom von „*Candidatus Phytoplasma mali*“ Stamm AT, zeigten eine zirkuläre Organisation (Tab.1). Das Genom von „*Candidatus Phytoplasma australiense*“ ist mit 879 kb das Größte und besitzt mit 882 proteincodierenden Genen die meisten unter den sequenzierten Phytoplasmagenomen [26, 27]. Im Gegensatz dazu ist das „*Candidatus Phytoplasma mali*“ Stamm AT-Genom mit 602 kb das kleinste unter den sequenzierten und verfügt auch mit 479 über die wenigsten proteincodierenden Gene [23]. Zum Vergleich: *Mycoplasma genitalium* hat bei einer Größe von 580 kb über 475 [28] und *Escheria coli* Stamm K-12 bei einer Größe von 4.639 kb über 4.146 [29] proteincodierende Gene. Einem Anteil von 29,7 - 45,8% an allen proteincodierenden Genen der vier Phytoplasmastämme konnte keine Funktion, basierend auf Homologieuntersuchungen, zugeordnet werden (Tab.1). Diese Gene codieren somit für sogenannte „hypothetische Proteine“. Mit der Sequenzierung und Veröffentlichung der Genome von diesen Phytoplasmastämmen konnte mit der Aufklärung begonnen werden, wie Phytoplasmaproteine die Pflanzenphysiologie und das Insektenverhalten manipulieren [2].

5.2. Phytoplasmen und ihre Wirte

Phytoplasmen sind pleiomorph mit einem durchschnittlichen Durchmesser von 200-800 µm und lediglich von einer Membran umgeben [15]. Sie beschränken sich in Pflanzen auf das Phloemgewebe, einem Teil der Leitbündel, und dort hauptsächlich auf die Siebelemente [3, 4, 16, 30, 31]. In den Siebelementen findet der Assimilatstrom statt, also der Transport der Substanzen von den Organen ihrer Bildung (Quelle, „source“) zu den Orten ihres Verbrauches (Senke, „sink“). Die Zusammensetzung des Phloensaftes ist sehr komplex und hängt stark von der betrachteten Pflanze und deren Umwelt ab. So enthält der Saft u.a. Zucker, Mineralien, freie Aminosäuren, Proteine und ATP [32]. Verbreitet werden Phytoplasmen überwiegend durch phloemsaugende Insekten der Ordnung Schnabelkerfe (*Hemiptera*). Dazu gehören Zwergzikaden (*Cicadellidae*), Spitzkopfszikaden (*Fulgoromorpha*) und Blattflöhe (*Psylloidea*) (Abb.2) [33]. Diese Insekten ernähren sich von Phloensaft wobei sie Phytoplasmen aufnehmen. Einmal in das Darmlumen gelangt, dringen sie in die Epithel- und Muskelzellen der Insekten ein und werden in die Hämolymphe freigesetzt [34, 35]. Die Zusammensetzung der Hämolymphe ähnelt in vielen Aspekten der des Phloensaftes, da auch sie hohe Konzentrationen an

komplexen und einfachen organischen Verbindungen enthält [36, 37]. Anschließend akkumulieren die Bakterien in den Vakuolen der Speicheldrüsenzellen [38] und können, bei erneutem Phloemsaugen, in den pflanzlichen Wirt gelangen [39]. Eine Übertragung über das Phloem in Wurzelbrücken ist ebenfalls beschrieben worden [40].

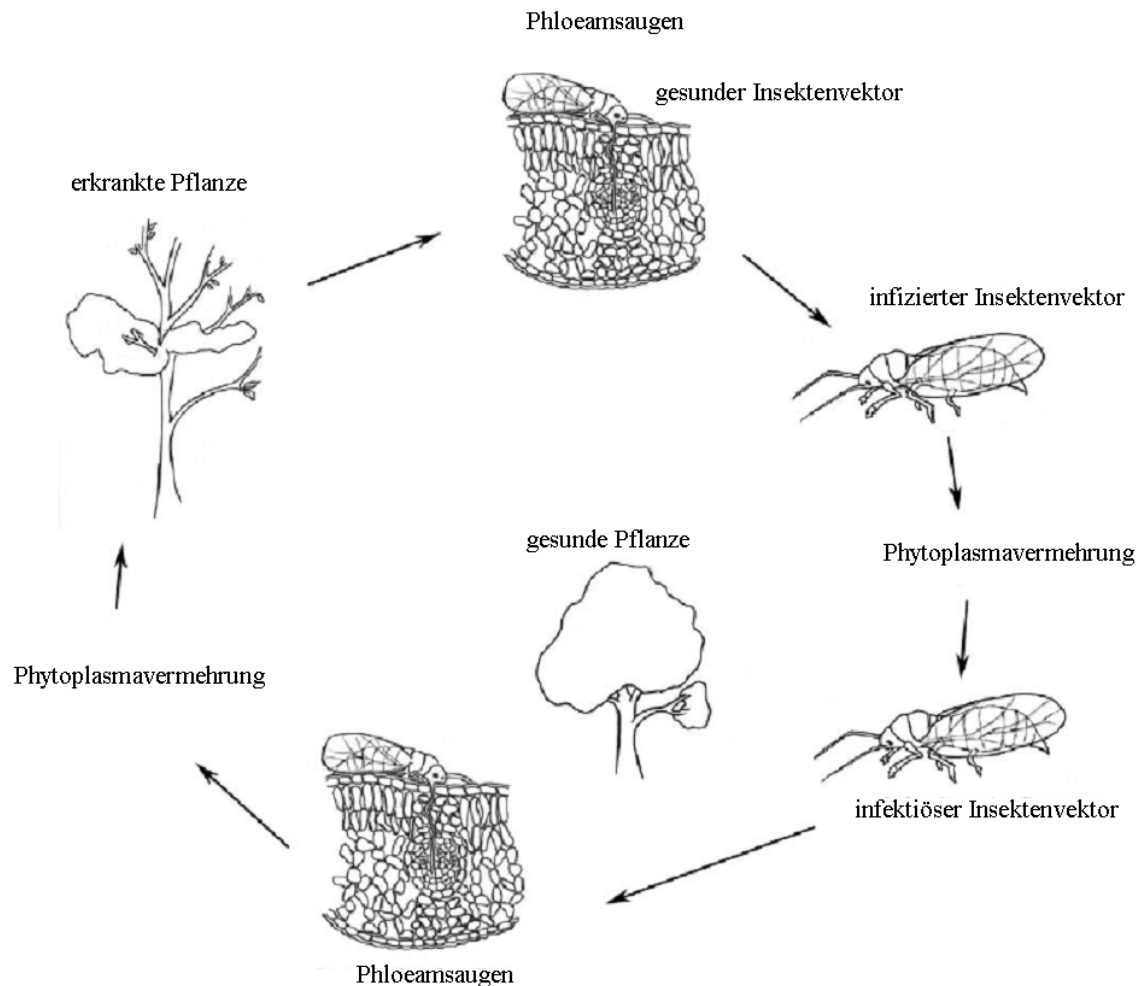


Abb.2. Der Wirtswechsel der Phytoplasmen. Phytoplasmen verbleiben in ihren Wirtspflanzen im Phloemgewebe und werden durch phloemsaugende Insekten von Pflanze zu Pflanze übertragen. Abbildung modifiziert und entnommen aus [41].

Nur wenig ist bekannt über Abwehrreaktionen die Phytoplasmen in den Wirten auslösen und Mechanismen über die sie sich diesen entziehen [11]. Pflanzen besitzen, im Gegensatz zu Säugetieren, keine mobilen Abwehrzellen und kein somatisches adaptives Immunsystem [42]. Sie verfügen jedoch über ein raffiniertes, zweiphasiges angeborenes Immunsystem [43-47]. Im Falle einer effizienten Abwehrreaktion der Wirtspflanze sind Symptome nicht, oder nur eingeschränkt erkennbar und das Pathogen kann sich nicht vermehren (inkompatible Interaktion), wohingegen in einer uneffizienten Abwehrreaktion

die Pflanze schnell infiziert wird (kompatible Interaktion) [48]. Da Phytoplasmen mit ihren Wirten kompatible Interaktionen ausbilden, müssen sie das Immunsystem zu ihrem Vorteil überwinden können [11]. Die erste Ebene der Immunabwehr basiert auf Rezeptoren, welche unspezifische „pathogen-associated molecular patterns (PAMPs)“, wie z.B. Lipopolysaccharide, Flagelline [44], „cold shock proteins (CSPs)“ [49] und mit dem „elongation factor TU (EF-Tu)“ eines der am weitesten verbreiteten bakteriellen Proteine [50, 51], zu erkennen vermögen. Diese erste Ebene wird als PAMP-ausgelöste Immunabwehr bezeichnet. Eine Aktivierung der PAMP-ausgelösten Immunabwehr führt zu einer unspezifischen Immunabwehr durch die transkriptionelle Induktion pathogenresponsiver Gene, der Produktion reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) und der Ablagerung von Callose zur Verstärkung der Zellwand an den Infektionsstellen [46]. All das trägt zur Verhinderung des Wachstums der Pathogene bei [43]. Als eine Antwort darauf haben Pathogene Strategien entwickelt, mit deren Hilfe sie der PAMP-ausgelösten Immunabwehr ausweichen können. Verhältnismäßig wenig bekannt ist über die molekularen Erkennungsmechanismen die eine Immunantwort gegen Pflanzenfresser, wie z.B. phloemsaugende Insekten, auslösen [52]. Eines dieser Mechanismen ist konzeptuell ähnlich zu dem durch Pathogene ausgelösten angeborenen Immunsystem. Es beinhaltet die Wahrnehmung von Molekülen aus Sekreten der Insekten, die, wenn sie auf pflanzliche Zellen treffen, eine Immunantwort auslösen [52]. Um eine kompatible Infektion auszulösen müssen Pathogene noch eine zweite Ebene der pflanzlichen Immunabwehr, die Effektor-ausgelöste Immunabwehr, überwinden. Dieses Abwehrsystem erkennt gezielt über spezifische pflanzliche Immunrezeptoren, genannt Abwehrproteine („resistance proteins“), spezielle pathogencodierte Effektoren [47]. So ist die Pflanze in der Lage durch eine hypersensitive Antwort (Zelltod) an der Infektionsstelle das Pathogen abzuwehren [47]. Verlust bzw. Veränderung der durch Abwehrproteine erkannten Effektoren oder der Erwerb zusätzlicher Effektoren zur Unterdrückung der Effektor-ausgelösten Immunabwehr als Folge der natürlichen Selektion, befähigt die Pathogene dazu sich der zweiten Ebene des Abwehrsystems zu entziehen [47]. Neben dem angeborenen Immunsystem verfügen Pflanzen über systemische Signale, wie Jasmonsäure, Ethylen und Salicylsäure [53], die von der Infektionsstelle ausstrahlen und so eine Abwehrreaktion gegen die Pathogene in entfernteren Zellen auslösen [46, 54, 55]. Jasmonsäuren spielen auch eine zentrale Rolle bei der Regulation der Immunantwort gegen Pflanzenfresser [56-58], wie z.B. phloemsaugende Insekten [59-62]. Zusätzlich zu diesen abwehrbezogenen Prozessen steuern Jasmonsäuren verschiedene Aspekte in der

Entwicklung von Pflanzen. So inhibiert das Hormon Wachstum und den photosynthetischen Ertrag von vegetativen Geweben [63, 64].

5.3. Apfeltriebsucht und „*Candidatus Phytoplasma mali*“

Die Apfeltriebsucht (apple proliferation disease), eine der wirtschaftlich bedeutendsten Pflanzenkrankheiten im Kernobst [65], konnte erstmalig 1950 im italienischen Veneto [66] und anschließend 1954 im Trentino, einem der größten Apfelanbaugebiete Europas, beschrieben werden [67] und scheint nur in Europa verbreitet zu sein [65]. 1968 wurden Phytoplasmen [68] und 2004 durch 16S-rRNA-Gensequenzanalysen speziell „*Candidatus Phytoplasma mali*“ als Erreger dieser Apfelbaumkrankheit identifiziert [65]. In Nordwestitalien erfolgt die natürliche Übertragung von „*Candidatus Phytoplasma mali*“ über den Weißdornblattsauger *Cacopsylla melanoneura* [69], einem Blattfloh (*Psylloidea*), in Deutschland hingegen über den Sommerapfelblattsauger *Cacopsylla picta* [70]. Eine direkte Bekämpfung des Erregers ist bis heute nicht möglich, weshalb hier vorbeugende Maßnahmen, wie z.B. Verwendung zertifizierten Pflanzgutes (phytoplasmenfrei) und Bekämpfung der Insektenvektoren von großer Bedeutung sind um die Ausbreitung des Erregers in den Apfelanbaugebieten und -anlagen zu verhindern [71]. Ein charakteristisches Krankheitssymptom stellt die „Hexenbesen“-Erscheinung am Ende der Austriebe dar. Erkrankte Bäume besitzen kleinere Blätter mit ungewöhnlich großen Nebenblättern. Es werden nur fad schmeckende, verkleinerte Früchte mit verlängerten Stielen angesetzt. Diese können nicht mehr als Industrieobst vermarktet werden [71]. Die verfrühte Rotfärbung von Blättern ist ebenso wie ein feines, haariges Wurzelsystem ein häufig beobachtetes Anzeichen für die Krankheit [72]. Jürgen Groß und seine Kollegen konnten zeigen, das mit „*Candidatus Phytoplasma mali*“ infizierte Apfelbäume verstärkt (*E*)- β -Caryophyllen, einen Lockstoff für den Insektenvektor *Cacopsylla picta*, absondern [73, 74]. Die Verteilung des Phytoplasmas im Baum ist ungleichmäßig und nicht konstant über das Jahr [72]. „*Candidatus Phytoplasma mali*“ wird in der EG-Richtlinie 2000/29 als Quarantäneschadorganismus gelistet [75].

5.4. Phytoplasmaeffektoren

Die Genome der vier sequenzierten Phytoplasmastämme lieferten nur wenige Informationen über bereits aus anderen Pathogenen bekannte Faktoren, welche zur Virulenz beitragen und es den Bakterien ermöglichen sich der PAMP- und Effektor- ausgelösten Immunabwehr zu entziehen [23-27]. So liegt die Vermutung nah, dass sich unter den hypothetischen Proteinen Phytoplasmaeffektoren befinden. Diese Effektoren versetzen die Bakterien in die Lage die Wirte zu ihrem Vorteil zu manipulieren [11]. Da Phytoplasmen den Siebteil des Phloems besiedeln, sind insbesondere durch die Bakterien sekretierte Proteine in der Lage zelluläre Prozesse im Wirt zu beeinflussen. Bakterien haben im Laufe der Evolution unterschiedliche Systeme entwickelt, über die Proteine aus der Zelle geschleust werden. Über ein Typ III-Sekretionssystem können Effektorproteine von Bakterien direkt durch einen Nadelkomplex in die Wirtszelle injiziert werden. Dieses ist jedoch in Phytoplasmen nicht vorhanden [23-27, 76]. Hingegen besitzen die sequenzierten Phytoplasmastämme Gene für den Proteinexport und -targeting des Sec-abhängigen Weges [23-27]. Jedoch können die Proteine über diesen Weg nicht in das Cytoplasma der Wirtszellen appliziert werden (Abb.3). Das Sec-abhängige Translokationssystem ermöglicht es ihnen Phytoplasmaproteine in die unmittelbare Umgebung der Zelle abzugeben [25]. Aus diesem Grund ist das gesamte „*Candidatus Phytoplasma asteris*“ Stamm AYWB-Genom mittels bioinformatischer Methoden hinsichtlich membrangerichteter Proteine anhand N-terminaler Signalpeptidsequenzen in den abgeleiteten Proteinsequenzen untersucht worden [17]. Das resultierte in 56 Effektorkandidaten, die als „secreted AY-WB proteins (SAPs)“ bezeichnet werden. SAP11, eines dieser Proteine, besitzt ein eukaryontisches Kernlokalisierungssignal (NLS) und akkumuliert in den Nuklei der Pflanzenzellen [77]. Zudem ist es mit 9 kDa sehr klein [11]. Weiterhin konnte gezeigt werden das SAP11 mit TCP-Transkriptionsfaktoren interagiert und so u.a. den Transkriptionsfaktor TCP4 destabilisiert [78]. Dieser reguliert normalerweise die Lipoxygenase 2 (LOX2), ein Enzym der Jasmonsäurebiosynthese, positiv [79]. In SAP11-transgenen *Arabidopsis*-Linien ist eine reduzierte LOX2-Expression sowie Jasmonsäureakkumulation zu verzeichnen [78]. Ähnliche bioinformatische Ansätze führten zur Identifikation von 41 Effektorkandidaten in „*Candidatus Phytoplasma australiense*“, 13 Kandidaten in „*Candidatus Phytoplasma mali*“ Stamm AT und 45 potentiellen Effektoren in „*Candidatus Phytoplasma asteris*“ Stamm OY-M [11].

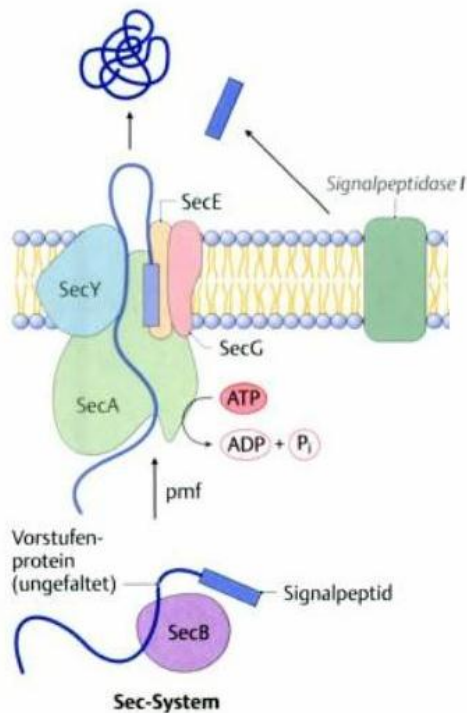


Abb.3. Phytoplasmen geben Effektorproteine über den Sec-abhängigen Translokationsweg getrieben durch die protonenmotorische Kraft (PMF) ab. Die Gene *secA*, *secE* (nur „*Candidatus Phytoplasma mali*“ Stamm AT), *secY*, *yidC*, *ffh*, *ftsY*, *dnaJ*, *dnaK*, *grpE*, *groES* und *groEL* sind in den Genomen der „*Candidatus Phytoplasma asteris*“ Stämme OY-M und AYWB und in „*Candidatus Phytoplasma mali*“ Stamm AT codiert [23-27]. Ihnen fehlen jedoch einige Untereinheiten wie *secB*, *secG*, *secF*, *secD* und die Signalpeptidase I [22, 25]. Trotz der Abwesenheit einiger Komponenten besitzt „*Candidatus Phytoplasma asteris*“ Stamm OY-M ein funktionelles Sec-abhängiges Translokationssystem [80]. Es ist möglich, dass einige hypothetische Proteine Peptidaseaktivität besitzen, was die bisherige Entdeckung, dass Phytoplasmen ein funktionsfähiges Sec-abhängiges Translokationssystem besitzen und die N-terminalen Signalpeptide der sekretierten Proteine abgespalten werden, bekräftigt [81, 82]. Abbildung entnommen aus [83].

2009 konnte in „*Candidatus Phytoplasma asteris*“ Stamm OY mit „TENGU“, einem 5 kDa kleinem Protein [11], die Funktion einer dieser Kandidaten charakterisiert werden. Wenn dieses Protein „TENGU“ in *Nicotiana benthamiana* oder *Arabidopsis thaliana* rekombinant exprimiert wird, kommt es zur Auslösung typischer mit Phytoplasmainfektionen assoziierter Symptome wie Kleinwuchs und „Hexen Besen“-Erscheinung [84]. Microarrayanalysen von TENGU-exprimierenden *Arabidopsis*-Linien zeigen eine Herunterregulation verschiedener Auxin (ein pflanzliches Hormon)-responsiver Gene und Auxin-Efflux-Carrier-Gene [84]. Somit sind mit TENGU aus „*Candidatus Phytoplasma asteris*“ Stamm OY und SAP11 aus dem Stamm AYWB bereits zwei Proteine als Phytoplasmaeffektoren identifiziert worden [77, 84]. Homologe dieser Proteine scheinen im Genom von „*Candidatus Phytoplasma mali*“ Stamm AT nicht codiert zu sein [23]. Wie „*Candidatus Phytoplasma mali*“ Stamm AT seine Wirte zu dessen Vorteil manipuliert und die typischen Krankheitssymptome hervorruft ist unbekannt. Es ist nur bekannt welche aus anderen Organismen bekannten Pathogenitätsfaktoren im Genom codiert sind. Hämolyse und Proteinsekretionswege können solche Faktoren darstellen, da sie die Abgabe von Toxinen und antimikrobiellen Verbindungen ermöglichen [85]. So sind im Genom zwei Hämolyse (*hlyC* und *tlyC*) und, wie bereits erwähnt, der Sec-abhängige Translokationsweg codiert [23]. Eine membranständige ATP-abhängige Metalloprotease (*hflB*) wird an 11 verschiedenen Loci

des Genoms von „*Candidatus Phytoplasma mali*“ Stamm AT codiert. Diese große Anzahl an *hflB*-Genen ist einzigartig, da die „*Candidatus Phytoplasma asteris*“ Stämme OY-M sowie AYWB über sieben und die meisten anderen sequenzierten Bakterien wie *Escherichia coli* und *Bacillus subtilis* nur über eine Kopie verfügen [25, 86]. Es wird vermutet dass diese Proteasen, die aufgrund der Abwehrreaktion der Wirtszelle von ihr gebildet werden, degradieren und auf diese Weise Aminosäuren und Peptide zur Aufnahme in das Phytoplasma bereitstellen [23].

5.5. Das Konzept des Phytoplasmametabolismus

Bioinformatische Untersuchungen der sequenzierten Genome zeigen auf, dass Phytoplasmen eine reduzierte metabolische Leistungsfähigkeit aufgrund unvollständiger bzw. fehlender Stoffwechselwege besitzen. So fehlen viele Gene, die für oxidative Phosphorylierung, Tricarbonsäurezyklus, Pentosephosphatweg, Aminosäure- und Fettsäurebiosynthese codieren [23-27]. Der Verlust vieler wichtiger Funktionen in Phytoplasmen könnte das Resultat reduktiver Evolution, als Konsequenz des Lebens als intrazellulärer Parasit in nährstoffreicher Umgebung, sein [87]. Viele Bakterien, auch die mit einem reduzierten Genom wie z.B. Mycoplasmen, nutzen F_0F_1 -Typ ATP-Synthasen zur ATP-Synthese mittels einer reversen Protonenentladungsreaktion [22, 28, 88]. Betrachtet man die Genome von „*Candidatus Phytoplasma asteris*“ Stamm OY-M und AYWB, „*Candidatus Phytoplasma australiense*“ und „*Candidatus Phytoplasma mali*“ Stamm AT, zeigt sich dass die entsprechenden Gene für eine ATP-Synthase nicht vorhanden sind [23-27], was zur Annahme führte dass Phytoplasmen ATP des Wirtes über noch unbekannte Mechanismen aufnehmen [87]. Als alternative könnte die ATP-Synthese in Phytoplasmen stark abhängig von der Glykolyse sein [87]. Jedoch fehlt den Stämmen ein Phosphoenolpyruvat-Phosphotransferase (PTS)-System, durch welches Zucker importiert, phosphoryliert und anschließend in die Glykolyse eingespeist werden würde [23-27]. Außerdem scheinen die Proteine des zentralen, Energie generierenden Teils der Glykolyse (*GapA*, *Pgk*, *Pgm*, *Eno* und *PykF*), im Gegensatz zu den anderen sequenzierten Phytoplasmastämmen, in „*Candidatus Phytoplasma mali*“ Stamm AT nicht präsent zu sein [23]. Diese rudimentäre Glykolyse wirft die Frage auf wie „*Candidatus Phytoplasma mali*“ Stamm AT ATP und NADH generiert um Energie und Redoxäquivalente bereit zu stellen. Ein weiterer jedoch ebenfalls unvollständiger Stoffwechselweg scheint im Genom

codiert zu sein. So ist bekannt, dass Malat und Citrat als alleinige Kohlenstoffquelle für Bakterien dienen können [89, 90]. Diese beiden Säuren bilden den Hauptbestandteil an allen im Apfelfloem transportierten organischen Säuren [91]. Phytoplasmen besitzen Gene die für Symporter der 2-Hydroxycarboxylat (2-HCT)-Familie codieren, welche die Aufnahme von Malat und Citrat in die Zelle bewirken [23, 76]. Wahrscheinlich wird durch die Decarboxylierung von Malat zu Pyruvat durch die NAD⁺-abhängige Malat Decarboxylase NADH gewonnen [23]. Der für die Umwandlung von Pyruvat zu Acetyl-CoA zuständige Dehydrogenasekomplex (*AcoAB*, *AceF* und *Lpd*) ist in „*Candidatus* Phytoplasma mali“ Stamm AT vorhanden. Das Gen für die Phosphotransacetylase (*Pta*), welche die Bildung von Acetyl-P aus Acetyl-CoA katalysiert, konnte nicht identifiziert werden [23]. In einer Reaktion von Acetyl-P zu Acetat durch die Acetat Kinase (*AckA*), deren Gen ebenfalls vorhanden ist, kann so ATP gewonnen werden [90, 92]. Der Gewinn von Energie, speziell in Form von ATP, durch den Katabolismus von Carbonsäuren durch „*Candidatus* Phytoplasma mali“ Stamm AT kann nicht mit Sicherheit evaluiert werden [23]. Alle vier Phytoplasmen Genome codieren für Membrantransportsysteme, die für eine Aufnahme von Aminosäuren, anorganischen Ionen, Dipeptiden/ Oligopeptiden, Spermidine/Putrescine und Zucker verantwortlich sind und solche die eine „multidrug resistance“ vermitteln [23, 26]. Dies lässt vermuten dass Phytoplasmen viele Metabolite der Wirtszellen importieren [87].

5.6. Validierung der Genomannotation

Die Existenz eines „Open Reading Frames (ORF)“ in Genomdaten bedeutet nicht zwangsläufig, dass ein funktionelles Gen vorhanden ist [93]. Gene können auch mehrfach in einem Genom auftreten. Nicht alle müssen exprimiert werden. So befindet sich z.B. das *hflB*-Gen an 11 verschiedenen Loci im Genom von „*Candidatus* Phytoplasma mali“ Stamm AT [23]. Außerdem sind 16 Gene als Pseudogene annotiert, also als Gene aus denen kein funktionsfähiges Produkt wie z.B. ein Protein mehr entstehen kann [23]. Die exakte bioinformatische Vorhersage von insbesondere kleinen Genen [94] und Genen mit geringer bzw. keiner Homologie zu anderen bekannten Genen („hypothetische Proteine“), ist nur schwer zu erreichen [93]. Aus einer Studie geht hervor, dass die Fehlerrate bei der Annotierung von 340 Genen aus dem *Mycoplasma genitalium*-Genom mindestens 8% betrug [95]. Die Validierung der Vorhersage von Genprodukten ist ein wichtiger Schritt in

der Annotierung von Genomen. Die systematische Analyse der Funktion von Genen kann auf der Nukleotidebene, dem Transkriptom, und auch auf der Proteinebene, dem Proteom, stattfinden. Dazu sind verschiedene Techniken, wie die Sequenzierung von RNA-Bibliotheken durch RNA-Seq und Massenspektrometrie zur Identifikation von Proteinen, entwickelt worden. Mit diesen Methoden ist es möglich das gesamte Genom und nicht nur einzelne Gene, wie z.B. durch PCR und Westernblot, zu untersuchen. Da eine axenische Kultivierung von Phytoplasmen bis heute nicht gelungen ist [11] müssen die Proben aus „*Candidatus Phytoplasma mali*“ Stamm AT positivem pflanzlichen Material entnommen werden.

5.6.1. RNA-Seq

„Next Generation Sequencing (NGS)“-Technologien, wie z.B. die Sequenzierung von RNA (RNA-Seq), ermöglichen eine weitaus präzisere Messung von Transkripten, Transkriptmengen und -isoformen als „Microarray“-Technologien [96]. Das ist von Vorteil bei der Verbesserung der Annotation von Genomdaten [97]. Undegradierete, reine und somit zur Sequenzierung geeignete RNA konnte erfolgreich unter Verwendung kommerziell erwerbbarer Kits sowie mittels Guanidiniumisothiocyanat- oder Phenol-basierten Methoden isoliert werden [98-103]. Es ist wichtig genomische DNA durch DNase-Behandlung aus der RNA-Fraktion zu entfernen [104]. Diese DNA wird ansonsten ebenfalls sequenziert und führt in der Datenanalyse zur Validierung fälschlich als transkribiert erscheinender Bereiche von Genen. In den meisten bisher veröffentlichten NGS-basierten Transkriptomstudien erfolgte außerdem die Entfernung der ribosomalen RNAs (rRNAs) aus der RNA-Fraktion. Diese RNA-Spezies macht 50-80% aller in einer Zelle vorkommenden RNAs aus und ist „non-coding“, d.h. sie trägt keine genetischen Informationen die z.B. in ein Protein umgesetzt werden könnten. Die große Menge an rRNAs reduziert den Anteil an anderen, biologisch informativeren, RNA-Spezies im RNA-Seq-Experiment [104-107], denn die Kapazität in einer Sequenzierreaktion ist durch das Gerät beschränkt. RNA muss anschließend in cDNA umgeschrieben und so eine cDNA-Bibliothek erstellt werden. Die Sequenzierung erfolgt im Hochdurchsatzverfahren unter Verwendung von NGS-Technologien, wie z.B. der „Genome Analyzer“-Technologie (Illumina). Diese basiert auf der Vereinzelung und Immobilisation der cDNA auf einen vorbereiteten Träger in einer Durchflusszelle. Die cDNA wird anschließend

durch *in situ* PCR amplifiziert. Dadurch entstehen auf der Oberfläche des Trägers sogenannte „Cluster“, wobei jeder „Cluster“ aus mehreren Kopien derselben RNA-Sequenz besteht. So wird eine Signalverstärkung in der anschließenden Sequenzierreaktion erreicht, was die Detektierbarkeit verbessert. Die Sequenzierung erfolgt durch Synthese des komplementären Stranges („sequencing by synthesis“). Reversible, Fluorophor-gekoppelte Terminatornucleotide werden der Reihe nach in Zyklen über die Durchflusszelle geleitet. Eine DNA-Polymerase baut diese in den komplementären Strang ein. Die Fluoreszenzsignale der eingebauten Nucleotide werden mittels CCD-Kamera erfasst [108]. Eine Liste mit den Sequenzen der cDNAs kann anschließend bioinformatisch unter Verwendung geeigneter Software, wie z.B. der CLC Genomics Workbench (CLC bio Germany), ausgewertet werden. Soweit bekannt ist diese Technik noch nie in der Phytoplasmaforschung angewendet worden.

5.6.2. Massenspektrometrie

Mit der Entwicklung von Ionisationstechniken wie Elektrospray-Ionisation [109] und Matrix-unterstützter Laser-Desorption/Ionisation [110, 111] Ende der 80er bzw. Anfang der 90er Jahre wurde die Massenspektrometrie zur Methode der Wahl um das Proteom im Hochdurchsatzverfahren zu charakterisieren. Verschiedene Methoden zur massenspektrometrischen Identifikation von Proteinen sind entwickelt worden, von denen jedoch die meisten ein und demselben Ablauf folgen (Abb.4: innerer Kreis) [112]. So müssen Proteine zunächst extrahiert werden um das sehr komplexe Proteingemisch anschließend zu fraktionieren. Die SDS-PAGE-Gelelektrophorese z.B. ermöglicht eine Auftrennung der Proteine nach ihrer Größe. Nun erfolgt die Spaltung der fraktionierten Proteine durch eine sequenzspezifische Protease. Häufig wird Trypsin verwendet. Dieses Enzym zerteilt Proteine an der carboxyterminalen Seite jedes Arginins und Lysins [113]. Die Spaltung ist notwendig um Peptide im Massenspektrometer zu detektieren und anschließend fragmentieren zu können, wodurch Sequenzinformationen freigesetzt werden. Optimal ist eine Peptidlänge von bis zu 20 Aminosäuren [114]. Eine Fraktionierung des Peptidgemisches erfolgt oftmals chromatographisch mittels Umkehrphasen-HPLC („reverse phase (RP)-HPLC“). Bei dieser Methode eluieren die Peptide in Abhängigkeit ihrer Hydrophobizität. Verschiedene Ionisationstechniken und Massenspektrometer, wie z.B. das nanoESI-LTQ-Orbitrap XL ETD™-

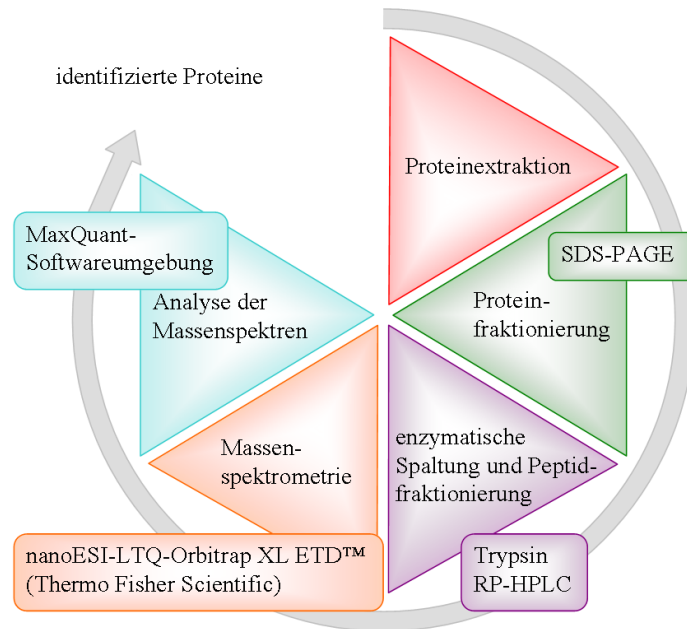


Abb.4. Der massenspektrometrische Arbeitsablauf. Verschiedene Methoden zur massenspektrometrischen Identifikation von Proteinen sind entwickelt worden. Die meisten folgen jedoch einem Grundgerüst aus Proteinextraktion, Proteinfractionierung, enzymatische Spaltung, Peptidfractionierung, Massenspektrometrie und informatische Analyse der Massenspektren. Die in den Untersuchungen angewendeten Methoden sind beispielhaft erwähnt.

Massenspektrometer (Thermo Fisher Scientific), sind entwickelt worden und kommen zur Analyse der Proben zum Einsatz. Die generierten Massenspektren können anschließend bioinformatisch ausgewertet und so Proteine identifiziert werden. Die am Ende der Säule am Emitter eluierenden Peptide können durch Ausbildung eines

Elektrosprays (ESI) ionisiert sowie in das Massenspektrometer eingeleitet werden. Nach Bestimmung des Masse/Ladungsverhältnisses (m/z) und der Intensität dieses so genannten

„Vorläuferions“ („precursor ion“) erfolgt dessen Isolation. Es schließen sich die Fragmentierung in y - und b -Ionen („Produktionen“ bzw. „product ions“), sowie die Bestimmung der Masse/Ladungsverhältnisse (m/z) und Intensitäten der „Produktionen“ an. Eine Fragmentierung wird z.B. durch „collision induced dissociation (CID)“ erreicht, bei der die Ionen auf ein Inertgas prallen. Aus diesen so generierten Massenspektren lassen sich die Peptidsequenzen ableiten. Abschließend können die erhaltenen Sequenzen Proteinen zugeordnet und so Proteine identifiziert werden. Da eine manuelle Auswertung der Spektren für ein solches Hochdurchsatzverfahren nicht praktikabel ist, wurden in der Vergangenheit eine Reihe an Algorithmen und Programmen entwickelt, die dies bewerkstelligen. Erwähnt sei an dieser Stelle die „Mascot search engine“ [115]. Diese vermag es über einen wahrscheinlichkeitsbasierten Algorithmus die Überlappung zwischen einem theoretischen Massenspektrum, abgeleitet aus der Proteinsequenz aus einer Datenbank, und dem experimentell ermittelten Spektrum zu bestimmen. Diese Übereinstimmung wird in Form eines „Scores“ ausgedrückt. So lässt sich das am besten passende theoretische Spektrum, das mit dem höchsten „Score“, und dadurch die Peptidsequenz ermitteln. Die Wahrscheinlichkeit dass diese Zuordnung zufällig ist wird berechnet und in einem Identifikations-„Score“ („P-Score“) ausgedrückt. Ein weiteres

Programm zur Auswertung der Massenspektren, welches speziell für hochaufgelöste quantitative Daten, wie sie mit LTQ-Orbitrap-Instrumenten generiert werden, entwickelt wurde, stellt die „Andromeda search engine“ [116] in der MaxQuant-Softwareumgebung [117] dar. Die Massenpeaks und Isotopenmuster in den Massenspektren werden als 3D-Objekte in den Dimensionen m/z , Elutionszeit und Intensität ausgemacht. Ermöglicht wird dies durch Korrelationsanalyse und Graph-Theorie. Das Masse/Ladungsverhältniss jedes einzelnen 3D Objektes wird als intensitätsgewichteter Mittelwert ermittelt. Im nächsten Schritt erfolgt in der „Andromeda search engine“, ähnlich wie in der „Mascot search engine“, die Erstellung von theoretischen Massenspektren, abgeleitet aus den Proteinsequenzen aus einer Datenbank. Diese theoretischen Spektren werden den experimentell ermittelten zugeordnet. Die Wahrscheinlichkeit, dass diese Zuordnung zufällig ist wird über einen wahrscheinlichkeitsbasierten Algorithmus [118] berechnet. Die verwendete Datenbank enthält neben den Proteinsequenzen auch umgekehrte Nonsenseversionen dieser Sequenzen („Decoy“-Datenbank [119, 120]). Durch „Decoy“-Datenbanken lässt sich die Wahrscheinlichkeit für eine falsch positive Zuordnung („false discovery rate (FDR)“) über die „posterior error probability (PEP)“ abschätzen. Durch die Komplexität der Peptidgemische und der relativ niedrigen Auflösung bei der Isolation der „precursor ions“ werden häufig mehrere verschiedene Peptide co-fragmentiert. Die „Andromeda search engine“ enthält deshalb neben dem wahrscheinlichkeitsbasierten Algorithmus einen neuartigen „second peptide“-Identifikationsalgorithmus [116].

Ji und Kollegen konnten auf diese Weise Proteine des „mulberry dwarf“-Phytoplasma in Maulbeerbäumen identifizieren [121], verwendeten dabei jedoch ein ESI-LTQ-Massenspektrometer und u.a. die „Mascot search engine“ zur Proteinidentifikation. Das Genom dieses Phytoplasmas ist nicht sequenziert. So erfolgte die Proteinidentifikation auf Basis sämtlicher Proteine der *Mollicutes*. Deshalb ist es möglich das Proteine des Phytoplasmas falsch-positiv bestimmt wurden. Erwähnt sei an dieser Stelle das Untereinheiten einer F_0F_1 -Typ ATP-Synthase identifiziert wurden. Alle vier bisher sequenzierten Phytoplasma Stämme zeigen jedoch, dass die entsprechenden Gene nicht vorhanden sind [23-27]. Aufgrund der vollständigen Genomsequenz von „*Candidatus* Phytoplasma mali“ Stamm AT ist eine stringenter und verlässlichere Proteinidentifikation möglich.

5.7. Pflanze/Phytoplasma-Interaktion

Nur wenig verstanden sind die molekularen Mechanismen der Pflanze, die aufgrund einer Besiedlung mit Phytoplasmen ausgelöst werden. Einige Studien untersuchten die Veränderungen in Folge einer Phytoplasmainfektion auf Ebene des pflanzlichen Transkriptoms [122-124] und Proteoms [125-127].

5.7.1. Veränderungen auf Transkriptomebene

Zamharir und Kollegen nutzten cDNA-AFLP-Analysen um veränderte Genexpressionsprofile des mexikanischen Limettenbaumes aufgrund einer Infektion mit „*Candidatus* Phytoplasma aurantifolia“ zu untersuchen [122]. So konnten 36 differentiell exprimierte Gene bestimmt werden, von denen die meisten Funktionen in Abwehr, Stressantwort und Proteinmetabolismus übernehmen. *Mos1* zeigte eine Herunterregulation. In der Modellpflanze *Arabidopsis* reguliert dieses Protein die Expression von *snc1*, einem TIR-NB-LRR-Typ Abwehrprotein der Effektor-ausgelösten Immunabwehr. So ist gezeigt worden, dass *mos1*-Mutationen die Expression von endogenem *snc1* reprimieren und so die konstitutive Abwehrantwort, vermittelt durch *snc1*, reduziert wird [128]. Chen und Lin wandten die „differential display“-Technik an um *Catharanthus roseus* (Immergrün)-cDNAs zu isolieren die in Folge einer Infektion mit dem „peanut witches` broom“-Phytoplasma ein verändertes Expressionsprofil aufweisen [123]. Sieben Transkripte, darunter die plastidische Aldolase NPALDP1 als eines der sechs herunterregulierten Transkripte, konnten so identifiziert werden. Haake und Kollegen zeigten dass eine Abnahme der plastidischen Aldolaseaktivität die Photosynthese und das Wachstum von Kartoffelpflanzen inhibiert [129]. In einer „Microarray“-Studie haben Hren und seine Kollegen 1327 Gene bestimmen und Stoffwechselwegen bzw. Prozessen zuordnen können, die in *Vitis vinifera* cv. `Chardonnay` durch eine Infektion mit dem „Bois noir“-Phytoplasma differentiell exprimiert werden [124]. So konnten Veränderungen im Kohlenhydratmetabolismus, eine induzierte Expression der Callose Synthase, sowie viele reprimierte Gene der Photosynthese ermittelt werden. Eine verstärkte Expression zeigten die Gene für Thaumatin-ähnliche Proteine und Osmotine, von denen eigentlich vermutet wurde, dass sie eine wichtige Rolle im Schutz gegen Pilzbefall spielen [130].

5.7.2. Veränderungen auf Proteomebene

Drei der bisher veröffentlichten Studien, die Veränderungen im Expressionsprofil der Proteine des pflanzlichen Wirtes als Antwort auf eine Phytoplasmainfektion untersuchten, verwendeten 2D-Elektrophoresen [125-127]. Mittels Bildauswertesoftware sind so unterschiedlich stark gefärbte Punkte, durch Vergleich der Gelmuster von Proteinisolaten gesunder und infizierter Pflanzen, bestimmt worden. Diese sind anschließend aus dem Gel ausgeschnitten und die Proteine über MALDI-TOF/TOF-Massenspektrometrie identifiziert worden. 39 Proteine des mexikanischen Limettenbaumes zeigen sich aufgrund einer Infektion mit „*Candidatus* Phytoplasma aurantifolia“ differentiell exprimiert [126]. Neun Proteine die in der Detoxifizierung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) beteiligt sind werden ebenso wie fünf Proteine der Photosynthese reprimiert. Außerdem zeigten drei Hitzeschockproteine und ein Chaperon eine reduzierte und das „ubiquitin conjugating enzyme 1“ eine induzierte Expression. Dies führte zur Vermutung, dass vermehrt missgefaltete Proteine entstehen und degradiert werden [126]. Margaria und Palmano analysierten die Antwort des *Vitis vinifera* L. cv. „Nebbiolo“-Proteoms auf eine „Flavescence dorée“-Phytoplasmainfektion [125]. 33 Proteine zeigten eine differentielle Regulation. Eine Untereinheit des Photosystems II und die Rubisco Aktivase, beide Proteine involviert in der Photosynthese, waren reprimiert und zwei Bestandteile des Ubiquitin/26S-Proteasom-Komplexes sowie GroEL, ein Chaperon, induziert. Vier Enzyme, die an der Detoxifizierung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) beteiligt sind, werden induziert. Auch in dieser Studie zeigten Thaumatin- und Osmotin-ähnliche Proteine eine verstärkte Expression. Eine Analyse der Veränderungen im Maulbeerbaumproteom, hervorgerufen durch das „mulberry dwarf“-Phytoplasma, resultierte in 16 differentiell exprimierten Proteinen [127]. Proteine welche in photosynthetischen Prozessen involviert sind, wie die „rubisco large subunit“, RuBisCO-Aktivase und die Sedoheptulose-1,7-Bisphosphatase, zeigten genauso wie die 20S-Proteasom-Untereinheit eine reprimierte Expression in infizierten Pflanzen.

5.7.3. Quantitative Massenspektrometrie

Auf 2D-Elektrophoresen basierte quantitative Massenspektrometriemethoden besitzen einige Limitationen. So ist die in der Elektrophorese erreichte Auflösung der Proteine

oftmals nicht ausreichend [131, 132]. Der dynamische Bereich von Proteinmengen in biologischen Proben ist sehr groß [133-135]. Mittels 2D-Elektrophorese können nur die am meisten vorhandenen Proteine erfasst werden [136]. Proteine mit extremen pI-Werten und Molekularmassen lassen sich gar nicht im 2D-Gel auftrennen [137]. Als ein Ergebnis dessen sind 2D-Elektrophoresen weitestgehend abgelöst und sensitivere Methoden zur Quantifizierung entwickelt worden [133]. Eine der am häufigsten verwendeten Methoden zur vergleichenden und präzisen Quantifizierung von Proteinmengen basiert auf differentiellem Isotopenlabeling [138]. Proteine oder Peptide verschiedener Proben werden mit chemischen Verbindungen gelabelt, die nahezu identische Eigenschaften besitzen. Diese Verbindungen unterscheiden sich lediglich in ihrer Zusammensetzung hinsichtlich stabiler Isotope, was zu unterschiedlichen Massen der Verbindungen und letzten Endes der Proteine bzw. Peptide führt. Auf diese Weise können beide Proben vereinigt und dennoch in einer einzigen massenspektrometrischen Analyse unterschieden werden [139]. Dieses Isotopenlabel kann auf verschiedenen Ebenen im massenspektrometrischen Arbeitsablauf (Abb.4) eingeführt werden, wie z.B. auf metabolischer Ebene bereits vor der Proteinisolation (z.B. SILAC [140]), vor der enzymatischen Spaltung der Proteine (z.B. ICAT [141]) und danach auf Ebene der Peptide (z.B. Dimethyl Labeling [142]). In der Dimethyl Labeling-Strategie (Abb.5) reagieren die primären Amine (N-Termini sowie Lysinseitenketten) der Peptide mit Formaldehyd um

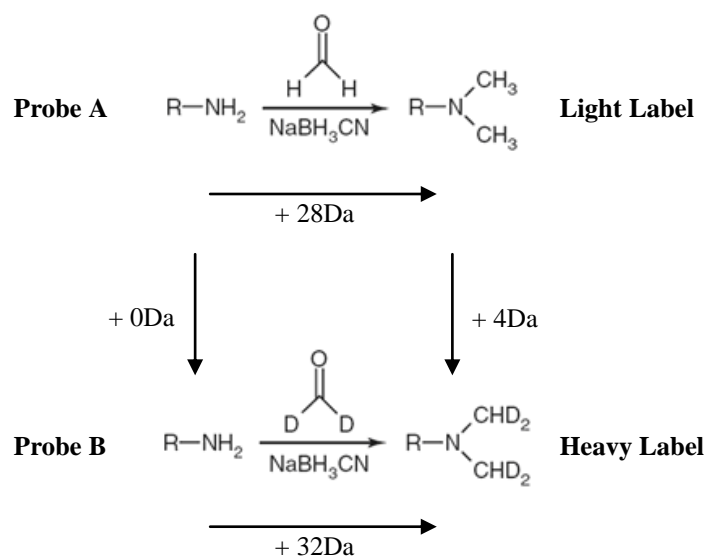


Abb.5. Dimethyl Labeling. Zwei zu vergleichende Proben (Probe A/B) können durch differentielles Labeling mit dem Light und Heavy Label relativ quantifiziert werden. R-NH₂ = primäre Aminogruppe eines Peptids.

eine Schiff'sche Base zu bilden, die schnell durch die Zugabe von Cyanoborohydrid zum Reaktionsansatz reduziert wird. Diese Reaktionen besitzen ein pH-Optimum bei pH 5-8 [139]. Die Kombination von Formaldehyd und Cyanoborohydrid führt zu einer Zunahme der Masse der Peptide um 28 Da pro gelabeltem primären Amin. Verwendet man deuteriertes Formaldehyd, bei dem die

Wasserstoffatome durch die 1 Da schwereren Deuteriumatome ausgetauscht sind, erzeugt dies eine Massenzunahme um 32 Da (Abb.5) [142]. Erfolgt die enzymatische Spaltung der Proteine mit Trypsin, einer Protease die C-Terminal von Arginin und Lysin spaltet, könnte theoretisch jedes Peptid mit mindestens einem Dimethyl Label versehen werden. Nach Arginin gespaltene Peptide können nur N-Terminal gelabelt werden, was, wenn man zwei differentiell gelabelte Peptide betrachtet, einer Massendifferenz von 4 Da entspricht. Peptide, welche am Lysin gespalten werden, können sowohl N-Terminal als auch am Lysin gelabelt werden. Demnach unterscheiden sich solche Peptide um 8 Da. Für eine möglichst exakte Quantifizierung muss jedes Peptid mit einem Label versehen sein. Die Vollständigkeit des Labelings muss daher überprüft werden, bevor die differentiell gelabelten Proben gemischt werden. Ein linearer dynamischer Bereich von 1:10 bis 1:20 für das Dimethyl Labeling wurde berichtet [142, 143].

5.8. Zielstellung

Nur wenig ist bekannt, welche Effektorproteine „*Candidatus Phytoplasma mali*“ Stamm AT exprimiert und wie dieses Bakterium mit seinen Wirten eine kompatible Interaktion ausbildet. Bisher konnten nur wenige der vorhergesagten Proteine in ihrer Expression bestätigt werden. So stellen die zu den potentiellen Virulenzfaktoren SAP11 aus „*Candidatus Phytoplasma asteris*“ Stamm AYWB [77] sowie TENGU aus „*Candidatus Phytoplasma asteris*“ Stamm OY [84] und den Proteomanalysen des „mulberry dwarf“-Phytoplasma [121] veröffentlichten Studien zurzeit Ausnahmen dar. In einem innovativen Ansatz unter Verwendung von RNA-Seq (Illumina), eines nanoLC-gekoppelten LTQ-Orbitrap MS/MS-Massenspektrometers und der Dimethyl Labeling-Strategie sollen das Transkriptom und das Proteom von „*Candidatus Phytoplasma mali*“ Stamm AT sowie die Auswirkungen einer Infektion auf das pflanzliche Proteom bestimmt werden. Die vollständige Genomsequenz dieses Phytoplasmas liefern dabei die Datengrundlage für die Auswertung der erzeugten Daten. Da es bis heute nicht gelungen ist Phytoplasmen außerhalb ihres Wirtes in Medien zu kultivieren, müssen Proben für die Analysen aus „*Candidatus Phytoplasma mali*“ Stamm AT-positiven und negativen Pflanzen gewonnen werden. *Nicotiana occidentalis* dient dabei als Modellpflanze. Im Rahmen einer Annotationsvalidierung ist zu klären welche Phytoplasmagene im Pflanzenwirt auf Transkriptom- und Proteomebene exprimiert werden und ob bisher nicht annotierte Gene zu entdecken sind. Die Dimethyl Labeling-Strategie soll in einem quantitativen Massenspektrometrieansatz angewendet werden, um so die Veränderung auf Proteomebene von infizierten *Nicotiana occidentalis*-Pflanzen und damit die Reaktion der Pflanze auf die Infektion und Modulation durch „*Candidatus Phytoplasma mali*“ Stamm AT zu erfassen. Ob Ergebnisse der bisherigen Studien, die Veränderungen in Folge einer Phytoplasmainfektion auf Ebene des pflanzlichen Transkriptoms [122-124] und Proteoms [125-127] untersuchten, auf andere Pflanze-Phytoplasma-Systeme übertragbar sind ist zu diskutieren. Die Schwerpunkte der Masterarbeit liegen entsprechend in folgenden Bereichen.

(i) Validierung der Genomannotation von „*Candidatus Phytoplasma mali*“ Stamm AT:

- Probenvorbereitung zum RNA-Seq und Datenanalyse
 - massenspektrometrische Detektion von Phytoplasmaproteinen
-

(ii) Anwendung quantitativer massenspektrometrischer Methoden um einen Einblick in die Interaktion von Pflanzen mit „*Candidatus Phytoplasma mali*“ Stamm AT zu gewinnen:

- die Bestimmung des linearen dynamischen Bereiches des Dimethyl Labelings
- das Festsetzen von Regulationsschwellenwerten
- Dimethyl Labeling-basierte Bestimmung der in Folge einer Phytoplasmainfektion differentiell exprimierten pflanzlichen Proteine

Der Arbeitsablauf ist als Schema in Abbildung 6 dargestellt.

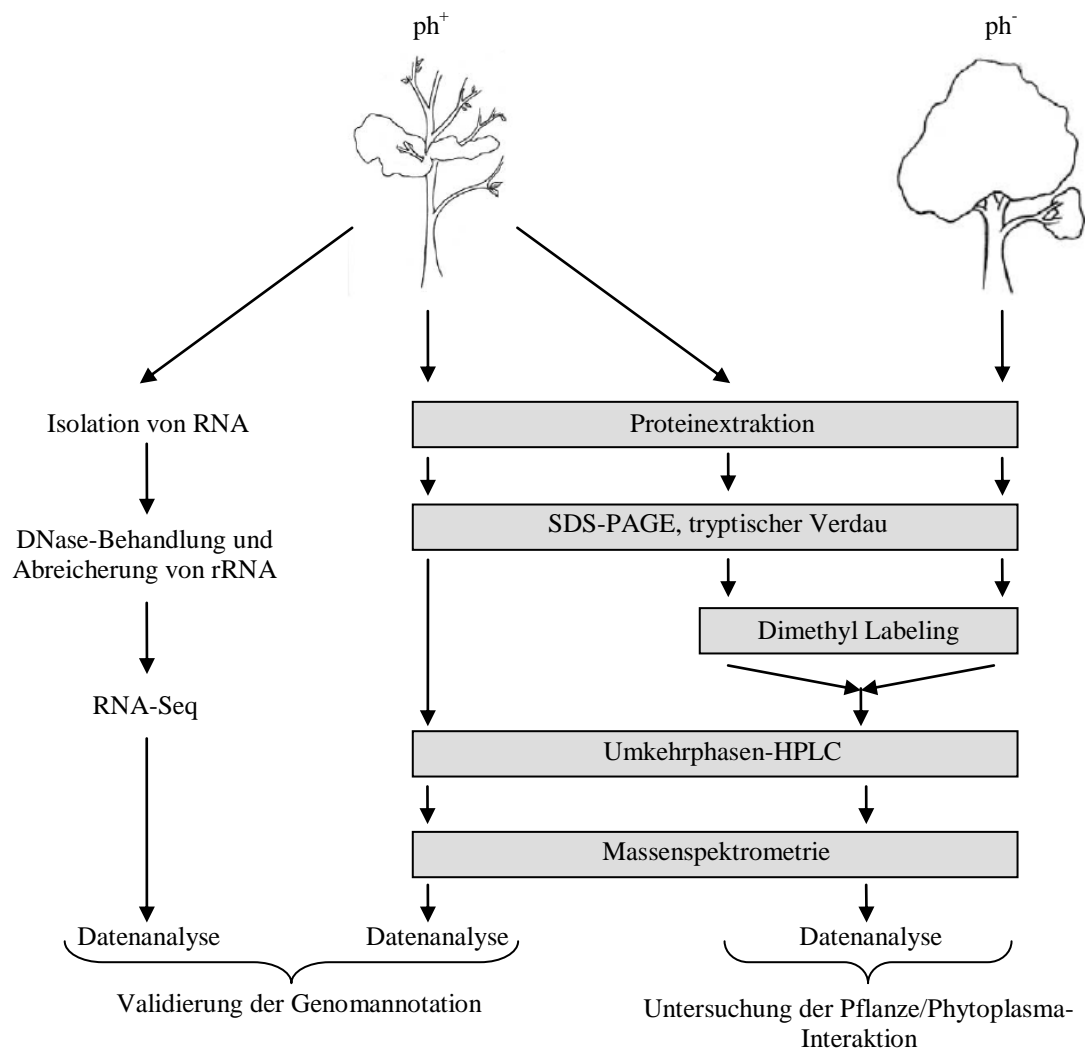


Abb.6. Übersicht Zielstellung der Arbeit. Zur Validierung der Genomannotation von „*Candidatus Phytoplasma mali*“ Stamm AT auf Transkriptom- und Proteomebene sind Methoden wie RNA-Seq und Massenspektrometrie anzuwenden. In einem quantitativen Massenspektrometrieansatz unter Verwendung der Dimethyl Labeling-Strategie sollen neue Erkenntnisse in der Interaktion von Pflanzen mit „*Candidatus Phytoplasma mali*“ Stamm AT auf Proteomebene gewonnen werden.

6. Material

6.1. Geräte und Materialien

Die im Laufe der Arbeit verwendeten Geräte sind in Tabelle 2, die verwendeten Materialien in Tabelle 3 gelistet.

Tab.2. Benutzte Geräte.

Beschreibung	Produkt und Hersteller
Massenspektrometer	<i>LTQ Orbitrap XL ETD™</i> Thermo Fisher Scientific AG, Reinach BL, Schweiz
Nano-ESI	<i>Nanospray ion source</i> Thermo Fisher Scientific AG, Reinach BL, Schweiz
HPLC-System	<i>1260 Infinity Nanoflow LC System for MS</i> Agilent Technologies Deutschland GmbH, Böblingen, Deutschland
Sonifizierstab	<i>UW 2200</i> BANDELIN electronic, Berlin, Deutschland
Geldokumentationssysteme	<i>UltraLum</i> UltraLum Inc., Claremont CA, USA <i>ScanJet 5370C</i> Hewlett-Packard GmbH, Böblingen, Deutschland
Kapillarelektrophorese	<i>2100 Bioanalyzer</i> Agilent Technologies Deutschland GmbH, Böblingen, Deutschland
Stromversorgungsgeräte	Modell und Firma nicht ausgewiesen
Zentrifugen	Modell und Firma nicht ausgewiesen <i>Centrifuge 5417C, 5430, 5804 R</i> Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Schüttelinkubator	<i>Thermomixer comfort, Mixer 5432</i> Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Waagen	<i>SBC32</i> SCALTEC Instruments, Göttingen, Deutschland <i>u4800R</i> Sartorius AG, Göttingen, Deutschland
Vortex Schüttler	<i>VORTEX-GENIE</i> Bender & Hobein AG, Zürich, Schweiz
Wasserbad	<i>2019 Multiheat Thermostatic Circulator</i> LKB Bromma, Schweden
SpeedVac	<i>Speed Vac Concentrator</i> Savant
Homogenisator	<i>Homogenizer Hand Model</i> BIOREBA, 4153 Reinach BL, Schweiz <i>TissueLyser</i> QIAGEN, Hilden, Deutschland
Thermocycler	<i>GeneAmp PCR System 2400</i> PerkinElmer, Waltham Massachusetts, USA
NanoDrop	<i>NanoDrop ND-2000</i> Thermo Fisher Scientific AG, Reinach BL, Schweiz
Mikrowelle	<i>Privileg</i> Eine Marke der IRE Beteiligungs GmbH, Stuttgart, Deutschland

Tab.3. Benutzte Materialien.

Beschreibung	Produkt und Hersteller
Pipetten	<i>PIPETMAN</i> Gilson Inc., Middleton, USA
Pipettenspitzen	<i>Premium Tips, SafeSeal-Tips</i> Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf, Deutschland <i>Pierce® C18 Tips</i> Thermo Fisher Scientific AG, Reinach BL, Schweiz
Reaktionsgefäße 0,5; 1,5; 2 ml	<i>Safe-Lock Reaktionsgefäße, Protein LoBind Tubes</i> Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Parafilm	<i>Parafilm</i> Pechiney Plastic Packaging, Menasha, USA
Handschuhe	<i>Blossom Nitrile</i> Boissey Blossom Europe, Madrid, Spanien
Tubes 15 ml; 50 ml	<i>Centrifuge Tube CentriStar Cap</i> Corning Incorporated, Corning, USA
Meshbags	<i>Extraction Bags "UNIVERSAL"</i> BIOREBA, 4153 Reinach BL, Schweiz
DNA-Isolationskit	<i>Dneasy Plant Mini Kit</i> QIAGEN, Hilden, Deutschland
On Column DNase-Verdau	<i>NucleoSpin RNA II</i> MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG, Düren, Deutschland
Proteinisolationskit	<i>AllPrep DNA/RNA/Protein Mini Kit</i> QIAGEN, Hilden, Deutschland
rRNA-Abreicherungskit	<i>RiboMinus Plant Kit for RNA-Seq</i> Invitrogen GmbH, Darmstadt, Deutschland
PCR-Kit	<i>OptiTaq DANN Polymerase-Kit</i> ROBOKLON GmbH, Berlin, Deutschland
Säule	<i>0.15 mm × 150 mm PicoFrit</i> New Objective Inc., Woburn USA
C18- Beads	<i>ReproSil- Pur C18- AQ</i> Dr. Maisch GmbH, Ammerbuch-Entringen, Deutschland
Enzyme	<i>Trypsin Modified Sequencing Grade</i> Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland
Proteine	<i>Albumin from bovine serum, minimum 98% electrophoresis</i> Sigma-Aldrich CHEMIE GmbH, Steinheim, Deutschland
Proteinmarker	<i>Precision Plus Protein Unstained Standards</i> Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
DNA-Marker	<i>10 ng Marker</i> hergestellt am Max Planck Institut für molekulare Genetik Berlin
Chip	<i>RNA 6000 Pico- Kit</i> Agilent Technologies Deutschland GmbH, Böblingen, Deutschland

Die Untersuchungsobjekte *Nicotiana occidentalis* und mit „*Candidatus* Phytoplasma mali“ Stamm AT-infizierte *Nicotiana occidentalis* wurden vom Julius-Kühn-Institut für Pflanzenschutz im Obst- und Weinbau Dossenheim (Arbeitsgruppe Seemüller) bereitgestellt.

6.2. Chemikalien und Zusammensetzungen verwendeter Lösungen

Die im Laufe der Arbeit verwendeten Substanzen sind in Tabelle 4 gelistet.

Tab.4. Benutzte Substanzen.

Substanz	Hersteller
Ethanol	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
DEPC-Wasser	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland
Natriumacetat	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Trisbase	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Borsäure	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
EDTA	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Acetonitril	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Ameisensäure	Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH, Seelze, Deutschland
Iodacetamid	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland
DTT	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Ammoniumhydrogencarbonat	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
SDS	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
2-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich CHEMIE GmbH, Steinheim, Deutschland
Bromphenolblau	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Xylone-Cyanol	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Sucrose	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
UltraPure TEMED	Invitrogen, Carlsbad CA, USA
APS	Sigma-Aldrich CHEMIE GmbH, Steinheim, Deutschland
HCL	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Acrylamid	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland
N,N'-Methylenbisacrylamid	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland
EGTA	Sigma-Aldrich CHEMIE GmbH, Steinheim, Deutschland
PMSF	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland
Leupeptin	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland
Pepstatin	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland
cOmplete Protease Inhibitor Cocktail Tablets	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland
Harnstoff	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Coomassie Brilliant Blau G250	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Essigsäure	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Glycerin	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Isoamylalkohol	Sigma-Aldrich CHEMIE GmbH, Steinheim, Deutschland
Isopropanol	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Chloroform	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Roti-Aqua-Phenol/C/I	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Guanidinthiocyanat	Sigma-Aldrich CHEMIE GmbH, Steinheim, Deutschland
Disodiumcitrat	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Certified Low Range Ultra Agarose	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
Glycogen	Boehringer Mannheim GmbH, Deutschland
Formaldehyde solution for molecular biology 36,5%-38% in H ₂ O	Sigma-Aldrich CHEMIE GmbH, Steinheim, Deutschland

Substanz	Hersteller
Formaldehyde-d2, 98% atom %D, ca. 20 wt% solution in deuterium oxide	ISOTEC, Miamisburg, USA
Ammoniaklösung, 25%	Fisher Scientific, Leicestershire, UK
Triethylammoniumbicarbonatpuffer 1M, pH 8,5	Sigma-Aldrich CHEMIE GmbH, Steinheim, Deutschland
Natriumcyanoborohydrid	Sigma-Aldrich CHEMIE GmbH, Steinheim, Deutschland
P1/P7-Primerpaar und PCR-Positivkontrolle	bereitgestellt durch Herrn Dr. Kube, Max Planck Institut für molekulare Genetik Berlin
Eisessig	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Methanol	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Ethidiumbromidlösung	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland

Lösungen:

Sealing- und Trenngel:

25 ml H₂O
 0,8 ml 10% SDS
 20 ml 1.5M Tris-HCl pH 8,8
 33,3 ml 29% Acrylamid, 0,8% Bis

Sammelgel:

23,8 ml H₂O
 0,4 ml 10% SDS
 10 ml 0,5M Tris-HCl, pH 6,8
 5,3 ml 29% Acrylamid, 0,8% Bis

SDS-Laufpuffer:

0,125 M Tris-Base
 1,25 M Glycin
 0,5% SDS

6x SDS-PAGE-Probenpuffer:

0,3M Tris-Cl pH 6,8
 12% SDS
 0,006% Bromphenolblau
 60% Glycerol

Coomassie-Färbelösung:

1,25 g Coomassie Brilliant Blue R-250
 in 225 ml technischem Ethanol lösen.
 225 ml Wasser und 50 ml Eisessig zugeben.
 2 h rühren, filtrieren.

Coomassie-Entfärberlösung:

20% Methanol
 7.5% Essigsäure

2% ACN + 0,1 % FA:
20 ml 100% ACN
1 ml Ameisensäure
mit H₂O auf 1 l aufgefüllt

98% ACN + 0,1 % FA:
980 ml 100% ACN
1 ml Ameisensäure
mit H₂O auf 1 l aufgefüllt

Lysepuffer I:
100 mM Tris-HCl pH 8
2.5 mM EDTA
2.5 mM EGTA
4% SDS
1 mM PMSF
10 µM Pepstatin
10 µM Leupeptin
1x cOmplete Proteaseinhibitorcocktail

Lysepuffer II:
9 M Urea
100 mM Tris-HCl pH 8
2.5 mM EDTA
2.5 mM EGTA
4% SDS
1 mM PMSF
10 µM Pepstatin
10 µM Leupeptin
1x cOmplete Proteaseinhibitorcocktail

10xTBE:
108 g Trisbase
55 g Borsäure
40 ml 0,5 M EDTA pH 8
Auf 1 l mit H₂O aufgefüllt und über
Faltenfilter filtriert

TBE-Elektrophorese-Ladepuffer:
0,25% Bromphenolblau
0,25% Xylene Cyanol FF
40% Sucrose in H₂O

Tris-HCl:
0,5 M Tris-HCL pH 6,8 und 1,5 M Tris-HCL
pH 8,8 mit HCl eingestellt

7. Methoden

7.1. Pflanzliches Untersuchungsmaterial

Vier mit „*Candidatus Phytoplasma mali*“ Stamm AT infizierte *Nicotiana occidentalis*-Pflanzen sowie drei nicht mit „*Candidatus Phytoplasma mali*“ Stamm AT infizierte *Nicotiana occidentalis*-Pflanzen, der Einfachheit halber als ph^+ - *N. Oc.* Nr. 1-4 bzw. ph^- - *N. Oc.* Nr. 1-3 bezeichnet, wurden vom Julius-Kühn-Institut für Pflanzenschutz im Obst- und Weinbau Dossenheim (Arbeitsgruppe Seemüller) bereitgestellt. Die Pflanzen wurden in Dossenheim im Gewächshaus gezüchtet und infiziert. Sämtliche Proben für Analysen wurden innerhalb einer halben bis vier Wochen, nach Zustellung dieser zum Max Planck Institut für molekulare Genetik Berlin, gewonnen.

Tabelle 5 stellt zusammen, welche pflanzlichen Gewebe aus den *Nicotiana occidentalis*-Pflanzen, die unterschiedlich starke Symptome einer Phytoplasmainfektion zeigten, entnommen und welche Analysen damit durchgeführt wurden. So ist DNA aus Phytoplasma-negativen und RNA aus Phytoplasma-positiven Pflanzen isoliert worden. Eine qualitative Proteomanalyse zur Proteinidentifikation erfolgte an Phytoplasma-positiven Pflanzen und für die quantitative Proteomanalyse wurden Phytoplasma-positive mit Phytoplasma-negativen Pflanzen verglichen.

Tab.5. *Nicotiana occidentalis*-Pflanzen und deren Einsatz in verschiedenen Analysen. DNA, RNA sowie Proteine wurden aus Phytoplasma-negativen (ph^-) und positiven (ph^+) *Nicotiana occidentalis*-Pflanzen (*N. Oc.*) die starke (+) oder keine (-) Symptome einer Phytoplasmainfektion wie freie Verzweigung (Hexenbesenformation) und verkleinerte Blätter aufzeigten isoliert und in den weiteren Versuchen eingesetzt (X).

Pflanze	Symptome	Gewebe	DNA-Analyse	RNA-Analyse	Proteinanalysen	
					qualitative Proteomanalyse	quantitative Proteomanalyse
ph^- <i>N. Oc.</i> Nr. 1	-	Blattrippe	X			X
ph^- <i>N. Oc.</i> Nr. 2	-	Blattrippe	X			X
ph^- <i>N. Oc.</i> Nr. 3	-	Blattrippe	X			X
ph^+ <i>N. Oc.</i> Nr. 1	+++++	Sproßachse			X	
ph^+ <i>N. Oc.</i> Nr. 2	+	Blattrippe			X	X
ph^+ <i>N. Oc.</i> Nr. 3	+	Blattrippe		X	X	X
ph^+ <i>N. Oc.</i> Nr. 4	+++	Blattrippe		X		X

7.2. DNA-Analysen

Um nachzuweisen, dass die Pflanzen ph⁻- *N. Oc.* Nr. 1-3 nicht irrtümlich mit Phytoplasmen infiziert waren, wurden diese getestet. Dazu musste DNA gewonnen und in einer PCR zur Identifikation von Phytoplasmen eingesetzt werden. Die PCR-Produkte konnten anschließend im Agarosegel aufgetrennt und somit deren Größe ermittelt werden. Eine Positiv- und Negativkontrolle wurde mitgeführt.

7.2.1. Extraktion von DNA

Die Isolation von DNA der Pflanzen ph⁻- *N. Oc.* Nr. 1-3 erfolgte unter Verwendung des DNeasy Plant Mini Kits von Qiagen. Dabei handelt es sich um ein auf eine Silika-Membran basiertes System. Diese Membran vermag es selektiv DNA zu binden. Die Nukleinsäuren adsorbieren in Gegenwart von chaotropischen Salzen an der Membran und werden nach einem Waschschriff unter „low“- bzw. „no-salt“- Bedingungen wieder eluiert. So kann man die unter diesen Bedingungen nicht adsorbierenden Bestandteile, wie Polysaccharide und Proteine entfernen.

Jeweils 100 mg Blattrippenmaterial wurden in Meshbags (BIOREBA) platziert, mit 800 µl AP1-Puffer versetzt und homogenisiert. Das gesamte Lysat wurde in ein Reaktionsgefäß überführt und mit 4 µl RNase A (100 mg/ml) versetzt. Die Durchführung erfolgte im Weiteren, wie in dem Kit beiliegenden Protokoll beschrieben. Im letzten Schritt wurde die DNA eluiert. Dazu sind 100 µl AE- Puffer auf die Membran gegeben worden. Nach 5 minütiger Inkubation bei RT, folgte ein Zentrifugationsschritt für 1 min bei 6000 g. Abschließend wurde die DNA-Konzentration am NanoDrop (Thermo Fisher Scientific) bestimmt.

7.2.2. Nukleinsäure Konzentrationsbestimmung

Die Bestimmung der Konzentration an DNA (7.2.1.) bzw. RNA (7.3.) in den gewonnenen Proben erfolgte spektrophotometrisch unter Verwendung des NanoDrop (Thermo Fisher Scientific). Nukleinsäuren besitzen ein Absorptionsmaximum bei 260 nm, weshalb die Extinktionen der Proben bei dieser Wellenlänge gemessen werden. Es gilt das Lambert-

Beersche Gesetz. Doppelsträngige DNA und einzelsträngige RNA unterscheiden sich in ihren molaren Extinktionskoeffizienten und das muss bei der Messung berücksichtigt werden. Als Blindprobe wurden 1,5 µl AE-Puffer (Qiagen) bzw. Wasser (Qiagen) auf das optische Empfänger-Glasfaserkabel des NanoDrop (Thermo Fisher Scientific) geladen und gemessen, bevor 1,5 µl der entsprechenden nukleinsäurehaltigen Probe analysiert werden konnte. Die Software berechnete die Nukleinsäurekonzentration in ng/µl.

7.2.3. P1/P7-PCR

Zur Detektion von Phytoplasmen wurde das auf den 16S-rRNA-Gensequenzen basierte Primerpaar P1/P7 (P1: 5'-AAGAGTTTGATCCTGGCTCAGGATT-3', P7: 5'-

Tab.6. Zusammensetzung des PCR-Mastermixes für einen Reaktionsansatz.

	Volumen pro Ansatz [µl]
10xPuffer B	5
40 µM Primer P1	0,5
40 µM Primer P7	0,5
5mM dNTP`s	1,25
OptiTaq (5U/ µl)	0,5
H2O bidest.	41,25

CGTCCTTCATCGGCTCTT-3`) benutzt [144]. Dabei wird ein ca. 1,8 kb großes Fragment aus dem rRNA-Operon der DNA der Phytoplasmen amplifiziert, welches das 16S-rRNA Gen sowie die „intergenic spacer region“ zwischen dem 16S- und 23S-rRNA Gen beinhaltet. Zur PCR wurden das „OptiTaq DNA Polymerase-Kit“ (ROBOKLON GmbH) und das GeneAmp PCR System 2400 (PerkinElmer) verwendet. Bei der im Kit enthaltenen OptiTaq-DNA-Polymerase handelte es sich um ein Gemisch der *Taq*-, eine DNA-Polymerase ohne Korrekturlese („proofreading“)-Funktion, und *Pfu*-Polymerasen, eine DNA-Polymerase mit Korrekturlese („proofreading“)-Funktion. Die Reaktionsansätze wurden

wie in Tabelle 6 dargestellt hergestellt, wobei ein Mastermix für alle Ansätze verwendet wurde. Als Templat diente 1 µl der isolierten DNA (7.2.1). Als Kontrollen waren DNA aus „*Candidatus Phytoplama mali*“ Stamm 1/93 (Positivkontrolle, bereitgestellt durch Herrn Dr. Kube, Max Planck Institut für molekulare Genetik Berlin), sowie bidestilliertes Wasser (Negativkontrolle) mitgeführt worden. Das verwendete Temperaturprofil ist in Abbildung 7 zu sehen.

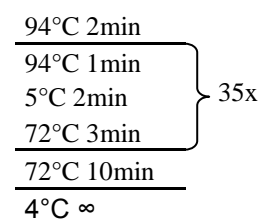


Abb.7. PCR-Temperaturprofil.

7.2.4. TBE-Agarose-Gelelektrophorese

Zur Größenauftrennung und Visualisierung der PCR-Produkte (7.2.3.), wurden diese gelelektrophoretisch aufgetrennt. Nach Resuspendierung von 1 g Agarose in 100 ml TBE-Puffer, war diese vorsichtig aufzukochen. Nach Abkühlung wurde 1 µl Ethidiumbromid (10 mg/ml) zur Färbung der Nukleinsäuren zugegeben und das Gel, bevor es gelierte, in die Gelkammer gegossen. Anschließend waren jeweils 1 µl der PCR-Produkte mit 3 µl TBE-Elektrophorese-Ladepuffer, zu versetzen. Nach Polymerisation des Gels konnte dieses mit TBE-Puffer überschichtet, sowie 4 µl der vorbereiteten Proben und des Größenmarkers („*in house*“-Produkt) in die Taschen geladen werden. Die Elektrophorese erfolgte für 30 min bei 80 V. Abschließend wurde das Gel im UV-Dokumentationssystem abgelichtet.

7.3. RNA-Analysen

Zur Untersuchung des Transkriptoms von „*Candidatus Phytoplama mali*“ Stamm AT war es notwendig, zunächst ausreichende Mengen an RNA aus ph^+ - *N. Oc.*-Pflanzen zu isolieren und für die Sequenzierung vorzubereiten. Die Sequenzierung erfolgte unter Verwendung der „Genome Analyzer“-Technologie (Illumina). Die erzeugten Daten konnten abschließend mit Hilfe der Software CLC Genomics Workbench (CLC bio Germany) analysiert werden.

7.3.1. Solution D-RNA-Extraktion

Undegradierte, reine RNA zu erhalten, ist äußerst wichtig für die nächsten Schritte. So neigt RNA in Gegenwart von RNasen schnell zu degradieren, weshalb während des Zellaufschlusses RNasen deaktiviert werden müssen. Die Solution D-Extraktion erfolgte nach Chomczynski und Sacchi [145]. Der Guanidiniumisothiocyanat-haltige Puffer denaturiert RNasen reversibel. Zusätzlich ist noch β -Mercaptoethanol im Puffer enthalten, welches eine stark reduzierende Wirkung besitzt und somit ebenfalls RNA vor Degradation schützt. So wurden 400 mg der Rippen eines Blattes der Pflanzen ph^+ - *N. Oc.* Nr. 3 und 4 in Meshbags (BIOREBA) platziert und nach Zugabe von 6 ml Solution D

homogenisiert. 4 ml des Lysats wurden entnommen und mit 0,5 ml 2M Natriumacetat pH 4 versetzt bzw. gemischt. Nach Aufschluss des Zellmaterials, konnte nun die RNA aus dem Homogenat durch Zugabe von Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol, sowie anschließendem Mischen extrahiert werden. Dabei bewirken Phenol und Chloroform aufgrund ihrer denaturierenden Eigenschaften ein Ausfallen der Proteine in der Interphase, wobei RNA sich in der wässrigen Phase löst. Isoamylalkohol verhindert während des Mischvorgangs das Schäumen. Zum Lysat wurde deshalb 4 ml Phenol/Chloroform/Isoamylalcohol pH 4,5-5 zugegeben. Nach vortexen, erfolgte ein Zentrifugationsschritt für 5 min bei 4°C und 1800 g. Die obere Phase wurde entnommen und mit einem einfachen Volumen an Chloroform-Isoamylalcohol (24:1) gemischt. Nach Wiederholung des Zentrifugationsschrittes, war die obere Phase auf mehrere 2 ml-Reaktionsgefäße aufzuteilen und mit einem einfachen Volumen Isopropanol zu versetzen. In Gegenwart monovalenter Kationen (bereitgestellt durch z.B. Natriumacetat) bilden Nukleinsäuren in Isopropanol einen unlöslichen Niederschlag, wodurch sich die gewonnene RNA präzipitieren ließ. Es folgte eine Zentrifugation der gefällten Nukleinsäuren für 10 min bei 4°C und 20000 g. Zum Schluss, nach waschen der Nukleinsäuren mit 0,6 ml 80%igem Ethanol und anschließender erneuter Pelletierung bei 20000 g und 4°C für 2 min, wurde das Pellet für 10 min bei 37°C getrocknet, bevor es in RNase-freiem Wasser (Qiagen) aufgenommen und nach 30 minütiger Inkubation auf Eis resuspendiert werden konnte.

7.3.2. *rDNase-Verdau*

Zur Entfernung eventueller Kontaminationen der Proben mit DNA waren diese mit einer RNase-freien DNase zu inkubieren. Dieser Verdau erfolgte unter Verwendung des NucleoSpin RNA II- Kits (Machery & Nagel). Dabei werden die Nukleinsäuren zunächst auf einer Silikamembran immobilisiert, bevor die DNase auf die Membran gegeben wird. Nach Waschsritten kann dann die DNA-freie RNA eluiert werden.

Die RNA-Proben (7.3.1.) waren zunächst mit einem einfachen Volumen an 70%igem Ethanol zu mischen, bevor diese auf die „Nucleospin RNA II“-Säulen zur Bindung der Nukleinsäuren gegeben werden konnten. Es folgte die Zentrifugation der Säulen für 30 s bei 10000g und die Zugabe von 350 µl MDB-Puffer (Machery & Nagel). Dem schloss sich eine erneute Zentrifugation für 1 min bei 11000 g an. Die Membran war nun mit 95

µl des DNase- Reaktionsmixes für 15 min bei RT zu inkubieren und zu waschen mit 200 µl RA2-Puffer (Machery & Nagel) und 600 µl RA3-Puffer (Machery & Nagel). Anschließend war die Membran nach Zugabe von 250 µl RA3-Puffer (Machery & Nagel) für 2 min bei 11000 g trocken zu zentrifugieren. Zum Schluss konnte nun die RNA mit 20 µl RNase-freiem Wasser (Qiagen) und Zentrifugation für 1 min bei 11000 g von der Säule eluiert werden, wobei das Eluat erneut auf die Säule gegeben und ein zweites mal zentrifugiert wurde. Zur Bestimmung der Konzentration an Nucleinsäuren, erfolgte die Messung am NanoDrop (Thermo Fisher Scientific, 7.2.2). Ein Aliquot wurde außerdem im Bioanalyzer (Agilent) analysiert (7.3.4).

7.3.3. Entfernung pflanzlicher ribosomaler RNAs

Da ribosomale RNAs 50-80% aller in einer Zelle vorkommenden RNAs ausmachen, erfolgte in den meisten „next generation sequencing (NGS)“-basierten Transkriptomstudien deren Entfernung. Zur Abreicherung der pflanzlichen ribosomalen RNAs fand das „RiboMinus Plant Kit for RNA-Seq“ (Invitrogen) Anwendung. Dabei binden 5'-biotinylierte Oligonukleotidsonden an die pflanzlichen nukleären (25/26S, 17/18S) sowie Chloroplasten (23S, 16S) und mitochondrialen (18S) rRNA- Moleküle. Die Komplexe aus Sonden und rRNAs können anschließend durch streptavidin-beschichtete magnetische Kügelchen entfernt werden. Die Sonden bestehen aus modifizierten RNA-Nukleotiden („locked nucleic acids (LNAs)“), bei welchen, im Gegensatz zu normalen Nucleinsäuren, die 2'- und 4'-Position in einem Furanosering über eine O-Methylengruppierung verknüpft ist. Dadurch wird eine stärkere Hybridisation an die Matrize erreicht.

10 µl der 500 ng/µl-konzentrierten (entspricht 5 µg) DNase verdauten RNA-Probe, der Pflanze *ph*⁺- *N. Oc.* Nr. 3 bzw. der 661,2 ng/µl-konzentrierten (entspricht 6,612 µg) DNase verdauten RNA-Probe der Pflanze *ph*⁺- *N. Oc.* Nr. 4 wurden verwendet. Die Proben wurden zunächst zu 100 µl Hybridisierungspuffer und 10 µl der „RiboMinus™-Probes“ (15 pmol/µl) gegeben. Die weitere Durchführung erfolgte wie in dem Kit beiliegendem Protokoll beschrieben. Abschließend wurde die RNA in 20 µL DEPC-behandeltem Wasser (Invitrogen) resuspendiert. Die Konzentrationsbestimmung an Nucleinsäuren erfolgte unter Verwendung des NanoDrop (Thermo Fisher Scientific, 7.2.2.). Die Qualität wurde mit dem Bioanalyzer (Agilent) bestimmt (7.3.4.).

7.3.4. „On Chip“-Kapillarelektrophorese

Zur Kontrolle der Qualität der RNA-Präparation sowie um das Resultat der pflanzlichen rRNA-Abreicherung beurteilen zu können, wurden die unter Abschnitt 7.3.2. und 7.3.3. gewonnenen Proben im Bioanalyser (Agilent), einem Gerät zur „On Chip“-Kapillarelektrophorese kleinster Probenmengen, untersucht. Während der Kapillarelektrophorese werden RNA-Moleküle im Bioanalyser aufgrund ihres negativ geladenen Zucker-Phosphat-Rückgrats und des stets konstantem Masse/Ladungsverhältnisses in einer siebartigen Polymermatrix der Größe nach aufgetrennt. Fluorophormoleküle interkalieren dabei in den Nukleinsäuresträngen, was die Detektion der RNA über Laser-induzierte Fluoreszenz ermöglicht. Der mit zuführende Größenstandard gibt über die Molekülgrößen Auskunft. Zur Visualisierung werden die Daten u.a. in Form von Elektropherogrammen ausgegeben.

Aliquote aus den Proben der Pflanzen ph^+ - *N. Oc.* Nr. 3 und 4 wurden jeweils vor und nach der rRNA-Abreicherung entnommen und auf 2 ng/ μ L verdünnt. 1 μ L dieser Aliquote waren im Bioanalyser mittels des „RNA 6000 Pico-Kits“ im Eukaryotenmodus zu analysieren. Der Chip wurde dazu wie im „Agilent RNA Pico Assay Protocol-Edition March 2008-Quick Start Guide“ beschrieben vorbereitet, die Proben aufgegeben und anschließend im Agilent 2100 Bioanalyser analysiert.

7.3.5. RNA-Seq

Die Sequenzierung der RNA (RNA-Seq) erfolgte am Max Planck Institut für molekulare Genetik durch die Service Gruppe „Next Generation Sequencing“ von Bernd Timmerman. Dabei kamen die Kits "TruSeq RNA Sample Preparation Kit", "Single-Read Cluster Generation Kit v4" und "TruSeq SBS Kit v5", alle vertrieben von Illumina, zur Verwendung. Die Sequenzierung im „single read“-Modus wurde auf dem „Genome Analyzer Iix“ (Illumina) durchgeführt. Die Proben beider Pflanzen konnten durch „multiplexen“ auf einem von insgesamt elf Hybridisierungsbereichen der Durchflusszelle vermessen werden. Die Sequenzierreaktion lief dabei über 100 Zyklen.

7.4. Datenanalyse RNA-Seq

Eine Liste mit nicht-redundanten Sequenzen der analysierten Proben konnte nun in der CLC Genomics Workbench v4.7.2 (CLC bio Germany) analysiert werden. Alle Sequenzen unter einer Länge von 30 Basen und über einer Länge von 200 Basen wurden aus dem Datensatz entfernt und die verbliebenen Sequenzen anschließend auf dem Genom von „*Candidatus* Phytoplasma mali“ Stamm AT (CU469464.1) als Referenz angeordnet („alignment“). Die auf dem Genom angeordneten Sequenzen werden auch als „tags“ bezeichnet. Die Standarteinstellungen der Software wurden bis auf zwei Ausnahmen beibehalten. (i) Die „length fraction“, also der Anteil einer Sequenz der mit der Referenz übereinstimmt, soll 95% und (ii) die „similarity“, d.h. die Ähnlichkeit der Sequenz zur Referenz, muss 100% betragen. Gene im Referenzgenom, auf denen Sequenzen, die diese Kriterien erfüllen, „aligned“ werden können, gelten als transkribiert. Über die Softwarefunktion „RNA-Seq-analysis“ werden die mit „tags“ abgedeckten im Genom annotierten proteincodierenden Gene bestimmt. Diese Funktion wurde mit Standarteinstellungen angewendet. Die so identifizierten proteincodierenden Phytoplasmagene wurden nach KEGG-Pathways [146] sortiert (<http://img.jgi.doe.gov/>). Als transkribiert bestimmte Gene für hypothetische Proteine wurden mittels Phobius (<http://phobius.sbc.su.se/>) [147], einem bioinformatischen Membrantopologie- und Signalpeptid-Vorhersagetool, analysiert. Weisen diese hypothetischen Proteine keine Transmembrandomäne aber ein Signalpeptid auf, werden sie vermutlich sekretiert.

7.5. Proteinanalysen

Neben der Verifizierung von Genprodukten auf der Ebene des Transkriptoms, kann diese auch auf der Ebene des Proteoms stattfinden. So waren in einer qualitativen Proteomanalyse von Phytoplasma-positiven Pflanzen, die von „*Candidatus* Phytoplasma mali“ Stamm AT exprimierten Proteine, zu bestimmen. Proteinisolate aus unterschiedlichen Geweben der drei Pflanzen ph^+ - *N. Oc.* Nr. 1-3 sind mit massenspektrometrischen Methoden analysiert worden.

Abgesehen von der Verifizierung von Genprodukten war es das Ziel pflanzliche Proteine zu identifizieren, die in Folge einer Phytoplasmainfektion verstärkt oder vermindert exprimiert werden. Um dies zu bewerkstelligen wurde eine quantitative Proteomanalyse durchgeführt, genauer das Dimethyl Labeling angewendet (7.5.5). Um verlässlich regulierte Proteine bestimmen zu können, ist Kenntnis über den linearen dynamischen Bereich der Labeling-Methode erforderlich (7.5.6.). Durch massenspektrometrische Analyse zweier Proben, in denen Proteine per se nicht differentiell exprimiert werden, sollten Regulationsschwellenwerte festgesetzt werden. Abschließend konnten nun durch vergleichende Analyse der Proteinisolate dreier Phytoplasma-positiver (ph^+ - *N. Oc.* Nr. 2-4) und dreier Phytoplasma-negativer Pflanzen (ph^- - *N. Oc.* Nr. 1-3) pflanzliche Proteine identifizieren werden, die in Folge einer Phytoplasmainfektion verstärkt oder vermindert exprimiert werden. Abbildung 8 soll als Gesamtüberblick über die im Folgenden beschriebenen Methoden dienen.

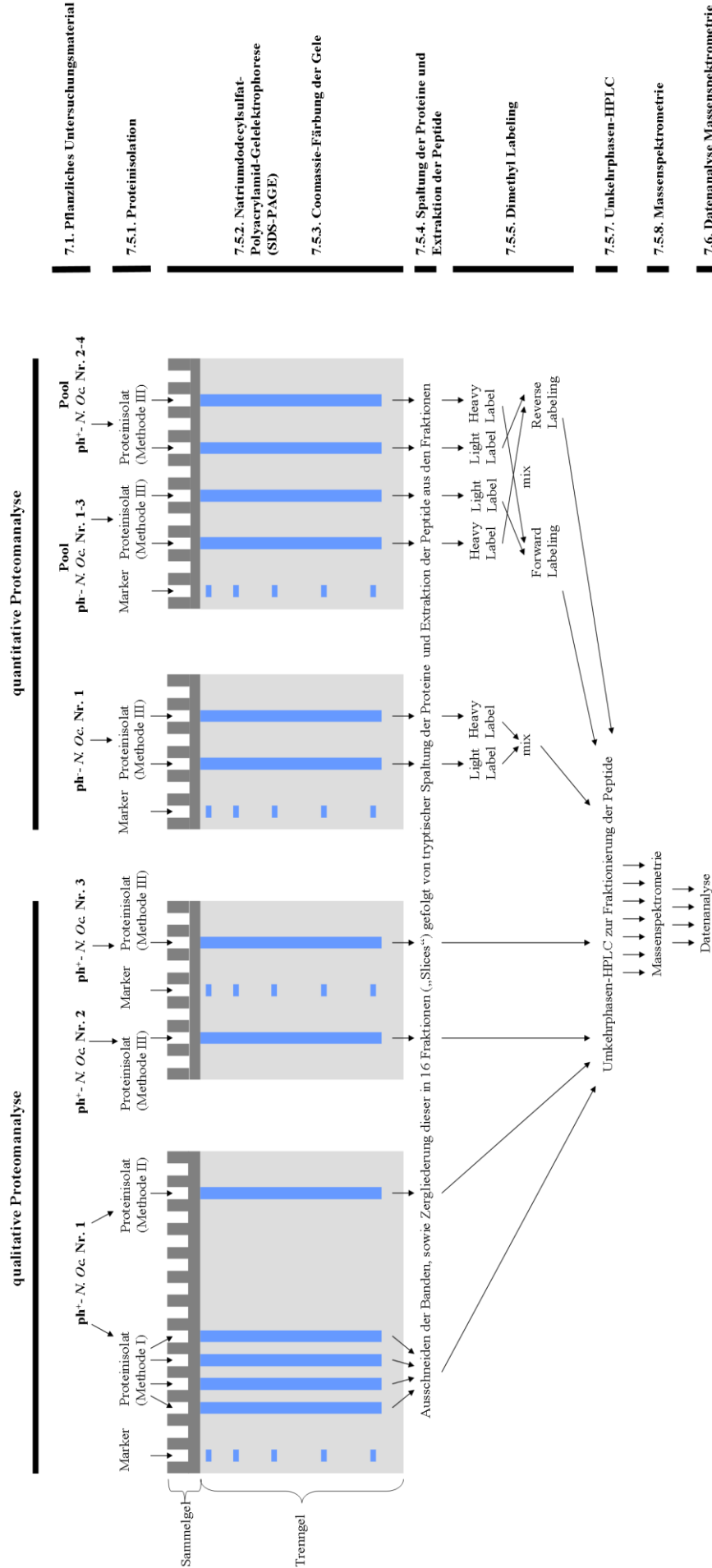


Abb.8. Proteinanalysen im Überblick. Durchgeführt qualitative und quantitative Untersuchungen auf der Gesamtproteomebene von Phytoplasma-positiven (ph⁺) und negativen (ph⁻) *Nicotiana occidentalis*-Pflanzen (N. oc.). Einzelne Schritte der Analysen sind abgebildet und werden unter dem entsprechenden Gliederungspunkt im Detail beschrieben.

7.5.1. Proteinisolation

Im ersten Schritt einer Proteomanalyse müssen die Proteine aus dem Ausgangsmaterial in Lösung gebracht werden. In einem quantitativen Proteomicsansatz ist insbesondere darauf zu achten, dass die in der Natur vorliegenden quantitativen Verhältnisse nicht durch die Isolation bzw. Probenvorbereitung verändert werden. Deshalb wird das zu untersuchende Material häufig in isotonischen Puffern bei neutralem pH-Wert und unter Zusatz diverser Proteaseinhibitoren homogenisiert bzw. lysiert und die Probe anschließend direkt gelelektrophoretisch aufgetrennt. Eine Fällung der Proteine vor ihrer elektrophoretischen Auftrennung hat den Vorteil, dass durch diesen Konzentrationsschritt mehr Proteine auf das Gel geladen werden können, jedoch verzerrt dies die quantitativen Verhältnisse der Proteine zueinander, da ein Protein unter den gewählten Bedingungen stärker als ein anderes präzipitieren kann.

Drei Proteinisolationmethoden wurden ausgewählt. Die Isolation der Proteine erfolgte wie in Tabelle 7 dargestellt, zum einen mit für die quantitative Proteomanalyse geeigneten Puffern (Lysepuffer I bzw. II, Methoden II und III) und zum anderen über ein kommerziell erwerbbares Kit („AllPrep DNA/RNA/Protein Mini Kit“ von Qiagen, Methode I), an dessen Ende eine Fällung der Proteine stattfindet.

Tab.7. Proteinisolationmethoden. Drei unterschiedliche Methoden wurden angewandt um aus unterschiedlichen Geweben Phytoplasma-positiver (ph^+) und negativer (ph^-) *Nicotiana occidentalis*-Pflanzen (*N. Oc.*) die Proteine für massenspektrometrische Untersuchungen zu extrahieren.

Pflanze	ph^+ - <i>N. Oc.</i> Nr. 1	ph^+ - <i>N. Oc.</i> Nr. 1	ph^+ - <i>N. Oc.</i> Nr. 2-4 und ph^- - <i>N. Oc.</i> Nr. 1-3
Gewebe	Sproß	Sproß	Blattrippen
Proteinisolationsmethode	Methode I	Methode II	Methode III
Reduktion und Alkylierung	nach SDS-PAGE	nach SDS-PAGE	vor SDS-PAGE

In der Proteinisolationmethode I erfolgte im ersten Schritt die Homogenisation von 60 mg Gewebe in 1,2 ml RLT-Puffer (Qiagen) in Meshbag (BIOREBA) unter Hilfe des Handhomogenisators (BIOREBA). 0,6 ml Homogenat wurden in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und 3 min bei 20000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde

auf die „AllPrep DNA spin column“ (Qiagen) transferiert. Es folgte die Zentrifugation der „AllPrep DNA spin column“ (Qiagen) für 30 s bei 10000 g. Die weitere Durchführung erfolgte entsprechend dem „AllPrep DNA/RNA/Protein Mini Kit“ (Qiagen) beiliegenden Protokoll und das Pellet wurde abschließend in 50 µl ALO-Puffer (Qiagen) resuspendiert. Die Proteinisolationmethode II startete mit dem Einfrieren von 250 mg Gewebe in flüssigem Stickstoff. Das Gewebe wurde anschließend nach Zugabe einer Stahlkugel im TissueLyser (Qiagen) zersetzt, in 500 µl Lysepuffer I (100 mM Tris / HCl pH 8, 2.5 mM EDTA, 2.5 mM EGTA, 4% SDS, 1x „Complete Protease Inhibitor Cocktail Tablets“ (Roche Diagnostics), 1 mM Phenylmethylsulfonyl Fluorid, 10 µM Pepstatin, 10 µM Leupeptin) aufgenommen und sonifiziert (UW2200 BANDELINelectronic). Dieses Homogenat ist anschließend für 15 min bei 20000 g und 4°C zentrifugiert worden um so jegliches unlösliches Material zu sedimentieren. Der Überstand ist für weitere Analysen eingesetzt worden. In Proteinisolationmethode III wurden 500 mg Gewebe in 1 ml Lysepuffer II (wie Lysepuffer I, nur zusätzlich 9M Urea) unter Verwendung eines Meshbags (BIOREBA) sowie des Handhomogenisators (BIOREBA) homogenisiert und lysiert. Das Lysat wurde anschließend entnommen und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Es folgte ein Zentrifugationsschritt für 15 min bei 20000 g und 4°C um jegliches unlösliches Material zu sedimentieren. Der Überstand wurde entnommen und das Pellet verworfen.

Die Komplexität der so gewonnenen Proben konnte mittels SDS-PAGE reduziert werden. Die Proben der Pflanzen ph^+ - *N. Oc.* Nr. 2-4 und ph^- - *N. Oc.* Nr. 1-3 wurden unmittelbar vor Aufgabe auf das SDS-PAGE-Gel reduziert und alkyliert (Tab.7). Im Gegensatz dazu sind die Proteine der Pflanze ph^+ - *N. Oc.* Nr. 1 erst nach ihrer Auftrennung im Gel reduziert und alkyliert worden (Tab.7). Die Proben zur Reduzierung und Alkylierung vor SDS-PAGE wurden mit 1:20 Volumen DTT (1M) versetzt und 30 min bei 60°C schüttelnd inkubiert. Der pH-Wert ist mit 0,5 M NaOH auf 7,5-8 eingestellt worden, woraufhin die Alkylierung durch Zugabe von 1:5 Volumen Iodacetamid (0,5 M) und die Inkubation der Proben schüttelnd unter Lichtschutz für 30 min bei 25°C erfolgte. Zur Reduzierung und Alkylierung der Proben nach ihrer SDS-PAGE-Auftrennung wurde das Gel wie unter 7.5.4. beschrieben fraktioniert. Vor Zugabe des Trypsin sind die Gelstückchen in 200 µl DTT (10 mM in 100 mM NH_4HCO_3) rehydriert und für 1 h bei 56°C inkubiert worden. Diesem Ansatz wurden 200 µl Iodacetamid (50 mM in 100 mM NH_4HCO_3) zugesetzt und Alkylierung erfolgte anschließend bei RT für 30 min. Die Gelstückchen sind durch Zugabe von 600 µl NH_4HCO_3 (100 mM) und Inkubation der

Proben für 15 min auf einem Schüttler gewaschen worden. Der Überstand wurde entfernt und die Proben mit 600 µl 20 mM NH_4HCO_3 /Acetonitril (50:50 v/v) gewaschen (15 min Inkubation auf Schüttler). Die Gelstückchen wurden mit 100 µl Acetonitril für 5 min dehydriert. Dem folgte abschließend die Entfernung des Acetonitrils in der SpeedVac. Die so reduzierten und alkylierten Proben sind wie unter 7.5.4. beschrieben dem tryptischen Verdau unterzogen worden.

7.5.2. Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Wanderung geladener Teilchen im elektrischen Feld, wie sie bei Elektrophoresen auftreten, kann zur Trennung komplexer Gemische von Proteinen genutzt werden. Zur Vermeidung von physikalischen Effekten wie Konvektion und Diffusion besteht die Möglichkeit, die Teilchen durch polymere Matrices wie z.B. Polyacrylamid wandern zu lassen. In diesem molekularen Sieb wandern Proteine unterschiedlich schnell in Abhängigkeit ihres Masse/Ladungsverhältnisses. Um zu erreichen, dass die Proteine lediglich in Abhängigkeit ihrer Größe aufgetrennt werden, muss man ihre Eigenladung überdecken. Dabei findet das anionische Detergens Natriumdodecylsulfat (SDS) Verwendung. Um das Aggregieren von Proteinen beim Eintritt in das Gel zu verhindern und schärfere Banden zu erhalten, wird die Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) diskontinuierlich betrieben (Disk-Elektrophorese). Dabei wird die Gelmatrix in zwei Bereiche aufgeteilt: in das weitporige Sammelgel mit 0,5 M Tris-HCL, pH 6,8 und das engporige Trenngel mit 1,5 M Tris-HCL, pH 8,8. Die Kombination aus unterschiedlichen Porengrößen und den verschiedenen Puffern sowie dem glycinhaltigen Probenladepuffer, ermöglicht die Isotachophorese im Sammelgel.

Die SDS-PAGE erfolgte nach Laemmli [148]. Nach Zusammenbau der Gelelektrophoresekammer, musste zunächst der Boden der Kammer versiegelt werden. 6 ml „Sealinggel“, aktiviert mit 2,4 µl TEMED und 60 µl 10% APS, wurden zum auspolymerisieren in den Boden gegossen. Danach konnten 30 ml Trenngel mit 12 µl TEMED und 300 µl 10% APS aktiviert und in die Kammer gegeben werden, ohne das es am Boden auslief. Zum Polymerisieren war das Gel mit ~ 2 ml Isopropanol zu überschichten, welches anschließend wieder abdekantiert wurde. Auf das fertige Trenngel wurden 6 ml Sammelgel, aktiviert mit 2,4 µl TEMED und 60 µl 10% APS, gegeben und zur Ausbildung der Taschen ein Kamm in ihm platziert. Die Kammer wurde nun mit SDS-

Laufpuffer befüllt, der Kamm entfernt und nach Spülen der Taschen 50 µl der denaturierten Proben bzw. 40 µl des Markers geladen. So mussten zunächst 41,7 µl der Proteinisolate, gewonnen mit den Methoden II und III (Tab.7), mit 8,3 µl 6x SDS-PAGE-Probenpuffer versetzt und 5 min bei 95°C inkubiert werden. Die Proben der Proteinisolate aus Methode I (Tab.7) waren bereits in Ladepuffer (ALO-Puffer, Qiagen) gelöst und konnten nach 5 minütiger Inkubation bei 95°C direkt geladen werden. Zur Identifizierung differentiell exprimierter pflanzlicher Proteine waren die Proben dreier Phytoplasma-positiver bzw. dreier Phytoplasma-negativer Pflanzen zu poolen. Dazu wurden jeweils 30 µl der Proteinisolate vereinigt, gemixt sowie die Proteine durch Zugabe von 22,69 µl 6x SDS-PAGE-Probenpuffer und Inkubation für 5 min bei 95°C denaturiert. An das Gel war für die ersten 20 Minuten eine Spannung von 100 V anzulegen, bevor diese für 1,5 h auf 200 V erhöht wurde. Als die Farbstofffront ca. 1 cm vor Ende des Gels angelangt war, wurde der Lauf abgebrochen. So konnte verhindert werden, dass Proteine aus dem Gel herauslaufen. Das Gel wurde vorsichtig entnommen und die Proteinbanden angefärbt.

7.5.3. Coomassie-Färbung der Gele

Zur Visualisierung der Proteinbanden in den Gelen mussten die Proteine angefärbt werden. Dabei kam der Triphenylmethanfarbstoff Coomassie-Brilliant Blau G250 zum Einsatz, welcher als blauer Komplex unspezifisch an fast alle Proteine bindet.

Die Gele waren nach Überschichten mit Färbelösung für 30 s in der Mikrowelle bei 600 Watt zu erhitzen und anschließend für 15-30 min bei RT zu inkubieren. Danach konnten die Färbelösung abdekantiert sowie das Gel mit Leitungswasser abgespült werden, bevor es mit Entfärberlösung bedeckt und erneut für 30 s in der Mikrowelle erhitzt wurde. Nach ca. 1-2 h erfolgte ein Wechsel der Entfärberlösung. Die Gele waren so über Nacht zu entfärben, bevor sie am Geldokumentationssystem eingescannt werden konnten.

7.5.4. Spaltung der Proteine und Extraktion der Peptide

Nach der Auftrennung der Proteinproben mittels SDS-PAGE, Coomassie-Färbung und Dokumentation des Gels wurden die Proteinbänder in 16 gleich große Streifen, genannt „Slices“, geschnitten. Gleiche „Slices“ der Quadruplikate der Pflanze ph⁺- *N. Oc.* Nr. 1

(Abb. 8) wurden vereinigt. Jeder Slice war zudem in ca. 1 mm x 1 mm kleine Stückchen zu zerteilen. Die Proben wurden entfärbt, indem sie 3x 30 min mit jeweils 1 ml 25 mM NH_4HCO_3 , Acetonitril (50% v/v) und abschließend über Nacht bei 4°C inkubiert wurden. Anschließend galt es die Gelstückchen mit 500 µl 50 mM NH_4HCO_3 pH 8 für 45 min bei RT zu inkubieren, bevor sie in 500 µl Acetonitril (75% v/v) für 10 min dehydriert und abschließend für 10 min in der SpeedVac getrocknet wurden. Nun folgte der Trypsinverdau der Proteine. 200-250 µl Trypsin, gelöst in 50 mM NH_4HCO_3 pH 8, waren jeder Probe so zuzusetzen, dass sich eine Konzentration von 3,125 ng/µl einstellte. Die Spaltung der Proteine mit der sequenzspezifischen Protease erfolgte über Nacht für ca. 16 h bei 37 °C und wasserdampfgesättigter Atmosphäre. Am nächsten Morgen erfolgte die Extraktion der Peptide. Der Überstand der Gelstückchen wurde in ein 1,5 ml „Protein-low binding“-Reaktionsgefäße (Eppendorf) überführt. Die Gelstückchen konnten nun mit 400 µl 60% Acetonitril in 0,5 % FA versetzt und 20 min bei RT inkubiert werden. Der Überstand war mit dem zuvor bereits abgenommenen zu vereinigen. Der Extraktionsschritt wurde mit 300 µl 100% Acetonitril wiederholt und der Überstand mit dem bereits entnommenen vereinigt. Die Peptide im Pool der Überstände konnten nun mittels SpeedVac soweit eingengt werden, bis keine Flüssigkeit mehr übrig blieb. An dieser Stelle war für die Proben zur quantitativen Proteomanalyse mit dem Isotopen Labeling (7.5.5.) fortzufahren. Zur qualitativen Proteomanalyse hingegen, mussten die eingengten Peptide in 20 µl 5% Acetonitril und 2% FA resuspendiert werden. Dem folgte eine Inkubation für 10 min auf dem Schüttler. Außerdem waren jegliche eventuell überführte Gelstückchen durch Zentrifugation für 10 min bei 20000 g und 4°C zu sedimentieren. 18 µl Überstand wurden in 0,5 ml „Protein-low binding“-Reaktionsgefäße (Eppendorf) überführt. Die Proben waren bis zur Injektion bei -20°C zu lagern.

7.5.5. Dimethyl Labeling

Die quantitative Analyse eines Proteoms ist ein immer wichtiger werdender Bestandteil von massenspektrometrie-basierten Proteomicsansätzen. Die am häufigsten verwendeten Methoden, zum Vergleich und zur präzisen Quantifizierung von Proteinmengen, basieren auf differentiellem Labeling mit Isotopen, wie es im angewendeten Dimethyl Labeling stattfindet.

Die zuvor in der SpeedVac eingedampften Peptide (7.5.4.) waren zunächst in 100 µl 100 mM TEAB-Puffer (Sigma Aldrich) zu resuspendieren. Das Labeling folgte Analog den Schritten 5A: i-viii des „In- Solution stable isotope dimethyl labeling protocols“ von Boersema und Kollegen [139]. Nach erneutem Einengen der nun gelabelten Peptide waren diese in 20 µl 5% Acetonitril und 2% FA aufzunehmen. Nach 10 minütiger Inkubation auf dem Schüttler wurden jegliche eventuell überführte Gelstückchen durch Zentrifugation (10 min bei 20000 g und 4°C) beseitigt. 18 µl des Überstandes sind in 0,5 ml „Protein-low binding“-Reaktionsgefäße (Eppendorf) überführt worden. Bevor jeweils 8 µl der differentiell gelabelten Proben im Verhältnis 1:1 (v:v), wie in Abbildung 8 dargestellt gemischt werden konnten, galt es Aliquote von 6 µl zu entnehmen und hinsichtlich der Vollständigkeit des Labelings zu überprüfen (7.6.5.). Alle Proben waren bis zur Injektion in das HPLC-System bei -20°C zu lagern.

7.5.6. BSA-Verdau und Labeling

Der dynamische Bereich des Dimethyl Labelings sollte evaluiert werden. Dazu war ein tryptischer BSA-Verdau aufzuteilen und differentiell zu labeln. Die gelabelten Peptide galt es nun in definierten Verhältnissen zu mischen sowie nach deren Fraktionierung im Massenspektrometer zu analysieren (Abb.9).

BSA (Sigma Aldrich) wurde eingewogen und in NH_4HCO_3 (50 mM, pH 8) gelöst, um 200 µl einer 0,4 µg/µl-konzentrierten BSA-Lösung zu erhalten. BSA war nun analog zum vor-SDS-PAGE-Ansatz (7.5.1.) zu reduzieren und alkylieren. Die Spaltung des BSA erfolgte mit 1,6 µg Trypsin über Nacht in wasserdampfgesättigter Atmosphäre. Anschließend musste der Ansatz so auf vier 1,5 ml „Protein-low binding“-Reaktionsgefäße (Eppendorf) aufgeteilt werden, das zwei Gefäße mit 25 µg und zwei mit 10 µg resultieren. 25 µg Protein ist die in dem Protokoll von Boersema und Kollegen [139] maximal angegebene Menge, die nach diesem Protokoll vollständig gelabelt werden kann. Eine Hälfte der Ansätze galt es nun mit dem Light Label (L) zu versehen, während die andere Hälfte das Heavy Label (H) erhielt. Die zuvor in der SpeedVac eingedampften Peptide waren dazu in 100 µl 100 mM TEAB-Puffer (Sigma Aldrich) zu resuspendieren. Das Labeling wurde nach den Schritten 5A: i-viii des „In- Solution stable isotope dimethyl labeling protocols“ von Boersema und Kollegen [139] durchgeführt. 25 µl der gelabelten Peptide waren nun zu aliquotieren um die Vollständigkeit des Labelings überprüfen zu können (7.6.5.).

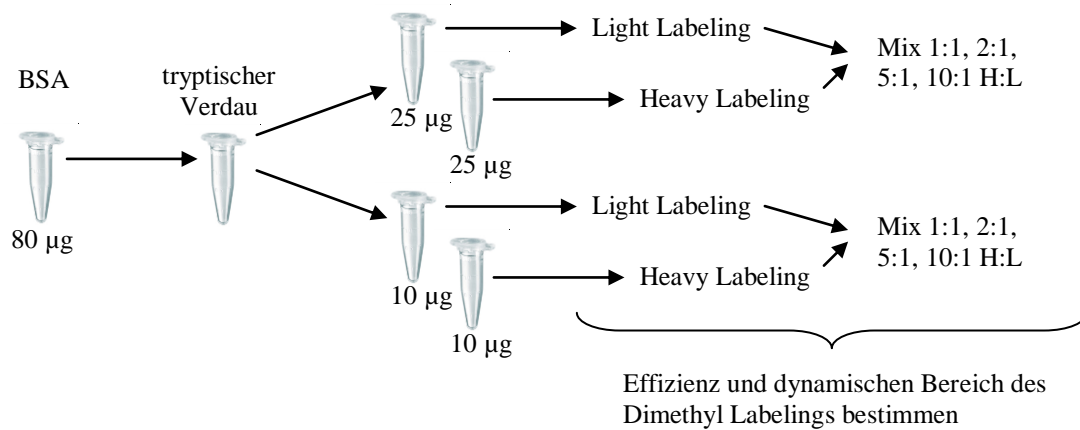


Abb.9. Versuchsablauf zur Bestimmung des linearen dynamischen Bereiches im Dimethyl Labeling.

Nun konnten die Peptide in definierten Verhältnissen gemischt werden: 1:1 (12,5 µl L + 12,5 µl H), 1:2 (8,33 µl L + 16,67 µl H), 1:5 (4,17 µl L + 20,83 µl H), 1:10 (2,27 µl L + 22,73 µl H). Alle Proben galt es nun unter Hilfe von Pierce[®] C18 Tips (Thermo Fisher) zu entsalzen. Die Durchführung erfolgte dabei mit einigen Ausnahmen wie in dem Kit beiliegenden Protokoll beschrieben: anstatt TFA wurde FA verwendet und jeder Schritt nicht wie beschrieben zweimal, sondern dreimal wiederholt. Die Peptide konnten dann in 50 µl 0,1% FA/80% ACN eluiert werden. 25 µl wurden entnommen und die Peptide nach einengen in der SpeedVac in 20 µl 2% ACN + 1% FA resuspendiert. Die so behandelten Proben konnten abschließend wie unter Abschnitt 7.5.7. und 7.5.8. beschrieben gemessen werden.

7.5.7. Umkehrphasen-HPLC

Die Fraktionierung der Peptide erfolgte basierend auf deren Hydrophobizität mittels Umkehrphasen (RP)-HPLC. Zum Einsatz kam dabei das Agilent 1200 Series HPLC-System (Agilent Technologies). Das System war ausgestattet mit einer ca. 15 cm langen selbst gepackten C18 RP-Säule (New Objective; Dr. Maisch). 4-8 µl der Proben (Tab.10 sowie Anhang Tab.A7) wurden in das HPLC-System injiziert und über die Säule bei einer Flussrate von 0,2 µl/min aufgetrennt. Als mobile Phase dienten 2% ACN + 0,1 % FA

(Puffer A) bzw. 98% ACN + 0,1 % FA (Puffer B) wobei die in Tabelle 8 und 9 dargestellten Gradienten gefahren wurden.

Tab.8. Elutionsprofil der RP-HPLC zur Fraktionierung der Peptide. Puffer A (2% ACN + 0,1 % FA) wird kontinuierlich von Puffer B (98% ACN + 0,1 % FA) verdrängt.

t [min]	% Puffer B
0	2,5
14	7
94	20
114	27
139	40
143,1	50
145	90
151	90
154	0

Tab.9. Elutionsprofil der RP-HPLC zur Fraktionierung der BSA-Peptide. Puffer A (2% ACN + 0,1 % FA) wird kontinuierlich von Puffer B (98% ACN + 0,1 % FA) verdrängt.

t [min]	% Puffer B
0	4
44	33
48	40
48.1	90
53	90
55	0

7.5.8. Massenspektrometrie

Die massenspektrometrische Analyse der unter 7.5.7. fraktionierten Peptide, erfolgte unter Verwendung des LTQ Orbitrap XL ETD™-Systems von Thermo Scientific (Abb. 10). Durch die am Emitter angelegten 1,8 keV ist ein stabiles Spray erzeugt worden. Die Massen der Peptide wurden im Orbitrap-Massenanalysator im Bereich 300-2000 m/z mit einer Auflösung von 60.000 gemessen. Für die Fragmentierung der zehn intensivsten Vorläuferionen (im Folgenden als „Top10-CID“-Methode bezeichnet), mit einer Ladung ≥ 2 und einem Signal von mindestens 500 „counts“, wurde ein Isolationsfenster von ± 1 m/z gewählt. Die „Collision Induced Dissociation (CID)“ erfolgte im LTQ-Massenanalysator mit einer Breitbandaktivierung („Wide Band Activation“) der Vorläuferionen, einer Kollisionsenergie von 35 und einer Aktivierungszeit von 30 ms. Bereits fragmentierte Massen wurden dynamisch für 60 s ausgeschlossen. Zur Erhöhung der Anzahl an identifizierten Proteinen sind Proben zweimal in das HPLC-System injiziert und im Massenspektrometer gemessen worden (Tab.10). In der zweiten Messung der Proben der Pflanzen ph^+ - N. Oc. Nr. 2 und 3 erfolgte die Wahl der zehn intensivsten

Massen unter Verwendung einer Ausschlussliste, wie sie unter 7.6.3 beschrieben erstellt wurde (im Folgenden auch als „Top10-CID-Excl“-Methode bezeichnet, Tab.10). Die Daten werden im RAW-Format ausgegeben. Tabelle 10 gibt eine Übersicht, die zusammenstellt welche Messmethoden zur Analyse der unterschiedlichen Proben verwendet wurden.



Abb.10. Das LTQ Orbitrap XL ETD™-System (Thermo Scientific) des Max Planck Instituts für molekulare Genetik Berlin. (a) Das System ist gekoppelt mit dem Agilent 1200 Series HPLC- System (Agilent Technologies) (b) die eluierten Peptide werden über einen Emitter und die NanoSpray ion source (Thermo Scientific) in das Massenspektrometer injiziert.

Tab.10. Überblick Messmethoden. Die Proben für die Versuche wurden aus unterschiedlichen Pflanzen über drei Proteinisolationmethoden gewonnen. 4-8 µl sind in das HPLC-System injiziert und anschließend mit den angegebenen Messmethoden massenspektrometrisch analysiert worden. Daraus resultierten 8 verschiedene Datensätze mit einem Umfang von 8-33 RAW-Dateien.

Versuch	Probe	Proteinisolationsmethode	Injektionsvolumen [µl]	RAW-Dateien	Methode 1. Messung	Methode 2. Messung
qualitative Proteomanalyse	ph ⁺ - <i>N. Oc.</i> Nr. 1	Methode I	4-6	33	Top10-CID	Top10-CID
	ph ⁺ - <i>N. Oc.</i> Nr. 1	Methode II	4-6	32	Top10-CID	Top10-CID
	ph ⁺ - <i>N. Oc.</i> Nr. 2	Methode III	4	32	Top10-CID	Top10-CID-Excl
	ph ⁺ - <i>N. Oc.</i> Nr. 3	Methode III	4	32	Top10-CID	Top10-CID-Excl
linearer dynamischer Bereich	BSA	-	8	8	Top10-CID	-
Schwellenwertbestimmung	ph ⁻ - <i>N. Oc.</i> Nr. 1	Methode III	4	16	Top10-CID	-
quantitative Proteomanalyse	„Forward Labeling“	Methode III	4	28	Top10-CID	Top10-CID
	„Reverse Labeling“	Methode III	4	32	Top10-CID	Top10-CID

7.6. Datenanalyse Massenspektrometrie

7.6.1. Datenbanken

Zur Auswertung erzeugter Massenspektren müssen Datenbanken mit sämtlichen Sequenzen der Proteine, die möglicherweise in Proteinproben vorkommen, erstellt werden. Aus diesen Sequenzen werden durch die Software theoretische Massenspektren generiert und den gemessenen Massenspektren zugeordnet. Auf diese Weise findet die Proteinidentifikation statt.

Die erste Datenbank zur Analyse der Massenspektren generiert aus den Proben der Phytoplasma-positiven und negativen Pflanzen, enthielt die Aminosäuresequenzen der Proteine von *Nicotiana occidentalis*, „*Candidatus* Phytoplasma mali“ Stamm AT sowie bisher im Genom des Phytoplasma nicht annotierte Proteine. Da bisher nur wenige

Nicotiana occidentalis-Proteine beschrieben wurden, waren sämtliche Proteine der Gattung *Nicotiana* zur Auswertung zu verwenden. So wurden zum einen die FASTA-Formate der 9002 *Nicotiana*-Proteinsequenzen (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) und der 497 proteincodierenden Sequenzen von „*Candidatus* Phytoplasma mali“ Stamm AT (CU469464.1) zu einer FASTA-Datei vereinigt. Zum anderen waren alle 13080 „Open Reading Frames“, abgeleitet aus dem Genom von „*Candidatus* Phytoplasma mali“ Stamm AT (CU469464.1), die für Aminosäuresequenzen mit einer Mindestlänge von 20 Aminosäuren codieren zu dieser Datei hinzuzufügen. Nun konnte die Datei in Andromeda unter dem Reiter „Sequences“ geladen und so die „Target - Decoy“-Datenbank, im Folgenden als Phytoplasma-Datenbank bezeichnet, erzeugt werden.

Eine zweite „Target - Decoy“-Datenbank war zur Auswertung der Versuche mit BSA (7.5.6.) zu erstellen. Dazu musste der bovine Datensatz (v3.54) der „International Protein Index (IPI)“-Datenbank für Proteomics Experimente (<http://www.ebi.ac.uk/IPI>) [149] geladen und wie oben beschrieben mittels Andromeda die „Target – Decoy“-Datenbank, im Weiteren der Einfachheit halber BSA-Datenbank genannt, erzeugt werden.

Beide Datenbanken enthielten auch eine Liste häufig auftretender Kontaminationen (z.B. Keratine; www.maxquant.org). Identifizierte Kontaminationen wurden am Ende von den Analysen der Datensätze (7.6.3-7.) ausgeschlossen.

7.6.2. MaxQuant-Software

Die Auswertung der acht mittels LTQ Orbitrap XL ETDTM-Massenspektrometrie generierten 8-33 RAW-Dateien umfassenden Datensätze erfolgte unter Verwendung der MaxQuant v1.1.1.25-Software. Die Standardeinstellungen der Software wurden, bis auf die in Tabelle 11 gezeigten Ausnahmen, übernommen und eine „False Discovery Rate (FDR)“ auf Peptid- und Proteinebene von 1% angewendet. Die Ergebnisse der Analysen liefert die MaxQuant-Software in Form unterschiedlicher *.txt-Dateien. Von diesen wurden die proteingroups.txt- und evidence.txt- Datei für weitere Auswertungen verwendet. Die proteingroups.txt- Datei listet sämtliche Proteinidentifikationen auf und die evidence.txt- Datei hingegen die den Proteinen zugeordneten Peptide.

Tab.11. Ausgewählte MaxQuant-Softwareparameter. Die acht Datensätze, welche vier verschiedenen Versuchen zuzuordnen sind, wurden in der MaxQuant v1.1.1.25-Software mit einzelnen Ausnahmen unter Standardeinstellungen analysiert. Eine Auswahl der Parameter und alle Änderungen der Standardeinstellung sind aufgelistet.

Versuch	qualitative Proteom-analyse	linearer dynamischer Bereich	Schwellenwert-bestimmung	quantitative Proteomanalyse
Datenbank	Phytoplasma-Datenbank	BSA-Datenbank	Phytoplasma-Datenbank	Phytoplasma-Datenbank
Enzym	Trypsin	Trypsin	Trypsin	Trypsin
verpasste Spaltungen	3	2	3	3
variable Protein-modifikationen	Oxidation am Methionin; Acetylierung am Protein-N-term	Oxidation am Methionin; Acetylierung am Protein-N-term	Oxidation am Methionin; Acetylierung am Protein-N-term	Oxidation am Methionin; Acetylierung am Protein-N-term
fixe Protein-modifikationen	Carbamido-methylierung am Cystein	Carbamido-methylierung am Cystein	Carbamido-methylierung am Cystein	Carbamido-methylierung am Cystein
min. Peptidlänge	6	6	6	6
min. "Unique Peptides"	1	0	1	2
Peptid-"FDR"	0,01	0,01	0,01	0,01
Protein-"FDR"	0,01	0,01	0,01	0,01
max. Peptid-"PEP"-Wert	1	1	1	1
MS/MS-Toleranz [Da]	0,5	0,5	0,5	0,5
Label	-	DimethLys0; DimethNter0/ DimethLys4; DimethNter4	DimethLys0; DimethNter0/ DimethLys4; DimethNter4	DimethLys0; DimethNter0/ DimethLys4; DimethNter4
Peptide, verwendet für Quantifizierung	-	alle Peptide	"Unique Peptides"	"Unique Peptides"
erlaubte Modifikationen der Peptide, die für Quantifizierung verwendet wurden	-	unmodifizierte Peptide, Oxidation am Methionin, Acetylierung am Protein-N-term, Carbamido-methylierung am Cystein	unmodifizierte Peptide, Oxidation am Methionin, Acetylierung am Protein-N-term, Carbamido-methylierung am Cystein	unmodifizierte Peptide, Oxidation am Methionin, Acetylierung am Protein-N-term, Carbamido-methylierung am Cystein

7.6.3. Erzeugen von Ausschlusslisten

Die Anzahl an identifizierten Proteinen in einer Probe kann durch mehrmaliges Messen erhöht werden. Bei der zweiten Injektion der Probe ist die Wahrscheinlichkeit hoch, dass abundante, bereits identifizierte Peptide erneut für die Fragmentierung ausgewählt werden. Um das zu unterbinden kann eine Ausschlussliste erstellt werden. Dabei werden die Massen bzw. Peptide, die unter bestimmten Kriterien bereits bei der ersten Injektion zu einer Peptididentifizierung geführt haben, von der erneuten Messung ausgeschlossen. Die aus der ersten Messung der Probe eines „Slices“ entstandene einzelne RAW-Datei, war in MaxQuant v1.1.1.25 zu laden und unter Verwendung der Phytoplasma-Datenbank und den versuchsspezifischen Softwareeinstellungen (Tab.11) auszuwerten. Aus den generierten *.txt-Dateien wurde die evidence.txt ausgewählt und in Excel geöffnet. Diese enthält neben einigen weiteren Informationen, sämtliche Masse/Ladungsverhältnisse der zur Fragmentierung ausgewählten Vorläuferionen. Alle Peptide die die Anforderungen „PEP“ $\leq 0,01$ und „Score“ ≥ 30 nicht erfüllten, wurden aus dem Datensatz entfernt. Die Anwesenheit eines Peptids in der gemessenen Probe gilt als nachgewiesen, wenn dessen Massenspektrum zur Identifizierung mit einem „PEP“-Wert von unter 0,01 und einem „Score“ von über 30 führte. Deshalb wurden die zu diesem Peptid gehörenden „m/z“-Werte behalten, sowie für die Retentionszeit („Retention Time“) ein Fenster von ± 5 min festgesetzt. Die so erstellte Liste im *.txt-Format konnte in Xcalibur, der Software des LTQ Orbitrap XL ETD™-Systems, geladen werden. Bei der erneuten Injektion dieser Probe erfolgte nun die Messung mittels Ausschlussliste.

7.6.4. Analyse der Datensätze der qualitativen Proteomanalyse

Vier verschiedene Datensätze wurden aus den Pflanzen ph^+ - *N. Oc.* Nr. 1, ph^+ - *N. Oc.* Nr. 2 und ph^+ - *N. Oc.* Nr. 3 generiert (Tab.10). Diese umfassten dabei 32 bzw. 33 RAW-Dateien (Tab.10). Jeder dieser Datensätze wurde einzeln mittels MaxQuant v1.1.1.25 unter Verwendung der Phytoplasma-Datenbank und der entsprechenden Softwareparameter (Tab.11: qualitative Proteomanalyse) ausgewertet. Ein Protein gilt als „identifiziert“, wenn mindestens zwei Peptide, wovon eines nur diesem Protein zuordenbar ist („Unique Peptide“), gefunden wurden. Die identifizierten Phytoplasma-

Proteine konnten, wie bereits unter 7.4. beschrieben, funktionellen Gruppen zugeordnet und die hypothetischen Proteine hinsichtlich ihrer Lokalisation untersucht werden.

7.6.5. Ermittlung der Labelingeffizienz

Zur relativen Quantifizierung der pflanzlichen Proteine in Phytoplasma-positiven und negativen *Nicotiana occidentalis*-Pflanzen kam die Dimethyl Labeling-Strategie zum Einsatz (7.5.5.). Zur exakten Quantifizierung ist es notwendig jedes Peptid mit einem Dimethyl Label zu versehen. Der Grad dieser Vollständigkeit des Labelings, die Labeling-Effizienz, war für ausgewählte Reaktionsansätze aus 7.5.5. und 7.5.6. (Anhang Tab.A7) zu bestimmen. Die RAW-Dateien der gelabelten Proben wurden zweimal in der MaxQuant-Software unter Verwendung der Phytoplasma-Datenbank und den versuchsspezifischen Einstellungen (Tab.11) analysiert: (i) mit der Einstellung „Singlets“ → „no label“ und (ii) mit der Einstellung „Singlets“ → „Light Label“ (DimethLys0; DimethNter0) bzw. „Heavy Label“ (DimethLys4; DimethNter4). Die Peptidanzahl n wurde der evidence.txt-Datei entnommen und die Labelingeffizienz E nach folgender Formel berechnet:

$$E = \frac{n_{no\ Label} * 100\%}{n_{no\ Label} + n_{Label}}$$

Eine Labeling-Effizienz $\geq 90\%$ wurde als ausreichend erachtet.

7.6.6. Bestimmung der Schwellenwerte für eine signifikante Proteinregulation

Das Proteinisolat von Pflanze ph⁻ *N. Oc.* Nr. 1 wurde in einem Duplikat für die massenspektrometrische Analyse vorbereitet, differentiell Dimethyl-gelabelt und gemessen. Der 16 RAW-Dateien umfassende Datensatz (Tab.10) ist in MaxQuant v1.1.1.25 analysiert worden. Zum Einsatz kamen dabei die Phytoplasma-Datenbank und Softwareeinstellungen wie in Tabelle 11 unter „Schwellenwertbestimmung“ gezeigt. Nach Öffnen der proteingroups.txt-Datei in Excel zeigte sich, welche Proteine mit welcher H/L-Ratio, nach Normalisierung aller Ratios über den Median, identifiziert werden konnten. Nur solche Proteine, die mit mindestens zwei nur diesem zuordenbaren Peptiden („Unique

Peptide“) identifiziert und einer H/L-Ratio versehen waren, wurden in weitere Auswertungen einbezogen. Die Verteilung der Log₂-transformierten H/L-Ratios aller Proteine zeigte sich im Histogramm und wurde auf Standardnormalverteilung zum Signifikanzniveau $\alpha=0,5$ getestet. Dafür wurde die Software GraphPad Prism v.5 (GraphPad Software, Inc.) und der Test “d’Agostino and Pearson omnibus normality test“ verwendet. Anhand der Verteilung wurden die Schwellenwerte empirisch so festgelegt, dass über 95% aller gemessenen Ratios in den nichtregulierten Bereich fallen.

7.6.7. Analyse der Datensätze der quantitativen Proteomanalyse

Zur Ermittlung der pflanzlichen Proteine, die in Folge einer Phytoplasmainfektion reguliert werden, ist eine quantitative Proteomanalyse durchgeführt worden. Um Proteinmengen aus Phytoplasma-positiven Pflanzen mit denen aus Phytoplasma-negativen Pflanzen vergleichen zu können, kam das Dimethyl Labeling zum Einsatz (7.5.5. und Abb.8). Aus „Forward“ und „Reverse Labeling“ der Proben mit anschließender massenspektrometrischer Analyse der Proteingemische konnten zwei 28 bzw. 32 RAW-Dateien umfassende Datensätze (Tab. 10), generiert werden. Diese zwei Datensätze waren nun unter Verwendung der MaxQuant v1.1.1.25-Software, der Phytoplasma-Datenbank und der in Tabelle 11 („quantitative Proteomanalyse“) gezeigten Softwareparameter zu analysieren. Die proteingroups.txt-Dateien beider MaxQuant-Analysen waren in Excel zu vereinigen. Diese vollständige Liste identifizierter Proteine konnte nun weiter untersucht werden. Proteine, die mit einer normalisierten H/L-Ratio identifiziert wurden, waren hinsichtlich ihres Auftretens in sowohl „Forward“- als auch „Reverse“-Datensatz zu untersuchen. Diese Liste an überlappenden Proteinidentifikationen war zunächst einer Korrelationsanalyse zu unterziehen (Abb. 11). Dabei ist das Bestimmtheitsmaß r nach Pearson als Maß für die lineare Abhängigkeit der H/L-Ratios in beiden Datensätzen berechnet worden (Abb. 11). Proteine, die in beiden Datensätzen nach dem unter 7.6.6. ermittelten Schwellenwerten als in infizierten Pflanzen hoch bzw. runter oder nicht reguliert galten, waren zu entnehmen und weiter zu analysieren. Basierend auf den unter dem entsprechenden NCBI-Eintrag (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) der Proteine gemachten Angaben, konnten diese funktionellen Gruppen zugeordnet werden. Abschließend sind ausgewählte Proteine in metabolischen Stoffwechsel-Karten für *Arabidopsis thaliana* (<http://www.metacyc.org/>) dargestellt worden (Pathway- Mapping).

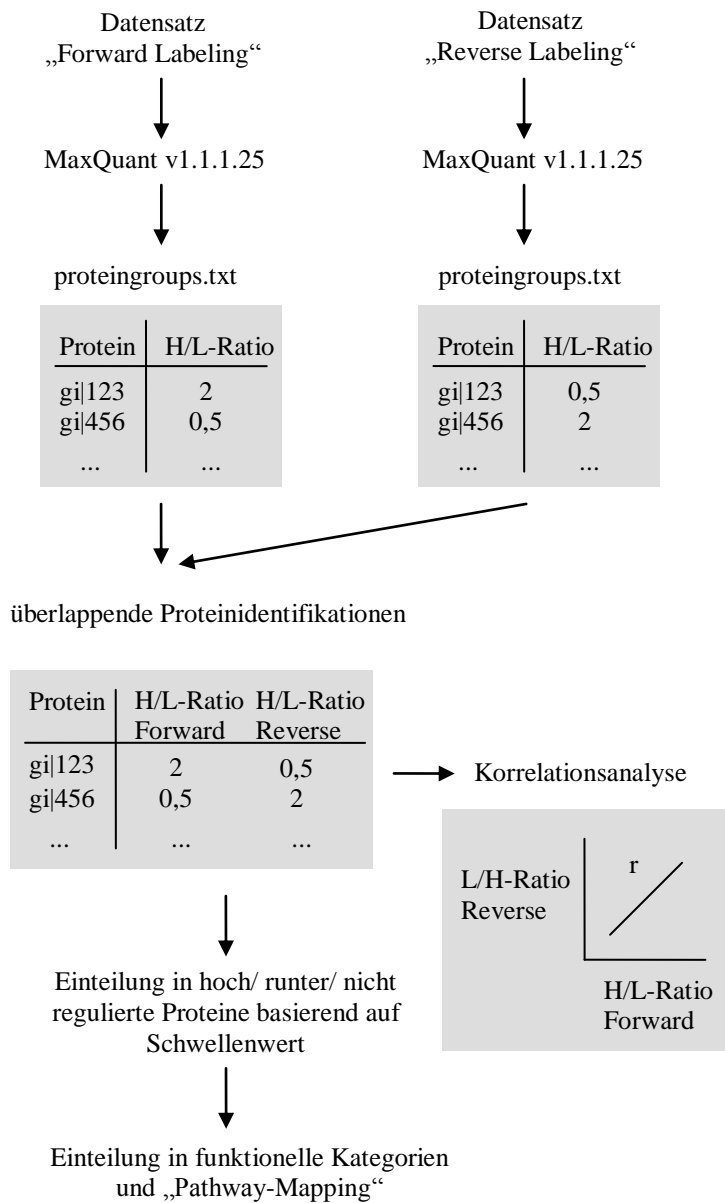


Abb.11. Analyseablauf zur Auswertung der quantitativen Proteomdaten. Analyse der Datensätze aus Forward und Reverse Labeling erfolgte in der MaxQuant-Software woraufhin eine Liste überlappender Proteinidentifikationen erstellt wurde. Diese Liste ist einer Korrelationsanalyse unterzogen worden. Nach dem zuvor ermittelten Schwellenwert wurden die Proteine in hoch/runter/nicht reguliert eingeteilt. Analyse der funktionellen Kategorien und ein „Pathway-Mapping“ fanden statt.

8. Ergebnisse

8.1. Infektion von *Nicotiana occidentalis*-Pflanzen mit „*Candidatus* Phytoplasma mali“ Stamm AT

Nicotiana occidentalis-Pflanzen und mit „*Candidatus* Phytoplasma mali“ Stamm AT-infizierte *Nicotiana occidentalis*-Pflanzen wurden am Julius- Kühn- Institut für Pflanzenschutz im Obst- und Weinbau Dossenheim (Arbeitsgruppe Seemüller) gezüchtet. Insgesamt drei Phytoplasma-negative und vier Phytoplasma-positive Pflanzen sind in den Versuchen eingesetzt worden (Abb. 12).

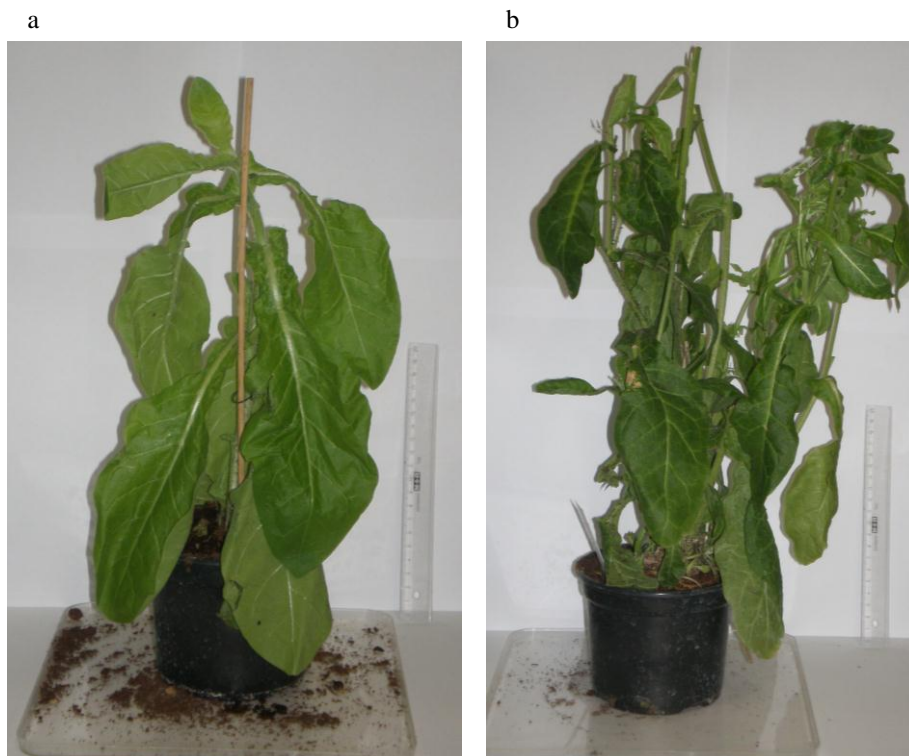


Abb.12. Pflanzliches Untersuchungsmaterial. (a) *Nicotiana occidentalis* (b) *Nicotiana occidentalis* infiziert mit „*Candidatus* Phytoplasma mali“ Stamm AT. Abbildung beispielhaft für sämtliche untersuchte Pflanzen.

Alle vier infizierten Pflanzen zeigten im Vergleich zu den nicht infizierten, deutliche Symptome einer Phytoplasmainfektion, wie z.B. kleinere Blätter und eine freie Verzweigung (Hexenbesenformation) (Abb.12 b). Diese waren bei der Pflanze ph⁺- *N. Oc.* Nr. 1 am stärksten ausgeprägt (Tab.5). Die nicht infizierten Pflanzen zeigten keinerlei phytoplasmaspezifischen Symptome (Abb.12 a).

Zusätzlich zu den am Julius-Kühn-Institut für Pflanzenschutz im Obst- und Weinbau Dossenheim (Arbeitsgruppe Seemüller) durchgeführten Tests, sind die Pflanzen ph^- *N. Oc.* Nr. 1-3 nach ihrer Zustellung zum Max Planck Institut für molekulare Genetik, mittels

Tab.12. Ergebnis der DNA-Isolation. DNA aus Phytoplasma-negativen (ph^-) *Nicotiana occidentalis*- (*N. Oc.*) Pflanzen extrahiert mit dem „DNeasy Plant Mini Kit“ (Qiagen).

Pflanze	DNA-Konzentration [ng/μl]
ph^- <i>N. Oc.</i> Nr. 1	21,4
ph^- <i>N. Oc.</i> Nr. 2	31,3
ph^- <i>N. Oc.</i> Nr. 3	28,1

P1/P7-PCR auf eine Infektion mit Phytoplasmen getestet worden.

Die DNA wurde isoliert (7.2.1.), im NanoDrop die Konzentration gemessen (Tab.12) und als Templat in der P1/P7-PCR eingesetzt. Die PCR-Produkte wurden anschließend gelelektrophoretisch in einem 1%-igem Agarosegel der Größe nach aufgetrennt (Abb. 13). Die Positivkontrolle zeigte bei ca. 1,8 kb eine starke Bande, die bei den anderen Proben nicht vorhanden war. Alle Proben, bis auf die Negativkontrolle, wiesen bei ca. 2,2 kb eine schwache Bande auf.

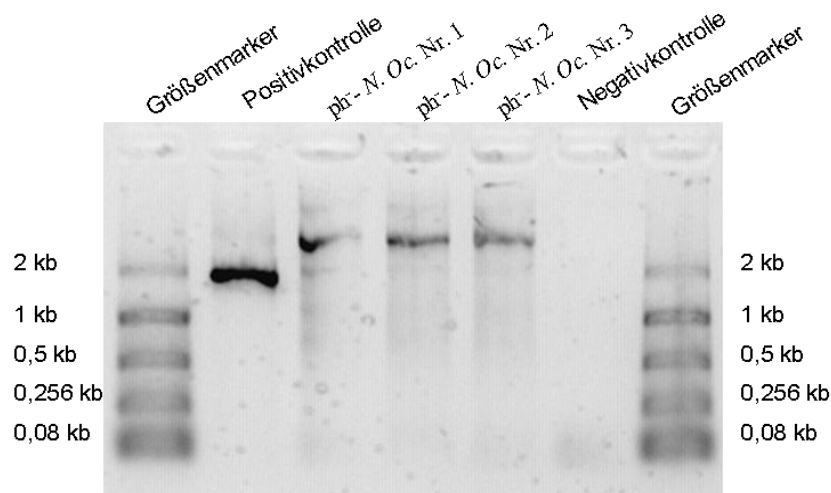


Abb.13. TBE-Agarosegelelektrophorese der P1/P7-PCR-Produkte. Als Positivkontrolle wurde DNA des „*Candidatus Phytoplasma mali*“ Stamm 1/93 verwendet, als Negativkontrolle H_2O . Die Proben stammen aus „*Candidatus Phytoplasma mali*“ Stamm AT-negativen *Nicotiana occidentalis* Pflanzen (ph^- *N. Oc.*).

8.2. Transkriptomanalyse

Zur Charakterisierung des in cDNA umgeschriebenen Transkriptoms von „*Candidatus* Phytoplasma mali“ Stamm AT kam RNA-Seq, eine „next generation sequencing (NGS)“-Technik, zum Einsatz. Dazu müssen ausreichende Mengen an RNA aus „*Candidatus* Phytoplasma mali“ Stamm AT-positiven *Nicotiana occidentalis*-Pflanzen isoliert, aufbereitet und nach Erstellung von cDNA-Bibliotheken in der Sequenzierreaktion eingesetzt werden. Das Auswerten der erzeugten Daten erfolgte mittels der Software CLC Genomics Workbench (CLC bio Germany).

8.2.1. Probenvorbereitung

Aus 400 mg Blattrippenausgangsmaterial der Pflanzen ph^+ - *N. Oc.* Nr. 3 und Nr. 4 konnten mit Solution D-Extraktion (7.3.1.) 10 bzw. 16,5 μ g rDNase-verdaute RNA gewonnen werden. Die RNA-Integrität war zufriedenstellend (Abb.14 a und c).

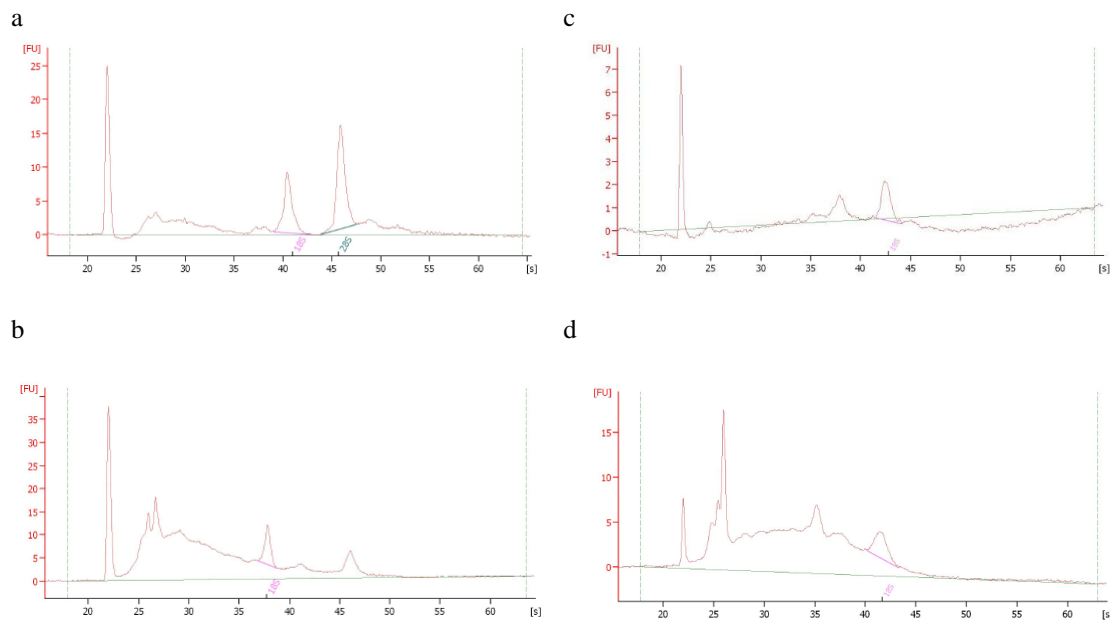


Abb.14. Elektropherogramme der RNA-Seq-Proben. 2 ng RNA wurden unter Verwendung des Agilent RNA 6000 Pico Kits im Agilent 2100 Bioanalyzer (eukaryote mode) eingesetzt. **(a)** rDNase-verdaute RNA der Pflanze ph^+ - *N. Oc.* Nr. 3. **(b)** rRNA-abgereicherte RNA der Pflanze ph^+ - *N. Oc.* Nr. 3. **(c)** rDNase-verdaute RNA der Pflanze ph^+ - *N. Oc.* Nr. 4. **(d)** rRNA-abgereicherte RNA der Pflanze ph^+ - *N. Oc.* Nr. 4.

Nach Abreicherung der pflanzlichen ribosomalen RNAs wurden aus 5 bzw. 6,6 µg der rDNase verdauten RNA 0,99 bzw. 1,9 µg gewonnen. Die Integrität der RNA nach Entfernung der pflanzlichen ribosomalen RNAs ist in Elektropherogrammen dargestellt (Abb. 14 b und d). In Abbildung b und d ist im Vergleich zu a und c bei ca. 40 und 46 Sekunden eine Abnahme der Fluoreszenz zu verzeichnen.

8.2.2. RNA-Seq

Die vorbereiteten Proben sind an die Servicegruppe des Max Planck Instituts für molekulare Genetik „Next Generation Sequencing“ von Bernd Timmermann übergeben worden. Die Servicegruppe erstellte die cDNA-Bibliotheken und führte die Sequenzierreaktion in einem massiven, parallelen Ansatz auf dem „Genome Analyzer IIx“ (Illumina), nach „multiplexen“ beider Proben, durch. Die Analyse der erhaltenen Daten erfolgte in der CLC Genomics Workbench v4.7.2 (CLC bio Germany). Die Sequenzierung lieferte einen Satz an 20.608.391 (ph⁺- *N. Oc.* Nr. 3) und 17.043.759 (ph⁺- *N. Oc.* Nr. 4) nicht redundanten Sequenzen. Nach Filterung hinsichtlich Sequenzlänge (30bp ≤ x ≤ 200bp) reduzierte sich der Satz auf 20.533.460 (ph⁺- *N. Oc.* Nr. 3) und 16.967.577 (ph⁺- *N. Oc.* Nr. 4) Sequenzen, die anschließend auf dem Genom von „*Candidatus* Phytoplasma mali“ Stamm AT (CU469464.1) als Referenz nach bestimmten Kriterien „aligned“ wurden. Die daraus resultierende „tag“-Anzahl betrug 1258. Durch Nutzung der RNA-Seq-Funktion der Software sind insgesamt 117 der 497 proteincodierenden Gene als transkribiert bestimmt worden. Die funktionelle Verteilung der identifizierten Gene ist in Abbildung 15 zu sehen. Die Einteilung erfolgte dabei nach Stoffwechselwegkarten für „*Candidatus* Phytoplasma mali“ Stamm AT wie sie in KEGG („Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes“)-Datenbanken zu finden sind. Eine detaillierte Liste aller Gene befindet sich im Anhang (Tab.A1).

Mit einem Anteil von 32% an den 117 proteincodierenden Genen konnte ein Großteil keiner funktionellen Kategorie zugeordnet werden (Abb.15: „nicht verbunden mit KEGG-Pathways“). 38 proteincodierende Gene ohne Funktionszuweisung bilden die zweitgrößte Kategorie. Womöglich können vier davon (Locus tags ATP_00147, ATP_00189, ATP_00414 und ATP_00451) aus dem Cytoplasma des Phytoplasma geschleust und in die Umgebung im Pflanzenwirt sekretiert werden (Abb.15 und Anhang Tab.A1). Dies zeigten bioinformatische Analysen der Proteinsequenzen mittels Phobius. So besitzen

diese Proteine Signalsequenzen des sec-abhängigen Translokationssystems aber keine Transmembrandomänen. Es wurden ebenfalls Bestandteile des Sekretionssystems identifiziert (*secY*, *groEL* und *grpE*). Der Großteil der identifizierten proteincodierenden Gene ohne Funktionszuweisung wird höchstwahrscheinlich nicht sekretiert (Abb.15: „nicht-sekretorische hypothetische Proteine“). Als interessante Transporter wurden *mleP* (Malate/Na⁺-Symporter) und Bestandteile von ABC-Transportern für den Import von Maltose, Cobalt, Spermidine/Putrescine und Methionin exprimiert (Anhang Tab.A1). Aus dem Kohlenhydratmetabolismus (Abb.15) ist *acoB*, eine Pyruvatdehydrogenase-Untereinheit, und aus dem Energiemetabolismus *tpiA*, die Triosephosphat-Isomerase, identifiziert worden. Drei von insgesamt 16 im Genom annotierten Pseudogenen (Locus tags ATP_00171, ATP_00336, ATP_00414) wurden ebenfalls transkribiert.

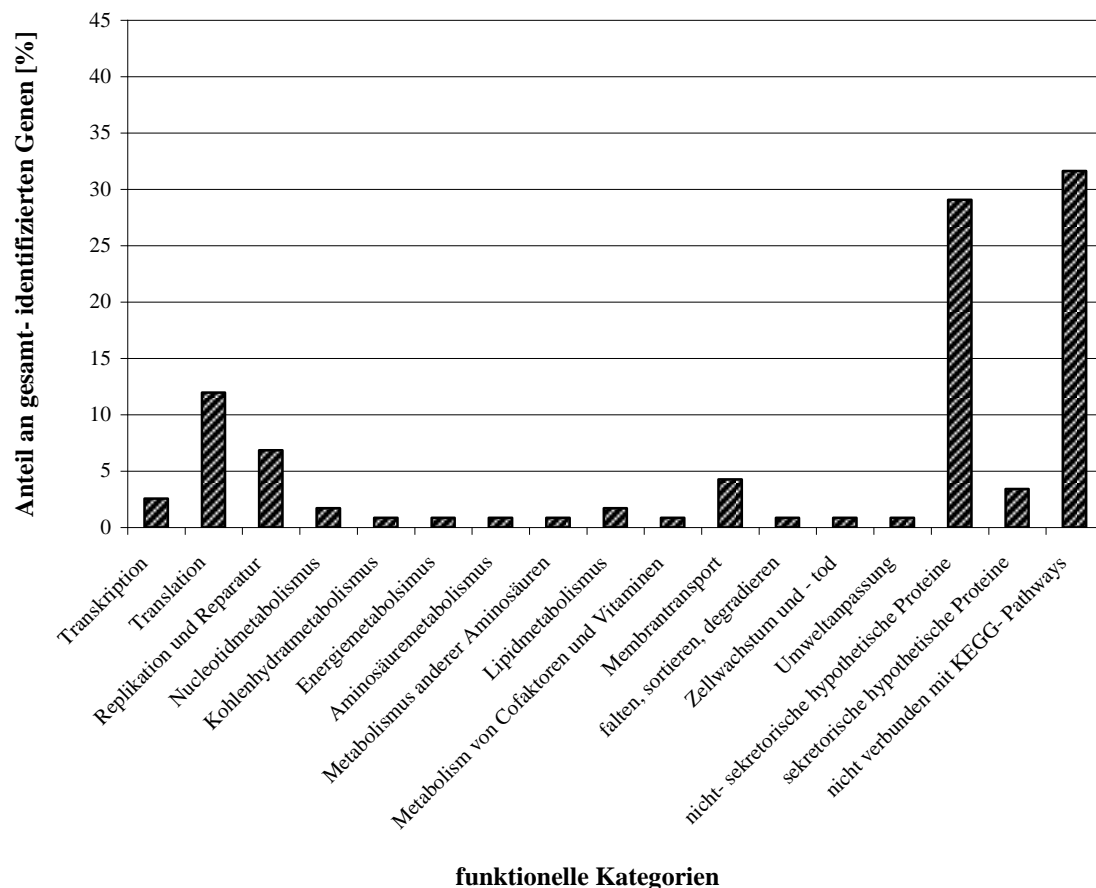


Abb.15. Funktionelle Kategorien repräsentiert durch 117 der mittels RNA-Seq identifizierten proteincodierenden Gene von „*Candidatus Phytoplasma mali*“ Stamm AT. Zuordnung basiert auf ihrer Verbindung mit KEGG-Pathways. Gene mit zugeordneter Funktion, jedoch ohne Verbindung mit KEGG-Pathways wurden gruppiert in „nicht verbunden mit KEGG-Pathways“. Gene ohne Funktionszuordnung wurden unter „nicht-sekretorische/sekretorische hypothetische Proteine“ gruppiert.

8.3. Qualitative Proteomanalyse

Um die Expression der Gene von „*Candidatus Phytoplasma mali*“ Stamm AT auch auf Proteinebene zu verifizieren wurden Proteinisolate aus unterschiedlichen Geweben der drei Pflanzen ph^+ - *N. Oc.* Nr. 1-3 (Tab.5) mit massenspektrometrischen Methoden analysiert.

8.3.1. Diskontinuierliche gelelektrophoretische Auftrennung der Proben

Um möglichst viele Proteine zu identifizieren musste die Komplexität der Proteinisolate verringert werden. Dazu sind die, mittels unterschiedlicher Methoden, aus Sproß und Blattrippen der Pflanzen gewonnenen Proteinproben (Vgl. dazu Tab.7) gelelektrophoretisch via SDS-PAGE aufgetrennt worden (Abb.16). Die Proteinspuren konnten anschließend in 16 gleich große Fraktionen geschnitten werden. Nach tryptischem Verdau und Umkehrphasenauftrennung der Peptide an einer C18-Säule wurden die Proben im Massenspektrometer gemessen.

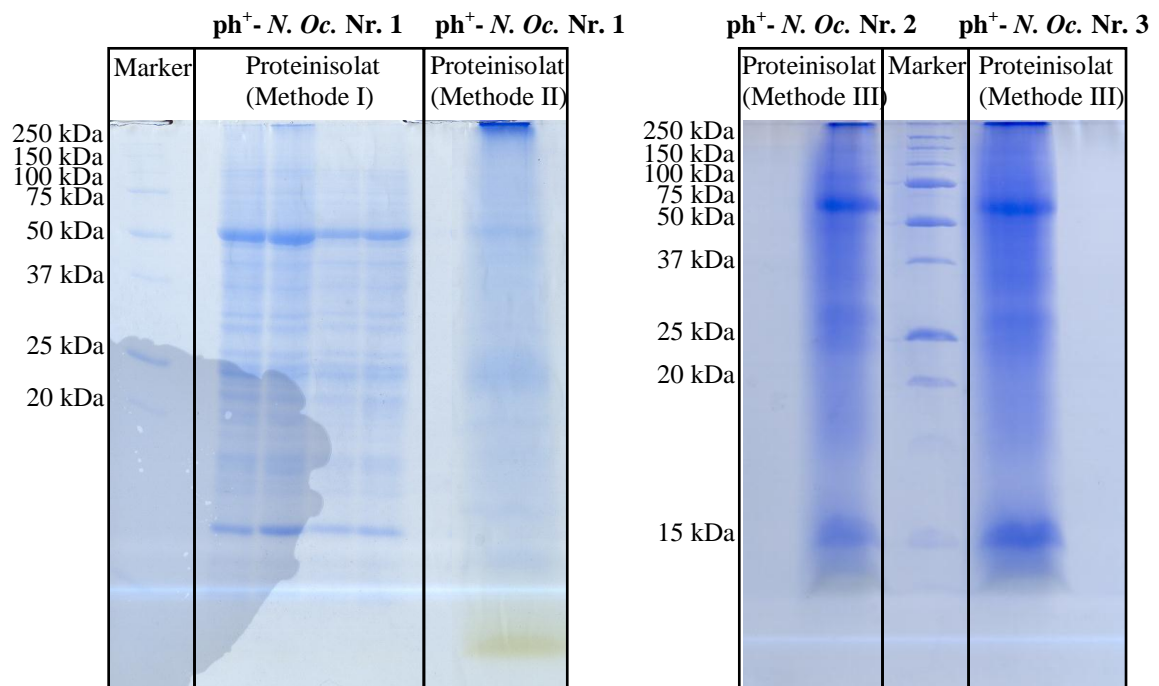


Abb.16. SDS-PAGE der Proben zur qualitativen Proteomanalyse. Proteinisolate aus drei verschiedenen „*Candidatus Phytoplasma mali*“ Stamm AT-positiven (ph^+) *Nicotiana occidentalis*-Pflanzen (*N. Oc.*) wurden zur Reduktion der Komplexität im SDS-PAGE-Gel aufgetrennt. Die Banden konnten anschließend aus- und in 16 gleich große Fraktionen geschnitten werden.

8.3.2. Identifizierte Proteine

105 der 497 (entspricht 21,1%) im Genom von „*Candidatus* Phytoplasma mali“ Stamm AT annotierten Proteine, konnten in den Proben, gewonnen aus Phytoplasma-positiven *Nicotiana occidentalis*-Pflanzen, als translatiert bestimmt werden. Eine vollständige Liste ist im Anhang (Tab.A2) zu finden. 102 der 105 Proteine wurden in der Pflanze ph^+ -*N. Oc.*

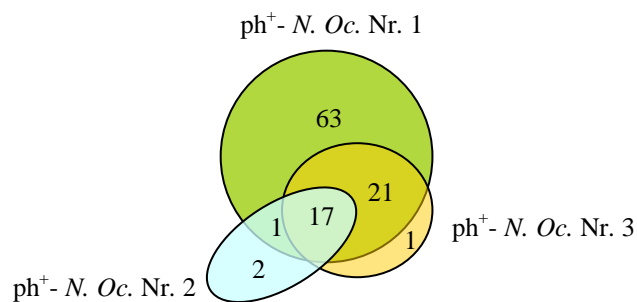


Abb.17. Verteilung der mittels qualitativer Massenspektrometrie identifizierten Phytoplasma-proteine. Proteinisolate aus drei verschiedenen „*Candidatus* Phytoplasma mali“ Stamm AT-positiven (ph^+) *Nicotiana occidentalis*-Pflanzen (*N. Oc.*) wurden mit massenspektrometrischen Methoden untersucht und Phytoplasmaproteine bestimmt. Ein Protein gilt als identifiziert wenn ihm mindestens zwei Peptide (eines davon ein „unique peptide“) zugeordnet werden konnten.

Oc. Nr. 1 nachgewiesen, die optisch die stärksten Symptome aufwies (Tab.5). 22 (ph^+ -*N. Oc.* Nr. 2) und 39 Proteine (ph^+ -*N. Oc.* Nr. 3) konnten in den anderen zwei Proteinisolaten identifiziert werden. Die gemeinsame Schnittmenge betrug 17 Proteine (Abb.17). Kein Protein aus einem bisher nicht im Genom annotierten „Open Reading Frame (ORF)“ war zu finden. In Abbildung 18 wurden die identifizierten Phytoplasma-proteine in funktionelle Gruppen unterteilt. 42% der 105 Proteine

konnten der Kategorie Translation zugeordnet werden. Diese beinhaltet unter anderem 41 von insgesamt 52 im Genom von „*Candidatus* Phytoplasma mali“ Stamm AT annotierten ribosomalen Proteinen. Die mit 23% zweitgrößte Gruppe stellen Proteine, die keiner funktionellen Kategorie zugeordnet werden konnten, dar (Abb.18 „nicht verbunden mit KEGG- Pathways“). Dieser folgen Proteine ohne Funktionszuordnung, sogenannte hypothetische Proteine. Vier von ihnen (Locus tags ATP_00189, ATP_00266, ATP_00268, ATP_00451) können vermutlich vom Bakterium sekretiert werden. Das zeigten bioinformatische Analysen der Proteinsequenzen mittels Phobius. Diese vier Proteine besitzen Signalsequenzen des sec-abhängigen Translokationssystems und keine Transmembrandomänen. Bestandteile des Sec-abhängigen Translokationssystems sind identifiziert worden (GrpE, GroES, GroEL und FfH). Eine weitere funktionelle Gruppe wird von Proteinen des Kohlenhydratmetabolismus gebildet, dazu gehören AckA, AceF, LpD, SfcA, AcoA, AcoB und ATP_00116.

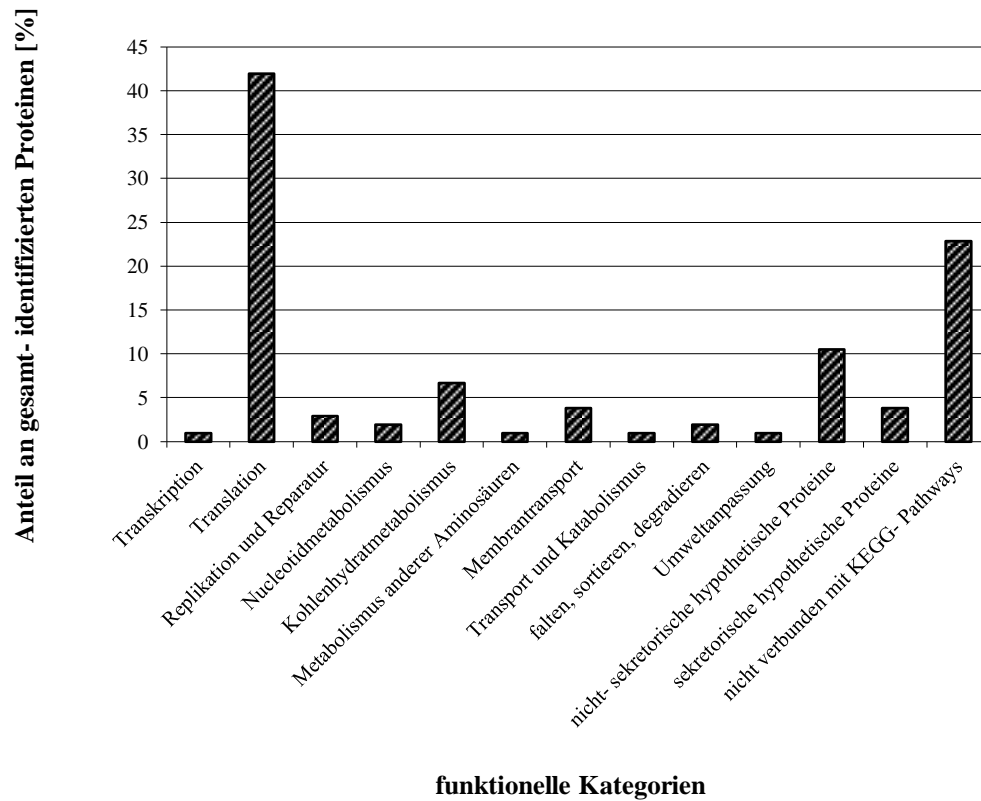


Abb.18. Funktionelle Kategorien der 105 durch Massenspektrometrie identifizierten Proteine von „*Candidatus Phytoplasma mali*“ Stamm AT basierend auf ihrer Verbindung mit KEGG-Pathways. Proteine mit zugeordneter Funktion, jedoch ohne Verbindung mit KEGG- Pathways wurden gruppiert in „nicht verbunden mit KEGG-Pathways“ wobei solche ohne Funktionszuordnung unter „nicht-sekretorische/sekretorische hypothetische Proteine“ zu finden sind.

Neben Phytoplasmaproteinen konnte auch eine Vielzahl pflanzlicher Proteine bestimmt werden. 815 bzw. 727 *Nicotiana*- Proteine sind in den Proteinisolaten (Methode I bzw. II) der Pflanze ph⁺- *N. Oc.* Nr. 1, 752 in dem Isolat aus Pflanze ph⁺- *N. Oc.* Nr. 2 und 788 in Pflanze ph⁺- *N. Oc.* Nr. 3 detektiert worden. Eine weitere Analyse dieser Proteine wurde nicht durchgeführt, da zur Untersuchung des in Folge einer Phytoplasmainfektion veränderten Proteinexpressionsprofils von *Nicotiana occidentalis*-Pflanzen eine rein qualitative Aussage über das Vorhandensein von Proteinen in einer Probe nicht ausreicht.

8.4. Vergleich zwischen Transkriptomanalyse und qualitativer Proteomanalyse

Genprodukte von „*Candidatus Phytoplasma mali*“ Stamm AT wurden zum einen auf der Transkriptomebene mittels RNA-Seq und zum anderen auf Proteomebene mittels Massenspektrometrie nachgewiesen. Mit den 115 durch RNA-Seq identifizierten proteincodierenden Genen, sind zehn mehr als über Massenspektrometrie ermittelt worden. 28 Produkte dieser Gene traten in beiden Methoden auf (Abb.19 und Tab.13). Unter ihnen auch zwei hypothetische Proteine (Locos tags ATP_00189 und ATP_00451)

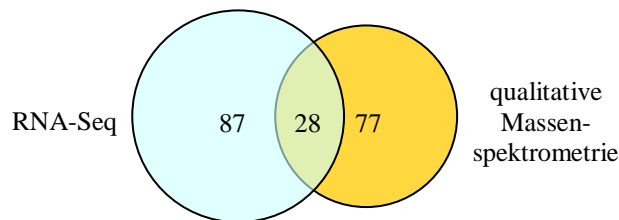


Abb.19. Vergleich der Methoden zur Bestimmung der exprimierten protein-codierenden Gene von „*Candidatus Phytoplasma mali*“ Stamm AT. Identifikation auf Transkriptomebene durch RNA-Seq (links) und auf Proteomebene mittels qualitativer Massenspektrometrie (rechts).

die vermutlich aus dem Bakterium hinaus geschleust werden. Eine Gruppe von sieben ribosomalen Proteinen war ebenso unter den 28 Genprodukten. Weiterhin konnten CspJ, das „Cold shock-like protein“, und EF-Tu, der „Elongation factor Tu“, sowohl auf Transkriptom- als auch auf Proteomebene nachgewiesen werden.

Tab.13. Proteincodierende Gene von „*Candidatus Phytoplasma mali*“ Stamm AT deren Expression sowohl auf Transkriptom- als auch auf Proteomebene nachgewiesen werden konnte.

Name	Locus tag
RpsK 30S ribosomal protein S11	ATP_00366
RpsL 30S ribosomal protein S12	ATP_00392
RpsM 30S ribosomal protein S13	ATP_00365
RpsB 30S ribosomal protein S2	ATP_00232
RpsG 30S ribosomal protein S7	ATP_00393
RplU 50S ribosomal protein L21	ATP_00284
RplT LSU ribosomal protein L20	ATP_00443
CspJ Cold shock-like protein	ATP_00295
FusA Elongation factor G	ATP_00394
Immunodominant membrane protein	ATP_00050
PduL Propanediol utilization protein	ATP_00224
GrpE putative protein GrpE (HSP-70 cofactor)	ATP_00205
FrR Ribosome recycling factor	ATP_00235
InfB Translation initiation factor IF-2	ATP_00315
HcaD Uncharacterized NAD-dependent dehydrogenase weakly similar to IcmE protein	ATP_00288
PolC1 DNA polymerase III alpha subunit	ATP_00081
conserved hypothetical protein	ATP_00144
hypothetical protein	ATP_00038
hypothetical protein	ATP_00145
hypothetical protein	ATP_00413
conserved hypothetical protein	ATP_00189
conserved hypothetical protein, fragment	ATP_00451
RpoA DNA-directed RNA polymerase, alpha chain	ATP_00367
TuF Elongation factor Tu	ATP_00395
GroEL Molecular chaperonin, large subunit	ATP_00185
PepA Putative aminopeptidase	ATP_00431
AcoB Pyruvate dehydrogenase E1 component beta subunit	ATP_00155

8.5. Quantitative Proteomanalyse

Neben der Verifizierung von Genprodukten von „*Candidatus Phytoplasma mali*“ Stamm AT war es Ziel, einen Einblick in die Wechselwirkung des Bakteriums mit seiner Wirtspflanze zu erhalten. So sollten in einem quantitativen Massenspektrometrieansatz pflanzliche Proteine identifiziert werden, die in Folge einer Phytoplasmainfektion verstärkt oder vermindert exprimiert werden. Dazu sind Proteinisolate der drei Pflanzen ph^+ - *N. Oc.* Nr. 2-4 vergleichend mit denen der drei Pflanzen ph^- - *N. Oc.* Nr. 1-3 (Tab.5), mit der Isotopenmarkierungsmethode Dimethyl Labeling massenspektrometrisch

untersucht worden. Zuvor wurden zur Etablierung der Labelmethode der lineare dynamische Bereich und der technische Fehler ermittelt.

8.5.1. Diskontinuierliche gelelektrophoretische Auftrennung der Proben

Zu Beginn der quantitativen Proteomanalyse musste zunächst die Komplexität der Proteinisolate verringert werden um so möglichst viele Proteine identifizieren zu können. So sind die Proteinproben (Vgl. dazu Tab.7) gelelektrophoretisch mittels SDS-PAGE aufgetrennt worden (Abb.20).

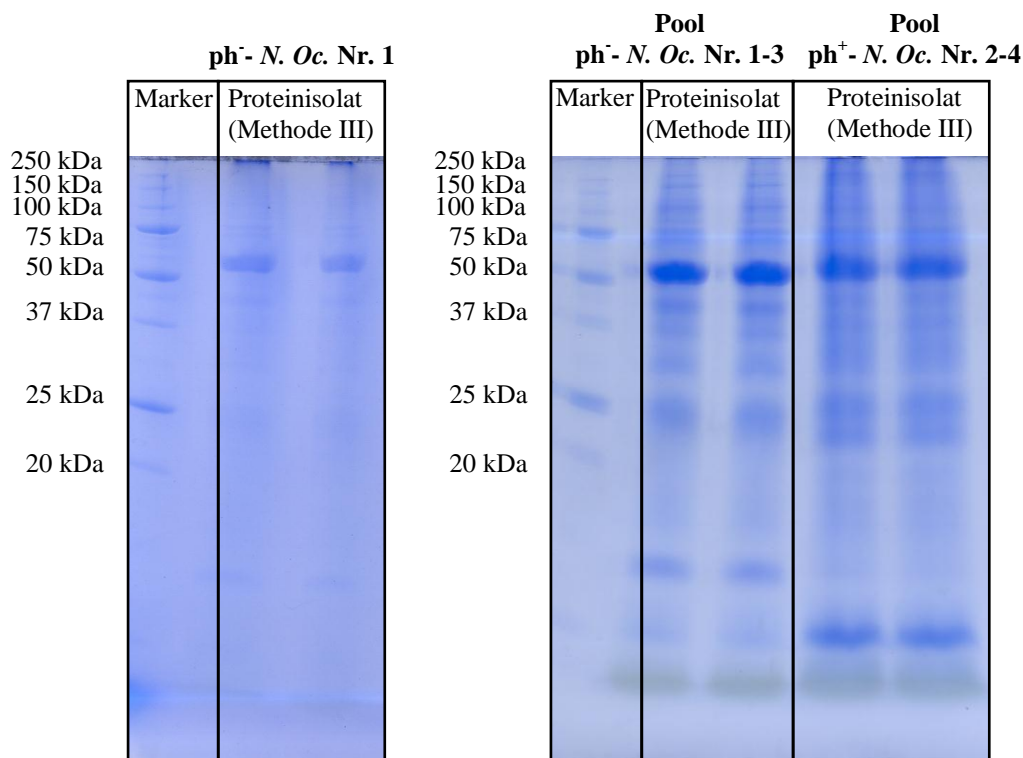


Abb.20. SDS-PAGE der Proben zur quantitativen Proteomanalyse. Proteinisolate aus drei verschiedenen „*Candidatus* Phytoplasma mali“ Stamm AT-positiven (ph^+) und negativen (ph^-) *Nicotiana occidentalis*-Pflanzen (*N. Oc.*) wurden zur Reduktion der Komplexität im SDS-PAGE-Gel aufgetrennt. Die Banden konnten anschließend aus- und in 16 gleich große Fraktionen geschnitten werden. Links: aufgetrennte Proteinprobe zur Bestimmung der Schwellenwerte. Rechts: Aufgetrennte Proteinproben für die quantitative Proteomanalyse.

Die Banden konnten anschließend in 16 gleich große Fraktionen geschnitten werden. Nach tryptischem Verdau der Proteine erfolgte das Dimethyl Labeling. Die so vorbereiteten Proben wurden im Verhältnis 1:1 gemischt und nach weiterer

Fraktionierung mittels Umkehrphasen-Chromatographie an einer C18-Säule im Massenspektrometvermessen.

8.5.2. Dynamischer Bereich des Dimethyl Labelings

Zur Ermittlung des dynamischen Bereiches des Dimethyl Labelings erfolgte ein tryptischer Verdau von bovinem Serumalbumin (BSA). Dieser Verdau war aufzuteilen und unterschiedliche Mengen (25 µg und 10 µg) an BSA differentiell zu labeln. Dabei zeigte sich eine 100%ige Labelingeffizienz (Anhang Abb.A1). Die gelabelten Peptide wurden in definierten Verhältnissen gemischt und im Massenspektrometer analysiert. Abbildung 21 zeigt den Zusammenhang zwischen eingestellten und gemessenen Mischverhältnissen. Für beide Labelingansätze ist ein linearer Zusammenhang über alle eingestellten H/L-Verhältnisse zu erkennen und weicht nicht mehr als $\pm 7,6\%$ von den tatsächlich eingestellten Verhältnissen ab, unabhängig davon ob 25 µg oder 10 µg gelabelt wurden (Abb.21).

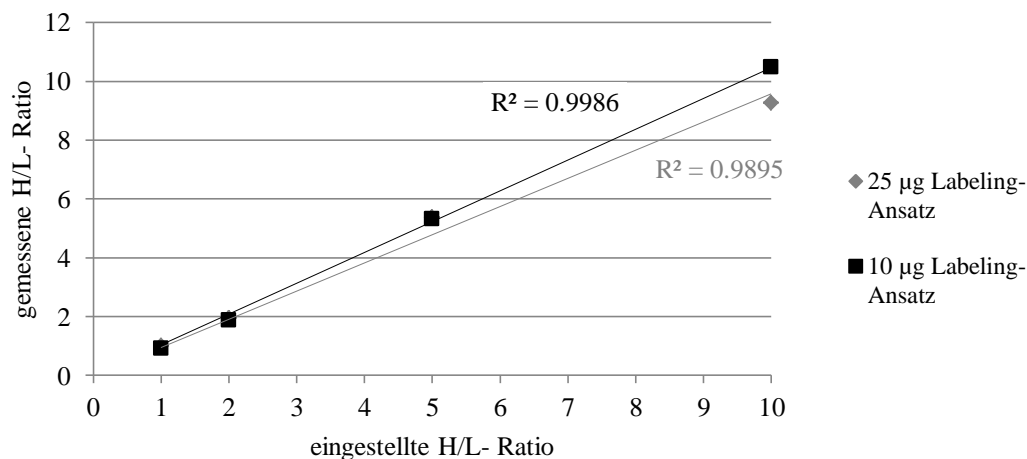


Abb.21. Dynamischer Bereich des Dimethyl Labelings. Verschiedene Mengen (25 µg und 10 µg) eines tryptischen Verdau von bovinem Serumalbumin (BSA) wurden mit dem Dimethyl Light (L)- und Heavy (H)-Label versehen. L- und H-gelabelte Peptide waren anschließend zu definierten Verhältnissen zu vereinigen (eingestellte H/L-Ratio). Mittels Massenspektrometrie konnte nun die H/L-Ratio bestimmt werden (gemessene H/L-Ratio).

8.5.3. Schwellenwerte für eine signifikante Proteinregulation

Um die technische Abweichung der Methode zu messen und damit die Ermittlung von Regulationsschwellenwerten durchzuführen, wurde das Proteinisolat der Pflanze ph⁻ *N. Oc.* Nr. 1 in einem Duplikat für die massenspektrometrische Analyse vorbereitet, jedoch differentiell Dimethyl Light und Heavy gelabelt. Die Effizienz des Labelings betrug 91,3-100% (Anhang Abb.A2). Die differentiell gelabelten Ansätze wurden abschließend im Verhältnis 1:1 vereinigt und massenspektrometrisch analysiert. Insgesamt 238 *Nicotiana*-Proteine konnten mit mindestens zwei „Unique Peptides“ identifiziert werden. 221 dieser Proteine (entspricht 92,9 %) hatten eine normalisierte H/L-Ratio bei einem Median von 0,94 (Abb.22: $\text{Log}_2(0,94)=-0,09$). Die Verteilung der Log_2 -transformierten H/L-Ratios ist in Abbildung 22 zu sehen.

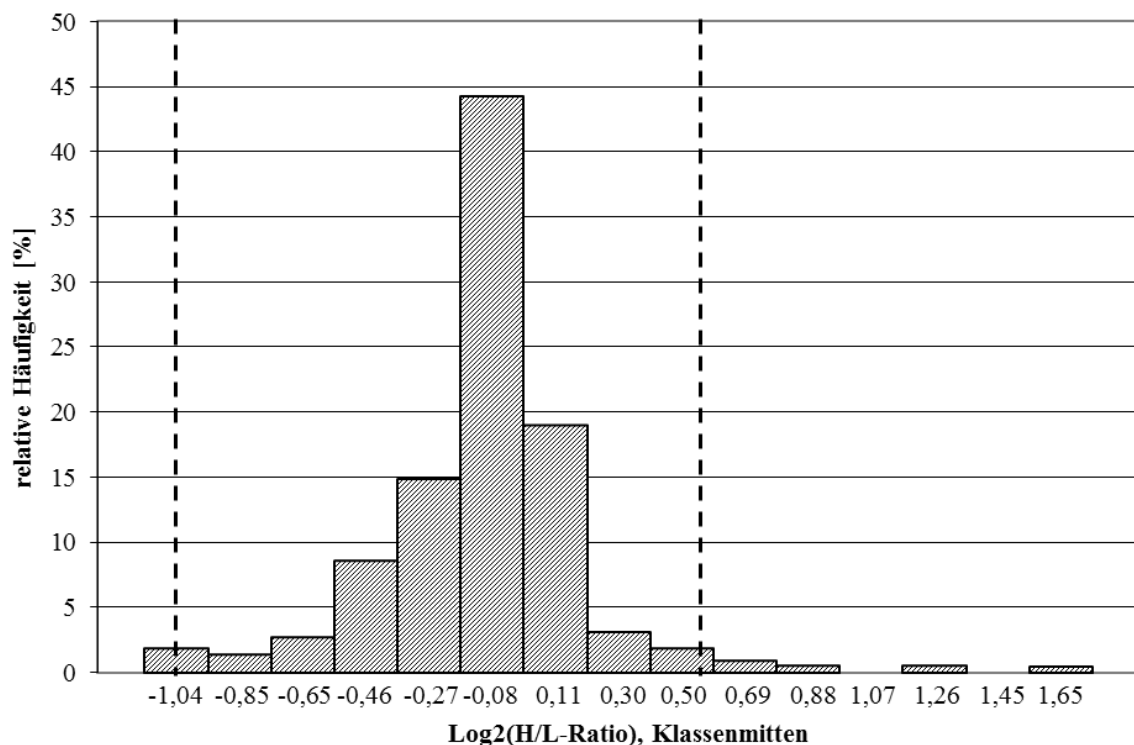


Abb.22. Streuung der normalisierten Heavy (H)/Light (L)-Ratios unregulierter Proteine im Dimethyl Labeling. Ein und dasselbe Proteinisolat der Pflanze ph⁻ *N. Oc.* Nr. 1 wurde in zwei Ansätze aufgeteilt, für die Massenspektrometrie vorbereitet, und entweder mit dem Dimethyl Light (L)- oder Heavy (H)-Label versehen. L- und H-Ansatz wurden anschließend im Verhältnis 1:1 vereinigt. Mittels Massenspektrometrie konnten nun die H/L-Ratios sowie deren Verteilung bestimmt werden. Gestrichelte Linien zeigen anhand der Streuung empirisch festgelegte Schwellenwerte: Proteine ab einer zweifachen Herunter- ($\text{Log}_2(0,5)=-1$) bzw. 1,5-fachen Heraufregulation ($\text{Log}_2(1,5)=0,58$) gelten als differentiell exprimiert.

Ein Test auf Standardnormalverteilung (“d’Agostino and Pearson omnibus normality test“) zum Signifikanzniveau α von 0,5 wurde abgelehnt und zeigte somit das die Ratios nicht Normalverteilt waren. Die Klassen unter dem Median wiesen eine größere Häufigkeit auf als die Klassen darüber (Abb.22). Aus diesem Grund wurden die Schwellenwerte für eine signifikante Proteinregulation empirisch festgelegt (Abb.22: gestrichelte Linien). Proteine ab einer H/L-Ratio $\leq 0,5$ (zweifache Herunterregulation) bzw. H/L-Ratio $\geq 1,5$ (1,5-fache Heraufregulation) gelten als differentiell exprimiert. Innerhalb dieser Grenzen befanden sich mit 96,4% über 95% aller H/L-Ratios der 221 detektierten *Nicotiana*-Proteine.

8.5.4. Identifizierte Proteine

Im quantitativen Massenspektrometrieansatz wurden pflanzliche Proteine identifiziert, die in Folge einer Phytoplasmainfektion verstärkt oder vermindert exprimiert werden. Dazu sind die Proteinexpressionslevel der Isolate der drei Pflanzen ph^+ - *N. Oc.* Nr. 2-4 mit denen der drei Pflanzen ph^- - *N. Oc.* Nr. 1-3 verglichen worden.

Die Isolate der Phytoplasma-positiven (ph^+) Pflanzen sind Dimethyl Heavy und die der Phytoplasma-negativen (ph^-) Pflanzen Dimethyl Light gelabelt und im Verhältnis 1:1 gemischt worden („Forward Labeling“). Im „Reverse Labeling“ wurden die Markierungen vertauscht, d.h. die Isolate der Phytoplasma-positiven (ph^+) Pflanzen Dimethyl Light und die der Phytoplasma-negativen (ph^-) Pflanzen Dimethyl Heavy gelabelt. Auch im „Reverse Labeling“ wurden die Proben im Verhältnis 1:1 gemischt.

Die Labelingeffizienz betrug 90-99,1% (Anhang Abb.A3 und A4). 409 *Nicotiana*-Proteine wurden im „Forward Labeling“- und 439 im „Reverse Labeling“-Ansatz mit mindestens zwei „unique peptides“ identifiziert. Für 38 („Forward Labeling“, entspricht 9,3 %) bzw. 22 („Reverse Labeling“, entspricht 5 %) pflanzliche Proteine konnte keine H/L-Ratio durch die Software berechnet werden. Diese wurden aus dem Datensatz entfernt. Die Schnittmenge betrug 332 Proteine. Die nur in einem der beiden Datensätze auftauchenden Proteine wurden, wenn nicht anders erwähnt, von der weiteren Analyse ausgeschlossen (Anhang Tab.A4 und A5). Eine Korrelationsanalyse der 332 gemeinsamen Proteine aus „Forward“ und „Reverse Labeling“ zeigte einen stark linearen Zusammenhang (Abb.23) mit einem Pearson’schen Korrelationskoeffizienten r von 0,83. Durch Anwendung der zuvor bestimmten Schwellenwerte konnten die Proteine in über-

/unter- und unverändert exprimiert eingeteilt werden. Nur Proteine, die in beiden Datensätzen in dieselbe Richtung abwichen und dabei die Schwellenwerte überschritten, galten als differentiell exprimiert (Abb.23). Auf diesem Weg konnten 79 in Phytoplasma-positiven Pflanzen hoch-, 42 runter- und 128 nicht regulierte pflanzliche Proteine identifiziert werden (Anhang Tab.A3). 83 Proteine waren in diesem Schritt von weiteren Analysen auszuschließen, da sie die Kriterien nicht erfüllten (Abb.23: weiß hinterlegte Quadrate). Eine vollständige Liste dieser 83 Proteine ist im Anhang (Tab.A6) zu finden.

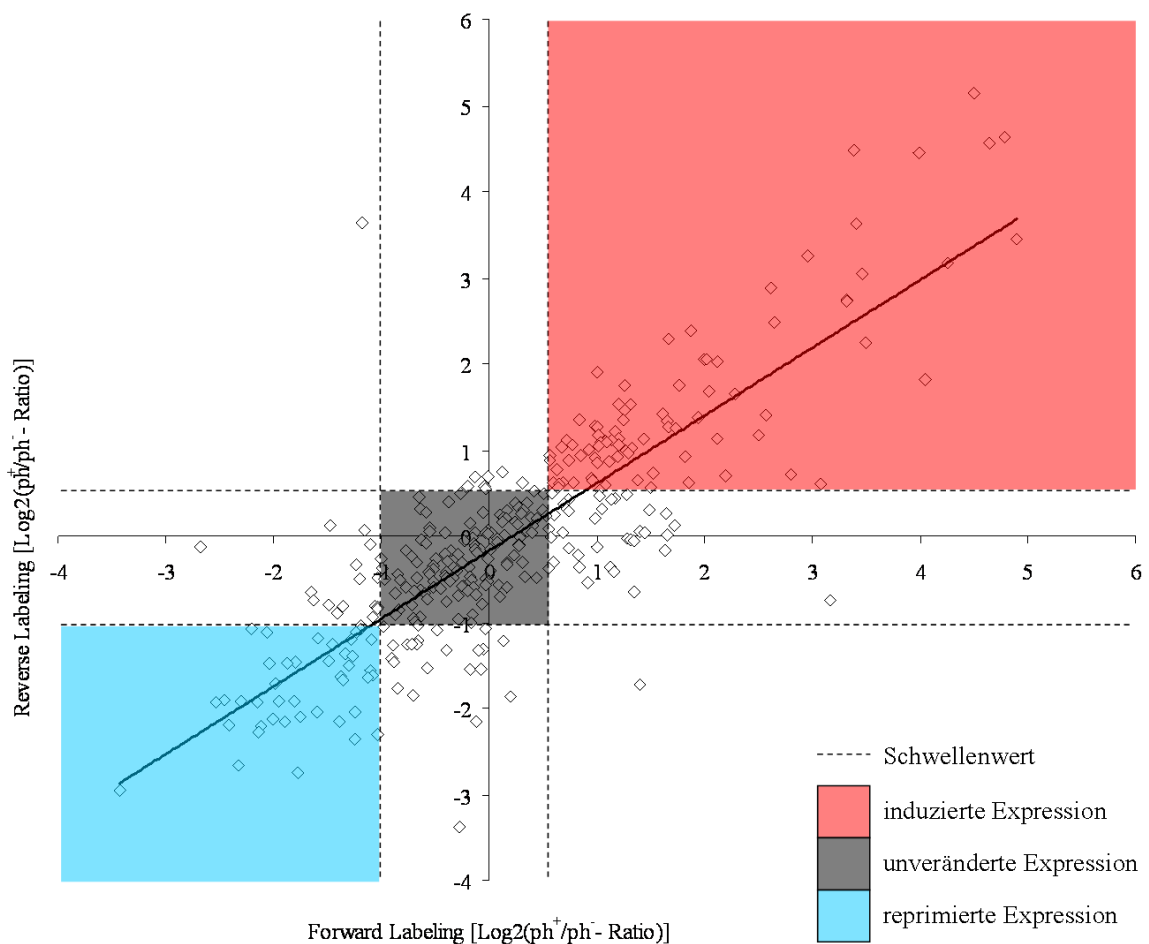


Abb.23. Korrelation zwischen Forward und Reverse Labeling. Ratios der mittels quantitativer Massenspektrometrie identifizierten Proteine von *Nicotiana* sind gezeigt. In „*Candidatus* Phytoplasma mali“ Stamm AT-positiven (ph^+) *Nicotiana occidentalis*-Pflanzen induzierte Proteine sind rot, reprimierte blau markiert. Grau steht für eine unveränderte Expression.

Neben pflanzlichen Proteinen konnten auch vier Proteine von „*Candidatus* Phytoplasma mali“ Stamm AT identifiziert werden (Tab.14). Diese waren ebenso in der qualitativen Proteomanalyse bestimmt worden (Anhang Tab.A2).

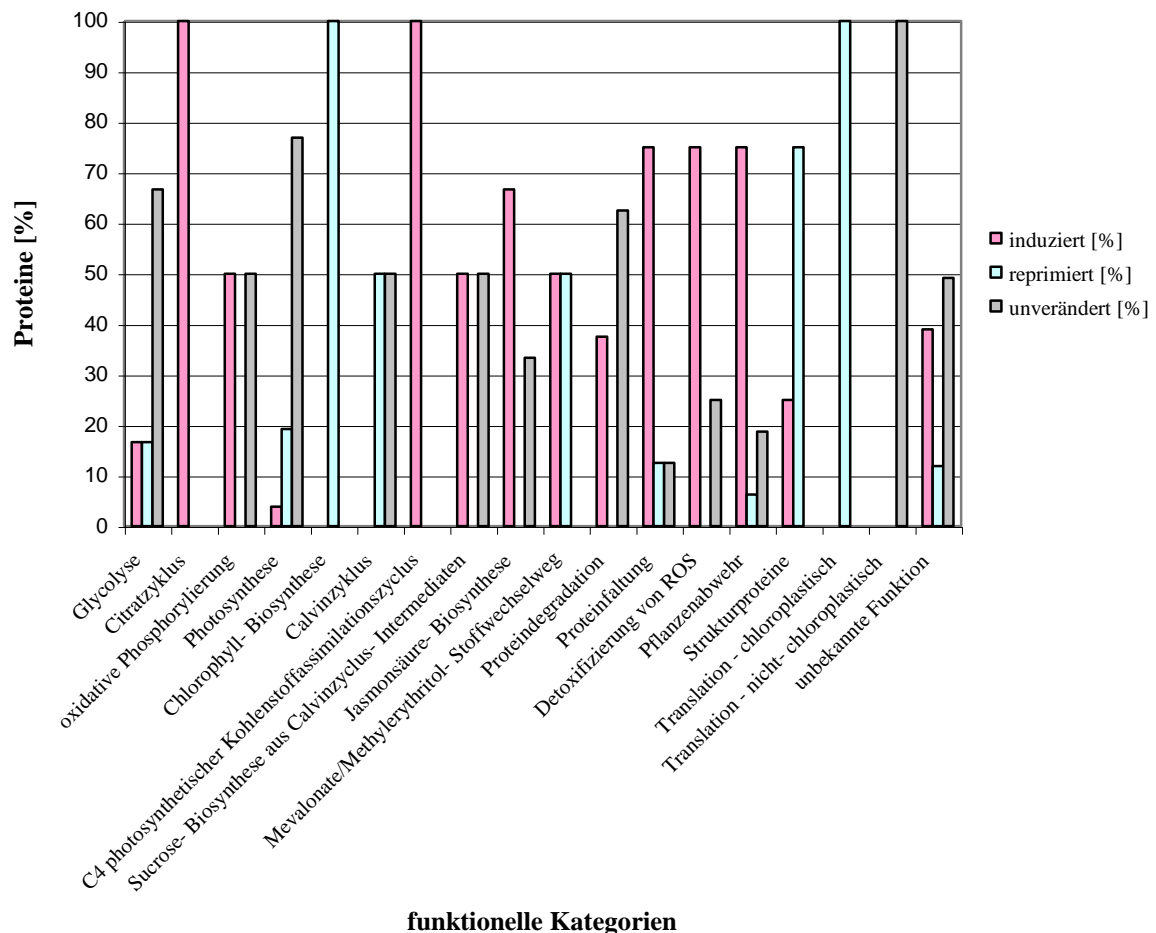
Tab.14. In quantitativen Proteomanalysen identifizierte Proteine von „*Candidatus Phytoplasma mali*“ Stamm AT.

Proteinname	Locus tag	Forward Labeling			Reverse Labeling		
		Unique Peptides	Sequence Coverage [%]	PEP	Unique Peptides	Sequence Coverage [%]	PEP
AcoB Pyruvate dehydrogenase E1 component beta subunit	ATP_00155	4	13,4	3,49E-20	2	6,7	5,33E-08
GroEL Molecular chaperonin, large subunit	ATP_00185	14	29,1	1,07E-103	12	24,7	3,76E-157
GroES 10 kDa chaperonin (GroES protein)	ATP_00184	3	40	4,05E-10			
CspJ Cold shock-like protein	ATP_00295				2	27,5	0,0006823

8.5.5. Identifizierte differentiell exprimierte Pflanzenproteine

Eine Zuordnung der 249 *Nicotiana*-Proteine in funktionelle Gruppen liefert Abbildung 24. 59 Proteinen konnte keine Funktion zugeordnet werden (Abb.24). Alle identifizierten Proteine, die der Translation in Chloroplasten zugeordnet werden konnten (insgesamt 11 Proteine, Anhang Tab.A3), wurden in Phytoplasma-positiven (ph^+) Pflanzen unterexprimiert. Nicht reguliert sind dagegen die 16 identifizierten, nicht in Chloroplasten lokalisierten Proteine mit einer Funktion in der Translation (Abb.24). Actin (gi|50058115) und β -Tubulin (gi|40036995), wichtige Strukturproteine, waren in den Phytoplasma-positiven Pflanzen herunterreguliert. Ein Großteil der Proteine mit einer Funktion in der Pflanzenabwehr zeigte sich induziert (Abb.24 und Anhang Tab.A3). Dazu gehören ein Thionin-ähnliches Protein (gi|7939581), γ -Thionin (gi|2244705), Trypsin-Proteinaseinhibitor (gi|76446042), Osmotine (gi|19783, gi|129098) und Chitinasen (gi|116314, gi|467689, gi|505267). Das, mit einer ph^+/ph^- -Ratio von 0,09 („Forward Labeling“) bzw. 0,13 („Reverse Labeling“) im gesamten Datensatz am stärksten reprimierte Protein, ist das Einzige in der Kategorie Pflanzenabwehr als herunterreguliert

eingordnete Protein. Es handelt sich dabei um das „chloroplast N receptor-interacting protein 1“ (gi|169786772).



funktionelle Kategorien

Abb.24. Ein Ausschnitt der Verteilung der durch quantitative Massenspektrometrie identifizierten *Nicotiana*-Proteine entlang funktioneller Kategorien. Quantifizierung erfolgte relativ durch Vergleich „*Candidatus* Phytoplasma mali“ Stamm AT-positiver (ph^+) *Nicotiana occidentalis*-Pflanzen mit Phytoplasma-negativen Pflanzen. Alle gefundenen Proteine einer Gruppe bilden 100% und sind prozentual auf induziert, reprimiert und unverändert verteilt. Proteine ohne zugeordnete Funktion sind unter „unbekannte Funktion“ zu finden.

Weitere funktionelle Gruppen, in denen mehr Proteine induziert als reprimiert wurden, stellen die Kategorien „Detoxifizierung von ROS“, „Proteinfaltung“ und „Proteindegradation“ dar (Abb.24). Eine Übersicht über die den Gruppen zugeordneten Proteine befindet sich im Anhang (Tab.A3). Mit der (E)-4-hydroxy-3-methylbut-2-enyl-Diphosphat Synthase (gi|45737901) ist ein im Methylerythritol-Stoffwechselweg reprimiertes Enzym identifiziert worden. Im Mevalonate-Stoffwechselweg konnte mit der Mevalonate-Diphosphate Decarboxylase (gi|157042753) ein induziertes Protein ausfindig gemacht werden. Aus dem Biosyntheseweg für Jasmonsäure waren die Lipoxygenase (

gi|32454706, Abb.25) und Allene-Oxid Synthase (gi|16973300) unter den verstärkt exprimierten *Nicotiana*-Proteinen.

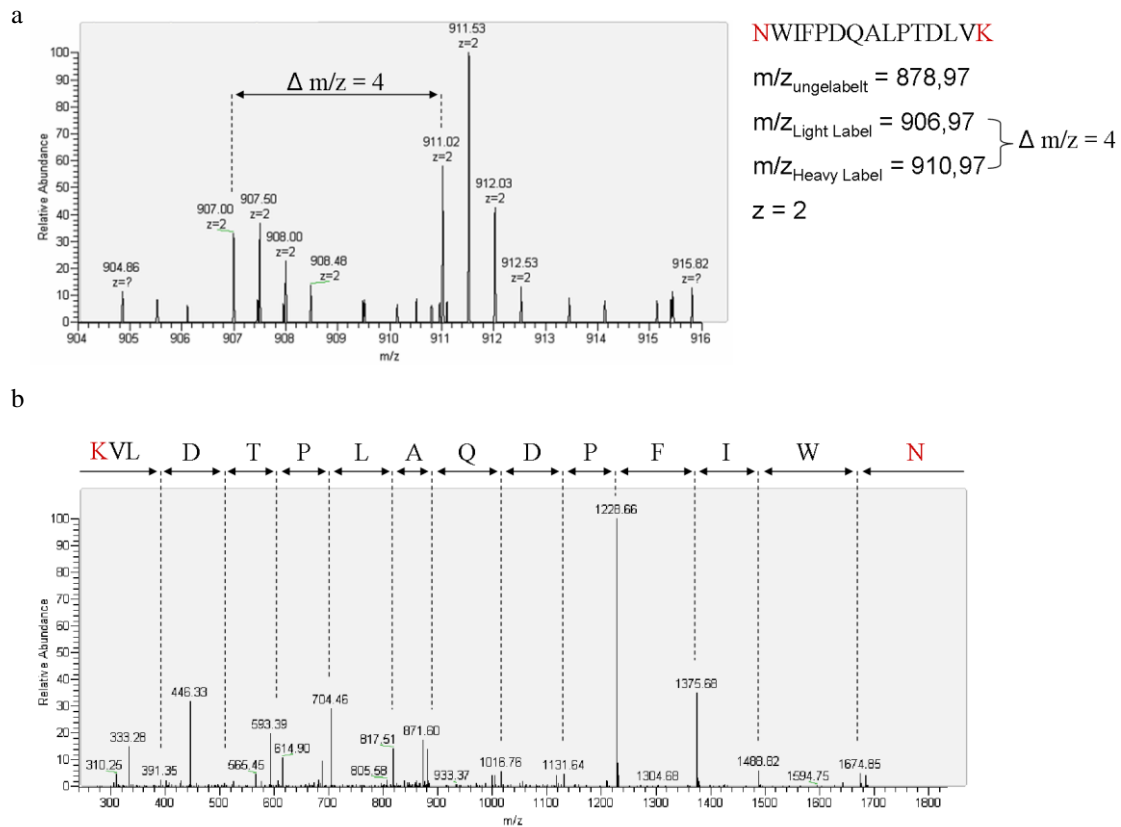


Abb.25. Die Lipoxygenase wird durch eine Infektion von *Nicotiana occidentalis* mit „*Candidatus Phytoplasma mali*“ Stamm AT heraufreguliert. Die Lipoxygenase (gi|32454706) wurde im Forward Labeling über zehn und im Reverse Labeling über 12 nur ihr zuordenbare Peptide („unique peptides“) identifiziert. **(a)** MS-Spektrum eines der zehn Peptide aus dem Forward Labeling: Das Peptid NWIFPDQALPTDLVK zeigte eine deutlich höhere Intensität der „Relative Abundance“ im Dimethyl Heavy- (ph^+) als im Dimethyl Light- (ph) gelabelten Zustand. **(b)** MS/MS-Spektrum des Peptids NWIFPDQALPTDLVK. Das Dimethyl Label wird an primären Aminen der N-termini und Lysinseitenketten eingeführt, was in einer Massenzunahme von 28 (Light Label) bzw. 32 Da (Heavy Label) pro **Labelingstelle** (rot) im Vergleich zum ungelabelten Peptid resultiert.

Viele Proteine aus dem Calvinzyklus (insgesamt vier Proteine), der Chlorophyll-Biosynthese (vier Proteine) und der Photosynthese (fünf Proteine) wiesen eine reprimierte Expression in Phytoplasma-positiven *Nicotiana occidentalis*-Pflanzen auf. Die α - und β -Untereinheiten der mitochondrialen ATP-Synthase (gi|114421, gi|114407) und eine NADH-Dehydrogenase Untereinheit („NADH dehydrogenase subunit 9“, gi|56806644) zeigten hingegen eine verstärkte Expression. Diese Proteine sind Bestandteil der oxidativen Phosphorylierung (Abb.24). Mit der Isocitrat Dehydrogenase (gi|3021506) und der Phosphoglycerat Kinase (gi|1161602) sind auch im Citratzyklus und der Glycolyse induzierte Enzyme identifiziert worden.

9. Diskussion

9.1. Identifikation der Genprodukte von „*Candidatus Phytoplasma mali*“ Stamm AT

Ein Ziel der vorliegenden Arbeit war es durch Bestimmung exprimierter Gene die Genomannotation von „*Candidatus Phytoplasma mali*“ Stamm AT zu validieren. Da eine axenische Kultivierung des Bakteriums nicht möglich ist [11], wurden durch RNA-Seq das Transkriptom und durch Massenspektrometrie das Proteom von „*Candidatus Phytoplasma mali*“ Stamm AT-positiven *Nicotiana occidentalis*-Pflanzen bestimmt. Die Expression von 164 protein-codierenden Genen des Phytoplasmas von insgesamt 479 im Genom annotierten (entspricht 34,2%) konnte validiert werden (Abb.26).

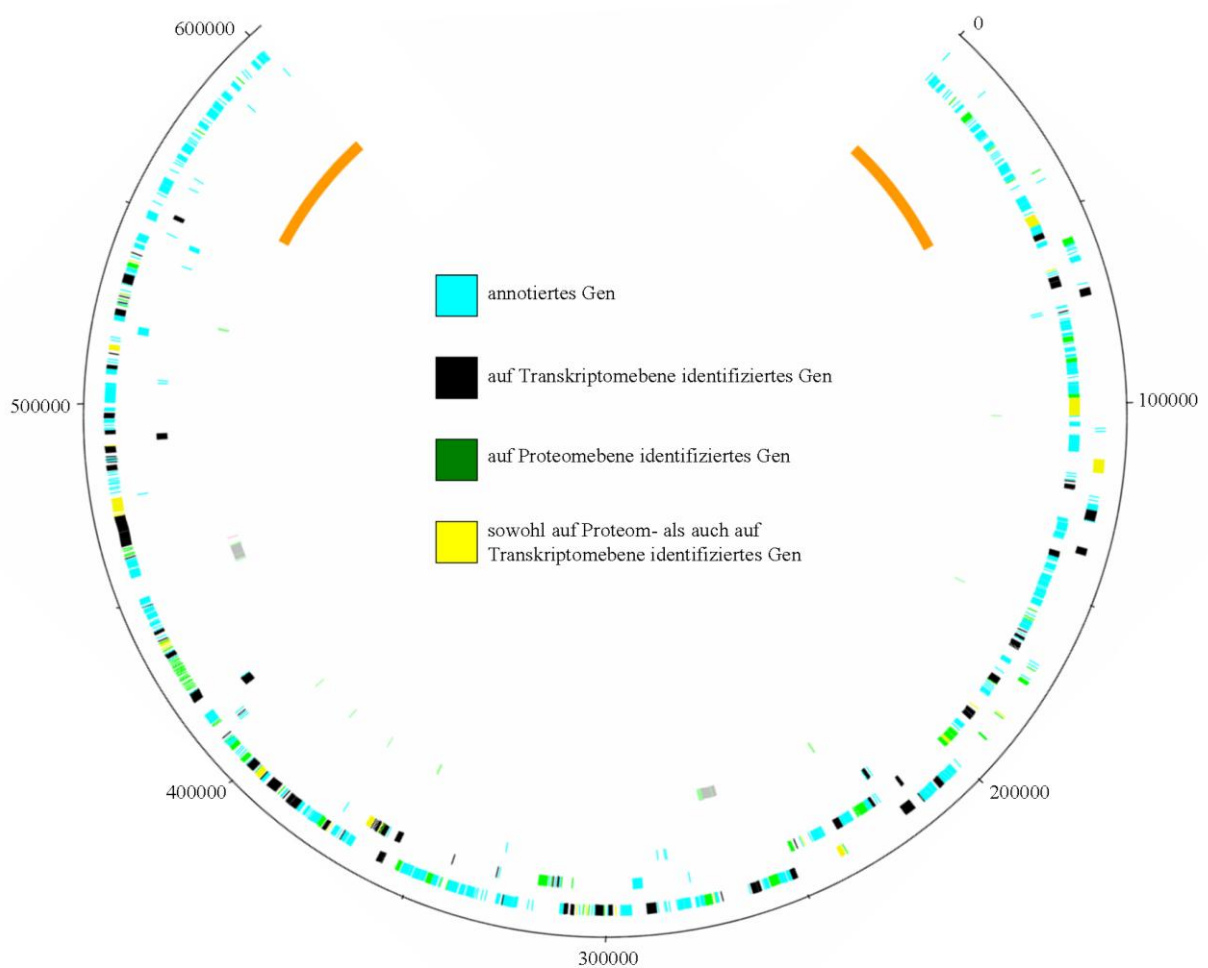


Abb.26. Validierte Gene von „*Candidatus Phytoplasma mali*“ Stamm AT. Die Expression von 164 verschiedenen protein-codierenden Genen des Phytoplasmas in *Nicotiana occidentalis*-Pflanzen wurde mittels RNA-Seq und Massenspektrometrie nachgewiesen. Von außen nach innen: (i) Maßstab des Chromosoms [b], (ii) Forwärtstrang, (iii) Rückwärtstrang, (iv) Pseudogene, (v) rRNA- und tRNA-Operons, (vi) terminal-invertierte Wiederholungen („terminal inverted repeats (TIRs)“, orange).

Die identifizierten Genprodukte wurden funktionellen Kategorien zugeordnet (Abb.15 und 18). So konnten 43 von insgesamt 52 im Genom von „*Candidatus Phytoplasma mali*“ Stamm AT annotierten ribosomalen Genen als Bestandteil der Kategorie „Translation“ bestimmt werden. Neun Gene wurden durch RNA-Seq und 41 durch Massenspektrometrie als exprimiert validiert. Die Methoden überlappten sich in sieben Genen (Tab.13). Diese große Anzahl an funktionellen Genen zeigt das „*Candidatus Phytoplasma mali*“ Stamm AT über einen funktionellen Translationsapparat verfügt. Der Stoffwechselweg der Glykolyse, also der Stoffwechselweg von dem vermutet wurde das er zur Energiegewinnung in Phytoplasmen dient, ist in „*Candidatus Phytoplasma mali*“ Stamm AT unvollständig [23]. So wird es für möglich gehalten das Malat als Kohlenstoffquelle für „*Candidatus Phytoplasma mali*“ Stamm AT dient. Ein Malat/Na⁺- Symporter (*mleP*) zur Aufnahme von Malat wurde durch RNA-Seq validiert (Abb.27). Mit *ackA*, *aceF*, *lpd*, *sfcA*, *acoA*, *acoB* und ATP_00116 sind sieben Gene dieses postulierten Kohlenhydratmetabolismus [23] als exprimiert identifiziert worden, die meisten davon auf Proteinebene (Abb.27). Diese Enzyme ermöglichen den Abbau von Malat und so die Erzeugung von ATP und NADH+H⁺. Eine Phosphotransacetylase ist nicht im Genom annotiert [23] und konnte somit auch nicht in ihrer Expression validiert werden, weshalb dieser postulierte Malatmetabolismus unvollständig ist. Es wird vermutet, dass eines der hypothetischen Proteine diese Funktion übernommen hat [23]. Wird angenommen, dass mittels RNA-Seq und Massenspektrometrie lediglich abundante Genprodukte identifiziert werden, stärkt dies die Vermutung, dass dieser Metabolismus von zentraler Bedeutung für „*Candidatus Phytoplasma mali*“ Stamm AT ist. Die Bestätigung durch q-RT-PCR-Experimente stehen noch aus.

Weiterhin importieren Phytoplasmen wahrscheinlich viele Metabolite der Wirtszellen [87]. Es wurden einzelne Bestandteile von ABC-Transportern für den Import von Maltose (*malE*), Cobalt (*cbiQ*, *cbiO2*), Spermidine/Putrescine (*potB*), Dipeptide (*phnL*, *dppA*) und Methionin (ATP_00191, ATP_00192) exprimiert. Die Funktionsfähigkeit kann aber nicht nachgewiesen werden, denn zu keinem ABC-Transporter wurden alle dazu nötigen Bestandteile gefunden. Die Expression der membranständigen ATP-abhängigen Metalloprotease (*hflb*), welche an elf verschiedenen Loci im Genom codiert wird, wurde für die Loci ATP_00146, ATP_00406 und ATP_00460 auf RNA-Ebene bestätigt. So wird vermutet, dass die ATP-abhängigen Metalloproteasen Pflanzenproteine, die Aufgrund der Abwehrreaktion der Wirtszelle von ihr gebildet werden, degradieren und auf diese Weise Aminosäuren und Peptide zur Aufnahme in das Phytoplasma bereitstellen. Auf

Proteinebene wurde keines der *hflb*-Genprodukte gefunden, jedoch eine Zn-abhängige Protease (*tldD*) exprimiert. Weiterhin codiert das Genom von „*Candidatus* *Phytoplasma mali*“ Stamm AT für insgesamt 16 Pseudogene, von denen drei (Locus tags ATP_00171, ATP_00336, ATP_00414) als transkribiert und keines als translatiert identifiziert wurden.

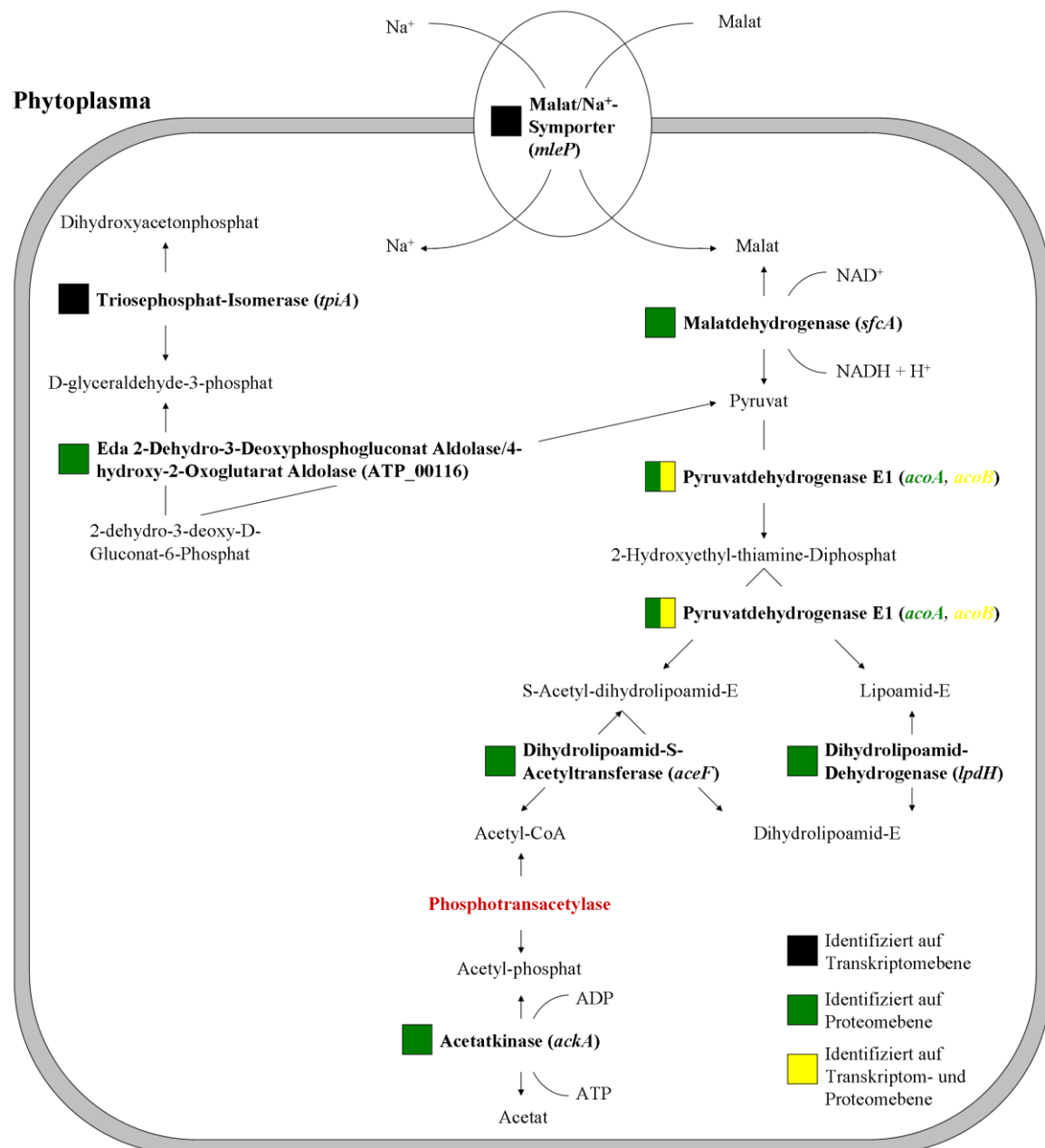


Abb.27. Validierung des postulierten Kohlenhydratmetabolismus von „*Candidatus* *Phytoplasma mali*“ Stamm AT. Nachbildung des Kohlenhydratmetabolismus, wie er durch Kube und Kollegen [23] beschrieben wurde, erfolgte anhand der durch RNA-Seq und Massenspektrometrie verifizierten Genprodukte. Eine **Phosphotransacetylase** ist nicht im Genom annotiert. Es wird vermutet, dass eines der hypothetischen Proteine diese Funktion übernommen hat.

Insgesamt 154 hypothetische Proteine sind im Genom codiert. Die Expression von 47 wurde bestätigt (38 durch RNA-Seq und 15 durch Massenspektrometrie, sechs Genprodukte konnten durch beide Methoden identifiziert werden). Eine Reihe der 47 als exprimiert validierten hypothetischen Proteine besitzen die Signalsequenz des Sec-abhängigen Translokationssystems und keine Transmembrandomäne. Dies zeigten bioinformatische Untersuchungen der Aminosäuresequenzen. Diese Proteine (Locus tags ATP_00147, ATP_00189, ATP_00266, ATP_00268, ATP_00414, ATP_00451) können somit vermutlich aus dem Zellinneren des Phytoplasma geschleust und in die Umgebung im Pflanzenwirt sekretiert werden. Sie stellen deshalb Kandidaten dar, die, ähnlich wie SAP11 [77, 78] und TENGU [84] der Phytoplasmen „*Candidatus* Phytoplasma asteris“ Stamm AYWB und OY-M, mit dem pflanzlichen Wirt interagieren und an der Ausbildung einer kompatiblen Interaktion beteiligt sind. Lediglich 13 solcher Kandidaten sind im Genom von „*Candidatus* Phytoplasma mali“ Stamm AT überhaupt codiert [11]. Dazu sind vier Bestandteile (*grpE*, *groES*, *groEL* und *ffh*) des Sec-abhängigen Translokationssystems auf Proteinebene und drei (*groEL*, *grpE* und *secY*) auf Transkriptomebene identifiziert worden. Somit scheinen insgesamt mindestens sechs der 11 Bestandteile des Sekretionssystems im pflanzlichen Wirt exprimiert zu werden. Weitere wichtige Teile wie *secA* konnten noch nicht validiert werden. Die gefundenen Bestandteile weisen darauf hin, dass ein Translokationssystem existiert. Das „Cold shock-like protein“ *cspJ* und der „Elongation factor Tu“ *EF-Tu* sind unter den sowohl auf Transkriptom- als auch auf Proteomebene nachgewiesenen Genen. Unspezifische „pathogen-associated molecular patterns (PAMPs)“, wie eben z.B. „cold shock proteins (CSPs)“ und der „elongation factor TU (EF-Tu)“, können die erste Ebene der pflanzlichen Immunantwort, die PAMP- ausgelöste Immunabwehr („PAMP- triggered immunity (PTI)“), auslösen [49-51] und eine Abwehrreaktion der Pflanze hervorrufen. Ob dies tatsächlich der Fall war kann anhand der bloßen Identifikation pflanzlicher Genprodukte nicht gezeigt werden. Hier ist eine Aussage über die Proteinmengen von Nöten, weshalb als Ergänzung zur bloßen Identifikation von Phytoplasmatranskripten und -proteinen ebenfalls eine quantitative Proteomanalyse durchgeführt wurde (9.2).

Nur für einen geringen Teil der Gene konnte die Expression sowohl auf Transkriptom- als auch auf Proteomebene nachgewiesen werden (28 Gene, Abb.19 und Abb.26). 24,3% der mittels RNA-Seq identifizierten exprimierten Gene konnten durch Massenspektrometrie und lediglich 26,7% der mittels Massenspektrometrie bestimmten Gene durch RNA-Seq validiert werden. Über eine Erklärung dafür kann nur gemutmaßt werden. Es gibt

wahrscheinlich verschiedene Gründe, weshalb nur so wenige Phytoplasmatranskripte durch RNA-Seq identifiziert wurden. Einer davon ist, dass phytoplasmale RNAs keine Schutzstrukturen wie den Poly(A)-Schwanz besitzen und somit einer höheren Umsatzrate im Organismus unterliegen. Proteine hingegen werden nicht so schnell wieder degradiert wie die codierende RNA. Vermutlich wurden deshalb für 77 massenspektrometrisch identifizierte Proteine (Abb.19) keine Transkripte gefunden. Für 87 auf Transkriptomebene exprimierte protein-codierende Gene wurden keine Proteine detektiert (Abb.19). Die Proteinmengen dieser in den Proteinisolaten, welche zur Massenspektrometrie verwendet wurden, könnten so gering gewesen sein, dass sie unter die Detektionsgrenze des Massenspektrometers fallen. Es wäre auch denkbar, dass von *Nicotiana occidentalis* abstammende Sequenzen fälschlicherweise zur Identifikation von protein-codierenden Genen des Phytoplasma führten. Welche aber wirklich falsch-positiv zugeordnet wurden, kann erst durch eine vollständige Sequenzierung von *Nicotiana occidentalis* aufgeklärt werden. Pflanze ph⁺- *N. Oc.* Nr. 1, die Pflanze die die stärksten Symptome einer Phytoplasmainfektion aufwies (Tab.5), lieferte die meisten Proteinidentifikationen (Abb.17). Diese Pflanze war jedoch zum Zeitpunkt der Probennahme für RNA-Seq bereits verwelkt. Deshalb mussten die Proben für RNA-Seq aus den weniger stark infizierten Pflanzen ph⁺- *N. Oc.* Nr. 3 und Nr. 4 (Tab.5) gewonnen werden. Wäre es gelungen, neben Proteinen auch genügend RNA aus der Pflanze ph⁺- *N. Oc.* Nr. 1 zu isolieren und diese im RNA-Seq einzusetzen, hätten mehr Phytoplasmatranskripte und so mehr Gene als transkribiert bestimmt werden können. Vermutlich ergäbe sich dann auch eine größere Übereinstimmung zwischen RNA-Seq und Massenspektrometrie.

Warum durch RNA-Seq lediglich zehn Genprodukte mehr als durch Massenspektrometrie validiert werden konnten, und das obwohl im RNA-Seq auch geringste Mengen an RNA durch PCR-Amplifikation sequenziert werden können, hat mehrere Gründe. Zur Charakterisierung des Transkriptoms von „*Candidatus* Phytoplasma mali“ Stamm AT musste RNA aus Blattrippenmaterial der Pflanzen ph⁺- *N. Oc.* Nr. 3 und Nr. 4 isoliert werden. Diese Proben enthielten bakterielle RNAs von „*Candidatus* Phytoplasma mali“ Stamm AT und einen großen Anteil an pflanzlichen RNAs. Der Anteil an wenig informativen RNA-Spezies in den Proben wurde verringert durch Abreicherung der pflanzlichen rRNAs. Der Erfolg dieser Abreicherung ist durch Analyse der Proben im 2100 Bioanalyzer (Agilent) vor und nach Entfernung der pflanzlichen rRNAs überprüft worden (Abb.14). Beide Proben zeigten eine eindeutige und ausreichend große Abnahme

der pflanzlichen nukleären rRNA-Moleküle. Durch diesen Ansatz konnte jedoch keine 100%-ige Abreicherung beobachtet werden. Eine Menge von mindestens 0,5 µg RNA wird laut Kit-Hersteller („TruSeq RNA Sample Preparation Kit“ von Illumina) für die nächsten Schritte, wie cDNA-Bibliothekherstellung, benötigt. Mit 0,99 bzw. 1,9 µg an RNA sind zwar ausreichende Mengen aus dem pflanzlichen Material isoliert worden, aber nicht genug um weitere Schritte zur Anreicherung der Phytoplasma-RNA durchzuführen, da ansonsten nicht genügend Material übrig bleibt. Es wäre möglich gewesen durch Abreicherung der bakteriellen rRNA-Spezies oder weiterer pflanzlicher RNAs den Anteil an Phytoplasma-RNA zu erhöhen. Im Genom von „*Candidatus* Phytoplasma mali“ Stamm AT ist keine Poly(A)-Polymerase codiert [23], was vermuten lässt, dass die RNA-Moleküle nicht durch Polyadenylierung der 3'-Enden geschützt werden. Durch Verwendung von Oligo-dT-Sonden hätte man so pflanzliche mRNA-Moleküle entfernen können, jedoch ist es denkbar, dass aufgrund des niedrigen G/C-Gehaltes von 21,4% des Genomes von „*Candidatus* Phytoplasma mali“ Stamm AT, auch Phytoplasma-RNA entfernt werden würde. Die Sonden hätten ebenfalls an besonders Adenin-reiche RNAs der Bakterien hybridisieren können. Mit jedem Schritt der Probenvorbereitung erhöht sich die Verzerrung der ursprünglich vorliegenden Mengenverhältnisse. Die durchgeführte Probenaufbereitung, bestehend aus RNA-Extraktion, rDNase-Verdau und Abreicherung pflanzlicher rRNA-Spezies, stellt somit einen Kompromiss aus optimaler Anreicherung phytoplasmaler RNAs bei gleichzeitiger Aufbereitung ausreichender Mengen dar. Somit ist es nicht verwunderlich, dass mit einer Menge von 1258 nur ein Bruchteil der 20.533.460 (ph⁺- *N. Oc.* Nr. 3) und 16.967.577 (ph⁺- *N. Oc.* Nr. 4) aus dem RNA-Seq-Experiment erhaltenen Sequenzen „*Candidatus* Phytoplasma mali“ Stamm AT zuzuordnen waren. Die verbleibenden Sequenzen sind demnach von *Nicotiana occidentalis*. Da jedoch keine Genomsequenz dieser Pflanze vorhanden ist, sind die Sequenzen nicht zugänglich für weitere Analysen. Es gibt mehrere Gründe, warum der Anteil an sequenzierten Phytoplasma-RNAs so gering ist. Zum einen machen Bakterien-RNAs, wie beschrieben, den kleineren Teil der RNA-Moleküle in den sequenzierten Proben aus. Weiterhin spielt der Infektionsgrad der Pflanzen eine große Rolle. Aus Pflanzen mit einer stärkeren Phytoplasmabesiedlung hätten vermutlich mehr Bakterien-RNAs erhalten werden können. Eine starke Symptombildung geht vermutlich mit einer hohen Phytoplasmabesiedlung der Pflanze einher. Die Pflanze mit den stärksten Symptomen war jedoch zum Zeitpunkt der Probennahme für RNA-Seq bereits verwelkt, weshalb die Pflanzen ph⁺- *N. Oc.* Nr. 3 und 4 ausgewählt wurden. Ein weiterer Grund für

die Unterrepräsentation phytoplasmaler RNAs ist dadurch gegeben, dass sie vermutlich keine Schutzstrukturen wie den Poly(A)-Schwanz besitzen. Phytoplasmale RNAs sind also schlechter vor dem Abbau geschützt als pflanzliche RNAs und unterliegen einer höheren Umsatzrate. Das Genom von „*Candidatus* Phytoplasma mali“ Stamm AT hat, wie alle Phytoplasmagenome [19], einen mit 21,4% reduzierten G/C-Gehalt. In der cDNA-Bibliothekserstellung findet eine PCR mit „Random Hexamers“ als Primer statt. Es ist bekannt, dass an dieser Stelle eine Verzerrung eingeführt wird, indem G/C-Reiche Moleküle, aufgrund der stärkeren Bindung der Primer, vermehrt in cDNA umgeschrieben werden [150, 151]. Dessen ungeachtet wurden 1258 Sequenzen durch softwaregestützte Analyse auf dem Genom von „*Candidatus* Phytoplasma mali“ Stamm AT „aligned“. Die Abdeckung des Genoms mit Sequenzen ist sehr gering und der Anteil der von *Nicotiana occidentalis* abstammenden Sequenzen, die fälschlicherweise auf dem Genom angeordnet wurden, bleibt unbekannt. Dennoch ist dieser Anteil vermutlich sehr gering, denn die Sequenzierreaktion auf der zum RNA-Seq verwendeten „Genome Analyzer IIX“-Plattform (Illumina) verlief über 100 Zyklen, d.h. dass bis zu 100 Basen lange Sequenzen erzeugt wurden. Je länger die Sequenzen sind, desto unwahrscheinlicher ist deren falsche Anordnung. Längere Sequenzen können derzeit auf der Illumina-Plattform nicht erzeugt werden [152]. Insgesamt 117 der 497 proteincodierenden Gene wurden mit mindestens einer Sequenz der Länge $30\text{bp} \leq x \leq 200\text{bp}$ abgedeckt. Diese Gene gelten als transkribiert (Anhang Tab.A1). Neben den Sequenzen, die im Genom auf proteincodierende Gene „aligned“ wurden, konnten auch viele auf nicht-proteincodierende Bereiche angeordnet werden. Die Gene der rRNA-Operons zeigten dabei die größte Abdeckung mit Sequenzen, was Resultat dessen ist, dass das phytoplasmale rRNA nicht abgereichert werden konnten. Einige Sequenzen decken bisher nicht im Genom des Phytoplasma annotierte Bereiche ab. Jedoch befinden sich in diesen Bereichen keine „Open Reading Frames (ORFs)“, weshalb eine proteincodierende Funktion auszuschließen ist. Auch „BLAST“-Untersuchungen (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>) zu diesen Sequenzen führten zu keinem Ergebnis. Es ist möglich, dass diese Sequenzen ebenfalls von *Nicotiana occidentalis* abstammen und fälschlicherweise auf dem Genom des Phytoplasma angeordnet wurden. Wie auch immer, eine Funktion konnte den Bereichen nicht zugeordnet werden und woher die Sequenzen stammen ist spekulativ. Kein Protein aus einem bisher nicht im Genom annotierten „Open Reading Frame (ORF)“ war in der Massenspektrometrie zu finden. Die Beobachtung, dass im RNA-Seq-Experiment einige Sequenzen bisher nicht im Genom des Phytoplasma annotierte Bereiche abdecken, konnte somit auf Proteomebene nicht bestätigt werden.

Dies zeigt die weiteren Untersuchungen zur Verifizierung der Beobachtungen von Nöten sind. So stehen q-RT-PCR-Experimente noch aus, wohingegen eine weitere Validierung von Genprodukten auf Proteomebene bereits erfolgt ist.

Im Gegensatz zu RNA-Seq wurde die Validierung der Gene von „*Candidatus Phytoplasma mali*“ Stamm AT anhand von Proteinisolaten aus Sproß- und Blattrippengewebe dreier *Phytoplasma*-positiver Pflanzen (ph^+ - *N. Oc.* Nr. 1-3) und massenspektrometrischer Methoden durchgeführt. Zur Auswertung der mittels des LTQ Orbitrap XL ETD™-Massenspektrometers (Thermo Scientific) gemessenen Massenspektren wurde die MaxQuant-Software und die „Andromeda search engine“ verwendet. Diese Software identifiziert Proteine durch Vergleich von theoretischen Massenspektren, abgeleitet aus Proteinsequenzen aus einer Datenbank, mit den im Massenspektrometer gemessenen Spektren. Somit können nur Proteine identifiziert werden, deren Sequenzen auch in die Datenbank geladen wurden. So sind neben den bisher bekannten *Nicotiana*- und „*Candidatus Phytoplasma mali*“ Stamm AT-Proteinen die Sequenzen aller „Open Reading Frames“ (mit einer gewissen Mindestlänge, 7.6.1.), abgeleitet aus dem Genom von „*Candidatus Phytoplasma mali*“ Stamm AT, zur Datenbank hinzugefügt worden. Auf diese Weise wurde, abgesehen von den bisher im Genom des *Phytoplasma* annotierten Proteinen, auch nach nicht-annotierten Proteinen gesucht. Ein Protein galt als identifiziert, wenn es mit mindestens zwei Peptide, wovon eines nur diesem Protein zuordenbar ist („Unique Peptide“), bei einer „False Discovery Rate (FDR)“ von 1% gefunden wurde. In der qualitativen Proteomanalyse wurden 105 der 497 (entspricht 21,1%) im Genom von „*Candidatus Phytoplasma mali*“ Stamm AT annotierten Proteine als translatiert bestimmt. Neben *Phytoplasm*proteinen sind mit 727-815 pflanzlichen Proteinen ähnliche Mengen pro analysierte Pflanze identifiziert worden. Im Gegensatz dazu variierte die Zahl der *Phytoplasm*proteine von 22-102 von Pflanze zu Pflanze (Abb.17). Mit 102 Proteinen wurden die meisten in der Pflanze ph^+ - *N. Oc.* Nr. 1, die die stärksten Symptome einer *Phytoplasm*infektion zeigte (Tab.5), bestimmt. Die anderen Pflanzen lieferten mit 22 (ph^+ - *N. Oc.* Nr. 2) und 39 (ph^+ - *N. Oc.* Nr. 3) wesentlich weniger Proteinidentifikationen. Auch das zeigt wie wichtig ein hoher Infektionsgrad der Pflanzen ist um viele Genprodukte der *Phytoplasm*en detektieren zu können. Ji und Kollegen konnten durch Anwendung einer *Phytoplasm*aanreicherungsstrategie massenspektrometrisch 209 Proteine des „mulberry dwarf“-*Phytoplasm*a in Maulbeerbäumen identifizieren [121]. Durch eine ähnliche Strategie hätten vermutlich auch mehr Proteine von „*Candidatus Phytoplasma mali*“

Stamm AT identifiziert werden können, jedoch verzerrt diese auch die tatsächlich in der Pflanze vorliegenden Mengenverhältnisse der Proteine zueinander. So konnten durch RNA-Seq und Massenspektrometrie lediglich abundante Genprodukte identifiziert werden. Weiterhin ist das Genom des „mulberry dwarf“-Phytoplasma nicht sequenziert. Die Proteinidentifikation erfolgte deshalb auf Basis sämtlicher Proteine der *Mollicutes*. Aufgrund dieser Datengrundlage ist es möglich das Proteine des Phytoplasmas falsch-positiv bestimmt wurden. Anhand der vollständigen Genomsequenz von „*Candidatus* Phytoplasma mali“ Stamm AT war eine wesentlich verlässlichere Proteinidentifikation möglich. Es ist sehr fraglich ob die Ergebnisse des „mulberry dwarf“-Phytoplasma auf „*Candidatus* Phytoplasma mali“ Stamm AT übertragbar sind, denn diese Phytoplasmen besiedeln sehr verschiedene Pflanzen und Insekten, haben verschiedene Genomsequenzen und damit auch unterschiedliche Genexpressionsprofile.

9.2. Antwort des pflanzlichen Wirtes auf eine Infektion

Nur wenig ist darüber bekannt welche Prozesse Phytoplasmen in ihren Wirten auslösen und wie sie sich der Immunabwehr entziehen. Aus diesem Grund wurden in einer quantitativen Proteomanalyse pflanzliche Proteine bestimmt die in Folge einer Phytoplasmainfektion differentiell exprimiert werden. Die Proteinzusammensetzung von „*Candidatus* Phytoplasma mali“ Stamm AT-positiven *Nicotiana occidentalis*-Pflanzen wurde dazu relativ durch Vergleich mit uninfizierten *Nicotiana occidentalis*-Pflanzen unter Verwendung von Massenspektrometrie und des Dimethyl Labelings quantifiziert. Die uninfizierten *Nicotiana occidentalis*-Pflanzen wurden zunächst auf eine eventuelle Phytoplasmainfektion mittels P1/P7-PCR getestet (8.1). Der Test viel negativ aus da keine PCR-Produkte der richtigen Größe entstanden sind (Abb.13). Laut Dr. Kube (Max Planck Institut für molekulare Genetik Berlin) resultiert das in allen PCR-Ansätzen (bis auf in der negativ Kontrolle) auftretende Nebenprodukt aus der Amplifizierung eines rRNA-Gens der Pflanze. Weiterhin sind der lineare dynamische Bereich (8.5.2) und der technische Messfehler (8.5.3) des Labelings bestimmt worden. Über den Messfehler wurden Schwellenwerte festgesetzt die aussagen ab wann ein Protein als differentiell exprimiert gilt (8.5.3). Anschließend wurden in Blattrippengewebe durch eine Phytoplasmainfektion differentiell exprimierte Proteine in einem Forward und Reverse Labelingansatz, also in einem technischen Replikat, bestimmt. Mit rund 400 Proteinen konnte ca. die Hälfte an

pflanzlichen Proteinen wie in der qualitativen Proteomanalyse identifiziert werden. Aufgrund des Isotopenlabelings kommt theoretisch jedes Peptid zweimal vor, weshalb vermutlich auch nur 50% der Proteinidentifikationen erreicht wurde. Die Ergebnisse aus Forward und Reverse Labeling stimmten gut überein, was die große Überlappung an identifizierten Proteinen (76-81%) und eine Regressionsanalyse (Abb.23) zeigten. Durch die zuvor bestimmten Schwellenwerte wurden 79 in Phytoplasma-positiven Pflanzen herauf- und 42 herunterregulierte Proteine bestimmt. 128 Proteine zeigten keine differentielle Regulation. Da ein Protein nur als reguliert galt wenn es sowohl im Forward als auch im Reverse Labeling die Schwellenwerte überschritten hat, ist dieses Set an regulierten Proteinen sehr Robust. Eine Einordnung in funktionelle Kategorien gab Auskunft darüber an welchen Prozessen die Proteine beteiligt sind (Abb.24). Insgesamt 27 Proteine wurden der Kategorie „Translation“ zugeordnet. Es viel auf, dass sämtliche Proteine (11 an der Zahl) die dabei in Chloroplasten lokalisiert sind unterexprimiert wurden und die anderen Proteine keine veränderte Expression zeigten. Fünf Proteine (ATP-Synthase β - und λ -Untereinheit gi|122213542 und gi|19785, Plastocyanin gi|256860445, ein Photosystem I Untereinheit gi|2499966, eine Untereinheit des sauerstoffproduzierenden Komplexes gi|1345550) der in chloroplasten lokalisierten Photosynthese wurden genauso wie vier wichtige Enzyme der Chlorophyllbiosynthese (Uroporphyrinogendecarboxylase gi|1009429, NADPH-Protochlorophyllidoxidoreductase gi|21068895, Coproporphyrinogenoxidase gi|1213067, Mg-Protoporphyrinchelatase gi|2323329) in infizierten Pflanzen herunterreguliert. Auch Proteine des Calvinzyklus, in dem die CO₂-Fixierung im Stroma der Chloroplasten stattfindet, wurden reprimiert (RuBisCO-Activase gi|1006835, Aldolase gi|111162651 und gi|4827253, Ribulosebisphosphatcarboxylase gi|12643758). Diese Beobachtungen sprechen für eine heruntergefahrte Photosynthese und decken sich mit den Ergebnissen aus anderen Studien die ebenfalls die Pflanze/Phytoplasma-Interaktion, jedoch in anderen Pflanze/Phytoplasma-Systemen, untersuchten. So zeigten Chen und Lin das Transkripte der plastidischen Aldolase reprimiert werden und diskutierten das dadurch Photosynthese und damit das Wachstum inhibiert werden könnten [123]. Eine „Microarray“-Studie zur *Vitis vinifera* cv. 'Chardonnay'/'Bois Noir'-Phytoplasma-Interaktion zeigt ebenfalls das viele Gene der Photosynthese durch eine Phytoplasmainfektion herunterreguliert werden [124]. In Untersuchungen auf Proteomebene durch 2DE-MALDI-TOF/TOF-Analysen sind viele Proteine aus photosynthetischen Prozessen, darunter eine Untereinheit des Photosystems II, die RuBisCO-Activase und die große Untereinheit von RuBisCO auch

auf Proteomebene reprimiert [125-127]. Einige phytoplasmainduzierte Symptome wie die generelle Unterentwicklung („stunting“), der Kleinwuchs und die nicht saisonal verursachte Gelbfärbung [15] lassen sich vermutlich durch die Abnahme der photosynthetischen Leistung und des Chlorophyllgehaltes erklären. Im Gegensatz zu den reprimierten Proteinen in photosynthetischen Prozessen wurden Proteine der Glycolyse (Phosphoglyceratkinase gi|1161602), des Citratzyklus (2-Oxoglutarat/Malat Carrier gi|10798640, Isocitratdehydrogenase gi|3021506) und der oxidativen Phosphorylierung (ATP-Synthase α - und β -Untereinheit gi|114407 und gi|114421, NADH-Dehydrogenase Untereinheit 9 gi|56806644) verstärkt exprimiert. Das lässt vermuten das infizierte Pflanzen verstärkt ihre Speicherstoffe metabolisieren anstatt durch Photosynthese neue aufzubauen. Auch darüber lassen sich wahrscheinlich Krankheitssymptome wie die generelle Unterentwicklung („stunting“), der Kleinwuchs und ein unterentwickeltes Wurzelsystem [15, 72] erklären. Proteine des Biosyntheseweges der Jasmonsäure (Lipoxygenase gi|32454706, Allenoxid Synthase gi|16973300), ein Phytohormon, wurden hochreguliert (Abb.28).

Pflanzenzelle

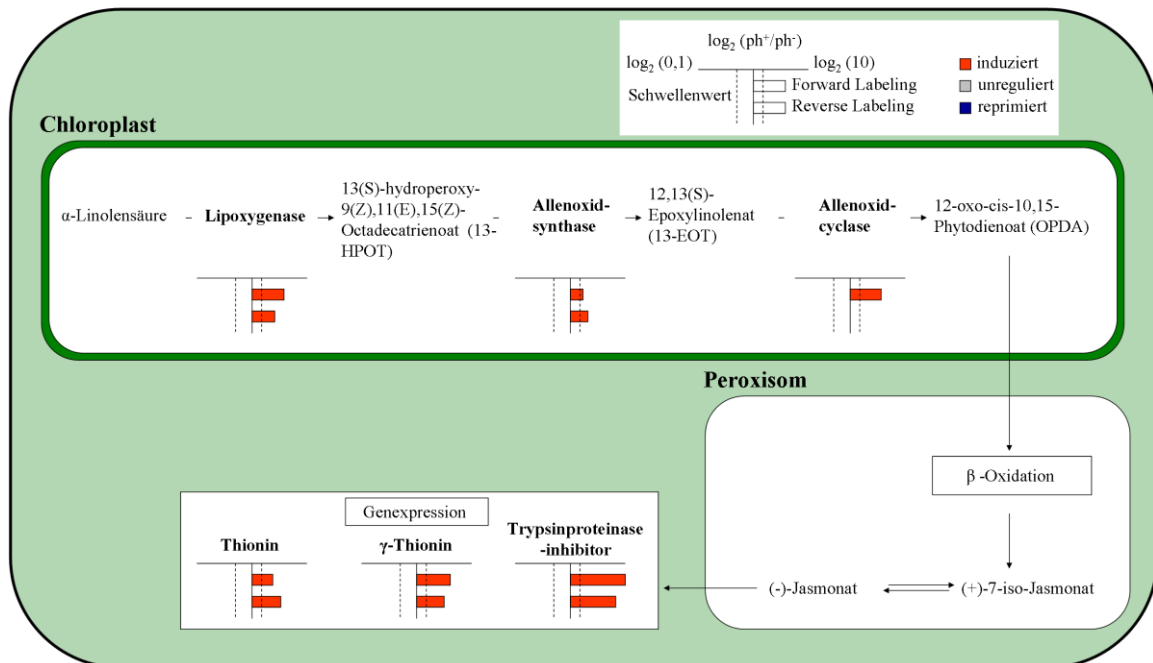


Abb.28. Jasmonsäurebiosynthese in Pflanzen und Regulation der Genexpression. Die Biosynthese von Jasmonsäuren findet in Chloroplasten und Peroxisomen statt. Dieses Phytohormon reguliert verschiedene Prozesse durch die Expression verschiedener Gene über bisher unbekannte Mechanismen. Die Lipoxygenase, Allenoxidsynthase, Thionine und der Trypsinproteinaseinhibitor zeigten eine verstärkte Expression auf Proteinebene in „*Candidatus* Phytoplasma mali“ Stamm AT-infizierten *Nicotiana occidentalis*-Pflanzen. Die Allenoxidcyclase wurde im Forward Labeling jedoch nicht im Reverse Labeling identifiziert.

Dieses Hormon steuert verschiedene Prozesse der Pflanzenentwicklung, der Immunantwort gegen Pathogene und phloemsaugende Insekten [46, 52, 54, 55, 61, 63, 64]. So ist bekannt das Jasmonsäuren Wurzelwachstum [153-155] und den photosynthetischen Apparat [156-159] inhibieren. Ob die beobachtete Herunterregulation photosynthetischer Prozesse durch Jasmonsäure ausgelöst wurde kann jedoch nicht mit Sicherheit bestätigt werden. Linolensäuren, die Ausgangssäuren der Jasmonsäurebiosynthese (Abb.28), kommen vermehrt in Chloroplastenmembranen vor, weshalb vermutet wurde das deren Freisetzung in Folge der Aktivierung von Phospholipasen zu erhöhten Jasmonsäuregehalt führt [160]. Eine Phospholipase wurde jedoch nicht identifiziert. Jasmonsäure aktiviert Gene für antifungal wirkende Proteine wie z.B. Thionine und Osmotine [161, 162]. Eine verstärkte Expression dieser Proteine wurde beobachtet (Abb.28). Unter Verwendung von bovinem Serumalbumin (BSA) wurde der lineare dynamische Bereich des Dimethyl Labelings bestimmt (8.5.2). Es zeigte sich das eine zehnfache Herauf- und Herunterregulation von Proteinen zuverlässig nachgewiesen werden konnte (Abb.21), was sich mit den Beobachtungen von Hsu und Kollegen deckt [142]. Huang und Kollegen weisen nach, dass das Labeling bis zu einer 20-fachen Regulation linear ist [143]. Osmotin wurde stärker als diese Grenzwerte heraufreguliert, weshalb der Regulationswert vermutlich nicht exakt ist, dieses Protein jedoch immernoch stark reguliert wurde. Neben Thionin und Osmotin wurden auch drei Chitinasen in Folge einer Infektion mit „*Candidatus Phytoplasma mali*“ Stamm AT verstärkt exprimiert (Anhang Tab.A3). Diese Proteine haben vermutlich keinen direkten Einfluss auf das Bakterium und sind der ersten unspezifischen Ebene der Immunabwehr des Pflanzenwirtes, der „PAMP“-ausgelösten Immunabwehr, zuzuordnen. Solche „PAMPs“ stellen z.B. „cold shock proteins (CSPs)“ und der „elongation factor TU (EF-Tu)“ dar [49-51]. Beide Proteine wurden in der qualitativen Proteomanalyse als durch „*Candidatus Phytoplasma mali*“ Stamm AT exprimiert bestimmt (Tab.13). Auch in der quantitativen Proteomanalyse wurde das „cold shock protein (CSP)“ als eines von insgesamt vier Phytoplasmaproteinen identifiziert (Tab.14). Ob die unspezifische Immunabwehr der Pflanze durch diese Proteine ausgelöst wurde kann jedoch nicht zweifelsfrei nachgewiesen werden. Warum im Vergleich zur qualitativen Proteomanalyse nur so wenige Phytoplasmaproteine gefunden wurden, hängt damit zusammen das die Proteinisolate dreier Phytoplasma-infizierter Pflanzen gepoolt und anschließend 1:1 mit den Isolaten aus drei nichtinfizierten Pflanzen gemischt wurden. Das führte zu einer Verdünnung der bakteriellen Proteine, die deshalb wahrscheinlich nicht mehr im

Massenspektrometer detektiert werden konnten. Neben der Aktivierung antifungaler Gene werden durch Jasmonsäure auch Gene für Proteaseinhibitoren induziert, welche die Pflanze vor Schäden, verursacht durch proteaseabsondernde Insekten, schützen [163]. Mit dem Trypsinproteinaseinhibitor wurde ein solches heraufreguliertes Protein bestimmt (Abb.21) [164]. Die Tatsache das wichtige Enzyme der Biosynthese und durch Jasmonsäure regulierte Gene verstärkt exprimiert wurden lässt vermuten das in „*Candidatus* Phytoplasma mali“ Stamm AT-infizierten Pflanzen Jasmonsäuren verstärkt akkumulieren. Sugio und Kollegen zeigen hingegen das in SAP11 (ein Protein des Phytoplasmas „*Candidatus* Phytoplasma asteris“ Stamm AYWB)-transgenen *Arabidopsis*-Linien die Lipoxygenaseexpression auf RNA-Ebene und die Jasmonsäureakkumulation reduziert werden [11, 78]. Dieses Protein ist im Genom von „*Candidatus* Phytoplasma mali“ Stamm AT jedoch nicht codiert [23]. Der Jasmonsäurevorläufer 12-oxo-cis-10,15-Phytodienoat (OPDA) (Abb.21) ist möglicherweise toxisch für pflanzenfressende Insekten [165] und ähnelt strukturell stark den Prostaglandinen, welche u.a. eine Funktion in der Aktivierung des Immunsystems von Insekten besitzen [166]. Deshalb wird es im Darm der Insektenlarven von Schmetterlingen (*Lepidoptera*) umgehend inaktiviert [167]. Da Jasmonsäuren eine wichtige Rolle in der Abwehr von sich von Phloemgewebe ernährenden Insekten spielen [46, 52, 54, 55, 61, 63, 64], stellt sich die Frage welche Auswirkung dies auf das Phytoplasma/Pflanze/Insekt-System hat, denn Phytoplasmen sind auf eine Verbreitung durch phloemsaugende Insekten angewiesen. Es ist denkbar, dass in Folge der Insektenabwehrmechanismen der Pflanze und dabei insbesondere durch den Jasmonsäurevorläufer 12-oxo-cis-10,15-Phytodienoat (OPDA) Insekten während des Phloemsaugens geschwächt werden. Die während des Phloemsaugens ebenfalls aufgenommenen Phytoplasmen könnten dadurch in die Lage versetzt werden dem Insektenimmunsystem auszuweichen. D.h. dass die Auslösung der Jasmonsäure durch „*Candidatus* Phytoplasma mali“ Stamm AT dem Phytoplasma einen Vorteil verschaffen könnte indem es sich im Insekt besser verbreiten kann. Hinzu kommt das mit „*Candidatus* Phytoplasma mali“ infizierte Apfelbäume verstärkt einen Lockstoff, das (*E*)- β -Caryophyllen, für den Insektenvektor *Cacopsylla picta* absondern [73, 74]. Die (*E*)- β -Caryophyllensynthese wurde nicht identifiziert, aber die Biosynthese dieses Lockstoffes findet aus Dimethylallyldiphosphat, dem Produkt der Methylerythritol- und Mevalonat-Stoffwechselwege, statt, aus denen Enzyme identifiziert werden konnten (Abb.29).

Pflanzelle

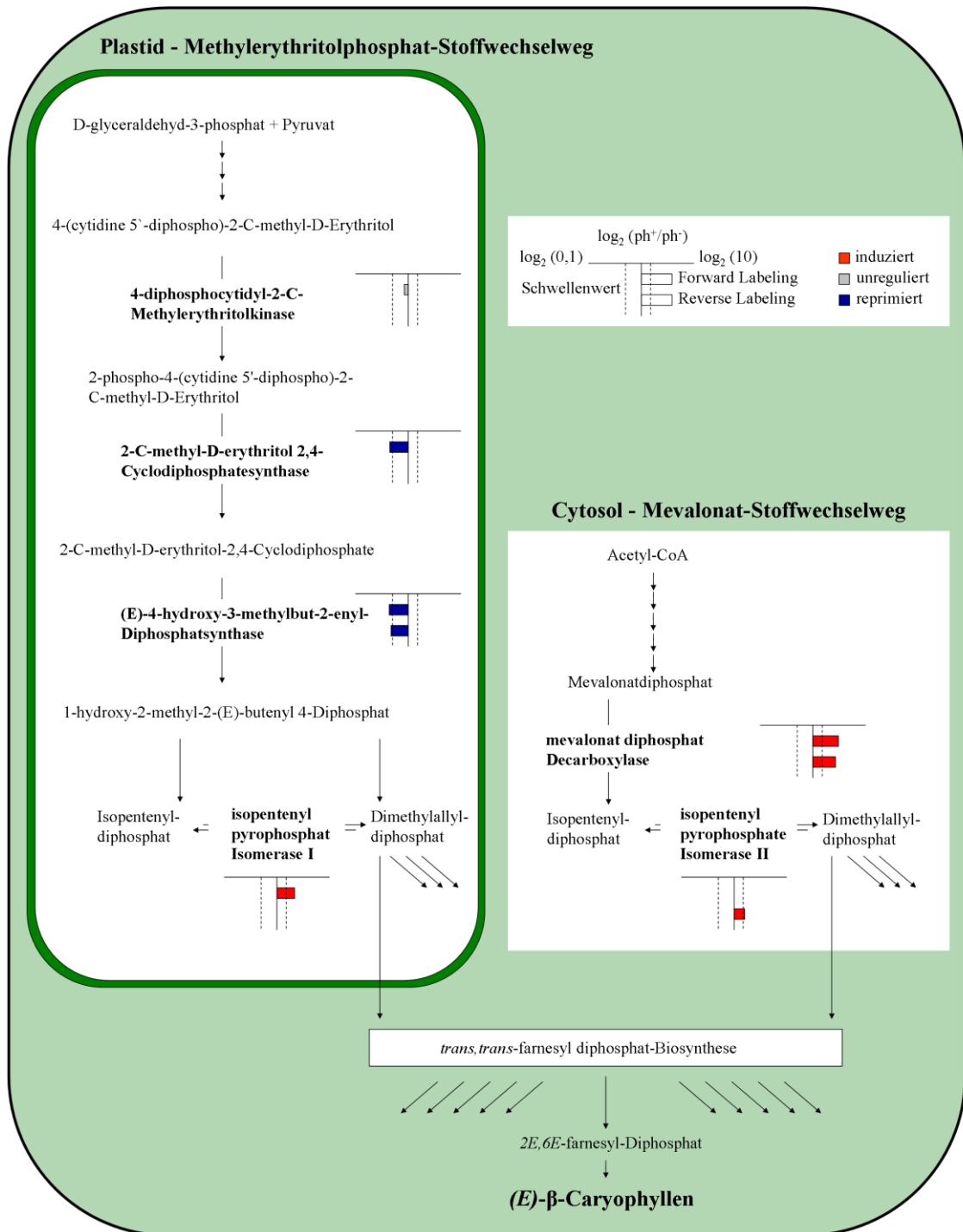


Abb.29. Aus im Methylerythritolphosphat- und Mevalonat-Stoffwechsel entstehenden Produkten erfolgt die Biosynthese von (E)-β-Caryophyllen. Der Lockstoff (E)-β-Caryophyllen für den Insektenvektor *Cacopsylla picta* von „*Candidatus* Phytoplasma mali“ wird in pflanzlichen Zellen aus Dimethylallyldiphosphat synthetisiert. Der plastidische Biosyntheseweg für diesen Vorläufer scheint im Gegensatz zum cytosolischen Weg auf Proteinebene reprimiert zu werden. Vier der aus diesen Stoffwechselwegen gefundenen Proteine wurden nur im Forward oder nur im Reverse Labeling identifiziert.

So wurden Proteine des plastidischen Methylerythritol-Weges reprimiert und Proteine des cytosolischen Mevalonat-Weges induziert. Ob es sich dabei nur um eine Kompensation handelt um dennoch ausreichend Dimethylallyldiphosphat bereitzustellen kann nur vermutet werden. Auch ist es fraglich ob erhöhte Mengen an Dimethylallyldiphosphat zu mehr (*E*)- β -Caryophyllen führen, denn diese Verbindung findet Eingang in viele weitere Biosynthesewege (Abb.29). Eine verstärkte Biosynthese des Lockstoffes in *Nicotiana occidentalis*-Pflanzen infiziert mit „*Candidatus* Phytoplasma mali“ Stamm AT kann somit nicht bestätigt, aber auch nicht abgelehnt werden. Hier könnten q-RT-PCR-Experimente Aufschluss darüber geben ob z.B. die (*E*)- β -Caryophyllensynthase induziert wird. Wie sich „*Candidatus* Phytoplasma mali“ Stamm AT der zweiten, spezifischen Ebene der pflanzlichen Immunabwehr, der Effektor-ausgelösten Abwehr, entzieht ist unbekannt. Das „Chloroplast-N-Receptor-interacting protein 1“ (gi|169786772) wurde in „*Candidatus* Phytoplasma mali“ Stamm AT-infizierten *Nicotiana occidentalis*-Pflanzen zehnfach herunterreguliert. Dieses Protein bindet eine Domäne des P50-Proteins des Tabakmosaikvirus und ist notwendig um das P50-Protein über den N-Immunrezeptor, ein Mitglied der TIR-NB-LRR-Rezeptorfamilie, zu erkennen und so den Virus abzuwehren [168]. Da die *Nicotiana occidentalis*-Pflanzen jedoch nicht mit dem Virus infiziert waren ist es möglich das das „Chloroplast-N-Receptor-interacting protein 1“ auf ähnliche Art und Weise zur Erkennung von „*Candidatus* Phytoplasma mali“ Stamm AT-Proteinen über den N-Immunrezeptor führen könnte, weshalb das Bakterium einen noch zu identifizierenden Mechanismus entwickelt hat um dieses Protein zu reprimieren. Ein positiver Regulator eines TIR-NB-LRR-Rezeptors wird in mit „*Candidatus* Phytoplasma aurantifolia“-infizierten Limettenbäumen auf RNA-Ebene herunterreguliert [122]. Diese Rezeptoren scheinen demnach eine Rolle in der spezifischen Erkennung und Abwehr von Phytoplasmen zu spielen.

9.3. Schlussfolgerungen und Ausblick

In der Modellpflanze *Nicotiana occidentalis* exprimierte Gene von „*Candidatus* Phytoplasma mali“ Stamm AT wurden auf RNA-Ebene durch RNA-Seq und auf Proteinebene via Massenspektrometrie bestimmt. Genprodukte von 34,2 % aller protein-codierenden Gene sind erfolgreich validiert worden. Darunter befinden sich alle im Genom codierten Gene des mutmaßlichen Kohlenhydratmetabolismus des Bakteriums.

30,5% der Gene für hypothetische Proteine wurden exprimiert. Durch bioinformatische Analysen sind sechs der hypothetischen Proteine identifiziert worden die vermutlich vom Bakterium in den pflanzlichen Wirt abgegeben werden. Diese stellen potentielle Effektoren dar, die es „*Candidatus Phytoplasma mali*“ Stamm AT ermöglichen eine kompatible Interaktion durch Überwindung der pflanzlichen Immunantwort auszubilden und so die spezifischen Krankheitssymptome in der Modellpflanze und seinem natürlichen Wirt, dem Apfelbaum, hervorzurufen. Die Symptome verursachen große Ernteeinbußen im Apfelanbau. In einer quantitativen Proteomanalyse unter Verwendung des Dimethyl Labelings konnten erfolgreich 121 pflanzliche Proteine der Modellpflanze *Nicotiana occidentalis* bestimmt werden, die aufgrund einer Infektion mit „*Candidatus Phytoplasma mali*“ Stamm AT differentiell reguliert wurden. Soweit bekannt, ist dadurch einer der größten Einblicke in die Pflanze/Phytoplasma-Interaktion gewonnen worden. Die beobachteten Veränderungen auf Proteomebene sind konform mit vielen durch Phytoplasmen ausgelösten Krankheitssymptomen. Eine bereits in anderen Studien berichtete Abnahme der photosynthetischen Leistung wurde auch für „*Candidatus Phytoplasma mali*“ Stamm AT-infizierte Pflanzen nachgewiesen. Die Biosynthese des Pflanzenhormons Jasmonsäure und Jasmonsäure-responsive Gene wurden heraufreguliert. Dieses Hormon spielt eine entscheidende Rolle in der Pflanzenentwicklung, der Abwehr von Pathogenen und phloemsaugenden Insektenvektoren. Es wurde diskutiert welche mögliche Rolle Jasmonsäure und der Jasmonsäurevorläufer 12-oxo-cis-10,15-Phytodienoat (OPDA) für die Verbreitung der Phytoplasmen durch Schwächung der Insektenvektoren besitzt. Eine verstärkte (*E*)- β -Caryophyllenbiosynthese zum Anlocken des Insektenvektors von „*Candidatus Phytoplasma mali*“, wie sie in anderen Studien berichtet wurde, ist wahrscheinlich, konnte aber nicht zweifelsfrei bewiesen werden. Die unspezifische Immunantwort der Pflanze scheint ausgelöst zu werden. Außerdem ist die bereits gemachte Beobachtung, dass Rezeptoren der TIR-NB-LRR-Familie eine wichtige Rolle beim Entzug der Phytoplasmen vor der spezifischen Ebene der pflanzlichen Immunabwehr spielen, bestätigt worden. Die durchgeführten Untersuchungen und gemachten Beobachtungen ergänzen das bisher bestehende Bild des Phytoplasma/Pflanze/Insekt-Kreislaufes (Abb.30). Neben der Verifizierung der Ergebnisse durch q-RT-PCR-Analysen ist aufzuklären ob diese auch auf andere Phytoplasma/Pflanzenwirt-Systeme übertragbar sind.

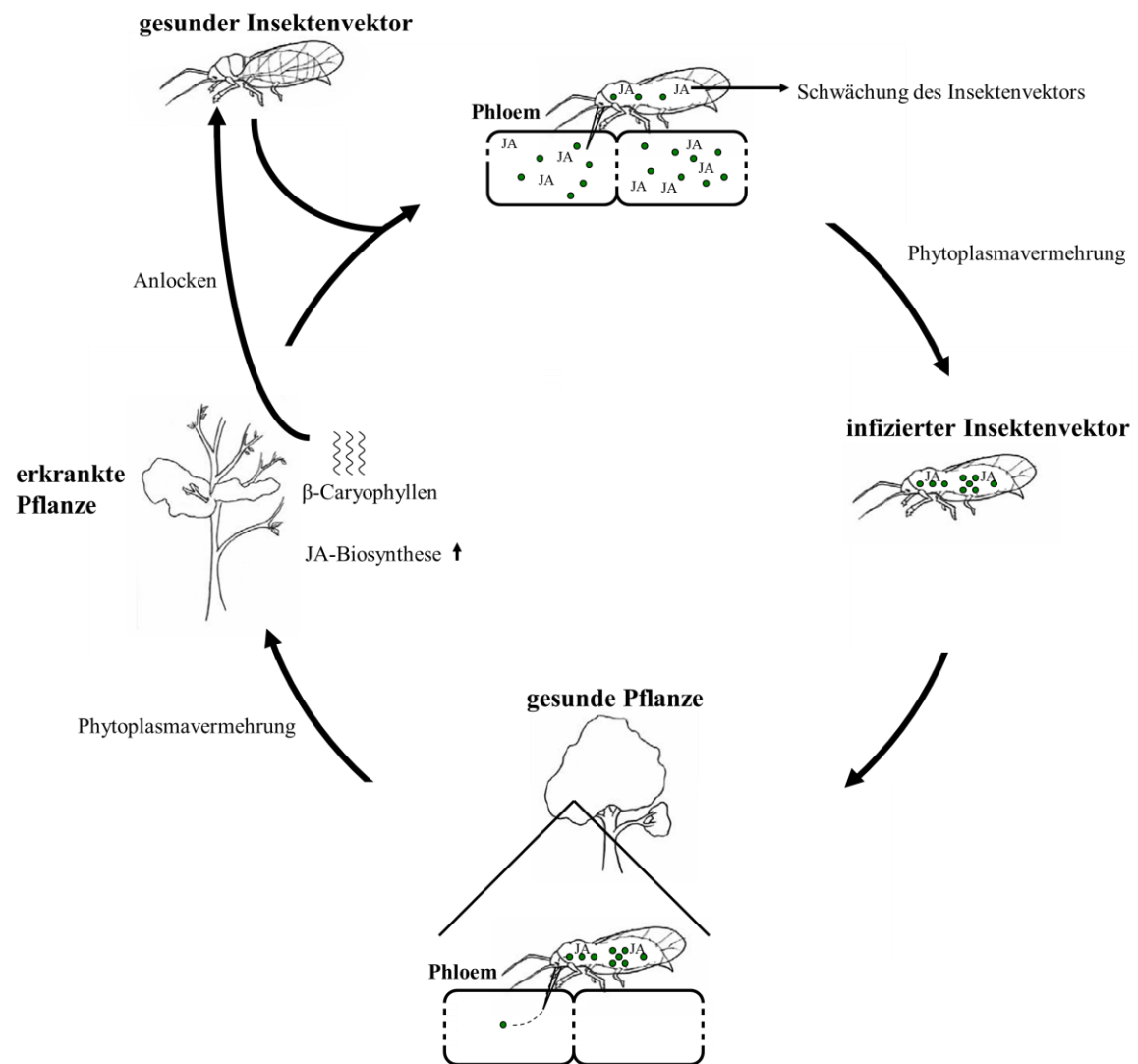


Abb.30. Der erweiterte Phytoplasma/Pflanze/Insekt-Kreislauf. Das Phytopathogen „*Candidatus Phytoplasma mali*“ Stamm AT ruft in Apfelbäumen verschiedenste Symptome in Folge molekularer Veränderungen hervor. Die Jasmonsäurebiosynthese wird heraufreguliert und somit die Pflanzenentwicklung beeinflusst. Der Lockstoff (*E*)- β -Caryophyllen, der den Insektenvektor *Cacopsylla picta* anlockt und zum Verbreiten der Phytoplasmen durch Phloemsaugen veranlasst, wird durch die Infektion mit „*Candidatus Phytoplasma mali*“ verstärkt abgesondert. Jasmonsäuren und die Biosynthesevorläufer wie 12-oxo-cis-10,15-Phytodienoat (OPDA) werden durch das Insekt mit aufgenommen und schwächen dieses. Dadurch kann „*Candidatus Phytoplasma mali*“ Stamm AT sich vermehren ohne vom Immunsystem erkannt zu werden und leichter in die Speicheldrüsenzellen gelangen. Bei erneuten Phloemsaugen des infizierten Insektenvektors gelangt „*Candidatus Phytoplasma mali*“ Stamm AT im Speichelsekret in weitere Pflanzen. JA: Jasmonsäure und 12-oxo-cis-10,15-Phytodienoat (OPDA).

Da „*Candidatus Phytoplasma mali*“ innerhalb des Genus „*Candidatus Phytoplasma*“ zur Apfeltriebsuchtgruppe („appleproliferation group (AP)“, Abb.1) gehört, sind zunächst weitere dazugehörige Phytoplasmen wie z.B. „*Candidatus Phytoplasma pyri*“ und „*Candidatus Phytoplasma prunorum*“ zu untersuchen, bevor phylogenetisch entferntere

Phytoplasmaspezies herangezogen werden. Die identifizierten, vermutlich sekretierten hypothetischen Proteine stellen potentielle Effektoren dar. Rekombinante Expression dieser in Modellpflanzen könnte Aufschluss über deren Funktion geben. Über „Two-Hybrid“-Systeme ist es möglich Phytoplasmaproteine zu identifizieren die das „Chloroplast-N-Receptor-interacting protein 1“ binden und so die Erkennung dieser über Rezeptoren der TIR-NB-LRR-Familie vermitteln würden, wenn das „Chloroplast-N-Receptor-interacting protein 1“ nicht vermindert exprimiert werden würde. Warum die Expression reduziert wird ist ebenfalls aufzuklären.

10. Zusammenfassung

Phytoplasmen sind phytopathogene Bakterien der Klasse *Mollicutes*, welche durch phloemsaugende Insekten von Pflanze zu Pflanze übertragen werden. Die Krankheitssymptome, die sie in ihren pflanzlichen Wirten hervorrufen, verursachen große Verluste in der Produktion pflanzlicher Erzeugnisse in der ganzen Welt. Bis heute ist es nicht gelungen sie in zellfreien Medien zu kultivieren. „*Candidatus Phytoplasma mali*“ Stamm AT, dessen natürlicher Wirt der Apfelbaum und dessen Genomsequenz veröffentlicht ist, gilt als Erreger der Apfeltriebsucht. Nur wenig ist bekannt, welche Gene Phytoplasmen in ihren pflanzlichen Wirten exprimieren und wie sie sich der Immunantwort entziehen. In einem innovativen Ansatz unter Verwendung von RNA-Seq, einer „Next Generation Sequencing“-Technik, und eines LTQ-Orbitrap MS/MS-Massenspektrometers wurden transkribierte und translatierte Gene von „*Candidatus Phytoplasma mali*“ Stamm AT in der Modellpflanze *Nicotiana occidentalis* bestimmt. Die Expression aller im Genom codierten Gene des postulierten Kohlenhydratmetabolismus von „*Candidatus Phytoplasma mali*“ Stamm AT wurde validiert. In einer quantitativen Proteomanalyse mit der Isotopenlabeltechnik Dimethyl Labeling konnte, soweit bekannt, einer der größten Einblicke in die Pflanze/Phytoplasma-Interaktion gewonnen werden. Die beobachteten Veränderungen auf Proteomebene stehen im Einklang mit vielen durch Phytoplasmen ausgelösten Krankheitssymptomen. Proteine, involviert in photosynthetischen Prozessen, wurden reprimiert. Wichtige Enzyme des Biosyntheseweges der Jasmonsäure zeigten eine induzierte Expression. Dieses Phytohormon spielt entscheidende Rollen in der Pflanzenentwicklung, der Immunabwehr und der Abwehr von Pflanzenfressern, wie es z.B. die Überträger von Phytoplasmen sind. Der Einfluss der Jasmonsäuren und Jasmonsäurebiosynthesevorläufer auf den Phytoplasma/Pflanze/Insekt-Kreislauf wurde diskutiert und die Hypothese aufgestellt, das sie eine Verbreitung der Phytoplasmen durch Schwächung der Insektenvektoren positiv beeinflussen. Zusätzlich wurde die Expression zahlreicher Gene von „*Candidatus Phytoplasma mali*“ Stamm AT, deren Funktion unbekannt ist, validiert. Ein Teil dieser hypothetischen Proteine werden, basierend auf bioinformatischen Analysen, vermutlich sekretiert und stellen somit potentielle Effektorproteine dar. Die Funktion dieser Proteine im Phytoplasmametabolismus und in der Pflanze/Phytoplasma-Interaktion muss in zukünftigen Studien untersucht werden.

11. Summary

Phytoplasmas, which are phytopathogenic bacteria of the class *Mollicutes*, are spread from plant to plant by phloem-sucking insects. The symptoms of disease they cause in their plant hosts contribute to major economic losses in the production of plant derived products in the whole world. To date, all attempts of cultivating these bacteria outside their hosts have failed. „*Candidatus Phytoplasma mali*“ strain AT, which infects apple trees and whose genome has been sequenced, causes apple proliferation. Only little is known about the genes that are expressed by phytoplasmas in their plant hosts and how they accomplish to not get noticed by the immune system. In an innovative approach using the “Next Generation Sequencing”-technique RNA-Seq and an LTQ-Orbitrap MS/MS-mass spectrometer in the model plant *Nicotiana occidentalis* transcribed and translated genes of the bacterium were determined. The expression of all in the genome encoded genes of the postulated carbon metabolism of „*Candidatus Phytoplasma mali*“ strain AT was successfully validated. In an quantitative analysis of the plant’s proteome with the isotope labeling technique Dimethyl Labeling the, as far as known, deepest so far reported view into the plant/phytoplasma-interaction could be obtained. The observed molecular changes on the proteome level are in line with several disease symptoms. Proteins involved in photosynthetic processes were down regulated due to phytoplasma infection. Important enzymes of the jasmonic acid biosynthesis pathway were found to be induced. This phytohormone plays a major role in plant development, immune resistance and resistance to herbivorous insects like the insect vectors of phytoplasmas. The impact of jasmonic acids and their precursors on the phytoplasma/plant/insect-circuit was discussed. This resulted in the hypothesis that jasmonic acids may benefit the spread of phytoplasmas due to weakening of the insect hosts. In addition the expression of several genes of „*Candidatus Phytoplasma mali*“ Stamm AT with unknown function was validated. A portion is most likely to be secreted based on bioinformatical analysis and thus represent potential effectors of „*Candidatus Phytoplasma mali*“ Stamm AT. The function of these hypothetical proteins in phytoplasma metabolism and in the plant/phytoplasma-interaction has to be addressed in future studies.

12. Literaturverzeichnis

1. Kunkel, L.O., *Studies on aster yellows*. Am. J. Bot. , 1926. **23**: p. 646–705.
2. Strauss, E., *Microbiology. Phytoplasma research begins to bloom*. Science, 2009. **325**(5939): p. 388-90.
3. Doi, Y.M., et al., *Mycoplasma or PLT-group-like microorganisms found in the phloem elements of plants infected with mulberry dwarf, potato witches' broom, aster yellows, or paulownia witches' broom*. Ann. Phytopathol. Soc. Jpn., 1967. **33**: p. 259-266.
4. McCoy, R.E., et al., *Plant diseases associated with mycoplasmalike organisms*. The Mycoplasmas, ed. R.F. Whitcomb and J.G. Tully. Vol. 5. 1989, New York: Academic.
5. Gundersen, D.E., et al., *Phylogeny of mycoplasmalike organisms (phytoplasmas): a basis for their classification*. J Bacteriol, 1994. **176**(17): p. 5244-54.
6. Kuske, C.R. and B.C. Kirkpatrick, *Phylogenetic relationships between the western aster yellows mycoplasmalike organism and other prokaryotes established by 16S rRNA gene sequence*. Int J Syst Bacteriol, 1992. **42**(2): p. 226-33.
7. Lim, P.O. and B.B. Sears, *16S rRNA sequence indicates that plant-pathogenic mycoplasmalike organisms are evolutionarily distinct from animal mycoplasmas*. J Bacteriol, 1989. **171**(11): p. 5901-6.
8. Namba, S., et al., *Phylogenetic diversity of phytopathogenic mycoplasmalike organisms*. Int J Syst Bacteriol, 1993. **43**(3): p. 461-7.
9. Seemuller, E., et al., *Phylogenetic classification of phytopathogenic mollicutes by sequence analysis of 16S ribosomal DNA*. Int J Syst Bacteriol, 1994. **44**(3): p. 440-6.
10. Int. Comm. Syst. Bacteriol., S.T.M., *Minutes of the interim meetings, 1 and 2 August 1992, Ames, Iowa*. Int. J. Syst. Bacteriol., 1993. **43**: p. 394–397.
11. Sugio, A., et al., *Diverse targets of phytoplasma effectors: from plant development to defense against insects*. Annu Rev Phytopathol, 2011. **49**: p. 175-95.
12. Murray, R.G. and K.H. Schleifer, *Taxonomic notes: a proposal for recording the properties of putative taxa of prokaryotes*. Int J Syst Bacteriol, 1994. **44**(1): p. 174-6.
13. Murray, R.G. and E. Stackebrandt, *Taxonomic note: implementation of the provisional status Candidatus for incompletely described prokaryotes*. Int J Syst Bacteriol, 1995. **45**(1): p. 186-7.
14. *'Candidatus Phytoplasma', a taxon for the wall-less, non-helical prokaryotes that colonize plant phloem and insects*. Int J Syst Evol Microbiol, 2004. **54**(Pt 4): p. 1243-55.
15. Lee, I.M., R.E. Davis, and D.E. Gundersen-Rindal, *Phytoplasma: phytopathogenic mollicutes*. Annu Rev Microbiol. 2000. **54**: p. 221-55.
16. Lee, I.M. and R.E. Davis, *Mycoplasmas which infect plants and insects*. Mycoplasmas: Molecular Biology and Pathogenesis, ed. J. Maniloff, et al. 1992, Washington, DC: Am. Soc. Microbiol.
17. Hogenhout, S.A., et al., *Phytoplasmas: bacteria that manipulate plants and insects*. Mol Plant Pathol, 2008. **9**(4): p. 403-23.
18. Neimark, H. and B.C. Kirkpatrick, *Isolation and characterization of full-length chromosomes from non-culturable plant-pathogenic Mycoplasma-like organisms*. Mol Microbiol, 1993. **7**(1): p. 21-8.
19. Kollar, A. and E. Seemüller, *Base composition of the DNA of mycoplasmalike organisms associated with various plant diseases*. J Phytopathol., 1989. **127**: p. 177-186.
20. Marcone, C., et al., *Chromosome sizes of phytoplasmas composing major phylogenetic groups and subgroups*. Phytopathology, 1999. **89**(9): p. 805-10.
21. Mushegian, A.R. and E.V. Koonin, *A minimal gene set for cellular life derived by comparison of complete bacterial genomes*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(19): p. 10268-73.
22. Razin, S., D. Yogevev, and Y. Naot, *Molecular biology and pathology of mycoplasmas*. Microbiol. Mol. Biol. Rev., 1998. **62**: p. 1094–1156.
23. Kube, M., et al., *The linear chromosome of the plant-pathogenic mycoplasma 'Candidatus Phytoplasma mali'*. BMC Genomics, 2008. **9**: p. 306.
24. Oshima, K., et al., *Reductive evolution suggested from the complete genome sequence of a plant-pathogenic phytoplasma*. Nat Genet, 2004. **36**(1): p. 27-9.
25. Bai, X., et al., *Living with genome instability: the adaptation of phytoplasmas to diverse environments of their insect and plant hosts*. J Bacteriol, 2006. **188**(10): p. 3682-96.
26. Tran-Nguyen, L., et al., *An overview of the genome sequence of 'Candidatus Phytoplasma australiense' - Australian strain*. Bull Insectol, 2007. **60**: p. 111-112.
27. Liefting, L.W., et al., *The complete genome sequence of 'Candidatus Phytoplasma australiense'*. Proc 16th Congr Int Org Mycoplasma 2006, Cambridge, UK: Int Org Mycoplasma.
28. Fraser, C.M., et al., *The minimal gene complement of Mycoplasma genitalium*. Science, 1995. **270**(5235): p. 397-403.

29. Blattner, F.R., et al., *The complete genome sequence of Escherichia coli K-12*. Science, 1997. **277**(5331): p. 1453-62.
 30. Whitcomb, R.F. and E.D. Tully, *The Mycoplasmas*. Vol. 5. 1989, San Diego: Academic Press, Inc.
 31. Christensen, N.M., et al., *Distribution of phytoplasmas in infected plants as revealed by real-time PCR and bioimaging*. Mol Plant Microbe Interact, 2004. **17**(11): p. 1175-84.
 32. Van Helden, M., W.F. Tjallinghii, and T.A. Van Beek, *Phloem sap collection from lettuce (Lactuca sativa L.): Chemical comparison among collection methods*. J. Chem. Ecol., 1994. **20**: p. 3191-3206.
 33. Weintraub, P.G. and L. Beanland, *Insect vectors of phytoplasmas*. Annu Rev Entomol, 2006. **51**: p. 91-111.
 34. Ammar, E.D. and S.A. Hogenhout, *Mollicutes associated with arthropods and plants*. Insect Symbiosis, ed. K. Bourtzis and Miller.T.A.2006. 97-118.
 35. Fletcher, J., et al., *The phytopathogenic mollicute-insect vector interface: a closer look*. Phytopathology, 1998. **88**(12): p. 1351-8.
 36. Moriwacki, N., et al., *High concentrations of trehalose in aphid hemolymph*. Appl. Entomol. Zool., 2003. **38**: p. 241-248.
 37. Saglio, P.H.M. and R.F. Whitcomb, *Diversity of wall-less prokaryotes in plant vascular tissue, fungi and invertebrate animals*. The Mycoplasmas, ed. R.F. Whitcomb and E.D. Tully. Vol. 3. 1979, New York: Academic Press.
 38. Lherminier, J., et al., *Immunolabeling of grapevine flavescence doree MLO in salivary glands of Euscelidius variegatus: a light and electronmicroscopy study*. J. Histochem. Cytochem., 1990. **38**: p. 79-85.
 39. Nault, L., *Arthropod transmission of plant viruses: a new synthesis*. Ann. Entomol. Soc. Am., 1997. **90**: p. 521-541.
 40. Ciccioiti, A.M., et al., *Natural and experimental transmission of Candidatus Phytoplasma mali by root bridges*. Acta Horticulturae, 2008. **781**: p. 459-464.
 41. Christensen, N.M., et al., *Phytoplasmas and their interactions with hosts*. Trends Plant Sci, 2005. **10**(11): p. 526-35.
 42. Ausubel, F.M., *Are innate immune signaling pathways in plants and animals conserved?* Nat Immunol, 2005. **6**(10): p. 973-9.
 43. Nurnberger, T., et al., *Innate immunity in plants and animals: striking similarities and obvious differences*. Immunol Rev, 2004. **198**: p. 249-66.
 44. Zipfel, C. and G. Felix, *Plants and animals: a different taste for microbes?* Curr Opin Plant Biol, 2005. **8**(4): p. 353-60.
 45. da Cunha, L., A.J. McFall, and D. Mackey, *Innate immunity in plants: a continuum of layered defenses*. Microbes Infect, 2006. **8**(5): p. 1372-81.
 46. Chisholm, S.T., et al., *Host-microbe interactions: shaping the evolution of the plant immune response*. Cell, 2006. **124**(4): p. 803-14.
 47. Jones, J.D. and J.L. Dangl, *The plant immune system*. Nature, 2006. **444**(7117): p. 323-9.
 48. Desender, S., D. Andrivon, and F. Val, *Activation of defence reactions in Solanaceae: where is the specificity?* Cell Microbiol, 2007. **9**(1): p. 21-30.
 49. Felix, G. and T. Boller, *Molecular sensing of bacteria in plants. The highly conserved RNA-binding motif RNP-1 of bacterial cold shock proteins is recognized as an elicitor signal in tobacco*. J Biol Chem, 2003. **278**(8): p. 6201-8.
 50. Kunze, G., et al., *The N terminus of bacterial elongation factor Tu elicits innate immunity in Arabidopsis plants*. Plant Cell, 2004. **16**(12): p. 3496-507.
 51. Zipfel, C., et al., *Perception of the bacterial PAMP EF-Tu by the receptor EFR restricts Agrobacterium-mediated transformation*. Cell, 2006. **125**(4): p. 749-60.
 52. Howe, G.A. and G. Jander, *Plant immunity to insect herbivores*. Annu Rev Plant Biol, 2008. **59**: p. 41-66.
 53. Reymond, P. and E.E. Farmer, *Jasmonate and salicylate as global signals for defense gene expression*. Curr Opin Plant Biol, 1998. **1**(5): p. 404-11.
 54. Dangl, J.L. and J.D. Jones, *Plant pathogens and integrated defence responses to infection*. Nature, 2001. **411**(6839): p. 826-33.
 55. Schillmiller, A.L. and G.A. Howe, *Systemic signaling in the wound response*. Curr Opin Plant Biol, 2005. **8**(4): p. 369-77.
 56. Bostock, R.M., *Signal crosstalk and induced resistance: straddling the line between cost and benefit*. Annu Rev Phytopathol, 2005. **43**: p. 545-80.
 57. Howe, G.A., *Jasmonates as signals in the wound response*. J. Plant Growth Regul., 2004. **23**: p. 223-237.
 58. Kessler, A. and I.T. Baldwin, *Plant responses to insect herbivory: the emerging molecular analysis*. Annu Rev Plant Biol, 2002. **53**: p. 299-328.
-

59. Ellis, C., I. Karafyllidis, and J.G. Turner, *Constitutive activation of jasmonate signaling in an Arabidopsis mutant correlates with enhanced resistance to Erysiphe cichoracearum, Pseudomonas syringae, and Myzus persicae*. Mol Plant Microbe Interact, 2002. **15**(10): p. 1025-30.
60. Gao, L.L., et al., *Involvement of the octadecanoid pathway in bluegreen aphid resistance in Medicago truncatula*. Mol Plant Microbe Interact, 2007. **20**(1): p. 82-93.
61. Mewis, I., et al., *Major signaling pathways modulate Arabidopsis glucosinolate accumulation and response to both phloem-feeding and chewing insects*. Plant Physiol, 2005. **138**(2): p. 1149-62.
62. Zarate, S.I., L.A. Kempema, and L.L. Walling, *Silverleaf whitefly induces salicylic acid defenses and suppresses effectual jasmonic acid defenses*. Plant Physiol, 2007. **143**(2): p. 866-75.
63. Devoto, A. and J.G. Turner, *Jasmonate-regulated Arabidopsis stress signalling network*. Physiol. Plant., 2005. **123**: p. 161-172.
64. Giri, A.P., et al., *Molecular interactions between the specialist herbivore Manduca sexta (Lepidoptera, Sphingidae) and its natural host Nicotiana attenuata. VII. Changes in the plant's proteome*. Plant Physiol, 2006. **142**(4): p. 1621-41.
65. Seemuller, E. and B. Schneider, *'Candidatus Phytoplasma mali', 'Candidatus Phytoplasma pyri' and 'Candidatus Phytoplasma prunorum', the causal agents of apple proliferation, pear decline and European stone fruit yellows, respectively*. Int J Syst Evol Microbiol, 2004. **54**(Pt 4): p. 1217-26.
66. Rui, D., R. Ciferri, and E. Refatti, *La virosi degli "scopazzi del melo" nel Veronese*. Not Mal Pianta, 1950. **13**: p. 7-11.
67. Refatti, E. and R. Ciferri, *La virosi del tipo a scopazzi in vivai di melo*. Ann. Sperim. Agr., 1954. **8**: p. 1543-1556.
68. Giannotti, J.G., G. Morvan, and C. Vago, *Micro-organismes de type mycoplasme dans le cellules libériennes de Malus sylvestris L. atteint de la maladie des prolifération*. C. R. Acad. Sci. Paris, Sér. D, 1968. **276**: p. 76-77.
69. Tedeschi, R. and A. Alma, *Transmission of apple proliferation phytoplasma by Cacopsylla melanoneura (Homoptera: Psyllidae)*. J Econ Entomol, 2004. **97**(1): p. 8-13.
70. Jarausch, B., et al., *First report of Cacopsylla picta as a vector for apple proliferation phytoplasma in Germany*. Plant Disease, 2003. **87**: p. 101-101.
71. Klähre, D.P., *Weltweit bedeutsame Gehölzphytoplasmosen*. Nachrichtenbl. Deut. Pflanzenschutzd., 2008. **60**: p. 217-231.
72. OEPP/EPPO, *Candidatus Phytoplasma mali*. Bulletin OEPP/EPPO, 2006. **36**: p. 121-125.
73. Mayer, C.J., A. Vilcinskas, and J. Gross, *Pathogen-induced release of plant allomone manipulates vector insect behavior*. J Chem Ecol, 2008. **34**(12): p. 1518-22.
74. Mayer, C.J., A. Vilcinskas, and J. Gross, *Phytopathogen lures its insect vector by altering host plant odor*. J Chem Ecol, 2008. **34**(8): p. 1045-9.
75. Smith, I.M., et al., *Quarantine Pests for Europe*. 2. Aufl. Wallingford, CABI International (EPP/CABI), 1997.
76. Tran-Nguyen, L.T., et al., *Comparative genome analysis of 'Candidatus Phytoplasma australiense' (subgroup tuf-Australia I; rp-A) and 'Ca. Phytoplasma asteris' strains OY-M and AY-WB*. J Bacteriol, 2008. **190**: p. 3979-3991.
77. Bai, X., et al., *AY-WB phytoplasma secretes a protein that targets plant cell nuclei*. Mol Plant Microbe Interact, 2009. **22**(1): p. 18-30.
78. Sugio, A., et al. *The phytoplasma effector protein SAP11 improves vector fitness*. in 18th Congr. Int. Org. Mycoplasmol. 2010. Cianciano Terme.
79. Schommer, C., et al., *Control of jasmonate biosynthesis and senescence by miR319 targets*. PLoS Biol, 2008. **6**(9): p. e230.
80. Kakizawa, S., et al., *Cloning and expression analysis of Phytoplasma protein translocation genes*. Mol Plant Microbe Interact, 2001. **14**(9): p. 1043-50.
81. Barbara, D.J., et al., *Immunodominant membrane proteins from two phytoplasmas in the aster yellows clade (chlorate aster yellows and clover phyllody) are highly divergent in the major hydrophilic region*. Microbiology, 2002. **148**(Pt 1): p. 157-67.
82. Kakizawa, S., et al., *Secretion of immunodominant membrane protein from onion yellows phytoplasma through the Sec protein-translocation system in Escherichia coli*. Microbiology, 2004. **150**(Pt 1): p. 135-42.
83. Fuchs, G. and H.G. Schlegel, *Allgemeine Mikrobiologie*. Vol. 8. 2007, Stuttgart: Georg Thieme Verlag.
84. Hoshi, A., et al., *A unique virulence factor for proliferation and dwarfism in plants identified from a phytopathogenic bacterium*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. **106**(15): p. 6416-21.
85. Rosch, J. and M. Caparon, *A microdomain for protein secretion in Gram-positive bacteria*. Science, 2004. **304**(5676): p. 1513-5.

86. Namba, S., K. Oshima, and K. Gibb, *Phytoplasma genomics*. Mycoplasmas: Molecular Biology, Pathogenicity and Strategies for Control, ed. A. Blanchard and G. Browning 2005, Norfolk, U.K.: Horizon Bioscience.
 87. Bertaccini, A. and B. Duduk, *Phytoplasma and phytoplasma diseases: a review of recent research*. *Phytopathol. Mediterr.*, 2009. **48**: p. 355–378.
 88. Wernegreen, J.J., *Genome evolution in bacterial endosymbionts of insects*. *Nat Rev Genet*, 2002. **3**(11): p. 850-61.
 89. Dimroth, P. and B. Schink, *Energy conservation in the decarboxylation of dicarboxylic acids by fermenting bacteria*. *Arch Microbiol*, 1998. **170**(2): p. 69-77.
 90. Sobczak, I. and J.S. Lolkema, *The 2-hydroxycarboxylate transporter family: physiology, structure, and mechanism*. *Microbiol Mol Biol Rev*, 2005. **69**(4): p. 665-95.
 91. Kollar, A. and E. Seemüller, *Chemical composition of the phloem exudate of mycoplasma-infected trees*. *J Phytopathol.*, 1990. **128**: p. 99-111.
 92. Summers, M.L., M.C. Denton, and T.R. McDermott, *Genes coding for phosphotransacetylase and acetate kinase in *Sinorhizobium meliloti* are in an operon that is inducible by phosphate stress and controlled by *phoB**. *J Bacteriol*, 1999. **181**(7): p. 2217-24.
 93. Pandey, A. and M. Mann, *Proteomics to study genes and genomes*. *Nature*, 2000. **405**(6788): p. 837-46.
 94. Rudd, K.E., et al., *Low molecular weight proteins: a challenge for post-genomic research*. *Electrophoresis*, 1998. **19**(4): p. 536-44.
 95. Brenner, S.E., *Errors in genome annotation*. *Trends Genet*, 1999. **15**(4): p. 132-3.
 96. Wang, Z., M. Gerstein, and M. Snyder, *RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics*. *Nat Rev Genet*, 2009. **10**(1): p. 57-63.
 97. Denoeud, F., et al., *Annotating genomes with massive-scale RNA sequencing*. *Genome Biol*, 2008. **9**(12): p. R175.
 98. Brautigam, A., et al., *Low-coverage massively parallel pyrosequencing of cDNAs enables proteomics in non-model species: comparison of a species-specific database generated by pyrosequencing with databases from related species for proteome analysis of pea chloroplast envelopes*. *J Biotechnol*, 2008. **136**(1-2): p. 44-53.
 99. Novaes, E., et al., *High-throughput gene and SNP discovery in *Eucalyptus grandis*, an uncharacterized genome*. *BMC Genomics*, 2008. **9**: p. 312.
 100. Alagna, F., et al., *Comparative 454 pyrosequencing of transcripts from two olive genotypes during fruit development*. *BMC Genomics*, 2009. **10**: p. 399.
 101. Barakat, A., et al., *Comparison of the transcriptomes of American chestnut (*Castanea dentata*) and Chinese chestnut (*Castanea mollissima*) in response to the chestnut blight infection*. *BMC Plant Biol*, 2009. **9**: p. 51.
 102. Dassanayake, M., et al., *Shedding light on an extremophile lifestyle through transcriptomics*. *New Phytol*, 2009. **183**(3): p. 764-75.
 103. Wang, W., et al., *Global characterization of *Artemisia annua* glandular trichome transcriptome using 454 pyrosequencing*. *BMC Genomics*, 2009. **10**: p. 465.
 104. Perkins, T.T., et al., *A strand-specific RNA-Seq analysis of the transcriptome of the typhoid bacillus *Salmonella typhi**. *PLoS Genet*, 2009. **5**(7): p. e1000569.
 105. Liu, J.M., et al., *Experimental discovery of sRNAs in *Vibrio cholerae* by direct cloning, 5S/tRNA depletion and parallel sequencing*. *Nucleic Acids Res*, 2009. **37**(6): p. e46.
 106. Passalacqua, K.D., et al., *Structure and complexity of a bacterial transcriptome*. *J Bacteriol*, 2009. **191**(10): p. 3203-11.
 107. Yoder-Himes, D.R., et al., *Mapping the *Burkholderia cenocepacia* niche response via high-throughput sequencing*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2009. **106**(10): p. 3976-81.
 108. Bennett, S.T., et al., *Toward the 1,000 dollars human genome*. *Pharmacogenomics*, 2005. **6**(4): p. 373-82.
 109. Fenn, J.B., et al., *Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules*. *Science*, 1989. **246**(4926): p. 64-71.
 110. Karas, M. and F. Hillenkamp, *Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10,000 daltons*. *Anal Chem*, 1988. **60**(20): p. 2299-301.
 111. Hillenkamp, F., et al., *Matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry of biopolymers*. *Anal Chem*, 1991. **63**(24): p. 1193A-1203A.
 112. Mallick, P. and B. Kuster, *Proteomics: a pragmatic perspective*. *Nat Biotechnol*, 2010. **28**(7): p. 695-709.
 113. Klammer, A.A. and M.J. MacCoss, *Effects of modified digestion schemes on the identification of proteins from complex mixtures*. *J Proteome Res*, 2006. **5**(3): p. 695-700.
 114. Steen, H. and M. Mann, *The ABC's (and XYZ's) of peptide sequencing*. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2004. **5**(9): p. 699-711.
-

115. Perkins, D.N., et al., *Probability-based protein identification by searching sequence databases using mass spectrometry data*. Electrophoresis, 1999. **20**(18): p. 3551-67.
116. Cox, J., et al., *Andromeda: a peptide search engine integrated into the MaxQuant environment*. J Proteome Res, 2011. **10**(4): p. 1794-805.
117. Cox, J. and M. Mann, *MaxQuant enables high peptide identification rates, individualized p.p.b.-range mass accuracies and proteome-wide protein quantification*. Nat Biotechnol, 2008. **26**(12): p. 1367-72.
118. Olsen, J.V. and M. Mann, *Improved peptide identification in proteomics by two consecutive stages of mass spectrometric fragmentation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(37): p. 13417-22.
119. Elias, J.E. and S.P. Gygi, *Target-decoy search strategy for increased confidence in large-scale protein identifications by mass spectrometry*. Nat Methods, 2007. **4**(3): p. 207-14.
120. Kall, L., et al., *Assigning significance to peptides identified by tandem mass spectrometry using decoy databases*. J Proteome Res, 2008. **7**(1): p. 29-34.
121. Ji, X., et al., *Shotgun proteomic analysis of mulberry dwarf phytoplasma*. Proteome Sci, 2010. **8**: p. 20.
122. Zamharir, M.G., et al., *Identification of genes differentially expressed during interaction of Mexican lime tree infected with "Candidatus Phytoplasma aurantifolia"*. BMC Microbiol, 2011. **11**: p. 1.
123. Chen, W.Y. and C.P. Lin, *Characterization of Catharanthus roseus Genes Regulated Differentially by Peanut Witches` Broom Phytoplasma Infection*. J Phytopathol., 2011. **159**: p. 505-510.
124. Hren, M., et al., *'Bois noir' phytoplasma induces significant reprogramming of the leaf transcriptome in the field grown grapevine*. BMC Genomics, 2009. **10**: p. 460.
125. Margaria, P. and S. Palmano, *Response of the Vitis vinifera L. cv. 'Nebbiolo' proteome to Flavescence doree phytoplasma infection*. Proteomics, 2011. **11**(2): p. 212-24.
126. Taheri, F., et al., *Proteomic analysis of the Mexican lime tree response to "Candidatus Phytoplasma aurantifolia" infection*. Mol Biosyst, 2011. **7**(11): p. 3028-35.
127. Ji, X., et al., *Comparative proteomic analysis provides new insights into mulberry dwarf responses in mulberry (Morus alba L.)*. Proteomics, 2009. **9**(23): p. 5328-39.
128. Li, J., et al., *A subgroup of MYB transcription factor genes undergoes highly conserved alternative splicing in Arabidopsis and rice*. J Exp Bot, 2006. **57**(6): p. 1263-73.
129. Haake, V., et al., *A moderate decrease of plastid aldolase activity inhibits photosynthesis, alters the levels of sugars and starch, and inhibits growth of potato plants*. Plant J, 1998. **14**(2): p. 147-57.
130. Ferreira, R.B., et al., *Engineering grapevine for increased resistance to fungal pathogens without compromising wine stability*. Trends Biotechnol, 2004. **22**(4): p. 168-73.
131. Gygi, S.P., et al., *Evaluation of two-dimensional gel electrophoresis-based proteome analysis technology*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(17): p. 9390-5.
132. Vuong, G.L., et al., *Improved sensitivity proteomics by postharvest alkylation and radioactive labelling of proteins*. Electrophoresis, 2000. **21**(13): p. 2594-605.
133. Ong, S.E. and M. Mann, *Mass spectrometry-based proteomics turns quantitative*. Nat Chem Biol, 2005. **1**(5): p. 252-62.
134. Anderson, N.L. and N.G. Anderson, *Proteome and proteomics: new technologies, new concepts, and new words*. Electrophoresis, 1998. **19**(11): p. 1853-61.
135. Corthals, G.L., et al., *The dynamic range of protein expression: a challenge for proteomic research*. Electrophoresis, 2000. **21**(6): p. 1104-15.
136. Rabilloud, T., *Two-dimensional gel electrophoresis in proteomics: old, old fashioned, but it still climbs up the mountains*. Proteomics, 2002. **2**(1): p. 3-10.
137. Wasinger, V.C., J.D. Pollack, and I. Humphery-Smith, *The proteome of Mycoplasma genitalium. Chaps-soluble component*. Eur J Biochem, 2000. **267**(6): p. 1571-82.
138. Bantscheff, M., et al., *Quantitative mass spectrometry in proteomics: a critical review*. Anal Bioanal Chem, 2007. **389**(4): p. 1017-31.
139. Boersema, P.J., et al., *Multiplex peptide stable isotope dimethyl labeling for quantitative proteomics*. Nat Protoc, 2009. **4**(4): p. 484-94.
140. Ong, S.E., et al., *Stable isotope labeling by amino acids in cell culture, SILAC, as a simple and accurate approach to expression proteomics*. Mol Cell Proteomics, 2002. **1**(5): p. 376-86.
141. Hansen, K.C., et al., *Mass spectrometric analysis of protein mixtures at low levels using cleavable ¹³C-isotope-coded affinity tag and multidimensional chromatography*. Mol Cell Proteomics, 2003. **2**(5): p. 299-314.
142. Hsu, J.L., et al., *Stable-isotope dimethyl labeling for quantitative proteomics*. Anal Chem, 2003. **75**(24): p. 6843-52.
143. Huang, S.Y., et al., *Quantitation of protein phosphorylation in pregnant rat uteri using stable isotope dimethyl labeling coupled with IMAC*. Proteomics, 2006. **6**(6): p. 1722-34.

144. Duduk, B., et al., *Occurrence of Phytoplasmas Related to Stolbur and to 'Candidatus Phytoplasma japonicum' in Woody Host Plants in China*. *Phytopathology*, 2010. **158**(2): p. 100-104.
 145. Chomczynski, P. and N. Sacchi, *Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction*. *Anal Biochem*, 1987. **162**(1): p. 156-159.
 146. Kanehisa, M., et al., *KEGG for representation and analysis of molecular networks involving diseases and drugs*. *Nucleic Acids Research*, 2010. **38**: p. 355-360.
 147. Kall, L., A. Krogh, and E.L. Sonnhammer, *A combined transmembrane topology and signal peptide prediction method*. *J Mol Biol*, 2004. **338**(5): p. 1027-36.
 148. Laemmli, U.K., *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4*. *Nature*, 1970. **227**(5259): p. 680-5.
 149. Kersey, P.J., et al., *The International Protein Index: an integrated database for proteomics experiments*. *Proteomics*, 2004. **4**(7): p. 1985-8.
 150. Dohm, J.C., et al., *Substantial biases in ultra-short read data sets from high-throughput DNA sequencing*. *Nucleic Acids Res*, 2008. **36**(16): p. e105.
 151. Hansen, K.D., S.E. Brenner, and S. Dudoit, *Biases in Illumina transcriptome sequencing caused by random hexamer priming*. *Nucleic Acids Res*, 2010. **38**(12): p. e131.
 152. Wilhelm, B.T., et al., *Defining transcribed regions using RNA-seq*. *Nat Protoc*, 2010. **5**(2): p. 255-66.
 153. Benedetti, C.E., D.X. Xie, and J.G. Turner, *COII-dependent expression of an Arabidopsis vegetative storage protein in flowers and siliques and in response to coronatine or methyl jasmonate*. *Plant Physiol*, 1995. **109**: p. 567-572.
 154. Berger, S., E. Bell, and J.E. Mullet, *Two methyl jasmonate-insensitive mutants show altered expression of AtVsp in response to methyl jasmonate and wounding*. *Plant Physiol*, 1996. **111**: p. 525-531.
 155. Staswick, P.E., W. Su, and S.H. Howell, *Methyl jasmonate inhibition of root growth and induction of a leaf protein are decreased in an Arabidopsis thaliana mutant*. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 1992. **89**: p. 6837-6840
 156. Chaudhry, B., et al., *The barley 60 kDa jasmonate-induced protein (JIP60) is a novel ribosome-inactivating protein*. *Plant J*, 1994. **6**(6): p. 815-24.
 157. Reinbothe, S., et al., *A methyl jasmonate-induced shift in the length of the 5' untranslated region impairs translation of the plastid rbcL transcript in barley*. *EMBO J*, 1993. **12**(4): p. 1505-12.
 158. Reinbothe, S., C. Reinbothe, and B. Parthier, *Methyl jasmonate represses translation initiation of a specific set of mRNAs in barley*. *Plant J.*, 1993. **4**p. 459-467
 159. Reinbothe, S., C. Reinbothe, and B. Parthier, *Methyl jasmonate-regulated translation of nuclear-encoded chloroplast proteins in barley (Hordeum vulgare L. cv. salome)*. *J Biol Chem*, 1993. **268**(14): p. 10606-11.
 160. Farmer, E.E. and C.A. Ryan, *Octadecanoid Precursors of Jasmonic Acid Activate the Synthesis of Wound-Inducible Proteinase Inhibitors*. *Plant Cell*, 1992. **4**(2): p. 129-134.
 161. Becker, W. and K. Apel, *Isolation and characterization of a cDNA clone encoding a novel jasmonate-induced protein of barley (Hordeum vulgare L.)*. *Plant Mol Biol*, 1992. **19**(6): p. 1065-7.
 162. Xu, Y., et al., *Plant Defense Genes Are Synergistically Induced by Ethylene and Methyl Jasmonate*. *Plant Cell*, 1994. **6**(8): p. 1077-1085.
 163. Johnson, R., et al., *Expression of proteinase inhibitors I and II in transgenic tobacco plants: effects on natural defense against Manduca sexta larvae*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1989. **86**(24): p. 9871-5.
 164. Wu, J., C. Hettenhausen, and I.T. Baldwin, *Evolution of proteinase inhibitor defenses in North American allopolyploid species of Nicotiana*. *Planta*, 2006. **224**(4): p. 750-60.
 165. Vollenweider, S., et al., *Fatty acid ketodienes and fatty acid ketotrienes: Michael addition acceptors that accumulate in wounded and diseased Arabidopsis leaves*. *Plant J*, 2000. **24**(4): p. 467-76.
 166. Stanley, D., J. Miller, and H. Tunaz, *Eicosanoid actions in insect immunity*. *J Innate Immun*, 2009. **1**(4): p. 282-90.
 167. Dabrowska, P., et al., *The phytohormone precursor OPDA is isomerized in the insect gut by a single, specific glutathione transferase*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2009. **106**(38): p. 16304-9.
 168. Caplan, J.L., et al., *Chloroplastic protein NR1P1 mediates innate immune receptor recognition of a viral effector*. *Cell*, 2008. **132**(3): p. 449-62.
-

13. Anhang

Tab.A1. Liste der durch RNA-Seq identifizierten Phytoplasmagene. Eine Transkriptomanalyse erfolgte anhand der RNA isoliert aus *Nicotiana occidentalis*-Pflanzen infiziert mit „*Candidatus* Phytoplasma mali“ Stamm AT.

Funktionelle Kategorie	Genname	Locus tag	Genlänge [b]	Unique gene reads	Total gene reads
Translation	rpsK 30S ribosomal protein S11	ATP_00366	393	1	1
	rpsL 30S ribosomal protein S12	ATP_00392	414	1	1
	rpsM 30S ribosomal protein S13	ATP_00365	384	1	1
	rpsB 30S ribosomal protein S2	ATP_00232	735	2	2
	rpsG 30S ribosomal protein S7	ATP_00393	471	1	1
	rplU 50S ribosomal protein L21	ATP_00284	309	1	1
	rpmB 50S ribosomal protein L28	ATP_00278	189	1	1
	rpmH 50S ribosomal protein L34	ATP_00378	135	1	1
	argS Arginyl-tRNA synthetase	ATP_00436	1698	13	13
	cca CCA-adding enzyme (tRNA adenylyl-/cytidylyl-transferase) (tRNA CCA-pyrophosphorylase)	ATP_00238	1164	2	2
	glnS Glutamyl- and glutaminyl-tRNA synthetase	ATP_00201	1623	1	1
	rplT LSU ribosomal protein L20	ATP_00443	681	6	6
	trpS Tryptophanyl-tRNA synthetase	ATP_00092	1032	1	1
	valS Valyl-tRNA synthetase (ValRS)	ATP_00338	2592	1	1
nicht verbunden mit KEGG- Pathways	rsuA 16S rRNA pseudouridylate synthase	ATP_00123	729	1	1
	malE ABC-type maltose/maltodextrin-binding protein	ATP_00162	1572	3	3
	prfA Bacterial peptide chain release factor 1	ATP_00175	1044	2	2
	Cation transport P-ATPase	ATP_00311	2664	1	1
	zntA Cation uptake P-type ATPase	ATP_00228	2016	1	1
	mycoplasma-like organism apple proliferation, strain AT nitroreductase like protein	ATP_00287	327	1	1
	cspJ Cold shock-like protein	ATP_00295	258	2	2
	dnaE DNA polymerase III, alpha subunit	ATP_00097	2763	24	24
	fusA Elongation factor G	ATP_00394	2067	1	1
	gidA Glucose-inhibited division protein A	ATP_00137	1875	1	1
	HD superfamily phosphohydrolase	ATP_00225	1248	8	8
	Immunodominant membrane protein	ATP_00050	498	4	4
	mleP Malate/Na ⁺ symporter	ATP_00104	1482	1	1
	N6-adenine-specific methylase	ATP_00243	561	3	3
	nitroreductase	ATP_00286	597	1	1
	O-sialoglycoprotein endopeptidase	ATP_00200	990	2	2
	gepA2 phage-associated protein	ATP_00257	654	1	1
	probable cation transport ATPase (similar to MgtA), fragment	ATP_00336	2460	1	1
	probable dimethyladenosine transferase	ATP_00279	1425	5	5
	rpoD probable RNA polymerase sigma factor RpoD	ATP_00306	1260	2	2
	probable transporter, permease component	ATP_00330	654	1	1
	pduL Propanediol utilization protein	ATP_00224	579	1	1
	hflB putative ATP-dependent Zn protease	ATP_00146	1230	4	4
	hflB putative ATP-dependent Zn protease	ATP_00406	1245	1	1
	hflB putative ATP-dependent Zn protease	ATP_00460	1107	1	1
	grpE putative protein GrpE (HSP-70 cofactor)	ATP_00205	708	1	1
	frr Ribosome recycling factor	ATP_00235	558	1	1
	trmD tRNA (guanine-N(1)-)-methyltransferase	ATP_00439	732	2	2
	miaA tRNA delta(2)-isopentenylpyrophosphate transferase	ATP_00125	900	1	1
	nusG Transcription antitermination protein NusG	ATP_00385	588	1	1
	infB Translation initiation factor IF-2	ATP_00315	1863	28	28
	infC Translation initiation factor IF3	ATP_00441	558	5	5
	Type I restriction-modification system methyltransferase subunit	ATP_00220	2778	1	1
	Type I site-specific deoxyribonuclease S subunit, fragment	ATP_00171	1161	6	6
	hcaD Uncharacterized NAD-dependent dehydrogenase	ATP_00288	1338	1	1
	gepA3 Uncharacterized phage-associated protein	ATP_00411	501	1	1
	weakly similar to IcmE protein	ATP_00087	3573	1	1

Funktionelle Kategorie	Genname	Locus tag	Genlänge [b]	Unique gene reads	Total gene reads
Membrantransport	cbiQ ABC-type cobalt transport system, permease component	ATP_00371	1044	2	2
	potB ABC-type spermidine/putrescine transport system, permease component I	ATP_00291	804	1	1
	D-methionine ABC transporter, permease component	ATP_00191	753	1	1
	secY Preprotein translocase subunit	ATP_00361	1245	1	1
	cbiO2 Putative cobalt import ATP-binding protein cbiO2	ATP_00369	825	1	1
Replikation und Reparatur	recG ATP-dependent DNA helicase	ATP_00054	1881	3	3
	polC1 DNA polymerase III alpha subunit	ATP_00081	4569	2	2
	dnaG1 DNA primase	ATP_00305	1821	7	7
	dnaG2 DNA primase	ATP_00415	1173	2	2
	ruvB Holliday junction DNA helicase B	ATP_00167	999	6	6
	ruvA Holliday junction resolvosome, DNA-binding subunit	ATP_00168	561	1	1
	priA Primosome assembly protein	ATP_00317	2358	1	1
	probable replicative DNA helicase	ATP_00420	1452	1	1
nicht-sekretorische hypothetische Proteine	conserved hypothetical protein	ATP_00093	585	1	1
	conserved hypothetical protein	ATP_00098	432	1	1
	conserved hypothetical protein	ATP_00103	1917	4	4
	conserved hypothetical protein	ATP_00127	1578	3	3
	conserved hypothetical protein	ATP_00144	375	2	2
	conserved hypothetical protein	ATP_00169	3006	45	45
	Conserved hypothetical protein	ATP_00242	198	3	3
	conserved hypothetical protein	ATP_00245	567	1	1
	conserved hypothetical protein	ATP_00253	705	2	2
	conserved hypothetical protein	ATP_00283	318	2	2
	conserved hypothetical protein	ATP_00307	294	2	2
	conserved hypothetical protein	ATP_00312	762	1	1
	conserved hypothetical protein	ATP_00314	273	4	4
	conserved hypothetical protein	ATP_00430	276	1	1
	obgE conserved hypothetical protein, GTP-binding	ATP_00281	1266	1	1
	conserved hypothetical protein, predicted kinase	ATP_00277	1485	34	34
	conserved hypothetical protein, rhodanese-like	ATP_00285	933	2	2
	hypothetical protein	ATP_00038	2910	1	1
	hypothetical protein	ATP_00041	1449	1	1
	hypothetical protein	ATP_00056	1971	18	18
	hypothetical protein	ATP_00061	426	4	4
	hypothetical protein	ATP_00091	168	1	1
	hypothetical protein	ATP_00128	453	13	13
	hypothetical protein	ATP_00145	828	2	2
	hypothetical protein	ATP_00148	609	23	23
	hypothetical protein	ATP_00203	693	5	5
	hypothetical protein	ATP_00267	768	3	3
	hypothetical protein	ATP_00327	480	1	1
	hypothetical protein	ATP_00407	309	5	5
	hypothetical protein	ATP_00409	309	4	4
hypothetical protein	ATP_00412	1641	9	9	
hypothetical protein	ATP_00413	777	13	13	
hypothetical protein	ATP_00427	918	1	1	
hypothetical protein	ATP_00453	639	1	1	
sekretorische hypothetische Proteine	conserved hypothetical protein	ATP_00189	369	4	4
	conserved hypothetical protein, fragment	ATP_00414	1842	15	15
	conserved hypothetical protein, fragment	ATP_00451	582	7	7
	hypothetical protein	ATP_00147	1047	5	5

Funktionelle Kategorie	Genname	Locus tag	Genlänge [b]	Unique gene reads	Total gene reads
Transkription	rpoC DNA-directed RNA polymerase beta' chain	ATP_00391	4059	1	1
	rpoA DNA-directed RNA polymerase, alpha chain	ATP_00367	996	1	1
	rpoB DNA-directed RNA polymerase, beta chain	ATP_00390	3822	1	1
Umweltanpassung	tuf Elongation factor Tu	ATP_00395	1179	1	1
Lipid-Metabolismus	plsX Fatty acid/phospholipid biosynthesis enzyme	ATP_00053	1053	1	1
	cdsA probable phosphatidate cytidyltransferase	ATP_00236	894	2	2
Metabolismus von Cofaktoren und Vitaminen	qns Glutamine-dependent NAD(+) synthetase	ATP_00183	1797	1	1
falten, sortieren, degradieren	groEL Molecular chaperonin, large subunit	ATP_00185	1611	7	7
Zellwachstum und -tod	dnaA Chromosomal replication initiator protein	ATP_00193	1368	1	1
Metabolismus anderer Aminosäuren	pepA Putative aminopeptidase	ATP_00431	1497	1	1
Kohlenhydrat-Metabolismus	acoB Pyruvate dehydrogenase E1 component beta subunit	ATP_00155	981	1	1
Energie-Metabolismus	tpiA Triosephosphate isomerase	ATP_00166	777	1	1
Aminosäure-Metabolismus	metK S-adenosylmethionine synthetase	ATP_00296	1134	1	1

Tab.A2. Liste der durch qualitative Proteomanalyse identifizierten Phytoplasmaproteine. 1a: Proteinisolat der Pflanze ph⁺- *N. Oc.* Nr. 1 – Proteinisolationmethode I; 1b: Proteinisolat der Pflanze ph⁺- *N. Oc.* Nr. 1 – Proteinisolationmethode II; 2: Proteinisolat der Pflanze ph⁺- *N. Oc.* Nr. 2 – Proteinisolationmethode III; 3: Proteinisolat der Pflanze ph⁺- *N. Oc.* Nr. 3 – Proteinisolationmethode III.

funktionelle Kategorie	Proteinname	Locus tag	Experiment	Peptides	Unique Peptides	Sequence Coverage [%]	PEP
nicht verbunden mit KEGG-Pathways	tldD Predicted Zn-dependent proteases and their inactivated homologs	ATP_00323	1b	2	2	7,1	1,41E-10
	infA Translation initiation factor IF-1	ATP_00363	1b	3	3	45,6	8,54E-05
			1a	4	4	57	3,38E-13
	Zn-dependent carboxypeptidase	ATP_00016	1b	7	7	17,3	1,40E-25
			1a	3	3	8,2	9,40E-07
	weakly similar to IcmE protein	ATP_00087	1b	6	6	18,3	7,03E-20
	hit Diadenosine tetraphosphate hydrolase, cell-cycle regulation histidine triad	ATP_00131	1b	2	2	17,9	0,0004927
	gyrA DNA gyrase, alpha subunit	ATP_00196	1b	2	2	3,9	3,44E-07
	tsf Elongation factor Ts (EF-Ts)	ATP_00233	1b	3	3	11,4	1,14E-36
			1a	2	2	9,1	1,01E-28
	fir Ribosome recycling factor	ATP_00235	1b	5	5	38,5	1,09E-28
			3	2	2	18,2	9,83E-05
			1a	4	4	19,8	2,32E-28
	greA Transcription elongation factor	ATP_00246	1a	4	4	29,5	5,21E-100
	probable hemolysin	ATP_00276	1a	2	2	5,6	0,0027641
	tig Trigger factor (TF)	ATP_00297	3	2	2	4,1	0,0002526
	infB Translation initiation factor IF-2	ATP_00315	1b	3	3	5	6,17E-06
	trxA Thioredoxin	ATP_00325	1a	2	2	17,8	5,16E-05
	fusA Elongation factor G	ATP_00394	1b	10	10	17,3	2,66E-122
			3	4	4	10	5,24E-31
			1a	6	6	13,4	2,89E-139
	Immunodominant membrane protein	ATP_00050	1b	28	28	65,5	0
			2	18	18	53,7	1,77E-209
			3	22	22	58,2	0
			1a	24	24	62,1	0
	Bacterial nucleoid DNA-binding protein	ATP_00119	1b	11	11	67	7,39E-33
			2	2	2	17	0,0005082
			3	5	5	42,5	1,52E-17
	1a	ATP_00179	1b	11	11	60,4	1,58E-84
			1b	9	9	66,7	9,66E-42
2			2	2	14,6	0,0005052	
ssb putative single-strand DNA-binding protein	ATP_00179	3	2	2	14,6	2,54E-06	
		1a	11	11	79,9	7,91E-174	
		1b	9	9	62,2	2,57E-61	
groES 10 kDa chaperonin (GroES protein)	ATP_00184	2	4	4	26,7	7,64E-24	
		3	4	4	40	3,90E-60	
		1a	8	8	48,9	1,03E-103	

funktionelle Kategorie	Proteinname	Locus tag	Experiment	Peptides	Unique Peptides	Sequence Coverage [%]	PEP
nicht verbunden mit KEGG-Pathways	grpE putative protein GrpE (HSP-70 cofactor)	ATP_00205	1b	13	13	49,4	5,91E-51
			3	7	7	34	2,14E-22
	pduL Propanediol utilization protein	ATP_00224	1b	13	13	54,4	1,52E-121
			3	7	7	33,8	1,16E-33
	spoVG Putative septation protein SpoVG	ATP_00227	1a	12	12	58,8	2,25E-111
			1b	9	9	67,3	2,53E-68
			2	4	4	37,6	1,77E-20
	thiJ 4-methyl-5(B-hydroxyethyl)-thiazole monophosphate biosynthesis enzyme	ATP_00237	3	8	8	67,3	5,64E-33
			1a	8	8	52,5	1,08E-247
			1b	2	2	11,2	3,76E-27
	hcaD Uncharacterized NAD-dependent dehydrogenase	ATP_00288	1a	8	8	36,6	1,43E-112
			1b	17	17	37,3	1,27E-147
cspJ Cold shock-like protein	ATP_00295	3	6	6	16	6,76E-82	
		1a	18	18	37,7	8,33E-220	
		1b	6	6	56	2,92E-212	
Transport und Katabolismus	sodA Superoxide dismutase	ATP_00030	2	3	3	35,2	7,66E-11
			3	4	4	53,8	7,05E-48
			1a	9	9	61,5	1,29E-260
faltend, sortieren und degradieren	dnaK Molecular chaperone	ATP_00206	1b	4	4	29,9	5,94E-25
			1a	5	5	35,5	7,14E-86
			1b	31	31	59,8	0
			2	6	6	14,3	1,18E-109
	groEL Molecular chaperonin, large subunit	ATP_00185	3	14	14	33,6	7,51E-270
			1a	3	3	5,5	0,001103
Umweltanpassung	tuf Elongation factor Tu	ATP_00395	1b	55	55	87,6	0
			2	26	26	60,1	0
			3	32	32	64,6	0
			1a	34	34	67,9	0
nicht-sekretorische hypothetische Proteine	conserved hypothetical protein	ATP_00009	1b	20	19	63,5	6,12E-259
			2	6	5	19,3	3,43E-156
			3	8	7	29,2	4,23E-227
	hypothetical protein	ATP_00038	1a	16	14	55,1	3,09E-296
			2	2	2	1,5	0,00199
	conserved hypothetical protein	ATP_00118	1a	2	2	41,2	0,0009431
			1b	4	4	17,3	4,69E-12
	hypothetical protein	ATP_00149	1b	2	2	35,4	5,95E-29
			1b	8	8	32,7	9,38E-172
	hypothetical protein	ATP_00145	2	2	2	13	1,46E-25
1a			8	8	37,7	1,93E-288	
1b			6	6	47,2	4,62E-25	
conserved hypothetical protein	ATP_00144	3	2	2	17,4	1,02E-11	
		1a	7	7	59	1,67E-97	

funktionelle Kategorie	Proteinname	Locus tag	Experiment	Peptides	Unique Peptides	Sequence Coverage [%]	PEP
nicht-sekretorische hypothetische Proteine	hypothetical protein	ATP_00020	1b	4	4	27,7	3,10E-31
			1a	3	3	24,2	2,03E-49
	hypothetical protein	ATP_00150	1b	4	4	25	6,68E-32
	hypothetical protein	ATP_00413	1b	3	3	20,8	4,67E-47
conserved hypothetical protein	ATP_00240	1b	8	8	46,2	8,74E-26	
		1a	4	4	26,3	4,07E-11	
sekretorische hypothetische Proteine	conserved hypothetical protein	ATP_00268	1a	3	3	37,2	1,19E-45
			1b	2	2	21,1	2,47E-26
	conserved hypothetical protein	ATP_00189	2	2	2	21,1	2,55E-07
			3	2	2	21,1	9,62E-32
	hypothetical protein	ATP_00266	1b	7	7	31,1	3,21E-24
			1a	5	5	28,5	1,00E-13
conserved hypothetical protein, fragment	ATP_00451	1b	4	4	25,6	4,98E-31	
		1a	7	7	35	4,42E-225	
Membran-transport	phnL ABC transporter, ATPase component	ATP_00013	1b	3	3	8,1	3,81E-14
	ABC-type methionine transport system, periplasmic component	ATP_00192	1b	6	6	20,9	2,84E-65
	dppA ABC-type dipeptide-binding protein, solute binding protein	ATP_00068	1b	31	31	53	0
			1a	4	4	11	6,16E-69
ffh Signal recognition particle, subunit FFH/SRP54	ATP_00073	1b	2	2	3,5	7,29E-05	
		1a	2	2	3,5	0,0018999	
Nucleotid-metabolismus	adk Adenylate kinase (ATP-AMP transphosphorylase)	ATP_00031	3	2	2	7,3	2,41E-05
			1a	2	2	8,6	1,26E-05
	dut Deoxyuridine 5'-triphosphate nucleotidohydrolase	ATP_00231	1b	3	3	24,5	3,52E-07
1a			2	2	19,6	4,60E-23	
Metabolismus anderer Aminosäuren	pepA Putative aminopeptidase	ATP_00431	1b	18	18	48,1	0
			2	6	6	18,2	2,49E-117
			2	7	7	20,6	2,34E-230
			1a	16	16	36,7	0
Kohlenhydrat-metabolismus	ackA Acetate kinase	ATP_00319	1b	7	7	24,4	2,40E-31
			1a	5	5	16,9	8,06E-59
	aceF Dihydrolipoamide acyltransferase component	ATP_00154	1b	22	22	64,7	0
			2	2	2	9	1,01E-14
			3	7	7	22,7	3,70E-117
	lpd Dihydrolipoamide dehydrogenase	ATP_00153	1a	12	12	36,5	3,06E-162
			1b	11	11	28,2	6,74E-119
	1pd Dihydrolipoamide dehydrogenase	ATP_00153	3	2	2	6,9	1,05E-06
			1a	11	11	31,2	3,51E-144
sfcA NADP-dependent malic enzyme	ATP_00450	1b	21	21	51,5	5,96E-241	
		2	2	2	6,4	1,60E-25	
		3	4	4	13,5	9,76E-104	
1a	22	22	51,7	0			

funktionelle Kategorie	Proteinname	Locus tag	Experiment	Peptides	Unique Peptides	Sequence Coverage [%]	PEP
Kohlenhydrat-metabolismus	acoA Thiamine pyrophosphate-dependent dehydrogenase, E1 component (alpha subunit)	ATP_00156	1b	18	18	56,7	8,00E-253
			2	3	3	11,8	1,25E-48
			3	4	4	15,2	5,67E-69
			1a	12	12	41,3	2,78E-177
	acoB Pyruvate dehydrogenase E1 component beta subunit	ATP_00155	1b	20	20	65,9	0
			2	5	5	20,7	1,28E-79
			3	7	7	30,8	1,76E-97
	1a	20	20	66,2	0		
	eda 2-dehydro-3-deoxyphosphogluconate aldolase/4-hydroxy-2-oxoglutarate aldolase	ATP_00116	1b	6	6	30,5	8,17E-147
3			4	4	23	5,00E-32	
1a			5	5	25,2	1,52E-89	
Translation	rplM 50S ribosomal protein L13	ATP_00332	1b	2	2	11,4	7,59E-05
			1a	2	2	11,4	1,95E-06
	rpsI 30S ribosomal protein S9	ATP_00333	1b	7	7	36,9	6,20E-13
			1a	7	7	41,5	1,26E-18
	rplB 50S ribosomal protein L2	ATP_00344	1b	3	3	11,8	1,69E-18
	rpsC 30S ribosomal protein S3	ATP_00347	1b	4	4	16,2	2,10E-20
	rpsQ 30S ribosomal protein S17	ATP_00350	1a	3	3	15,1	0,0009905
	rplX 50S ribosomal protein L24	ATP_00352	1b	2	2	23,9	5,37E-16
			1a	4	4	35	1,74E-10
	rpsN 30S ribosomal protein S14	ATP_00354	3	2	2	24	0,0002824
			1a	2	2	22,9	8,40E-08
	rpsH SSU ribosomal protein S8P	ATP_00355	1b	6	6	47,3	1,51E-31
			3	2	2	19,8	0,0002072
	1a	4	4	34,4	2,57E-45		
	rplR 50S ribosomal protein L18	ATP_00357	1b	3	3	26,1	7,86E-30
			1a	4	4	32,8	1,88E-18
	rplK 50S ribosomal protein L11	ATP_00386	1a	2	2	11,7	9,92E-08
	rplS 50S ribosomal protein L19	ATP_00440	1b	2	2	20,3	1,06E-14
			1a	5	5	32,2	1,35E-33
	rplT LSU ribosomal protein L20	ATP_00443	1b	5	5	27,9	1,33E-15
	rpsR SSU ribosomal protein S18P	ATP_00178	1b	3	3	26,6	1,55E-08
			1a	4	4	27,8	2,13E-17
	rpsB 30S ribosomal protein S2	ATP_00232	1b	4	4	23	4,43E-21
	rpmA 50S ribosomal protein L27	ATP_00282	1b	2	2	33,3	1,56E-24
			1a	3	3	42,4	2,34E-34
	rpsD SSU ribosomal protein S4	ATP_00310	1b	10	10	40,4	1,05E-26
			1a	2	2	10,6	4,49E-08
	rplE 50S ribosomal protein L5	ATP_00353	1b	7	7	49,4	8,85E-41
			3	5	5	34,8	7,79E-20
	1a	5	5	38,8	3,72E-50		
	rplA 50S ribosomal protein L1	ATP_00387	1b	5	5	24,7	1,29E-28
			3	2	2	10,8	2,78E-05
	1a	6	6	30,3	4,74E-97		
rplI 50S ribosomal protein L9	ATP_00177	1b	4	4	4,8	1,57E-06	
rpsF 30S ribosomal protein S6	ATP_00180	1a	2	2	15,3	0,0025244	
rplU 50S ribosomal protein L21	ATP_00284	1b	3	3	25,6	1,43E-12	
		1a	3	3	25,6	2,36E-41	
rpsJ 30S ribosomal protein S10	ATP_00340	1b	8	8	62,3	3,91E-16	
		1a	7	7	58,8	5,13E-47	
rplC 50S ribosomal protein L3	ATP_00341	1b	6	6	32,4	5,89E-184	
		2	2	2	16,2	3,09E-17	
		3	3	3	22,5	7,49E-53	
		1a	3	3	18,9	1,64E-70	

funktionelle Kategorie	Proteinname	Locus tag	Experiment	Peptides	Unique Peptides	Sequence Coverage [%]	PEP
Translation	rplD 50S ribosomal protein L4	ATP_00342	1b	7	7	39,3	3,09E-80
			1a	4	4	22,3	8,40E-72
	rplW 50S ribosomal protein L23	ATP_00343	1b	3	3	24,2	2,41E-08
			3	3	3	24,2	2,59E-06
	rpsS 30S ribosomal protein S19	ATP_00345	1b	5	5	54,1	9,48E-11
			3	4	4	38,8	1,38E-06
	rplV 50S ribosomal protein L22	ATP_00346	1b	5	5	38,5	3,46E-118
			1a	3	3	22,4	1,50E-58
	rplP 50S ribosomal protein L16	ATP_00348	1b	4	4	31	9,86E-10
	rpmC 50S ribosomal protein L29	ATP_00349	1b	4	4	54,1	2,04E-10
			3	2	2	29,6	0,0001759
	rplN 50S ribosomal protein L14	ATP_00351	1a	5	5	55,1	3,94E-105
			1b	4	4	33,9	6,45E-11
	rplF 50S ribosomal protein L6	ATP_00356	1b	4	4	22,4	8,72E-13
			3	2	2	8,7	0,0005941
	rpsE 30S ribosomal protein S5	ATP_00358	1a	6	6	24,5	4,62E-13
			1b	9	9	49,5	3,36E-51
	rpmD 50S ribosomal protein L30	ATP_00359	1a	13	13	58,8	2,65E-95
			1b	3	3	33,9	4,19E-06
	rpsM 30S ribosomal protein S13	ATP_00365	1a	2	2	35,5	5,17E-07
			1b	6	6	42,7	1,31E-14
	rpsK 30S ribosomal protein S11	ATP_00366	1a	8	8	45	2,14E-54
			1b	2	2	22,1	2,71E-09
	rplQ 50S ribosomal protein L17	ATP_00368	1a	3	3	22,1	5,74E-40
			1b	6	6	33,3	4,18E-20
	rplJ LSU ribosomal protein L10P	ATP_00388	1a	5	5	33,3	2,08E-83
			1b	4	4	31,8	1,99E-19
rplL 50S ribosomal protein L7/L12	ATP_00389	1a	5	5	37	9,13E-75	
		1b	10	10	76,3	4,37E-170	
		2	2	2	17,8	1,64E-07	
rpsL 30S ribosomal protein S12	ATP_00392	3	8	8	74,8	1,66E-45	
		1a	8	8	73,3	1,70E-170	
rpsG 30S ribosomal protein S7	ATP_00393	1b	2	2	12,8	3,55E-05	
		1a	5	3	23,7	1,71E-26	
rpsP 30S ribosomal protein S16	ATP_00437	1b	8	8	44,7	5,08E-46	
		3	3	3	20,5	1,12E-06	
pheS Phenylalanyl-tRNA synthetase alpha chain	ATP_00080	1a	8	8	49,7	1,82E-128	
		1b	2	2	40,2	1,67E-96	
alaS Alanyl-tRNA synthetase	ATP_00248	3	2	2	40,2	2,55E-21	
		1a	2	2	5,6	0,0037688	
aspS Aspartyl-tRNA synthetase	ATP_00271	1a	2	2	5,4	9,88E-05	
Replikation und Reparatur	dnaX DNA polymerase III	ATP_00043	1a	2	2	3,7	0,0020756
	polC1 DNA polymerase III alpha subunit	ATP_00081	1a	2	2	1	0,003946
	recA Recombinase A	ATP_00135	1b	8	8	33,6	1,68E-30
Transkription	rpoA DNA-directed RNA polymerase, alpha chain	ATP_00367	3	2	2	8,5	2,85E-07
			1b	5	5	19,6	2,90E-49

Tab.A3. Liste der durch quantitative Proteomanalyse identifizierten *Nicotiana occidentalis* infiziert mit „Candidatus Phytoplasma mali“ Stamm AT, ph^+ : *Nicotiana occidentalis*.

funktionelle Kategorie	Proteinname	Accession No.	Forward Labeling				Reverse Labeling				Ratio ph^+/ph^-
			Unique peptides matched	Sequence Coverage [%]	PEP	Ratio ph^+/ph^-	Unique peptides matched	Sequence Coverage [%]	PEP	Ratio ph^+/ph^-	
Jasmonsäure Biosynthese	acyl-CoA oxidase 1 allene oxide synthase lipoxigenase	gi 134140874	2	9,2	4,14E-04	0,88	2	9,7	4,42E-04	1,49	
		gi 16973300	4	6,6	5,25E-07	1,71	3	5,8	1,06E-06	2,09	
		gi 32454706	10	16	6,44E-81	3,84	12	17,1	3,97E-81	2,61	
Glycolyse	non-phosphorylating glyceraldehyde dehydrogenase enolase glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase phosphoglycerate mutase, cytosolic glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase phosphoglycerate kinase (PGK)	gi 1842115	11	26,6	7,61E-132	0,47	14	37,9	2,92E-79	0,34	
		gi 238814974	16	45,5	6,12E-210	0,91	13	41,4	9,70E-120	0,95	
		gi 157042763	8	67,4	1,47E-234	1,11	10	72,6	9,48E-255	1,15	
		gi 474168	13	22,5	2,34E-78	1,22	11	22,7	3,05E-39	0,99	
		gi 4539543	7	54,9	3,20E-236	1,49	8	53,1	3,01E-187	0,99	
Citratzyklus	mitochondrial 2-oxoglutarate/malate carrier protein isocitrate dehydrogenase (NAD ⁺) cytosolic NADP-malic enzyme	gi 10798640	4	28,6	1,15E-39	1,81	4	25,6	6,74E-39	1,92	
		gi 3021506	4	15,1	1,08E-38	2,12	8	27,7	5,31E-60	2,16	
		gi 118480585	20	40,4	1,24E-187	1,72	17	37,6	4,38E-125	1,54	
Pyruvatmetabolismus	cytochrome b6 mitochondrial ATP synthesis coupled proton transport protein ATP synthase protein M125 ATP synthase subunit beta, mitochondrial ATP synthase subunit alpha, mitochondrial NADH dehydrogenase subunit 9	gi 11465988	4	25,1	1,77E-78	0,91	4	25,1	4,08E-76	1,03	
		gi 93141182	4	23,9	5,28E-09	0,99	4	25,8	2,22E-15	0,83	
		gi 127083	3	11,6	8,66E-08	1,00	4	14,6	2,19E-08	1,02	
		gi 114421	4	55	0	2,01	3	56,2	0	2,41	
		gi 114407	22	46	0	2,13	19	41,7	1,42E-255	2,13	
		gi 56806644	4	22,1	4,67E-14	3,61	2	12,1	3,64E-12	1,54	
Mevalonate/ Methylerythritol- Stoffwechselweg	(E)-4-hydroxy-3-methylbut-2-enyl diphosphate synthase mevalonate diphosphate decarboxylase	gi 45737901	3	11,6	2,24E-11	0,44	2	9	6,92E-08	0,47	
		gi 157042753	2	4,9	1,51E-17	3,05	2	4,2	5,25E-06	2,69	
Translation - chloroplastisch	ribosomal protein L24 ribosomal protein L2 50S ribosomal protein L14, chloroplastic ribosomal protein S7 ribosomal protein S16 ribosomal protein S15	gi 170273	6	31	3,23E-53	0,17	6	31,6	2,07E-42	0,26	
		gi 11465998	5	21,5	6,08E-19	0,18	7	36,9	2,16E-30	0,27	
		gi 122233179	4	41	8,88E-54	0,20	4	40,2	1,12E-73	0,16	
		gi 11466006	6	41,3	5,53E-29	0,20	6	41,3	2,78E-30	0,27	
		gi 11465937	3	24,7	2,81E-20	0,23	2	23,5	7,39E-08	0,21	
gi 11466022	7	57,5	5,31E-43	0,25	6	56,3	5,73E-78	0,23			



Translation - chloroplastisch	chloroplast ribosomal protein L10	gi 3298441	8	33	5,12E-54	0,25	5	22,5	1,57E-29	0,31
	ribosomal protein S3	gi 11465995	6	25,2	4,57E-46	0,38	6	31,2	2,48E-42	0,22
Translation - nicht-chloroplastisch	ribosomal protein S18	gi 11465981	3	25,7	6,53E-11	0,41	3	25,7	3,59E-13	0,35
	chloroplast ribosomal protein L4	gi 3298439	7	18,4	5,10E-27	0,41	5	15,2	2,12E-31	0,38
	chloroplast elongation factor TuB(EF-TuB)	gi 459241	4	36,3	2,03E-224	0,49	5	45,4	1,63E-217	0,20
	Eukaryotic translation initiation factor 5A-2	gi 124226	2	30,2	6,63E-38	0,56	2	37,7	2,65E-60	0,74
	60S ribosomal protein L31	gi 1173027	2	14,2	5,31E-05	0,64	2	12,5	1,54E-06	0,65
	PRT1 protein	gi 5911685	2	3,2	4,13E-38	0,65	5	8,1	5,01E-24	0,97
	eukaryotic initiation factor 5A	gi 19887	2	30,2	2,40E-55	0,70	2	37,7	4,70E-60	0,79
	ribosomal protein S14	gi 1762931	2	31,8	2,67E-12	0,77	2	19,7	6,19E-18	1,32
	60S ribosomal protein L8	gi 132849	4	17,7	2,59E-32	0,79	3	20	3,97E-27	0,89
	60S ribosomal protein L10	gi 2500355	5	23,5	6,58E-24	0,80	4	19,9	1,80E-18	0,72
	60S ribosomal protein L13	gi 1350664	5	19,8	2,55E-112	0,83	6	24,3	3,89E-91	1,42
	elongation factor 2	gi 10798634	8	42,2	8,51E-133	0,87	7	42,8	2,14E-98	0,64
	40S ribosomal protein S5	gi 1620982	7	33,1	2,80E-87	0,88	5	31,8	5,81E-47	1,12
	ribosomal protein L11-like	gi 10799832	7	33,7	2,68E-46	0,90	6	32,6	4,91E-52	0,53
	40S ribosomal protein S6	gi 2507328	5	22,1	3,13E-29	0,92	6	27,6	1,01E-45	0,92
	elongation factor 1 gamma-like protein	gi 175363751	10	29,5	6,26E-113	0,96	10	24,9	9,63E-59	1,21
	40S ribosomal protein S3a	gi 122196609	13	54,4	2,48E-113	1,10	12	51	1,23E-104	1,01
60S ribosomal protein L2	gi 9230281	2	18,4	4,36E-12	1,21	2	25,3	1,06E-14	0,93	
60S ribosomal protein L25	gi 310935	4	19,5	2,33E-26	1,32	4	19,5	3,42E-37	1,03	
Photosynthese	ATP synthase subunit b, chloroplastic	gi 22213542	15	66,8	2,52E-231	0,22	13	62,5	7,22E-274	0,47
	chloroplast plastocyanin precursor	gi 256860445	2	38,5	2,63E-142	0,33	2	38,5	1,07E-129	0,24
	Photosystem I reaction center subunit IV A, chloroplastic	gi 2499966	3	40,4	2,23E-80	0,36	4	56	1,06E-225	0,37
	ATP synthase (gamma subunit), chloroplastic	gi 19785	10	34,2	1,94E-120	0,47	9	32,9	4,73E-120	0,44
	23-kDa polypeptide of photosystem II oxygen-evolving complex	gi 1345550	4	44	4,62E-282	0,47	3	46,2	6,50E-273	0,33
	photosystem I reaction center subunit	gi 270311593	12	42,3	4,58E-92	0,50	13	42,9	1,91E-147	0,78
	Oxygen-evolving enhancer protein 1, chloroplastic	gi 11134054	3	62,7	0	0,51	2	64,2	0	0,71
	chloroplast pigment-binding protein CP26	gi 110377793	17	62,8	5,31E-259	0,55	16	62,8	3,59E-289	0,63
	photosystem I subunit VII	gi 11466016	7	82,7	1,70E-96	0,56	7	74,1	9,33E-72	0,55
	Photosystem I reaction center subunit II, chloroplastic	gi 131167	4	43,6	4,31E-57	0,59	3	51	4,77E-98	0,89
	photosystem II protein D1	gi 11465935	7	22,9	1,56E-173	0,61	8	24,6	8,34E-172	0,85
	ATPase subunit beta, chloroplastic	gi 60391817	28	76,5	0	0,64	29	73,5	0	0,52
	chloroplast photosynthetic oxygen-evolving protein 23 kDa subunit	gi 61697113	3	42,5	2,53E-254	0,68	10	42,9	0	0,75
	chloroplast pigment-binding protein CP24	gi 110377772	7	29,6	0	0,68	6	23	0	1,04
	PSI-E subunit of photosystem I	gi 1217601	4	53,7	1,81E-147	0,68	5	55,8	1,57E-300	0,74
	photosystem I reaction center subunit X psaK	gi 30013661	2	7,7	5,32E-06	0,68	2	7,7	1,34E-09	1,07

Photosynthese	cytochrome f Photosystem I P700 chlorophyll a apoprotein A1 photosystem I P700 chlorophyll a apoprotein A2 photosystem II protein D2 PSII cytochrome b559 8 kDa subunit oxygen evolving complex 33 kDa photosystem II protein photosystem II 47 kDa protein ferredoxin-NADP oxidoreductase photosystem I subunit XI Chlorophyll a-b binding protein 36, chloroplastic	gij11465970	9	31,2	2,88E-220	0,70	11	42,2	4,42E-231	0,69
		gij122212906	14	15,7	2,99E-35	0,76	12	12,5	2,28E-47	0,72
		gij11465954	10	16,8	1,27E-228	0,77	9	15	9,38E-229	0,81
		gij11465949	6	22,1	4,39E-188	0,82	5	20,4	1,02E-136	0,62
		gij31580952	4	37,3	1,29E-72	0,82	4	37,3	1,74E-69	0,51
		gij30013657	5	54,2	0	0,84	6	58,1	0	0,67
		gij11465984	17	35	0	0,88	16	30,7	2,38E-207	0,78
		gij2190038	2	5,9	1,02E-07	1,06	2	5,9	5,05E-07	0,96
		gij29468504	3	16,4	3,27E-36	1,09	5	25	1,08E-71	1,12
		gij115802	7	46,4	2,20E-225	4,57	6	32,5	2,96E-217	1,64
Chlorophyll-Biosynthese	uroporphyrinogen decarboxylase NADPH:protochlorophyllide oxidoreductase coproporphyrinogen oxidase Mg protoporphyrin chelatase subunit	gij1009429	2	3,3	0,080196	0,19	3	5,9	7,04E-05	0,22
		gij21068895	4	14,3	3,03E-35	0,27	3	14,3	4,44E-33	0,23
		gij1213067	3	7,6	1,89E-17	0,37	5	13,6	1,23E-32	0,42
		gij2323329	7	17,6	3,06E-18	0,42	6	17,6	1,79E-30	0,24
Calvinzyklus	rubisco activase precursor chloroplast aldolase Ribulose biphosphate carboxylase/oxygenase activase 2 plastidic aldolase Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase B, chloroplastic phosphoglycerate kinase ribulose -1, 5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase A, chloroplastic	gij1006835	5	49,8	0	0,23	5	60,6	0	0,22
		gij111162651	2	56,6	2,66E-112	0,27	2	56,6	1,99E-146	0,36
		gij12643758	2	50,6	0	0,29	3	65,6	0	0,36
		gij4827253	4	44,5	1,31E-211	0,42	5	44,5	1,46E-207	0,19
		gij120665	11	34,9	4,15E-137	0,62	14	35,4	9,82E-146	0,50
		gij1161600	18	62,6	0	0,64	2	66,9	0	1,24
		gij1061022	3	71,9	0	0,66	2	74,4	0	0,63
		gij120661	16	51,8	0	0,67	16	54,1	0	0,60
C4 photosynthetischer Kohlenstoff-assimilationszyklus	NAD-malate dehydrogenase	gij5123836	6	26,7	2,52E-162	3,40	8	32,5	6,42E-98	3,36
		gij6289059	7	7,4	6,14E-45	1,23	7	5,6	5,18E-11	1,20
Sucrose- Biosynthese aus Calvinzyklus- Intermediaten	sucrose-6-phosphate synthase A UDP-glucose pyrophosphorylase sucrose synthase sucrose synthase	gij17402533	19	59,6	2,24E-136	1,28	17	44,7	8,42E-158	1,03
		gij17402523	2	16,1	1,41E-49	1,61	2	12,8	1,30E-51	1,53
UDP-D-Xylose- und UDP-D-Glucuronat-Biosynthese	UDP-glucuronate decarboxylase I putative UDP-glucose dehydrogenase I	gij157042755	4	10,8	1,45E-65	4,35	5	10,1	7,58E-44	2,20
		gij48093461	4	16	9,26E-16	0,98	6	19,5	2,04E-22	0,71
o-diquinones Biosynthese	polyphenol oxidase	gij48093457	11	19,6	3,54E-37	1,21	13	22,2	5,16E-31	0,94
		gij2916727	7	12,8	8,29E-36	1,57	6	11,8	4,09E-24	1,52
Ethanoldegradation	aldehyde dehydrogenase	gij1743354	6	9,4	2,49E-27	1,98	4	7,6	1,52E-10	1,87
Proteindegradation	ubiquitin specific protease 12 ATP-dependent zinc metalloprotease FTSH, chloroplastic	gij209977652	3	2,5	2,40E-07	0,50	3	2,5	2,70E-06	0,84
		gij17865457	5	14	9,41E-64	0,55	8	19,6	6,00E-62	0,53

Proteindegradation	proteasome delta subunit	gi 1743356	6	25,6	6,30E-101	0,64	5	22,2	6,53E-66	1,37	
	putative alpha7 proteasome subunit	gi 14594925	6	19,7	3,94E-14	0,75	4	15,7	5,57E-17	0,86	
	Ubiquitin activating enzyme E1	gi 1808656	10	9,4	1,37E-76	0,80	5	5,6	5,01E-47	0,78	
	putative beta5 proteasome subunit	gi 14594931	2	13,2	4,97E-11	0,82	2	13,2	1,06E-06	0,87	
	FtsH-like protein	gi 257222592	4	46	4,63E-107	0,85	3	43,1	2,16E-41	0,96	
	20S proteasome alpha 6 subunit	gi 22947842	4	15,3	1,75E-15	1,01	5	16,1	4,40E-17	1,03	
	putative alpha4 proteasome subunit	gi 14594917	4	21,5	1,98E-37	1,12	2	28	2,74E-38	0,81	
	Proteasome subunit alpha type-6	gi 12229948	7	35	1,73E-56	1,33	10	47,2	8,91E-232	1,09	
	21D7	gi 1864003	8	15,8	5,54E-46	2,00	4	8,6	1,63E-18	3,73	
	subtilase	gi 169674674	4	23,6	5,19E-233	2,02	4	22,2	4,55E-214	2,07	
	putative alpha3 proteasome subunit	gi 14594915	2	10,8	7,69E-08	2,13	2	11,4	9,51E-06	1,50	
	aspartic protease	gi 109675118	3	7,5	1,46E-17	2,50	3	6,3	1,16E-18	2,02	
	subtilase	gi 169674676	6	16,6	1,67E-88	3,15	6	17,7	1,06E-107	2,53	
	subtilisin-like serine protease	gi 257222598	5	35	1,03E-30	4,00	5	33,3	6,92E-37	4,17	
	heat shock protein 70	gi 48716124	2	29,2	6,03E-44	0,33	4	28,2	2,77E-57	0,44	
Proteinfaltung	molecular chaperone Hsp90-3	gi 260100692	5	44,6	0	0,99	4	42	0	1,05	
	cyclophilin	gi 443954	2	39,3	1,79E-09	1,55	2	39,3	1,27E-23	1,72	
	protein disulfide isomerase	gi 257222620	4	34,6	4,97E-85	2,31	7	54,7	2,56E-48	2,10	
	cyclophilin-like protein	gi 152206078	6	29	3,52E-62	2,59	7	31,9	3,15E-55	1,57	
	protein disulfide-isomerase precursor	gi 1848212	5	13,6	3,35E-24	3,19	7	22,8	1,88E-41	2,40	
	luminal binding protein (BiP)	gi 19813	4	37,6	1,85E-218	3,53	4	37,7	4,72E-213	1,90	
	heat shock protein 70-like protein	gi 257222624	3	60,8	5,37E-129	6,96	3	60,8	4,49E-94	1,64	
	glutathione peroxidase NtEIG-C08	gi 10798756	4	18,3	4,04E-20	1,42	3	18,3	1,98E-18	1,24	
	Superoxide dismutase	gi 134616	2	15,1	2,87E-06	1,47	5	34,9	1,82E-18	0,77	
	cytosolic ascorbate peroxidase	gi 1389654	8	41,2	1,02E-95	2,39	10	49,2	1,39E-121	2,76	
	putative glutathione S-transferase	gi 68687853	2	12,9	5,57E-06	4,05	2	12,9	0,0001438	4,16	
	peroxidase	gi 14031049	7	21,8	6,80E-53	4,89	8	26,8	2,72E-29	3,15	
	manganese superoxide dismutase	gi 411891	2	9,8	4,99E-59	8,46	2	9,8	7,89E-33	1,52	
	superoxide dismutase	gi 100284	9	48,9	5,87E-136	16,59	6	31,3	4,00E-100	3,53	
	Lignin-forming anionic peroxidase	gi 129837	2	19,8	2,22E-141	22,56	2	25,3	3,01E-170	35,31	
Detoxifizierung von ROS	unnamed protein product	gi 134273528	18	42,1	9,38E-188	0,23	17	37,1	1,76E-246	0,26	
	unnamed protein product	gi 134273528	18	42,1	9,38E-188	0,23	17	37,1	1,76E-246	0,26	
	mitochondrial glycine decarboxylase complex P-protein-like protein	gi 304273262	10	24	7,57E-45	0,24	9	18,6	2,04E-30	0,46	
	unnamed protein product	gi 15984192	4	23,9	5,57E-24	0,29	5	35,6	9,64E-20	0,15	
	unnamed protein product	gi 15984192	4	23,9	5,57E-24	0,29	5	35,6	9,64E-20	0,15	
	germin like protein	gi 222051768	4	27,9	5,62E-151	0,30	4	27,9	7,59E-99	0,23	
	H+-translocating ATPase	gi 170206	10	29,4	0	0,40	3	29,1	3,12E-295	0,39	
	unbekannte Funktion	unnamed protein product	gi 134273528	18	42,1	9,38E-188	0,23	17	37,1	1,76E-246	0,26
		unnamed protein product	gi 134273528	18	42,1	9,38E-188	0,23	17	37,1	1,76E-246	0,26
		mitochondrial glycine decarboxylase complex P-protein-like protein	gi 304273262	10	24	7,57E-45	0,24	9	18,6	2,04E-30	0,46
		unnamed protein product	gi 15984192	4	23,9	5,57E-24	0,29	5	35,6	9,64E-20	0,15
		unnamed protein product	gi 15984192	4	23,9	5,57E-24	0,29	5	35,6	9,64E-20	0,15
		germin like protein	gi 222051768	4	27,9	5,62E-151	0,30	4	27,9	7,59E-99	0,23
		H+-translocating ATPase	gi 170206	10	29,4	0	0,40	3	29,1	3,12E-295	0,39

unbekannte Funktion	unnamed protein product	3	35,4	4,43E-156	2,17	3	35,4	6,44E-201	1,82	
	unnamed protein product	3	35,4	7,13E-113	2,20	3	38,1	5,94E-139	2,17	
	putative ML domain protein	3	14,5	2,16E-42	2,25	4	31,7	5,72E-59	2,31	
	lipid transfer protein 1 precursor	2	31,5	1,25E-126	2,28	2	31,5	1,38E-125	1,89	
	Stem-specific protein TSJTI	3	19,5	2,24E-11	2,30	4	26,2	1,36E-13	2,18	
	Al-induced protein	3	31,5	2,32E-22	2,42	2	21,7	6,55E-13	1,99	
	unnamed protein product	3	15,6	4,15E-38	2,45	4	23,2	3,47E-80	1,95	
	unnamed protein product	10	22,5	1,73E-70	3,31	9	17,6	5,12E-27	2,38	
	lipid transfer protein	4	41,2	7,44E-36	4,35	4	40,4	7,52E-32	4,06	
	unnamed protein product	3	8,1	1,79E-15	7,75	2	4,7	4,08E-06	9,55	
	unnamed protein product	3	9,4	1,40E-66	9,96	2	5	3,58E-07	6,71	
	cysteine-rich extensin-like protein-1	2	9,6	2,25E-21	10,65	3	12,9	6,22E-15	12,31	
	unnamed protein product	4	9,4	2,42E-152	11,25	4	9,4	1,14E-123	4,76	
	unnamed protein product	6	21,5	2,51E-54	27,53	5	17,1	5,94E-35	24,85	
	Pflanzenabwehr	chloroplast N receptor-interacting protein 1	2	13	6,44E-11	0,09	2	13	9,27E-14	0,13
		beta-D-glucan exohydrolase	2	3,3	9,46E-11	0,73	3	4,8	1,97E-21	0,66
		ADP ribosylation factor	3	50,8	2,46E-79	0,89	3	50,8	8,64E-141	0,70
		pathogen-inducible alpha-dioxygenase	4	6,4	1,97E-06	1,24	6	9,5	6,56E-23	0,81
		thionin like protein	3	43,6	1,55E-96	2,39	3	34,6	2,71E-23	3,36
		ABC1 protein	13	17,3	1,48E-135	3,18	12	16,2	1,02E-134	4,88
gamma-thionin		2	9,5	7,08E-05	4,12	2	9,5	1,36E-07	3,21	
Kunitz trypsin inhibitor		4	17,7	2,70E-07	5,96	3	12,9	6,51E-07	2,64	
NBS-coding resistance gene analog		3	13,2	1,40E-07	6,13	4	16,6	9,69E-12	7,40	
trypsin proteinase inhibitor precursor		4	24	1,34E-211	9,96	5	27,6	1,67E-272	6,66	
osmotin		3	47,6	0	10,46	7	46,8	0	22,41	
Endochitinase A		4	18,5	4,85E-62	11,07	5	24,3	1,06E-50	8,28	
chitinase/lysozyme		2	6,3	9,65E-11	15,88	2	6,3	1,25E-08	21,85	
chitinase, class V		2	8,8	8,26E-11	19,12	2	8,8	1,60E-11	8,99	
pathogen- and wound-inducible antifungal protein CBP20 precursor		5	24,6	9,47E-153	24,97	6	26,5	7,63E-185	23,58	
Osmotin-like protein		6	45,4	0,00E+00	29,90	5	40,2	8,30E-259	10,93	
Aminosäure-metabolismus		nitrite reductase	4	13,5	4,13E-25	0,44	5	14,5	6,69E-47	0,49
		glutamate dehydrogenase	3	19,2	5,91E-132	0,63	2	28	1,26E-69	0,72
		putative chloroplast cysteine synthase 1 precursor	8	36	9,72E-256	0,95	9	45,1	6,29E-189	0,90
		putative cytosolic cysteine synthase 7	12	51,4	0	1,28	12	48,6	3,19E-181	1,31
	Glutamate dehydrogenase B	3	21,2	9,36E-91	1,34	5	36,5	4,06E-107	1,44	
	threonine deaminase	8	18,3	2,97E-197	1,65	7	14,3	1,04E-142	2,16	
	PII protein	4	35,8	3,49E-13	5,68	5	50	2,54E-21	2,26	

Aminosäure-metabolismus	Glutamine synthetase	gi 121373	4	8,1	7,56E-16	6,28	5	10,4	1,88E-12	5,58
Nucleotidmetabolismus	nucleoside diphosphate kinase	gi 27807824	5	18,5	2,09E-63	0,42	5	18,5	2,85E-76	0,46
	adenosine kinase isoform 1S	gi 51949800	3	23,8	2,40E-106	0,61	5	40,3	2,24E-286	0,57
	adenosine kinase isoform 2S	gi 51949802	2	16,2	2,82E-50	0,76	3	23,5	8,33E-139	0,59
	putative carbamoyl phosphate synthase large subunit	gi 21535791	8	6,4	1,59E-26	0,89	9	7,6	2,87E-38	0,72
	nucleoside diphosphate kinase	gi 62114996	5	32,4	5,55E-60	1,51	6	37,2	1,53E-92	1,54
	polyphenol oxidase	gi 2916727	7	12,8	8,29E-36	1,57	6	11,8	4,09E-24	1,52
Strukturproteine	villin 2	gi 57283139	6	15,6	1,01E-73	0,26	5	12,5	3,73E-62	0,27
	beta-tubulin	gi 40036995	18	50,4	2,17E-266	0,41	18	52,9	2,45E-261	0,43
	actin	gi 50058115	3	39,8	1,13E-181	0,46	3	43,5	2,91E-173	0,32
	Plastid-lipid-Associated Protein	gi 2632088	8	29,3	1,68E-93	2,31	7	25,2	1,46E-61	2,88
	CYP82E5v2	gi 161019204	2	7,9	3,39E-15	2,49	2	5,8	4,90E-07	2,90
post-transcriptionelle Gemregulation	31 kDa ribonucleoprotein, chloroplastic	gi 133248	7	33,3	1,41E-150	0,29	8	36,8	4,38E-112	0,26
	mRNA-binding protein precursor	gi 32746733	6	15,1	4,45E-35	0,39	10	29,1	4,58E-56	0,31
	AGO4-2	gi 84688912	7	7,4	8,62E-30	1,31	5	7,1	6,64E-21	1,16
	AGO1-2	gi 84688908	4	9,2	2,46E-64	2,87	9	10,1	8,07E-64	1,66
	histone 2b	gi 122894114	5	51	3,52E-69	0,67	3	45,6	8,80E-60	1,21
Nucleosom	histone H2B1	gi 1848210	2	40,4	9,86E-61	1,06	3	40,4	1,91E-53	0,99
	histone H3	gi 151413349	2	27,9	3,80E-11	1,17	2	27,9	4,71E-15	0,86
	thioredoxin	gi 20047	2	22,2	9,56E-12	1,01	2	22,2	3,22E-26	0,90
Zell-Redox-Homeostase	plastid thioredoxin M precursor	gi 312231978	5	29,7	4,73E-64	1,01	6	30,2	1,95E-65	0,76
	thioredoxin H-type 1	gi 257222628	2	23,5	1,34E-11	1,12	3	38,7	1,61E-28	0,79
Phosphatidylinositol-Signalling	Impa2	gi 119866037	4	6,2	1,18E-14	0,76	2	6	4,69E-15	0,73
Ethylen- Biosynthese	S-adenosyl-L-methionine synthase	gi 115361537	7	17,7	2,78E-38	0,86	8	22,1	1,37E-21	0,68
Ascorbat- Biosynthese	L-galactono-1,4-lactone dehydrogenase	gi 10047219	4	8,2	5,14E-22	0,92	4	8,2	1,12E-12	0,88
Glutathion- Biosynthese	chloroplast gamma-glutamylcysteine synthetase	gi 111380512	2	3,1	7,78E-05	0,97	2	3,1	0,0011467	1,49
	14-3-3 protein	gi 15778154	5	39,5	1,55E-153	0,90	5	42,1	3,89E-114	0,66
	14-3-3-like protein B	gi 1848208	6	51,9	1,48E-247	0,99	6	51,9	1,06E-224	0,70
Fettsäure- Biosynthese	14-3-3 protein isoform g	gi 15419924	4	40,5	2,26E-156	1,42	9	53,6	9,32E-184	1,42
	enoyl-ACP reductase	gi 2204236	2	13,5	2,31E-11	0,70	2	20,4	8,02E-40	0,66
nukleocytoplasmatischer Transport	GTP-binding nuclear protein Ran-A1	gi 1172835	6	27,1	1,20E-34	0,71	5	24,4	5,28E-18	0,83
Sucrosedegradation	vacuolar invertase	gi 29893064	4	7,2	3,44E-73	0,98	5	8,6	3,81E-56	1,03
Lignin- Biosynthese	cinnamyl-alcohol dehydrogenase	gi 19841	3	9	1,25E-27	1,25	4	21,3	1,99E-19	1,24
Calcium-abhängige	annexin	gi 2467255	7	46,5	2,92E-183	1,21	6	43	2,56E-250	1,26

Tab.A4. Liste der durch quantitative Proteomanalyse lediglich im Forward Labeling identifizierten *Nicotiana*-Proteine. ph⁺: *Nicotiana occidentalis* infiziert mit „*Candidatus* Phytoplasma mali“ Stamm AT, ph⁻: *Nicotiana occidentalis*.

Proteinname	AccessionNo.	Forward labeling			
		Unique peptides	Sequence Coverage [%]	PEP	Ratio ph ⁺ /ph ⁻
ribosomalprotein L12-1a	gi 20020	9	56,5	1,08E-236	0,05
catalase	gi 219560127	2	37,2	8,12E-122	0,16
L-galactosedehydrogenase	gi 77999796	2	7,2	2,74E-15	0,33
2-C-methyl-D-erythritol 2,4-cyclodiphosphate synthase	gi 157042737	3	24,4	7,46E-12	0,45
heatshockprotein 70	gi 48474196	2	9,3	0,0002667	0,46
LIM-domain SF3 protein	gi 1841464	3	12,7	5,56E-12	0,46
nitritereductase	gi 46367703	2	9,8	2,32E-10	0,47
P58IPK	gi 32395918	2	4	0,066807	0,48
ClpPprotease	gi 1143166	2	21,4	3,00E-93	0,5
NtpIII0	gi 22669	3	17,6	3,51E-13	0,5
101 kDaheatshockprotein	gi 11561806	2	0,9	0,0070673	0,52
plastidicphosphoglucomutase	gi 17402531	2	12	0,0054672	0,53
protoporphyrinogenoxidase	gi 2370333	5	8,4	1,61E-12	0,73
ACC oxidase ACO3	gi 131053151	3	17,4	7,52E-33	0,77
unnamedproteinproduct	gi 257658703	2	14,4	1,41E-152	0,78
4-diphosphocytidyl-2-C-methyl-D-erythritol kinase	gi 141452638	2	5,9	4,76E-40	0,84
nucleosome assembly protein 1-like protein 1	gi 45433313	2	5,3	0,0003676	1
unnamedproteinproduct	gi 257633930	2	6,8	6,70E-06	1,04
auxin-inducedprotein	gi 19793	3	18,1	8,41E-14	1,18
putative beta7 proteasomesubunit	gi 14594935	2	20,2	2,27E-05	1,19
putative beta6 proteasomesubunit	gi 14594933	2	13,5	5,00E-41	1,29
chloroplast methionine sulfoxidereductase B2 precursor	gi 156105710	2	9	1,64E-07	1,6
GDP dissociationinhibitor	gi 2501850	3	8,3	2,18E-54	1,62
calciumATPase	gi 291278198	3	2	0,000948	1,78
unnamedproteinproduct	gi 219911986	2	30,5	2,60E-130	1,85
NTFP2	gi 4097577	3	30,5	3,19E-36	1,86
ras-related GTP-bindingprotein	gi 311907	4	35	1,21E-38	2,08
isopentenylpyrophosphateisomerase	gi 78191045	2	11,3	3,87E-09	2,18
ADP-glucose pyrophosphorylase small subunit	gi 89089752	12	25,2	1,17E-83	2,21
glycerophosphodiesterase-likeprotein	gi 115500890	10	17,3	2,05E-188	2,37
subtilase	gi 169674672	2	18	9,61E-191	2,43
Glutamate dehydrogenase A	gi 12229785	2	9	1,06E-07	2,48
histone H1	gi 790929	4	13,8	2,10E-07	3,47
alleneoxidcyclase	gi 40644130	5	24,5	1,67E-27	3,66
Proteinaseinhibitor type-2	gi 3913932	2	14,7	2,83E-34	4,03
CYP73A47v1	gi 85068662	3	5,3	1,37E-06	4,81
subtilisin-likeproteasepreproenzyme	gi 253740260	2	2,4	0,02324	6,81
Glucan endo-1,3-beta-glucosidase, basic vacuolar isoform	gi 544201	8	34	4,12E-157	9,47
prb-1b	gi 19970	3	16,8	1,52E-32	63,58

Tab.A5. Liste der durch quantitative Proteomanalyse lediglich im Reverse Labeling identifizierten *Nicotiana*-Proteine. ph⁺: *Nicotiana occidentalis* infiziert mit „*Candidatus* Phytoplasma mali“ Stamm AT, ph⁻: *Nicotiana occidentalis*.

Protein name	AccessionNo.	Reverse labeling			
		Unique peptides	Sequence Coverage [%]	PEP	Ratio ph+/ph-
Acidicendochitinase Q	gi 116342	3	22,9	3,16E-92	131,17
Chain B, Chymotrypsin Inhibitor (C2)	gi 159162899	2	39,3	2,74E-06	10,65
glucan beta-1,3-glucanase	gi 170247	10	42,2	5,87E-257	6,48
invertaseinhibitor	gi 2765240	3	21,7	1,10E-13	2,85
glycerophosphodiesterase-likeprotein	gi 115500890	9	14,2	1,47E-228	2,75
unnamedproteinproduct	gi 298533104	2	6,6	2,12E-13	2,7
RNA-bindingproteinprecursor	gi 15822703	2	10,5	1,07E-23	2,18
unnamedproteinproduct	gi 15984178	2	24,8	2,68E-63	1,86
luminalbindingprotein	gi 19805	2	27,2	8,94E-56	1,81
NAD-dependentisocitratehydrogenase	gi 3790188	2	7	4,07E-07	1,75
ADP-glucose pyrophosphorylase small subunit	gi 89089752	10	18,7	3,41E-68	1,73
unnamedproteinproduct	gi 2295932	2	6,9	2,89E-07	1,62
dehydroascorbatereductase	gi 28192427	3	16,5	7,30E-86	1,62
isopentenylidiphosphateisomerase 2	gi 13603408	3	17,9	2,13E-39	1,58
putative betaproteasomesubunit	gi 14594921	2	9,3	3,94E-05	1,55
unnamedproteinproduct	gi 219727948	2	12,9	0,0004588	1,48
ferritin	gi 20152139	3	12,4	0,0020639	1,44
60S ribosomalprotein L15	gi 1620984	2	22,8	5,91E-06	1,43
histone H3	gi 3273350	2	27,9	3,82E-14	1,43
spermidinesynthase	gi 2821959	2	8,3	4,18E-07	1,38
RPN8	gi 78059504	2	9,6	0,0006387	1,36
chloroplastenvelopeprotein 1	gi 258678027	2	3,9	0,17319	1,35
EF-1-alpha-related GTP-binding protein	gi 1009232	2	11,8	1,43E-10	1,34
glutamatedecarboxylaseisozyme 2	gi 3252854	8	19,8	2,01E-74	1,31
SUMO	gi 213868279	2	26	1,42E-46	1,23
hydroperoxidelyase	gi 15982240	2	4,4	0,0009235	1,2
starchphosphorylase	gi 68300909	2	35,4	1,40E-32	1,16
Calreticulin	gi 11131769	8	20,7	2,36E-40	1,07
Rab GDP dissociationinhibitor	gi 224815412	4	9,5	1,05E-17	1,03
RPN9	gi 78059502	2	5	0,11209	1,02
unnamedproteinproduct	gi 110623121	3	11,4	3,67E-13	1
4-coumarate:coenzyme A ligase	gi 1237183	2	4,2	6,42E-09	0,99
N-ethylmaleimide sensitive fusionprotein	gi 1449179	6	8,9	7,92E-21	0,98
FtsZ-likeprotein	gi 14787784	2	7,9	1,48E-06	0,96
osmotic stress-activated protein kinase	gi 19568098	2	9,8	3,77E-06	0,94
50S ribosomalprotein L22, chloroplasti	gi 109893077	2	8,4	2,76E-08	0,94
auxin-inducedprotein	gi 19793	6	29	1,36E-22	0,94
putative multiproteinbridgingfactor 1	gi 20086364	2	15	1,78E-08	0,92
40S ribosomalprotein S9	gi 1351017	2	31,2	1,12E-25	0,88
myosin XI-K	gi 116047947	4	2,6	3,10E-06	0,86
FtsZ-likeprotein	gi 4753845	2	5,7	2,22E-09	0,83
pectinmethylesterase	gi 1279596	2	21,2	1,11E-13	0,83
syntaxin	gi 218744540	2	5,9	0,000677	0,82
Eukaryoticinitiationfactor 4A-7	gi 2500516	9	26,6	4,55E-59	0,8
SUP2	gi 1009234	2	12,5	1,10E-12	0,78
NADH-Ubiquinoneoxidoreductasesubunit 7	gi 61097780	4	11,2	2,72E-20	0,76
SGT1	gi 29468339	3	10,3	8,56E-30	0,75
SAICAR synthetase	gi 37983622	2	6,8	3,79E-05	0,74
NtRab11D	gi 226088538	3	17,1	1,21E-10	0,71
actindepolymerizingfactor	gi 99029028	3	20	3,56E-34	0,67
ELI3	gi 214014136	4	16,8	3,61E-13	0,66
nucleosome assembly protein 1-like protein 2	gi 45433315	2	5,3	4,46E-05	0,65
glutamate/malatetranslocator	gi 22121982	2	3,6	0,0001022	0,57
hypotheticalprotein	gi 257222618	3	16,8	3,29E-11	0,55
unnamedproteinproduct	gi 219922472	2	7,4	3,46E-07	0,55

unnamedproteinproduct	gi 14347833	5	9,9	1,95E-29	0,51
ribosomalprotein L20	gi 31580904	3	32	7,36E-06	0,46
plastidthioredoxin F precursor	gi 312231980	2	10,3	9,50E-05	0,45
S-adenosylmethioninetransporter	gi 119391879	3	14,7	1,49E-06	0,43
ZIP	gi 33943103	2	6,5	9,03E-08	0,43
NADH dehydrogenasesubunit 7	gi 11466021	2	6,6	0,20097	0,43
S-adenosyl-L-methionine Mg-protoporphyrin IX methyltransferase	gi 7839365	4	13,8	7,03E-41	0,42
G proteinbetasubunit	gi 1695181	2	30,1	6,77E-85	0,41
acetyl-CoA carboxylase beta subunit	gi 11465966	2	3,7	3,29E-07	0,41
1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate reductoisomerase	gi 111227950	3	5,9	7,88E-22	0,4
ribosomalprotein L27	gi 170306	2	14,5	7,38E-10	0,38
ribosomalprotein L16	gi 11465994	2	20,9	1,65E-15	0,37
NADPH:protochlorophyllideoxidoreductase orf	gi 21068893	2	10,6	1,91E-13	0,35
ribosomalprotein S11	gi 256141	3	13	5,80E-08	0,34
beta-1,3-glucanase	gi 11465991	3	26,8	2,86E-85	0,33
nuclear RNA bindingprotein	gi 4929153	3	7,1	5,98E-08	0,33
NADH dehydrogenasesubunit J	gi 6492262	2	6	0,0006811	0,32
NADH dehydrogenase 27kD subunit	gi 11465960	5	36,1	2,97E-33	0,3
proliferatingcellnuclearantigen ribonucleoprotein, 33K, precursor - common tobacco	gi 11837	2	9,5	1,16E-21	0,29
ribosomalprotein S8	gi 10946427	2	12,9	6,79E-09	0,24
chloroplastribosomalprotein L17	gi 100390	3	10,2	2,94E-18	0,24
Ribulose-1,5-Bisphosphate Carboxylase/oxygenase	gi 11465992	4	36,6	1,77E-72	0,23
putative carbamoyl phosphate synthase small subunit	gi 3298443	2	8,3	1,25E-09	0,23
beta-cyanoalaninesynthase	gi 231070	2	56,9	1,53E-137	0,23
Ferredoxin	gi 21535793	2	10,9	0,0014606	0,21
ribosomalprotein S4	gi 40549128	2	21,3	7,23E-12	0,21
ribosomalprotein L23	gi 34921273	2	45,4	1,48E-57	0,2
ribosomalprotein S2	gi 11465958	5	25,4	1,08E-22	0,19
	gi 11465999	2	23,7	1,95E-07	0,17
	gi 31580934	4	17,8	1,04E-08	0,16

Tab.A6. Liste der durch quantitative Proteomanalyse identifizierten *Nicotiana-* Proteine deren Expressionswerte in Forward und Reverse Labeling nicht konsistent waren. ph^+ : *Nicotiana occidentalis* infiziert mit „*Candidatus* Phytoplasma mali“ Stamm AT, ph^- *Nicotiana occidentalis*.

Proteinname	Accession No.	Forward labeling			Reverse labeling			Ratio ph^+/ph^-	
		Unique peptides	Sequence Coverage [%]	PEP	Ratio ph^+/ph^-	Unique peptides	Sequence Coverage [%]		PEP
putative photosystem I subunit III precursor	gi 30013659	5	24,3	6,94E-74	0,16	6	24,8	1,21E-67	0,92
PSI-D1 precursor	gi 407769	2	47,2	5,74E-93	0,32	2	47,2	1,34E-77	0,64
ATP synthase epsilon chain, chloroplastic	gi 114610	5	48,9	2,90E-115	0,32	7	62,4	4,78E-247	0,59
unnamed protein product	gi 21522879	8	18,8	1,03E-76	0,36	6	15,5	9,13E-62	0,57
light-harvesting chlorophyll a /b binding protein	gi 575349	2	13	1,59E-30	0,36	2	18	4,23E-47	1,09
chaperonin	gi 111162631	2	64,6	2,81E-07	0,38	2	64,6	3,19E-98	0,54
unnamed protein product	gi 219911718	2	43	5,43E-207	0,39	4	53,1	3,82E-256	0,57
chloroplast-localized protein	gi 157142955	7	31,9	7,98E-133	0,42	6	23,4	8,94E-125	0,8
Photosystem II CP43 chlorophyll apoprotein	gi 131289	10	24,7	4,26E-170	0,44	11	28,3	5,44E-211	0,71
unnamed protein product	gi 219733321	3	8,9	1,48E-17	0,44	2	6,9	7,49E-05	12,42
unnamed protein product	gi 50834461	4	15,6	1,37E-40	0,45	2	9,2	3,19E-13	1,05
unnamed protein product	gi 227247950	2	17,5	1,29E-11	0,47	6	29	1,00E-17	0,94
chloroplast pigment-binding protein CP29	gi 11037766	11	30,2	5,58E-135	0,47	9	26,7	3,96E-111	0,52
putative 16kDa membrane protein	gi 6996562	2	6,3	2,85E-10	0,48	2	6,3	7,07E-11	0,57
glycolate oxidase	gi 304368145	19	62,3	0	0,49	22	68,7	1,90E-278	0,56
sulfite reductase	gi 3721540	5	6,5	8,05E-13	0,49	7	9,5	9,39E-19	0,56
chloroplast oxygen-evolving protein 16 kDa subunit	gi 58700507	15	50,9	1,27E-223	0,49	16	53,1	4,99E-205	0,72
methionine synthase	gi 115361539	31	42	5,77E-227	0,51	26	31,8	1,99E-106	0,49
putative pyridoxine biosynthesis protein isoform A	gi 46399269	7	23,9	1,06E-30	0,54	6	21,7	1,69E-27	0,37
Ac-CoA carboxylase:SUBUNIT=biotin carboxylase	gi 1582354	7	15,3	1,22E-107	0,54	7	18,5	5,83E-112	0,42
glutamate-1-semialdehyde 2,1-aminomutase	gi 19875	8	22,4	3,21E-96	0,54	9	26,6	2,25E-89	0,36
14-3-3 protein	gi 15778152	3	37,6	4,63E-192	0,56	4	42,7	1,62E-172	0,29
unnamed protein product	gi 124052125	13	31,7	1,45E-235	0,59	15	33,6	3,77E-120	0,42
photosystem I psaH protein	gi 397555	3	13,1	3,25E-26	0,61	3	13,1	1,24E-23	0,42
plastidic aldolase NPALDPI	gi 4827251	6	36,2	1,75E-213	0,61	7	43,3	1,75E-210	0,28
alpha-tubulin	gi 17402471	11	41	3,76E-242	0,63	13	47,7	0	0,42
Elongation factor 2	gi 1841462	3	24	4,85E-13	0,63	3	24	1,39E-12	0,49
leaf profilin	gi 99029030	2	19,8	5,12E-12	0,63	2	19,8	2,38E-09	0,43
Phosphoenolpyruvate carboxylase	gi 115610	7	18,4	2,56E-132	0,67	5	13,9	4,75E-73	0,35
photosystem I light-harvesting chlorophyll a/b-binding protein	gi 493723	8	26,1	5,02E-40	0,71	7	17,1	7,91E-22	0,47
translation elongation factor EF-Tu	gi 170344	3	34,1	1,64E-209	0,76	3	35,8	3,29E-189	0,4
endoxyloglucan transferase related protein	gi 1498168	9	34,6	5,36E-80	0,83	6	23,7	6,96E-82	0,1

Proteinname	Accession No.	Forward labeling				Reverse labeling			
		Unique peptides	Sequence Coverage [%]	PEP	Ratio ph ⁺ /ph ⁻	Unique peptides	Sequence Coverage [%]	PEP	Ratio ph ⁺ /ph ⁻
chloroplast ATP synthase (delta subunit)	gi 19787	9	43,1	5,56E-182	0,88	7	31,9	1,43E-170	0,34
unnamed protein product	gi 219787539	3	8,4	4,81E-18	0,89	3	8,4	3,25E-27	0,5
29 kDa ribonucleoprotein A, chloroplastic	gi 12230584	9	58,6	2,06E-297	0,92	5	30,8	4,22E-138	0,22
photosystem II protein H	gi 11465987	3	37	3,65E-56	0,94	3	37	6,50E-38	0,4
MAR-binding filament-like protein 1-1	gi 14423763	2	2,4	3,24E-05	0,95	4	5,3	3,34E-08	0,34
24K germin like protein	gi 31711507	4	37,1	5,22E-127	0,96	4	37,1	1,54E-112	0,4
dehydrin	gi 46020014	4	19,7	6,76E-29	0,98	8	42,3	7,89E-23	0,47
cytosolic phosphoglucomutase	gi 17402535	2	23,2	1,40E-22	0,99	2	23,2	1,82E-21	1,61
putative reductase	gi 156763844	2	5,2	1,61E-07	1,09	6	16	1,56E-42	1,67
60S ribosomal protein subunit L17	gi 310933	3	18,6	1,42E-08	1,1	4	24,3	2,75E-11	0,43
chloroplast ribosomal protein L3	gi 3298437	8	35,5	1,71E-142	1,15	10	41,3	3,83E-135	0,28
60S ribosomal protein L34	gi 436030	3	22,5	7,54E-24	1,24	3	22,5	2,00E-11	1,54
vacuolar H ⁺ -ATPase B subunit	gi 6715512	18	40,1	1,66E-224	1,48	19	43,2	3,88E-195	1,84
unnamed protein product	gi 219725176	12	41,1	1,91E-105	1,48	13	46,2	1,81E-153	1,92
histone H4	gi 117307343	5	50,5	2,78E-30	1,5	5	50,5	1,34E-40	1,41
Glycine-rich protein 2	gi 121631	2	17,8	6,26E-85	1,51	2	17,8	1,98E-30	0,81
voltage-dependent anion channel	gi 161788872	3	33,3	1,51E-97	1,53	4	35,9	3,07E-123	1,18
transketolase	gi 111162653	2	58,3	9,50E-169	1,56	3	55,3	1,22E-179	1,48
thioredoxin peroxidase	gi 21912927	9	35,1	7,05E-198	1,61	8	35,1	1,08E-111	1,03
ubiquitin extension protein	gi 2894306	9	46,8	8,54E-119	1,62	9	46,8	9,49E-140	1,3
phospholipase D	gi 2281951	12	16,6	7,77E-66	1,65	11	15,8	2,17E-125	1,25
aspartate aminotransferase	gi 38453854	3	13,2	6,11E-09	1,67	4	18,1	1,80E-06	1,35
NiSarl protein	gi 1549222	6	45,6	1,12E-88	1,67	5	34,2	2,29E-56	1,22
unnamed protein product	gi 219892821	5	14,1	1,67E-15	1,67	9	25,7	8,81E-53	0,91
putative	gi 623592	5	26,5	3,00E-15	1,77	4	24,5	2,07E-13	0,86
ribosomal protein L3A	gi 37625023	10	20,1	8,59E-20	1,8	2	20,6	1,52E-17	0,78
elongation factor 2	gi 10798636	5	53,1	5,60E-123	1,88	6	65,3	9,34E-142	0,69
fructokinase	gi 23978579	2	14,2	5,54E-07	1,98	3	21,9	6,19E-16	1,15
Rieske FeS	gi 19995	4	22,8	4,72E-80	2,01	5	28,9	1,30E-101	0,92
small GTPase Rab2	gi 16755592	7	37,9	1,28E-61	2,03	5	26,5	9,54E-33	1,46
malate dehydrogenase	gi 10798652	13	34,6	5,52E-161	2,04	13	38,6	6,72E-183	1,38
unnamed protein product	gi 14135052	2	2,5	3,75E-07	2,08	3	3,5	2,75E-10	1,25
putative	gi 623586	3	12,5	4,59E-05	2,19	7	29,3	3,70E-15	0,78
cytosolic aconitase	gi 11066033	21	26,8	1,26E-238	2,2	22	27,2	3,83E-214	1,35
putative PIP	gi 12006847	2	14,7	2,87E-08	2,23	2	14,7	0,0009613	0,75

Proteinname	Accession No.	Forward labeling				Reverse labeling			
		Unique peptides	Sequence Coverage [%]	PEP	Ratio ph ⁺ /ph ⁻	Unique peptides	Sequence Coverage [%]	PEP	Ratio ph ⁺ /ph ⁻
unnamed protein product	gi 219799074	3	6,9	9,06E-19	2,25	7	14,7	7,53E-44	1,36
unnamed protein product	gi 114212265	2	8,9	6,53E-16	2,43	2	6,8	7,42E-08	0,99
lipoxigenase	gi 32454712	20	20,3	6,34E-126	2,44	21	20,4	8,17E-88	1,4
unnamed protein product	gi 219906855	2	32,7	8,20E-53	2,49	2	45,5	7,36E-102	0,97
isocitrate dehydrogenase (NADP ⁺)	gi 1617198	5	16,9	7,62E-87	2,55	7	23,1	3,49E-97	0,64
Pyruvate kinase, cytosolic isozyme	gi 2497543	6	14,8	1,46E-49	2,55	2	3,5	0,0002145	0,97
benzoquinone reductase	gi 257222622	9	56,6	2,27E-159	2,64	7	49,7	2,86E-104	1,04
putative PR-10 type pathogenesis-related protein	gi 311893231	2	11,6	0,0012686	2,64	2	11,6	0,0003533	0,3
ATP-synthase	gi 111162629	7	58	2,75E-129	2,73	9	71,8	6,81E-114	1,03
putative serine/threonine protein kinase	gi 3811293	2	4,1	0,0033081	2,8	2	8,8	4,02E-06	1,23
chloroplast photosystem II 22 kDa component	gi 84620802	2	41,6	8,58E-193	2,82	2	35	9,57E-145	1,47
putative mitochondrial malate dehydrogenase	gi 48375044	5	26,4	6,38E-280	3,11	8	42,9	3,63E-166	0,89
unnamed protein product	gi 257669866	5	35	7,59E-52	3,13	4	30	1,02E-12	1,2
putative beta4 proteasome subunit	gi 14594929	3	20,9	1,11E-09	3,16	2	12,7	1,32E-09	1,01
ALY protein	gi 94466659	2	6,9	2,27E-09	3,3	2	8,7	1,95E-19	1,09
chloroplast chlorophyll a-b binding protein	gi 48375048	4	35,7	4,84E-62	8,95	4	35,7	7,69E-35	0,6

Tab.A7. Datensatz zur Bestimmung der Labelingeffizienz in den einzelnen Versuchen.

Versuch	Proben bzw. Slices	Label	Injektionsvolumen [μL]	massenspektrometrische Methode
Bestimmung dynamischer Bereich	25 μg BSA- Ansatz	Light	8 μL	Top10- CID
	25 μg BSA- Ansatz	Heavy	8 μL	Top10- CID
	10 μg BSA- Ansatz	Light	8 μL	Top10- CID
	10 μg BSA- Ansatz	Heavy	8 μL	Top10- CID
Schwellenwertbestimmung	2; 3; 12	Light	4 μL	Top10- CID
	2; 3; 12	Heavy	4 μL	Top10- CID
Forward Labeling	1; 5; 9; 13	Light	4 μL	Top10- CID
	1; 5; 9; 13	Heavy	4 μL	Top10- CID
Reverse Labeling	1; 5; 9; 13	Light	4 μL	Top10- CID
	1; 5; 9; 13	Heavy	4 μL	Top10- CID

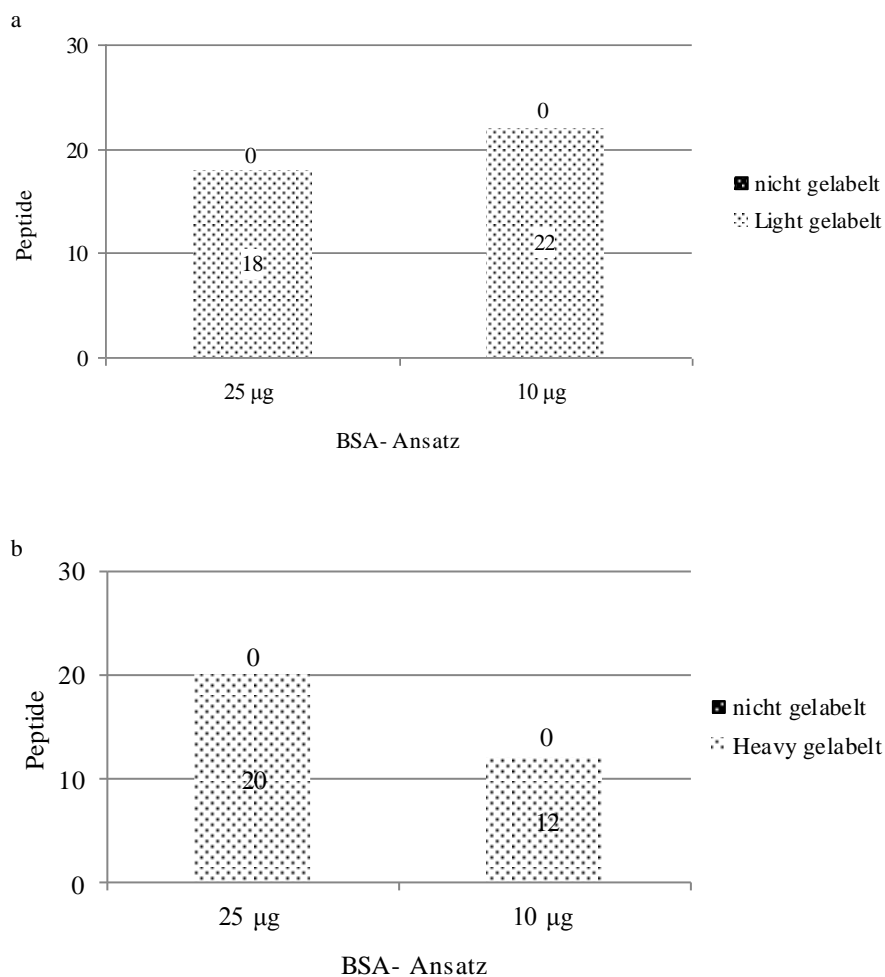


Abb.A1. Labelingeffizienz des Dimethyl Labelings im Versuch zur Ermittlung des dynamischen Bereiches des Labelings. Ein tryptischer BSA-Verdau wurde aufgeteilt und verschiedene Mengen entweder Light oder Heavy gelabelt. **(a)** Light gelabelte BSA- Ansätze **(b)** Heavy gelabelte BSA-Ansätze.

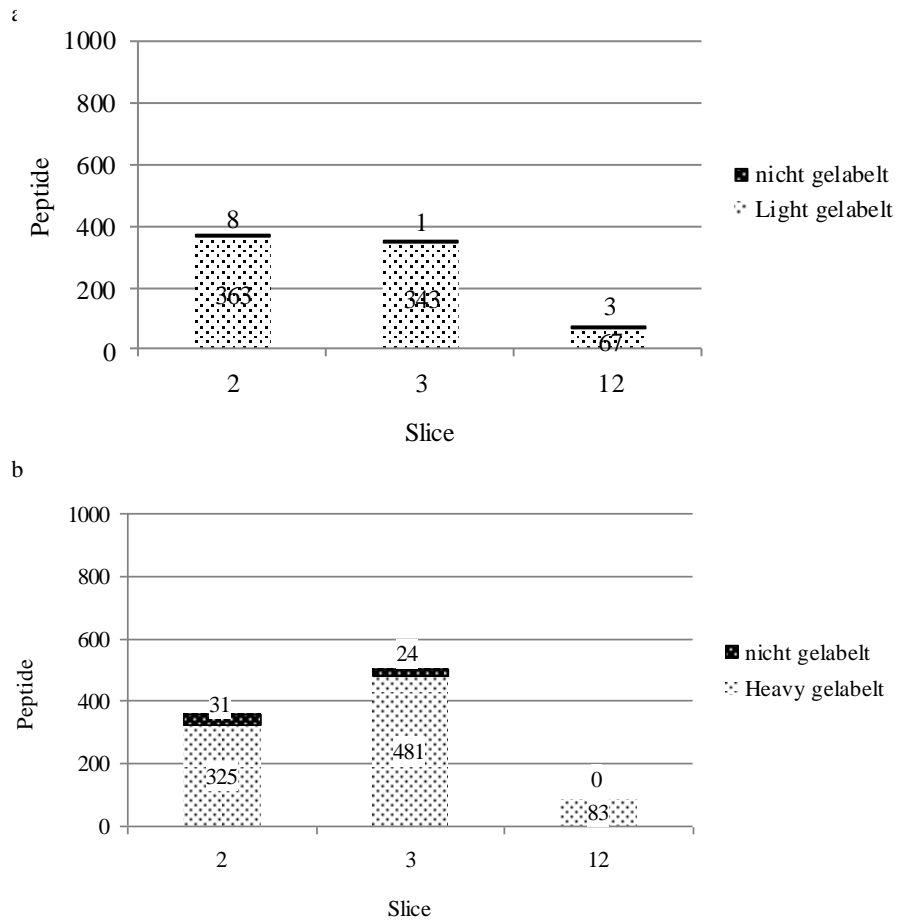


Abb.A2. Labelingeffizienz des Dimethyl Labelings im Versuch zur Ermittlung der Schwellenwerte für eine signifikante Proteinregulation. Aliquote der gelabelten Peptide aus drei Slices sind massenspektrometrisch vermessen worden und anschließend die Anzahl der gelabelten und nicht-gelabelten identifizierten Peptide bestimmt worden. **(a)** Light gelabelte Slices **(b)** Heavy gelabelte Slices.

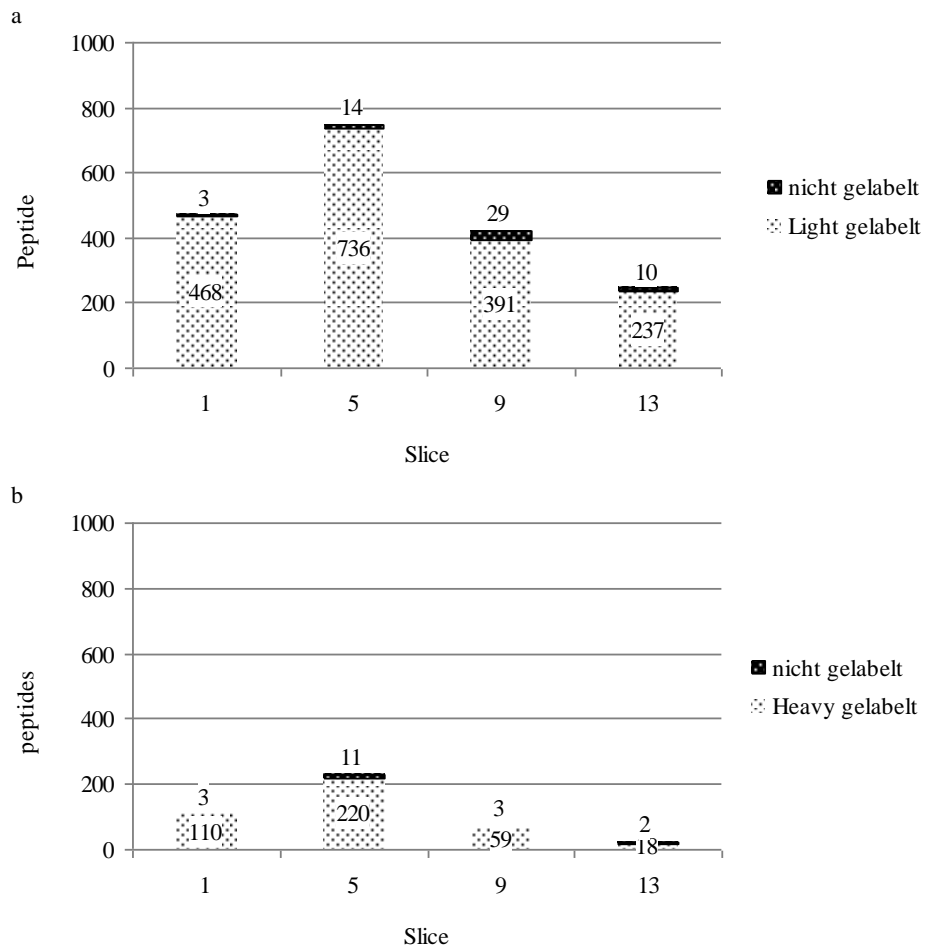


Abb.A3. Labelingeffizienz des Dimethyl Labelings im Versuch zur Ermittlung der in Folge einer Phytoplasmainfektion differentiell exprimierten pflanzlichen Proteine – Forward Labeling. Aliquote der gelabelten Peptide im Forward Labeling aus vier Slices sind massenspektrometrisch vermessen worden und anschließend die Anzahl der gelabelten und nicht-gelabelten identifizierten Peptide bestimmt worden. **(a)** Light gelabelte Slices der Phytoplasma-negativen Pflanzen **(b)** Heavy gelabelte Slices der Phytoplasma-positiven Pflanzen.

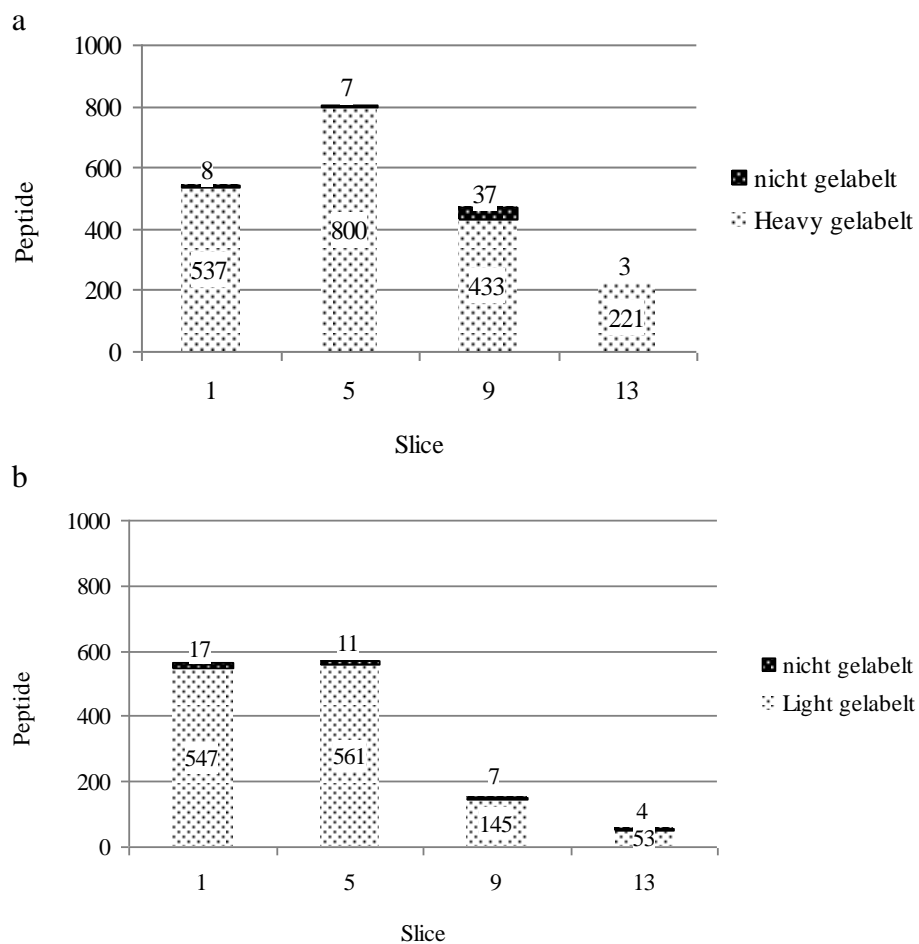


Abb.A4. Labelingeffizienz des Dimethyl Labelings im Versuch zur Ermittlung der in Folge einer Phytoplasmainfektion differentiell exprimierten pflanzlichen Proteine – Reverse Labeling. Aliquote der gelabelten Peptide im Reverse Labeling aus vier Slices sind massenspektrometrisch vermessen worden und anschließend die Anzahl der gelabelten und nicht-gelabelten identifizierten Peptide bestimmt worden. **(a)** Heavy gelabelte Slices der Phytoplasma-negativen Pflanzen **(b)** Light gelabelte Slices der Phytoplasma-positiven Pflanzen.

Danksagung

Vielen Dank an...

...Professor Dr.-Ing. Roza Maria Kamp für die Betreuung während der Bearbeitungszeit.

...Dr. rer. nat. Sascha Sauer für die Bereitstellung des Themas und die Unterstützung, die er meiner Arbeit zukommen ließ. Außerdem möchte ich mich bedanken für die Ermöglichung der Teilnahme am „International Phytoplastmologist Working Group Meeting (IPWG)“ in Neustadt a. d. Weinstraße im September 2011.

...Dr. rer. nat. Michael Kube für die wissenschaftliche Anleitung, die vielen Ratschläge, das Korrekturlesen meiner Arbeit und die laute Musik im Labor.

...M. Sc. Anja Freiwald für die Anleitung und Unterstützung in der Massenspektrometrie sowie für das stets offene Ohr bei aufgetretenen Fragen und nicht zuletzt für das Korrekturlesen meiner Arbeit.

...Prof. Dr. Erich Seemüller für die Bereitstellung der Pflanzen.

...die gesamte „Nutrigenomics and Gene Regulation“-Arbeitsgruppe am Max Planck Institut für molekulare Genetik Berlin für das kollegiale Miteinander.

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig verfasst, und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe. Diese Arbeit ist in gleicher oder ähnlicher Form keiner anderen Prüfungsbehörde eingereicht worden.

Weiterhin erkläre ich, dass ich mich nicht an einer anderen Hochschule im Geltungsbereich des Hochschulrahmengesetzes einer Masterprüfung gleicher Fachrichtung befinde.

Es trifft nicht zu, dass ich an einer Hochschule im Geltungsbereich des Hochschulrahmengesetzes eine Masterprüfung gleicher Fachrichtung endgültig nicht bestanden habe.

Berlin, 03.11.2011