

**Nutzung von „Omics“-Daten zur Analyse der Interaktion
zwischen Kartoffel und Kartoffelkrebs**

Von der Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover

zur Erlangung des Grades
Doktorin der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

genehmigte Dissertation
von
Friederike Chilla, geb. Busse, M.Sc.

2018

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

Korreferent: Prof. Dr. rer. nat. Helge Küster

Tag der Promotion: 11.07.2018

Zusammenfassung

Die Kartoffel ist ein Wirt für eine Vielzahl von Erregern. Ein bedeutender Vertreter stellt *Synchytrium endobioticum* dar, der Erreger des Kartoffelkrebses. Bei diesem Pathogen handelt es sich aufgrund seiner schweren Bekämpfbarkeit um einen Quarantäneschaderreger. Eine chemische Bekämpfung des Erregers ist nicht möglich, hauptsächlich der Anbau resistenter Sorten kann zu einer Eindämmung der Krankheit führen. *S. endobioticum* ist ein obligat biotropher, bodenbürtiger Pilz der Ordnung Chytridiales. Er zeichnet sich durch die Bildung von Dauersporen aus, welche unter optimalen Bedingungen bis zu 40 Jahre im Boden überdauern und eine erneute Infektion hervorrufen können. *S. endobioticum* infiziert die unterirdischen Pflanzenteile der Kartoffel (außer Wurzeln) durch Zoosporen, die durch Bewegungen im Bodenwasser meristematische Gewebe erreichen und befallen. Es kommt zur Ausbildung von tumorähnlichen Wucherungen. Es sind verschiedene Pathotypen des Erregers beschrieben, von welchen die Pathotypen 1, 2, 6 und 18 die bedeutendsten darstellen. Ein kleiner Teil zugelassener deutscher Kartoffelsorten ist gegen alle vier Pathotypen resistent. Das Resistenzvermittelnde Gen ist bisher nicht bekannt, ebenso liegen kaum Informationen zum Befallsmechanismus auf molekularer Ebene vor.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Interaktion von *S. endobioticum* mit resistenten und anfälligen Kartoffelsorten auf Basis von *shotgun* Proteomdaten zu charakterisieren. Die Proteomanalyse lieferte einen Einblick in die Proteine der Pathogenabwehr in der inkompatiblen Interaktion. Hierbei handelte es sich um PR-2, sowie andere Glucanasen. In der kompatiblen Interaktion waren Proteine des Zellzyklus erhöht vertreten.

Ebenso sollten erste Sequenzen des Erregers anhand von Transkriptom- und Genomdaten identifiziert und bioinformatisch analysiert werden. Es war möglich, eine Sequenzsammlung von insgesamt 8.866 ESTs und 423 genomischen Contigs zu generieren. Aus dieser Sequenzsammlung wurden 66 Effektorkandidaten identifiziert. Ebenso wurden 45 Effektorkandidaten aus einer Sequenzsammlung ohne Homologien zu bekannten Taxa bestimmt. Sequenzen wurden als Effektorkandidat gewertet, wenn sie unter 300 Aminosäuren aufwiesen und ein Signalpeptid enthielten, sowie am sekretorischen Weg der Zelle beteiligt waren. Eine Gruppe von 14 Effektorkandidaten beider Gruppen wurde in transienten Expressionsanalysen mittels Agroinfiltration in Tabak mit Hilfe einer nachfolgenden TRV-Infektion funktional untersucht. Für vier Kandidaten zeigte sich eine reduzierte Pathogenabwehr der infiltrierten Blätter. Im Rahmen der Arbeit war es erstmals möglich, Sequenzen des Erregers zu charakterisieren, sowie Effektorkandidaten zu identifizieren. Erstmals wurde eine Proteomanalyse zur Analyse des Kartoffelkrebses durchgeführt.

Schlagerworte: Kartoffelkrebs, *shotgun* Proteomdaten, Effektorkandidaten

Abstract

Potato is a host for many pathogens. One of them is *Synchytrium endobioticum*, the causal agent of potato wart disease. This pathogen is a quarantine pest, because of its aggressiveness and the lack of chemical control. The only way to restrict its distribution is the cultivation of resistant cultivars. *S. endobioticum* is an obligate biotrophic soil born fungus. It belongs to the order Chytridiales. The fungus produces resting spores, which are able to survive in soil under favorable conditions up to 40 years. After that time a new infection can still occur. *Synchytrium* infects the below ground parts of the potato plant (except the roots) by zoospores, which are able to overcome short distances through movements in soil water. The infection of meristematic tissues leads to the formation of tumor-like warts as typical disease symptoms. Different pathotypes occur, from which the pathotypes 1, 2, 6, and 18 are the most relevant and aggressive ones. Only a small number of German cultivars are resistant to all four pathotypes and only little information are available for the pathogenesis, specifically on the molecular level.

The aim of the present work was to characterize the interaction of *Synchytrium endobioticum* with resistant and susceptible potato cultivars based on shotgun proteomics. This analysis reveals proteins being active during resistance reactions in the incompatible interaction. These were PR-2 as well as other glucanases. In the compatible interaction proteins associated with the cell cycle were higher abundant.

Another aim was the identification of sequences from the fungus based on transcriptomic and genomic data. It was possible to identify 8,866 ESTs and 423 genomic contigs for the first time. Out of this collection 66 putative effector candidates were identified based on sequence characteristics. They should be less than 300 amino acids in size, have a predicted signal peptide and should be associated with the secretory pathway of the cell. Another set of 45 effector candidates were identified from a sequence collection without any sequence homology to known taxa. A subset of 14 effector candidates was analyzed in transient agroinfiltrations in tobacco. Their involvement in the reduction of a resistance reaction was checked by a subsequent TRV infiltration. Four candidates showed a reduction of the defense response of the tobacco leaves against TRV. With this thesis, it was possible to identify first sequences of *S. endobioticum*, as well as first effector candidates. And it was the first time that a proteome analysis of potato wart disease was carried out.

Keywords: Potato wart disease, shotgun proteomic, effector candidates

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung.....	i
Abstract.....	ii
Abbildungsverzeichnis.....	ix
Tabellenverzeichnis.....	xi
Abkürzungsverzeichnis.....	xii
1. Einleitung.....	- 1 -
1.1. <i>Solanum tuberosum</i> L.	- 1 -
1.1.1. Taxonomie, Biologie und Genetik.....	- 1 -
1.1.2. Die Kartoffelzüchtung.....	- 2 -
1.1.3. Kartoffelproduktion - Wirtschaftliche Bedeutung der Kartoffel.....	- 3 -
1.1.4. Relevante Krankheiten und Schaderreger der Kartoffel.....	- 4 -
1.2. <i>Synchytrium endobioticum</i> – der Erreger des Kartoffelkrebses.....	- 4 -
1.2.1. Kartoffelkrebs – Symptome und Auswirkungen.....	- 5 -
1.2.2. Taxonomie und Biologie von <i>S. endobioticum</i>	- 6 -
1.2.3. Geschichte des Kartoffelkrebses.....	- 7 -
1.2.4. Resistenz gegen <i>S. endobioticum</i> und die Möglichkeit der Eindämmung des Erregers.....	- 8 -
1.2.5. Resistenztestung von Kartoffeln.....	- 9 -
1.3. Wirt-Pathogen-Interaktionen: Das pflanzliche Immunsystem.....	- 11 -
1.3.1. <i>Pathogen associated molecular pattern (PAMP) recognition</i> in der PTI.....	- 13 -
1.3.2. <i>Effector-triggered immunity (ETI)</i>	- 14 -
1.3.3. Rolle und Eigenschaften von Effektorproteinen in der Wirt-Pathogen-Interaktion.....	- 17 -
1.4. „Omics“ in der Kartoffelforschung.....	- 20 -
1.4.1. <i>Genomics</i> – Genanalysen an Kartoffeln.....	- 21 -
1.4.2. <i>Transcriptomics</i> – Expressionsanalysen an Kartoffeln.....	- 21 -
1.4.3. <i>Proteomics</i> – Analysen der Proteinzusammensetzung in Kartoffeln.....	- 23 -
1.5. Zielsetzung der Arbeit.....	- 24 -
2. Material und Methoden.....	- 27 -
2.1. Probenmaterial: Pilz, Pflanzen, Bakterien.....	- 27 -
2.1.1. <i>Synchytrium endobioticum</i>	- 27 -
2.1.2. <i>Solanum tuberosum</i> L.	- 27 -
2.1.3. <i>Nicotiana benthamiana</i>	- 28 -
2.1.4. <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	- 28 -
2.1.5. <i>Escherichia coli (E. coli)</i>	- 28 -
2.2. Vektoren.....	- 28 -

2.2.1.	Expressionsvektor zur Effektoranalyse	- 28 -
2.2.2.	<i>Tobacco rattle virus</i> (TRV)	- 28 -
2.3.	Publizierte Sequenzdaten – Referenzdatensätze zur Sequenzanalyse.....	- 29 -
2.3.1.	Nukleinsäuresequenzen.....	- 29 -
2.3.1.1	<i>Solanum tuberosum</i> : Transkriptom- und Genomdaten.....	- 29 -
2.3.1.2	<i>Solanum lycopersicum</i> – Genomsequenzen	- 29 -
2.3.1.3	<i>Batrachochytrium dendrobatidis</i> – Genom- und Transkriptomdaten	- 29 -
2.3.2.	Aminosäuresequenzen	- 29 -
2.3.2.1	<i>Solanum tuberosum</i> - Sequenzsammlung zur Proteomanalyse	- 29 -
2.3.2.2	<i>Batrachochytrium dendrobatidis</i> – Proteinsequenzen	- 30 -
2.4.	Sequenzierungen - Transkriptomdaten aus RNAseq-Experimenten	- 30 -
2.4.1.	Transkriptomdaten aus einer anfälligen, mit Pathotyp 18 infizierten Kartoffelsorte	- 30 -
2.4.2.	Transkriptomdaten aus einer mit <i>S. endobioticum</i> Pathotyp 1 inokulierten tetraploiden Nachkommenschaft.....	- 30 -
2.5.	Molekularbiologische Methoden.....	- 31 -
2.5.1.	Isolierung von Nukleinsäuren	- 31 -
2.5.1.1	Extraktion von Ribonukleinsäuren (RNA) aus Pflanzengeweben	- 31 -
2.5.1.2	Aufreinigung von Desoxyribonukleinsäuren (DNA) aus Pflanzenmaterial	- 31 -
2.5.1.3	Plasmidaufreinigung	- 31 -
2.5.2.	Polymerasekettenreaktion (PCR).....	- 32 -
2.5.2.1	Primerdesign	- 32 -
2.5.2.2	Standardprotokoll der Polymerasekettenreaktion.....	- 32 -
2.5.2.3	Effektoramplifikation für eine gerichtete In-Fusion® Klonierung von PCR-Fragmenten... -	33 -
2.5.2.4	Kolonie-PCR zum Nachweis klonierter Fragmente	- 33 -
2.5.3.	Agarosegelelektrophorese.....	- 34 -
2.5.4.	Aufreinigung von PCR-Fragmenten aus Agarosegelen	- 34 -
2.5.5.	Klonierung von PCR-Fragmenten mittels In-Fusion® HD Cloning	- 34 -
2.5.6.	Reverse Transkription	- 35 -
2.5.7.	Sequenzierungen zur Kontrolle klonierter Fragmente	- 35 -
2.5.8.	Proteomik.....	- 35 -
2.5.8.1	Isolierung von Gesamtprotein für <i>shotgun Proteomics</i>	- 36 -
2.5.8.2	Probenvorbereitung Massenspektrometrie und Flüssigkeitschromatographie.....	- 36 -
2.5.8.3	Markierungsfreie quantitative <i>shotgun</i> Massenspektrometrie	- 36 -
2.5.8.4	Datenverarbeitung Proteinidentifikation	- 36 -
2.6.	Bakterientransformation und -kulturen	- 37 -
2.6.1.	Bakterientransformation	- 37 -
2.6.1.1	Transformation von Bakterien zur Plasmidvermehrung mittels Hitzeschock	- 37 -

2.6.1.2	Transformation von <i>Agrobacterium tumefaciens</i> durch Elektroporation	- 37 -
2.6.2.	Bakterienkultur auf Festmedium	- 37 -
2.6.3.	Flüssigkulturen von Bakterien.....	- 38 -
2.6.3.1	Übernachtkulturen von <i>E. coli</i> zur Plasmidaufreinigung	- 38 -
2.6.3.2	Kultur von <i>E. coli</i> zur mittelfristigen Lagerung.....	- 38 -
2.6.3.3	Bakterienkultur von <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	- 38 -
2.6.4.	Glycerinkulturen zur Langzeitlagerung von Bakterien.....	- 38 -
2.7.	Funktionsanalysen durch transiente Expressionsstudien.....	- 39 -
2.7.1.	Infiltration von <i>A. tumefaciens</i> in Blattgewebe zur transienten Genexpression.....	- 39 -
2.7.2.	Visualisierung der Reportergenexpression in transienten Transformationen	- 39 -
2.8.	Bioinformatische Sequenzanalysen	- 40 -
2.8.1.	Transkriptomanalyse - RNAseq-Analyse mittels CLC Genomic Workbench 7.5/ 9.5.....	- 40 -
2.8.2.	<i>de novo</i> Assemblierung von Sequenzdaten	- 40 -
2.8.3.	Abschätzung der Vollständigkeit von Transkriptomdaten mittels BUSCO	- 40 -
2.8.4.	Annotation von Sequenzdaten mittels Blast2GO	- 40 -
2.8.5.	Teilen von Sequenzdatensätzen mittels Splitter	- 40 -
2.9.	Bioinformatische Verfahren zur Vorhersage von Effektorproteinen	- 41 -
2.9.1.	Translation der cDNA-Sequenzen	- 41 -
2.9.2.	TargetP - Vorhersage der subzellulären Lokalisation von Proteinen.....	- 41 -
2.9.3.	SignalP – Vorhersage von Signalpeptiden in Aminosäuresequenzen.....	- 41 -
2.9.4.	Phobius – Vorhersage von Signalpeptiden in Aminosäuresequenzen	- 42 -
2.9.5.	DISULFIND - Vorhersage von Disulfidbrücken in Proteinen.....	- 42 -
2.9.6.	PS_Scan – Identifikation von Proteindomänen	- 42 -
2.9.7.	EffectorP – Bestimmung von Effektoren in Sekretomen	- 42 -
2.10.	Statistische Verfahren.....	- 42 -
2.10.1.	Testung des Effekts der transienten Effektorexpression auf die TRV-Expression.....	- 42 -
2.10.2.	Hauptkomponentenanalyse	- 43 -
2.10.3.	Gene Ontology Enrichment mittels AgriGO.....	- 43 -
2.11.	Datenvisualisierung.....	- 43 -
2.11.1.	Datenvisualisierung mittels Venny 2.1	- 43 -
2.11.2.	Visualisierung des <i>GO-Enrichments</i>	- 44 -
3.	Ergebnisse	- 45 -
3.1.	Identifizierung erster Sequenzen von <i>Synchytrium endobioticum</i>	- 45 -
3.1.1.	<i>Whole-genome</i> und <i>transcriptome shotgun</i> Sequenzierungen.....	- 45 -
3.1.2.	Erste Sequenzen von <i>S. endobioticum</i> basierend auf nicht normalisierten Transkriptom- und Genomdaten	- 47 -

3.1.3.	Analyse der normalisierten Transkriptomdaten zur Identifikation weiterer Sequenzen von <i>S. endobioticum</i>	- 50 -
3.1.4.	Abschätzung der Transkriptomabdeckung von <i>S. endobioticum</i>	- 52 -
3.2.	Effektorkandidaten von <i>Synchytrium endobioticum</i>	- 52 -
3.2.1.	Identifikation von Effektorproteinen von <i>S. endobioticum</i> Pathotyp 18.....	- 52 -
3.2.2.	Identifizierung von Effektorkandidaten aus einem Sequenzpool ohne Sequenz- übereinstimmungen zu bekannten Taxa	- 60 -
3.3.	Bioinformatischer und molekularbiologischer Nachweis von Effektorkandidaten in verschiedenen Pathotypen von <i>S. endobioticum</i>	- 62 -
3.4.	Klonierung von Effektorkandidaten.....	- 66 -
3.5.	Funktionsanalyse der Effektorkandidaten.....	- 69 -
3.6.	Proteomanalyse der Interaktion zwischen <i>S. endobioticum</i> und seinem Wirt.....	- 79 -
3.6.1.	Differentiell abundante Wirtsproteine in der Interaktion von <i>S. endobioticum</i> Pathotyp 1 und Kartoffel.....	- 79 -
3.6.2.	Identifikation von Proteinen aus <i>S. endobioticum</i> mittels <i>shotgun</i> Proteomic.....	- 93 -
4.	Diskussion	- 95 -
4.1.	Charakterisierung von cDNA Sequenzen von <i>Synchytrium endobioticum</i>	- 95 -
4.2.	Effektorkandidaten von <i>S. endobioticum</i>	- 98 -
4.2.1.	Bioinformatische Vorhersage von Effektorproteinen.....	- 98 -
4.2.2.	Funktionsanalyse der Effektorkandidaten.....	- 104 -
4.2.3.	Nutzungsmöglichkeiten der Effektorkandidaten in der Erforschung und Eindämmung des Kartoffelkrebses	- 109 -
4.3.	<i>Shotgun Proteomics</i> in der Kartoffelkrebsforschung.....	- 112 -
4.3.1.	Analyse der Interaktion von <i>S. endobioticum</i> und Kartoffel auf der Wirtsseite.....	- 112 -
4.3.1.1	Analyse der Resistenzreaktion von Kartoffel gegen <i>S. endobioticum</i>	- 114 -
4.3.1.2	Analyse der kompatiblen Interaktion zwischen <i>S. endobioticum</i> und Kartoffel.....	- 120 -
4.3.2.	<i>S. endobioticum</i> – Möglichkeiten und Limitierungen in der Proteinidentifikation	- 121 -
4.4.	„Omics“ – Chancen und Grenzen in der Charakterisierung des Kartoffelkrebses.....	- 122 -
5.	Fazit und Ausblick	- 126 -
6.	Quellenverzeichnis.....	- 128 -
6.1.	Literaturverzeichnis	- 128 -
6.2.	Onlineressourcen	- 141 -
A	Anhang.....	- 143 -
A 1.	Medien zur Bakterienkultur.....	- 143 -
A 1.1.	Yeast Extract Peptone (YEP)-Medium zur Kultur von <i>A. tumefaciens</i>	- 143 -
A 1.2.	Lysogeny Broth (LB)-Medium zur Kultur von <i>E. coli</i>	- 143 -
A 1.3.	FB-Medium zur mittelfristigen Lagerung bei -20 °C	- 144 -
A 2.	Puffer für molekularbiologische Anwendungen	- 144 -

A 2.1.	Willams-Puffer für PCR-Reaktionen.....	- 144 -
A 3.	Proteinanalysen	- 145 -
A 3.1.	Zusammensetzung des Sammelgels mit 4 % [v/v] Acrylamid.....	- 145 -
A 3.2.	Zusammensetzung des Trenngels mit 14 % [v/v] Acrylamid	- 145 -
A 3.3.	Zusammensetzung des Laufpuffers	- 145 -
A 3.4.	Zusammensetzung des Probenpuffers	- 145 -
A 4.	Primersequenzen	- 146 -
A 4.1.	Primersequenzen zur Überprüfung der cDNA-Synthese mittels PCR.....	- 146 -
A 4.2.	Primersequenzen zum Nachweis persistierender Agrobakterien in Blattgeweben	- 146 -
A 4.3.	Amplifikation von Effektorkandidaten zur In-Fusion®-Klonierung	- 147 -
A 4.4.	Primer zur Verifizierung der Contigs von <i>S. endobioticum</i>	- 148 -
A 4.5.	Nachweis von Effektorsequenzen in verschiedenen Pathotypen von <i>S. endobioticum</i> ..	- 154 -
A 5.	Vektorkarte des Expressionsvektors pRedU10-35S.....	- 158 -
A 6.	Spektren der Reportergene DsRed und GFP.....	- 158 -
A 7.	Bioinformatische Vorhersage von Effektorkandidaten	- 159 -
A 7.1.	Vorhersage der Zelllokalisierung mittels TargetP	- 159 -
A 7.2.	Vorhersage von Signalpeptiden (SignalP/ Phobius), Disulfidbrücken (DISULFIND) und der Wirksamkeit als Effektor (EffectorP)	- 161 -
A 7.3.	Identifizierte Proteine von <i>S. endobioticum</i> aus der Proteomanalyse infizierter Kartoffelknollen	- 163 -
D	Dateien elektronisch auf Datenträger	- 165 -
D 1.	Dateien.....	- 165 -
D 1.1.	Effektorsequenzen – Nukleinsäuresequenzen	- 165 -
D 1.1.1.	Gesamtsequenz der Effektoren aus dem Sequenzpool von <i>S. endobioticum</i>	- 165 -
D 1.1.2.	Effektorkandidaten aus dem Sequenzpool ohne Homologien zu bekannten Taxa	- 165 -
D 1.1.3.	Klonierte Effektoren.....	- 165 -
D 1.2.	Effektorsequenzen – Aminosäuresequenzen	- 165 -
D 1.2.1.	AS-Sequenzen der Effektoren aus dem Sequenzpool von <i>S. endobioticum</i>	- 165 -
D 1.2.2.	AS-Sequenzen Effektoren aus dem Sequenzpool ohne Homologien zu bekannten Taxa-	- 165 -
D 1.3.	Nukleinsäuresequenzen von <i>S. endobioticum</i> aus einer nicht-normalisierten und einer normalisierten cDNA-Bibliothek inokulierter Kartoffelknollen	- 166 -
D 1.3.1.	Nukleinsäuresequenzen von <i>S. endobioticum</i> aus der Sequenzierung einer nicht-normalisierten cDNA-Bibliothek	- 166 -
D 1.3.2.	Nukleinsäuresequenzen von <i>S. endobioticum</i> aus der Sequenzierung einer normalisierten cDNA-Bibliothek	- 166 -
D 1.4.	Vektorsequenzen	- 166 -
D 1.4.1.	Sequenz des Expressionsvektors pRedU10-35S	- 166 -
D 1.4.2.	Sequenzen der Bestandteile von TRV	- 166 -

Lebenslauf	- 167 -
Publikationen & Posterbeiträge	- 168 -
Danksagung	- 169 -
E Elektronischer Anhang	- E1 -
E 1. Molekularbiologischer Effektnachweis in verschiedenen Pathotypen von <i>S. endobioticum</i>	- E1 -
E 2. Statistische Auswertung des Einflusses der Effektorexpression auf die Expression und Verteilung von TRV	- E5 -
E 2.1 Zusammenfassung der Ergebnisse der Auswertung im Generalisierten Linearen Modell	- E5 -
E 2.2 Ergebnis der Devianzanalyse	- E6 -
E 2.3 Paarweise Mittelwertvergleiche der Proportionen nach Rücktransformation der Daten	- E7 -
E 3. Signifikant verschieden Abundante Proteine der paarweisen Vergleiche	- E8 -
E 3.1 Zusammenfassung der signifikant verschieden abundanten Proteine des Vergleichs KK gegen TK.....	- E8 -
E 3.2 Auflistung der signifikant verschieden abundanten Proteine des paarweisen Vergleichs von KK gegen KI	- E25 -
E 3.3 Zusammenfassung der signifikant verschieden abundanten Proteine des Vergleichs TI gegen TK.....	- E35 -
E 3.4 Zusammenfassung der signifikant verschieden abundanten Proteine des Vergleichs KI gegen TI	- E43 -
E 4. Code zur statistischen Auswertung in R	- E79 -
E 4.1 Testung des Effekts der transienten Effektorexpression auf die TRV-Expression	- E79 -
E 4.2 Hauptkomponentenanalyse	- E81 -

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Übersichtsschema über die genetischen Ressourcen der Kartoffelzüchtung, sowie die Evolution der modernen Kartoffelsorten (BRADSHAW, 2007c).	- 2 -
Abbildung 2:	Exemplarische Darstellung von Krankheitssymptomen nach einer Infektion mit <i>S. endobioticum</i> (STACHEWICZ, 2002).	- 5 -
Abbildung 3:	Globale Verbreitung von Kartoffelkrebs (OBIDIEGWU <i>et al.</i> , 2014).	- 7 -
Abbildung 4:	Übersicht über die Schritte der Glynne-Lemmerzahl-Methode.....	- 10 -
Abbildung 5:	Darstellung verschiedener Phänotypen aus der Interaktion von <i>S. endobioticum</i> mit Kartoffel entsprechend der Klassifizierung in der Resistenztestung (BALLVORA <i>et al.</i> , 2011).	- 10 -
Abbildung 6:	Schematische Übersicht des pflanzlichen Immunsystems (DANGL <i>et al.</i> , 2013).	- 12 -
Abbildung 7:	Zickzack-Modell zur Veranschaulichung des quantitativen Outputs des pflanzlichen Immunsystems (JONES & DANGL, 2006).	- 13 -
Abbildung 8:	Schematische Darstellung der zellulären Signalwege in der <i>effector-triggered immunity</i> (ETI) (CUI <i>et al.</i> , 2014).	- 14 -
Abbildung 9:	Schematische Darstellung der NB-LRR-Proteine (BELKHADIR <i>et al.</i> , 2004).	- 15 -
Abbildung 10:	Schematische Darstellung der drei Wege der Effektorerkennung durch NB-LRRs (CAPLAN <i>et al.</i> , 2008).	- 15 -
Abbildung 11:	Modell der Aktivierung der Abwehrreaktion durch NB-LRRs (CAPLAN <i>et al.</i> , 2008).	- 16 -
Abbildung 12:	Exemplarische Darstellung von Kriterien zur Vorhersage von pilzlichen Effektoren und Beispiele für ihre Anwendung (SPERSCHNEIDER <i>et al.</i> , 2015).	- 19 -
Abbildung 13:	Exemplarische Darstellung infizierter Kartoffelknollen.....	- 27 -
Abbildung 14:	Pipeline zur bioinformatischen Vorhersage von Effektorkandidaten.	- 41 -
Abbildung 15:	Auftrennung der aufgereinigten RNA der Probe P18_C_RNA mittels Agarosegelelektrophorese.....	- 45 -
Abbildung 16:	Schematische Darstellung der Filterschritte über Read Mappings zur Identifikation von Sequenzen von <i>S. endobioticum</i> P18 aus Transkriptom- und Genomdaten.....	- 47 -
Abbildung 17:	Gelelektrophoretische Auftrennung der PCR-Produkte von 38 Primern der 96 EST von <i>Synchytrium endobioticum</i> zur Verifizierung der bioinformatisch bestimmten Contigs.	- 49 -
Abbildung 18:	Übersichtsschema zur Identifikation weiterer Sequenzen von <i>S. endobioticum</i> basierend auf Sequenzdaten eines normalisierten RNAseq-Experiments.	- 51 -
Abbildung 19:	Exemplarische Darstellung des Outputs der Sequenzanalyse mittels SignalP (A) und Phobius (B) für das Contig P18_C_Contig_24410_Frame_2.	- 53 -
Abbildung 20:	Vorhersage der Disulfidbrücken innerhalb der Proteinsequenz des Contigs P18_C_Contig_24410_Frame_2.	- 57 -
Abbildung 21:	Übersicht über die Verteilung der Disulfidbrücken zwischen den untersuchten Sequenzen.	- 57 -
Abbildung 22:	Sekretom und Effektorkandidaten der abgeleiteten Aminosäuresequenzen aus <i>S. endobioticum</i> P18.	- 58 -
Abbildung 23:	Sequenzanalyse der Effektorkandidaten des Sequenzpools von <i>S. endobioticum</i> P18 auf das Vorhandensein funktionaler Aminosäuremuster mittels PS_Scan.	- 59 -
Abbildung 24:	Sequenzanalyse der Effektorkandidaten des Sequenzpools ohne Sequenzähnlichkeiten zu anderen Proteinen auf das Vorhandensein funktionaler Aminosäuremuster mittels PS_Scan.....	- 62 -

Abbildung 25: Exemplarische Darstellung der aufgetrennten Fragmente nach Amplifikation mit den Primern P18C_21259 und P18C_11138 auf einem 1,5 %igen [w/v] Agarosegel.	65 -
Abbildung 26: Exemplarische Darstellung der aufgetrennten Fragmente nach unspezifischer Amplifikation mit den Primern P18C_9511 und P18C_21903.....	65 -
Abbildung 27: Exemplarische Darstellung der PCR-Amplifikate für eine Fragmentaufreinigung zur anschließenden Klonierung der Sequenzen.	67 -
Abbildung 28: Exemplarische Darstellung des Agarosegels der Kolonie-PCR des klonierten Fragments des Effektorkandidaten E1.	68 -
Abbildung 29: Test auf Expression der klonierten Fragmente in infiltrierten Tabakblättern.....	69 -
Abbildung 30: Detektion der Reportergenexpression in infiltrierten Tabakblättern 6 dpi nach Infiltration mit dem Effektorkandidat P18_12020 und 3 dpi nach TRV-Infiltration.-	70 -
Abbildung 31: Zusammenfassung der Auswertung der Infiltrationen mit den Effektorkandidaten P18_12020, P18_24410 und oH_11569 und TRV.....	71 -
Abbildung 32: Graphische Darstellung der statistischen Auswertung des Effekts der Effektorkandidatenexpression auf die Expression und Ausbreitung von TRV.	73 -
Abbildung 33: 95 %-Konfidenzintervalle zur Lageschätzung der Mittelwerte der Proportionen...	74 -
Abbildung 34: Zusammenfassung der Auswertung der Ko-Infiltrationen mit den Effektorkandidaten E1, E2, E8, E9, E10, E11, E12, E13, E14, E18 und E22 mit TRV. -	75 -
Abbildung 35: Graphische Darstellung der statistischen Auswertung des Effekts der Effektorkandidatenexpression auf die Expression und Ausbreitung von TRV.	77 -
Abbildung 36: 95 %-Konfidenzintervalle zur Lageschätzung der Mittelwerte der Proportionen...	78 -
Abbildung 37: Übersicht über die Anzahl identifizierter Proteine von <i>Solanum tuberosum</i> und <i>Synchytrium endobioticum</i>	80 -
Abbildung 38: Hauptkomponentenanalyse der Rohintensitäten der Massenspektrometrie aus der MaxQuant Analyse.	81 -
Abbildung 39: Volcano Plots zur Veranschaulichung der Proteinunterschiede in den paarweisen Vergleichen der MS-Daten.	82 -
Abbildung 40: Venn-Diagramm der signifikanten Proteine aus dem paarweisen Vergleich beider Genotypen.	83 -
Abbildung 41: Graphische Darstellung der signifikant überrepräsentierten <i>GO-Terms</i> in der Probe `Tomensa´ Kontrolle im Vergleich zur Probe `Tomensa´ inokuliert.....	84 -
Abbildung 42: Scatterplot des <i>GO-Enrichment</i> der Proteine mit einer höheren Abundanz in `Karolin´ inokuliert als in `Karolin´ Kontrolle.....	85 -
Abbildung 43: Graphische Darstellung der Interaktion zwischen <i>GO-Terms</i> der Proteingruppe mit höherer Abundanz in `Tomensa´ inokuliert als `Karolin´ inokuliert.....	87 -
Abbildung 44: Graphische Darstellung der Interaktion zwischen den überrepräsentierten <i>GO-Terms</i> der Probe KI im Vergleich zu TI.....	89 -
Abbildung 45: Top 5 der hoch- und herunterregulierten Proteine in den paarweisen Vergleichen 14 Tage nach Inokulation beziehungsweise Kontrollbehandlung.	91 -
Abbildung A 1: Schematische Darstellung des Expressionsvektors zur transienten Transformation von Tabakblättern.....	158 -
Abbildung A 2: Spektrale Eigenschaften der verwendeten Reportergene DsRed und GFP (https://home.ccr.cancer.gov).	158 -

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Zusammenfassung der Proben und der erzielten <i>Read</i> -Zahlen in der RNAseq-Analyse.....	- 30 -
Tabelle 2:	Zusammensetzung des Standardreaktionsmixes in der PCR.....	- 32 -
Tabelle 3:	Sequenzen der komplementären Überhänge für eine gerichtete In-Fusion® Klonierung von PCR-Fragmenten in den Expressionsvektor pRedU10-35S.	- 33 -
Tabelle 4:	Primersequenzen zur Überprüfung der Klonierung in den Vektor pRedU10-35S...	- 33 -
Tabelle 5:	Reaktionsansatz für den Doppelverdau des Expressionsvektors.	- 34 -
Tabelle 6:	Werte der Konzentrationsbestimmung der Proben P18-1 und P18-9.	- 46 -
Tabelle 7:	Übersicht über die 66 Effektorkandidaten, welche für die weiterführenden Sequenzanalysen genutzt wurden.....	- 54 -
Tabelle 8:	Zusammenfassung der Effektorkandidaten aus dem Sequenzpool ohne Homologien zu bekannten Sequenzen.....	- 60 -
Tabelle 9:	Bioinformatischer Nachweis der Effektorkandidaten von <i>S. endobioticum</i> P18 in den Pathotypen P1 und P18.	- 63 -
Tabelle 10:	Übersicht über die klonierten Effektorkandidaten für die Funktionsanalyse in Tabak.	- 67 -
Tabelle 11:	Gewichte der isolierten Proteinpellets aus jeweils fünf biologischen Wiederholungen der inokulierten Proben und der jeweiligen Kontrollen 14 dpi... -	79 -
Tabelle 12:	Übersicht über die acht Proteine von <i>S. endobioticum</i> Pathotyp 1, die aufgrund zu Sequenzähnlichkeiten zu <i>Batrachochytrium dendrobatidis</i> anhand der <i>shotgun</i> Daten in mindestens vier biologischen Wiederholungen identifiziert werden konnten.....	- 94 -
Tabelle A 1:	Das Yeast Extract Peptone (YEP)-Medium zur Kultur von <i>A. tumefaciens</i>	- 143 -
Tabelle A 2:	Zusammensetzung des Lysogeny Broth (LB)-Mediums für die Kultur von <i>E. coli</i> . -	143 -
Tabelle A 3:	Zusammensetzung des FB-Mediums zur mittelfristigen Lagerung bei -20 °C.....	- 144 -
Tabelle A 4:	1x Williams Puffers für PCR-Reaktionen (WILLIAMS <i>et al.</i> , 1990).	- 144 -
Tabelle A 5:	Zusammensetzung des Sammelgels mit 4 % [v/v] Acrylamid.	- 145 -
Tabelle A 6:	Zusammensetzung des Trenngels mit 14 % [v/v] Acrylamid.....	- 145 -
Tabelle A 7:	Zusammensetzung des 10x Tris-Glycin SDS-Puffers.....	- 145 -
Tabelle A 8:	Zusammensetzung des 2x Probenpuffers für die Proteinauftrennung.....	- 145 -
Tabelle A 9:	Primersequenzen zur Überprüfung von cDNA.	- 146 -
Tabelle A 10:	Sequenzen der Primer zum Test auf persistierende Agrobakterien.	- 146 -
Tabelle A 11:	Sequenzen der genspezifischen Primerteilstücke zur Effektoramplifikation.	- 147 -
Tabelle A 12:	Primersequenzen zur Verifizierung der bioinformatisch bestimmten Contigs von <i>S. endobioticum</i>	- 148 -
Tabelle A 13:	Primersequenzen zum Nachweis der Effektorsequenzen in den Pathotypen 1, 2, 6 und 18 von <i>S. endobioticum</i>	- 154 -
Tabelle A 14:	Vorhersage der Beteiligung von Proteinen am sekretorischen Weg der Zelle.	- 159 -
Tabelle A 15:	Übersicht der cDNA-Contigs, deren abgeleitete Aminosäuren als Effektor vorhergesagt wurden.	- 161 -
Tabelle A 16:	Zusammenfassung der weiteren 45 Proteine von <i>S. endobioticum</i> mit Sequenzähnlichkeit zu <i>B. dendrobatidis</i>	- 163 -

Abkürzungsverzeichnis

A		E	
A	Adenin	E	Effektorkandidat
<i>A. tumefaciens</i>	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	<i>E. coli</i>	Escherichia coli
<i>ad</i>	auffüllen auf	EBN	engl.: <i>Endosperm Balance Number</i>
ANOVA	engl.: <i>analysis of variance</i>	EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
APS	Ammoniumperoxodisulfat	<i>ef1α</i>	Elongation factor 1-a
Aq _{dest}	destilliertes Wasser	EPPO	European and Mediterranean Plant Protection Organization
AS	Aminosäure	EST	engl.: <i>Expressed Sequence Tag</i>
ATP	Adenosintriphosphat	<i>et al.</i>	lat.: <i>et alia</i> (und andere)
<i>avr</i>	Avirulenz	ETI	engl.: <i>effector-triggered immunity</i>
B		ETS	engl.: <i>effector-triggered susceptibility</i>
<i>B. dendrobatidis</i>	<i>Batrachochytrium dendrobatidis</i>	F	
BIFC	bimolekulare Fluoreszenzkomplementation	FAO	engl.: <i>Food and Agriculture Organization of the United Nations</i>
BioGRID	engl.: <i>Biological General Repository for Interaction Datasets</i>	FB	engl.: <i>Freezing Broth</i>
BLAST	engl.: <i>Basic Local Alignment Search Tool</i>	FDR	engl.: <i>false discovery rate</i>
bp	Basenpaar	FNR	Fachagentur Nachwachsende Rohstoffe e. V.
BUSCO	engl.: <i>Benchmarking Universal Single-Copy Orthologs</i>	G	
C		g	Gramm
C	Cytosin	G	Guanin
Cas9	engl.: <i>CRISPR-associated protein 9</i>	Gb	Gigabyte
CC	engl.: <i>coiled-coil</i>	gDNA	engl.: <i>genomic desoxyribonucleic acid</i>
CDC48	division cycle protein 48-Homolog	GFP	engl.: <i>green fluorescent protein</i>
cDNA	engl.: <i>complementary deoxyribonucleic acid</i>	GLM	Generalisiertes Lineares Modell
cm	Centimeter	GM	genetisch modifiziert
Co. KG	Kommanditgesellschaft	GmbH	Gesellschaft mit beschränkter Haftung
CPK	Ca ²⁺ -abhängigen Proteinkinasen	GO	engl.: <i>gene ontology</i>
CRISPR	engl.: <i>clustered regulatory interspaced short palindromic repeat</i>	GTP	Guanosintriphosphat
°C	Grad Celsius	H	
D		ha	Hektar
DAMP	engl.: <i>damage associated molecular pattern</i>	HMM	Hidden Markov Model
DB conf	engl.: <i>confidence of disulfide bonding state prediction</i>	hPa	Hectopascal
DIP	engl.: <i>Database of Interacting Proteins</i>	HPRD	engl.: <i>Human Protein Reference Database</i>
DiRK	Diagnostik für eine Ressourcenschonenden Kartoffelstärkeproduktion	HR	Hypersensitive Reaktion
DM	Phureja clone DM1-3	I	
DNA	engl.: <i>desoxyribonucleic acid</i>	Inc.	engl.: <i>Incorporated</i>
dNTP	engl.: <i>desoxynucleotide</i>	IntAct	engl.: <i>Molecular Interaction Database</i>
dpi	engl.: <i>days post inoculation</i>	J	
DsRed	engl.: <i>red fluorecent protein</i>	JA	Jasmonsäure
∅	Durchmesser	K	
		kb	Kilobasen
		kg	Kilogramm
		KI	'Karolin' inokuliert
		KK	'Karolin' Kontrolle
		Kt	Kilotonnen

L		O	
λ	Lambda	OD ₆₀₀	optische Dichte bei 600 nm
L	Liter	oH	ohne Hit
LB	engl.: <i>Lysogeny Broth</i>	ORF	engl.: <i>open reading frame</i>
LED	Leuchtdiode	P	
LFQ	engl.: <i>label-free quantification</i>	p	binomiale Proportion
Loc	engl.: <i>localization</i>	P1	Pathotyp 1
Log ₂	Logarithmus zur Basis 2	P2	Pathotyp 2
<i>L. maculans</i>	<i>Leptosphaeria maculans</i>	P6	Pathotyp 6
LRR	engl.: <i>leucine-rich repeat</i>	P8	Pathotyp 8
M		P18	Pathotyp 18
M	Molar	PAMP	engl.: <i>pathogen-associated molecular pattern</i>
<i>M. oryzae</i>	<i>Magnaporthe grisea</i>	PCA	engl.: <i>principal component analysis</i>
MAMP	engl.: <i>microbe-associated molecular pattern</i>	PCD	engl.: <i>programmed cell death</i> , (programmierter Zelltod)
MAPK	Mitogen-aktivierte Protein Kinase	PCR	engl.: <i>Polymerase chain reaction</i>
Mb	Megabasen	PDB	engl.: <i>Protein Data Bank</i>
Mbp	Megabasenpaaren	PGSC	engl.: <i>Potato Genome Sequencing Consortium</i>
MES	2-(<i>N</i> -Morpholino)ethansulfonsäure	pH	negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration
mg	Milligramm	PRR	engl.: <i>pathogenesis related receptor</i>
Min	Minute	PR	engl.: <i>pathogenesis-related protein</i>
min ⁻¹	pro Minute	PTI	engl.: <i>pattern-triggered immunity</i>
MINT	engl.: <i>Molecular Interaction Database</i>	PVX	Potato Virus X
mL	Milliliter	PVY	Potato Virus Y
mM	Millimolar	%	Prozent
mm	Millimeter	R	
mRNA	engl.: <i>messenger ribonucleic acid</i>	R	Resistenzlokus
MS	Massenspektrometer	R	Resistenzprotein
mTP	mitochondriales Transitpeptid	R1, 2	Resistenzgruppe 1, 2
μg	Mikrogramm	RACE	engl.: <i>rapid amplification of cDNA-ends</i>
μL	Mikroliter	RC	engl.: <i>reliability class</i>
μM	Micromolar	REVIGO	engl.: <i>reduce+visualize gene ontology</i>
μm	Micrometer	RH	RH89-039-16
N		RNA	engl.: <i>ribonucleic acid</i>
NADH	Nicotinamidadenindinukleotid	RNAi	RNA-Interferenz
NB	Nukleotidbindestelle	RNAseq	engl.: <i>RNAsequencing</i>
<i>N. benthamiana</i>	<i>Nicotiana benthamiana</i>	ROS	engl.: <i>reactive oxygen species</i> , (reaktive Sauerstoffspezies)
NA	nicht ausgewertet	rpm	engl.: <i>revolutions per minute</i>
NB-LRR	engl.: <i>Nucleotid binding site-leucine-rich repeat</i>	rRNA	ribosomale RNA
NCBI	engl.: <i>National Center for Biotechnology Information</i>	RXLR	Argenin-X-Leucin-Argenin
ncRNA	engl.: <i>non-coding RNA</i>	®	engl.: <i>Registered</i>
ng	Nanogramm	S	
nL	Nanoliter	S	Svedberg
NLR	engl.: <i>Nucleotid binding site-leucine-rich repeat</i>	S ⁻⁵	engl.: <i>susceptibility</i> pro Sekunde
nm	Nanometer	<i>S. endobioticum</i>	<i>Synchytrium endobioticum</i>
NO	engl.: <i>nitric oxid</i> (Stickstoffmonoxid)	<i>S. phureja</i>	<i>Solanum phureja</i>
Nr.	Nummer		
N-terminal	Amino-terminal		

S		V	
S1, 2	Anfälligkeitsgruppe 1, 2	V	Volt
<i>S. tuberosum</i>	<i>Solanum tuberosum</i>	<i>vir</i>	Virulenz
SA	Salizylsäure	vs.	versus
SDS	engl.: <i>Sodium Dodecyl Sulfate</i> (Natriumlaurylsulfat)	[v/v]	engl.: <i>volume in volume</i>
SEA	engl.: <i>singular enrichment analysis</i>	W	
SP	Signalpeptid	[w/v]	engl.: <i>weight in volume</i>
T		X	
T	Thymin	X	Beliebige Aminosäure
TEMED	Tetramethylethylendiamin	x	-fach
TI	`Tomensa´ inokuliert	Y	
TIR	<i>Toll, interleukin-1 receptor, resistance protein</i>	Y	engl.: Yes
TK	`Tomensa´ Kontrolle	Y2H	engl.: <i>yeast two hybrid</i>
™	engl.: <i>Trademark</i>	YEP	engl.: <i>yeast extract Peptone</i>
Tm	Schmelztemperatur		
Tris	Tris-aminomethan		
tRNA	engl.: <i>transfer RNA</i>		
TRV	Tobacco rattle virus		
U			
U	engl.: <i>Unit</i>		
UDP-GlcNAc	Uridin Diphospho-N-acetylglucosamin		
<i>ufm1</i>	<i>Ubiquitin-fold Modifier-conjugating Enzyme 1</i>		
USA	engl.: <i>United States of America</i>		
~	ungefähr		

1. Einleitung

1.1. *Solanum tuberosum* L.

Die Geschichte von Kartoffeln geht weit zurück; bereits vor 2.400 Jahren wurden sie in den Bergen von Peru und Bolivien angebaut (ACQUAAH, 2012). Ihren Weg nach Europa fanden sie um 1570, von wo aus sie im 17. Jahrhundert in viele andere Teile der Erde verteilt und kultiviert wurden. Die Einführung der Kartoffel in Deutschland wurde für die 1620er Jahre beschrieben. Heutzutage werden Kartoffeln in 149 Ländern angebaut (BRADSHAW *et al.*, 2006; ACQUAAH, 2012).

1.1.1. Taxonomie, Biologie und Genetik

Die Kartoffel ist botanisch als *Solanum tuberosum* subsp. *tuberosum* in der Gattung *Solanum* L. innerhalb der Familie Solanaceae eingeordnet. Diese Familie umfasst 95 Gattungen, von welchen die Gattung *Solanum* die größte und wirtschaftlich bedeutendste darstellt. Zusätzlich zu Kartoffeln sind der Familie Solanaceae andere wichtige Kulturpflanzen zugeordnet, wie Tomate, Aubergine, Pfeffer und Tabak (BRADEEN & HAYNES, 2011).

Kartoffeln sind an tendenziell kühlere Temperaturen adaptiert, wobei für eine optimale Entwicklung der Pflanzen ein Temperaturwechsel in der Wachstumsperiode notwendig ist. Für das Sprosswachstum und die Entwicklung sind 22 °C als optimale Temperatur beschrieben, wobei in frühen Stadien eine Bodentemperatur von über 24 °C ideal ist. In späteren Phasen der Entwicklung, in denen es zur Knollenbildung kommen soll, bieten Temperaturen von 18 °C optimale Bedingungen. Bei einem Anstieg der Temperaturen auf über 20 °C während der Knollenbildung kommt es zu Deformationen und einer Verlangsamung der Knollenbildung (ACQUAAH, 2012). Die Knolle stellt nicht nur den ökonomisch relevanten Teil der Pflanze dar, sondern ist gleichzeitig das primäre Organ zur vegetativen Vermehrung (BRADEEN & HAYNES, 2011).

Bezüglich der genetischen Konstitution der Kartoffel kann festgehalten werden, dass es sich um einen genetisch komplexen Organismus handelt. Das Ploidieniveau erstreckt sich von diploiden bis hexaploiden Genotypen (CAMADRO *et al.*, 2004). Kultivierte Kartoffeln sind in der Regel tetraploid ($2n = 4x = 48$) mit einer Basischromosomenzahl von $x = 12$ (CARPUTO & FRUSCIANTE, 2011). Die kultivierte Kartoffel ist ein autotetraploider Organismus, da die Subgenome eine hohe Ähnlichkeit aufweisen. Diese genetische Konstitution hat einige Konsequenzen für die Vererbung von Merkmalen. Alle vier Sätze von Chromosomen sind im Stande miteinander zu paaren; so können Trivalente und Quadrovalente in frühen Phasen der Meiose beobachtet werden. Somit zeigen tetraploide Kartoffeln eine tetrasome Vererbung (JANSKY, 2009; BRADSHAW, 2007a). Sie sind hoch heterozygot (LI *et al.*, 2007; MASSA *et al.*, 2011) und zählen mit einer haploiden Genomgröße von ~840 Megabasenpaare (Mbp) zu den Pflanzen mit einer mittleren Genomgröße (BRADSHAW, 2007a).

1.1.2. Die Kartoffelzüchtung

Die moderne Kartoffelzüchtung geht zurück ins Jahr 1807, als Knight in England erste Hybridisierungen zwischen Sorten durch artifizielle Bestäubungen durchführte. In den Folgejahren fand ein Austausch von genetischem Material zwischen Bauern und Hobbyzüchtern statt (BRADSHAW, 2007b). Zur Züchtung neuer Kartoffelsorten wurden vielseitige Züchtungsprogramme entwickelt. Die Züchtungsziele dieser Programme variieren allerdings zwischen verschiedenen Ländern, um an die jeweiligen Bedürfnisse angepasst zu sein. Allerdings beinhalten sie wahrscheinlich in fast allen Fällen eine Selektion auf höheren Ertrag, eine angemessene Reifedauer und bestimmte Knolleneigenschaften, die sich auf die jeweiligen gefragten Endprodukte auswirken. Ebenso ist die Resistenz gegenüber biotischen und abiotischen Faktoren ein wichtiges Züchtungsziel (BRADSHAW & BONIERBALE, 2010). Die Anpassung der Kartoffel an eine große Bandbreite von Umweltfaktoren und an die spezifischen Bedürfnisse der Endnutzung wird durch die reproduktive Biologie der Kartoffel begünstigt, welche ideal für die Schaffung und Erhaltung von Variationen ist (BRADSHAW, 2007c). Für die Züchtung neuer Kultursorten stehen neben den bereits etablierten Sorten auch Wildarten zur Verfügung. Eine Übersicht über die Evolution moderner Kartoffelsorten und die genetischen Ressourcen in der Kartoffelzüchtung wurden in der Abbildung 1 zusammengefasst.

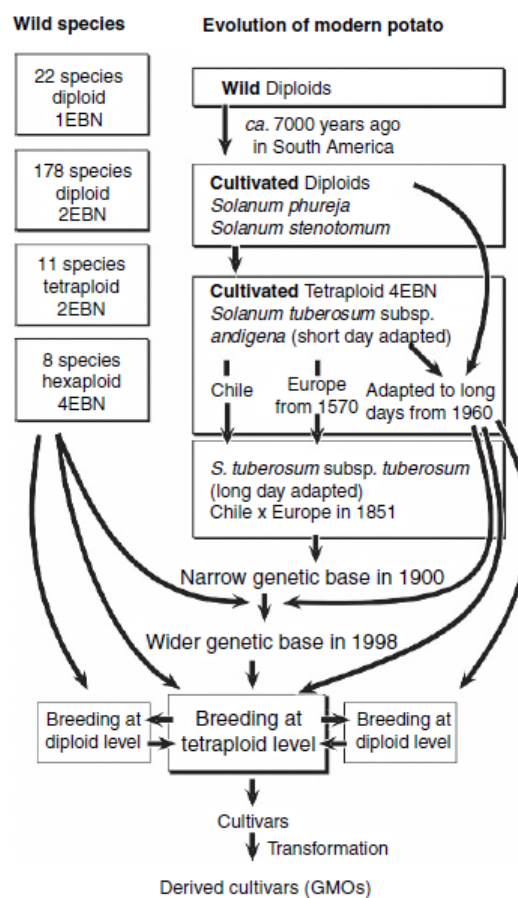


Abbildung 1: Übersichtschema über die genetischen Ressourcen der Kartoffelzüchtung, sowie die Evolution der modernen Kartoffelsorten (BRADSHAW, 2007c).

Die Entwicklung moderner Kartoffelsorten ging über die Kultivierung wilder Kartoffeln mit einem diploiden Ploidieniveau hin zur Kultivierung tetraploider Kartoffeln (Abbildung 1). Diese wurden dann für die Züchtung und die Kreuzung auf tetraploidem Ploidieniveau genutzt. Die meisten derzeitigen Sorten basieren auf tetraploiden Kreuzungen (CARPUTO & FRUSCIANTE, 2011). Ebenso wurden Wildarten zur Einkreuzung von Eigenschaften herangezogen (Abbildung 1). Eine der wichtigsten Entscheidungen innerhalb des Züchtungsprozesses ist die Kombination von Elterngenotypen in der Kreuzung (JANSKY, 2009). Die Züchtung neuer Kartoffelsorten kann sich über eine lange Periode von zehn oder mehr Jahren erstrecken (JANSKY, 2009), in denen eine strikte Selektion der Nachkommen stattfindet. Es ist in diesen Schritten nicht unüblich, über 99 % der Nachkommen anhand der visuellen Beurteilung der Knolle zu verwerfen. Erst in späteren Schritten des Züchtungsprogramms wird auf Krankheitsresistenzen und Knollenqualität selektiert (JANSKY, 2009). In typischen konventionellen Züchtungsprogrammen werden bis zu 100.000 Sämlinge ausgebracht, die aus Kreuzungen mehrerer dutzend Eltern resultieren. Eine einzelne Knolle von jeder Pflanze wird geerntet und im Feld als Einzelpflanze angezogen. Anschließend wird auf gewünschte Merkmale hin selektiert (JANSKY, 2009).

Für die erfolgreiche Vorhersage einer normalen Samenentwicklung nach einer innerartlichen Kreuzung oder einer Kreuzung zwischen verschiedenen Arten wurde in den 1980er Jahren die sogenannte *Endosperm Balance Number* (EBN) Hypothese entwickelt. Angelehnt an diese Hypothese haben alle Arten eine Genom-spezifische Ploidie, die EBN, welche nicht zwingend äquivalent zu der chromosomalen Ploidie sein muss. Das wichtigste Kriterium hierbei ist, dass die EBN in einem Verhältnis von 2:1 (mütterlich:väterlich) im Endosperm des Hybrides vertreten sein muss, um eine normale Samenentwicklung zu gewährleisten (CARPUTO *et al.*, 1999).

1.1.3. Kartoffelproduktion - Wirtschaftliche Bedeutung der Kartoffel

Durch ihren hohen Nährstoffgehalt zählen Kartoffeln zu den meist konsumierten Nahrungsmitteln weltweit. Kartoffeln sind eine reiche Quelle an Proteinen, Energie, Vitaminen und Mineralien (AUGUSTIN *et al.*, 2012). Sie können mit geringem technologischen Aufwand gelagert werden, was sie zu einer idealen Nahrungsquelle auch für Menschen in weniger entwickelten Ländern macht (BRADEEN & HAYNES, 2011). Kartoffeln werden von mehr als einer Milliarde Menschen täglich konsumiert (MULLINS *et al.*, 2006). Neben ihrer Verarbeitung in der Gastronomie sind Kartoffeln auch vielseitig in der Produktion für verschiedene Endprodukte einsetzbar (AUGUSTIN *et al.*, 2012). Beispielsweise wird die Stärke der Kartoffel für die Herstellung verschiedener Lebensmittel verwendet und dort als Verdickungsmittel und Stabilisator eingesetzt (<http://organicpotatostarch.eu>). Allerdings wird die Kartoffelstärke auch für industrielle Zwecke verwendet. Hierbei findet sie ihren Einsatz beim Beizen von Baumwolle, Leimen von Papier, aber auch in der Herstellung von Biokunststoffen (<http://www.chemie.de>). Die wirtschaftliche Bedeutung der Kartoffel spiegelt sich in der Platzierung unter den Top 5 der meist produzierten

Kulturpflanzen weltweit im Jahr 2013 wider. Kartoffeln belegten den fünften Platz hinter Zuckerrohr, Mais, Reis und Weizen. Es wurden im Jahr 2013 weltweit 368.096 kt Kartoffeln produziert (FAO STATISTICAL POCKETBOOK, 2015). Im selben Jahr wurden in Deutschland 9.669.700 Tonnen Kartoffeln auf einer Fläche von 242.800 ha produziert (FAOSTAT, <http://www.fao.org>). Basierend auf den gemittelten Erträgen der Jahre 1994-2016 befindet sich Deutschland auf Platz 7 der Länder mit der größten Kartoffelproduktion weltweit. Anhand dieser Daten zählen zu den Hauptproduzenten von Kartoffeln China und Indien, gefolgt von Russland, Amerika, Ukraine und Polen (FAO, Stand Januar 2018, <http://www.fao.org/faostat>).

1.1.4. Relevante Krankheiten und Schaderreger der Kartoffel

Die Kartoffel bietet einen Wirt für eine Vielzahl von Krankheitserregern: hierzu zählen Pilze, Bakterien und Viren.

Eines der bekanntesten Beispiele dafür ist vermutlich *Phytophthora infestans*, der Verursacher der Hungersnot von Irland in der Mitte des neunzehnten Jahrhunderts. Aber auch heute noch stellt die Kraut- und Knollenfäule die zerstörerischste Erkrankung an Kartoffeln dar (HAAS *et al.*, 2009; YOSHIDA *et al.*, 2013). Ein Beispiel für einen bakteriellen Schaderreger an Kartoffeln ist *Erwinia carotovora* ssp. *carotovora*, dem Verursacher der Nassfäule. Befallen werden durch dieses Bakterium Knollen und Spross der Kartoffelpflanze (PÉROMBELON, 2002). Es handelt sich hierbei um ein Bakterium, das sowohl an gemäßigte als auch wärmere Klimate adaptiert ist (WEBER, 1990). Einer der bedeutendsten Kartoffelviren ist der *Potato Virus Y* (PVY). Das Virus verbreitet sich leicht und kann die Erträge um bis zu 80 % reduzieren. Die primären Symptome einer Infektion sind Nekrosen und Fleckigkeit der Blätter, bis hin zum vorzeitigen Absterben der Pflanze (LAWSON *et al.*, 1990).

Ein weiteres Beispiel für einen bedeutenden Schaderreger an Kartoffel ist *Synchytrium endobioticum*, bei dem es sich um einen bodenbürtigen Pilz handelt (BRADSHAW, 2007b; STACHEWICZ, 2002). Dieser ist der Erreger des Kartoffelkrebses, einer Erkrankung der unterirdischen Pflanzenteile (mit Ausnahme der Wurzeln) der Kartoffel (BALLVORA *et al.*, 2011). In den 1920er und 1930er Jahren gehörte der Kartoffelkrebs durch seine schnelle Verbreitung neben der Kraut- und Braunfäule und den Virose zu den wichtigsten Kartoffelkrankheiten (STACHEWICZ, 2002).

1.2. *Synchytrium endobioticum* – der Erreger des Kartoffelkrebses

Wie bereits zuvor erwähnt handelt es sich bei *Synchytrium endobioticum* (Schilberszky) Percival, dem Erreger des Kartoffelkrebses, um einen A2 Quarantäneschaderreger (BAAYEN *et al.*, 2005). Im Jahr 2012 war *Synchytrium* in 55 Ländern als Quarantänerreger gelistet (KHIUTTI *et al.*, 2012). Dieses komplexe und interessante Pathosystem soll im Folgenden näher beschrieben werden.

1.2.1. Kartoffelkrebs – Symptome und Auswirkungen

Die typischen Krankheitssymptome des Kartoffelkrebses sind tumorartige Auswüchse auf den Knollen, wie in Abbildung 2 dargestellt.

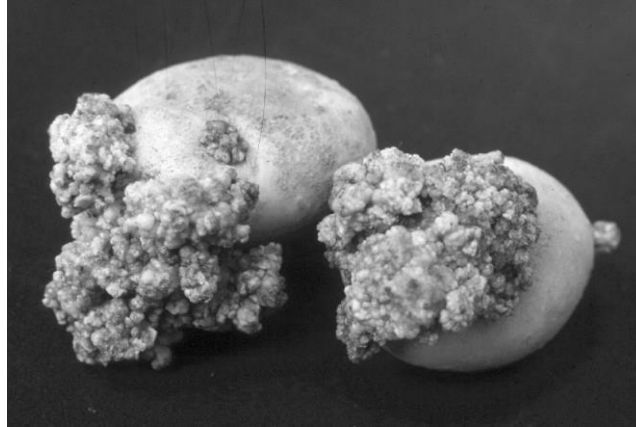


Abbildung 2: Exemplarische Darstellung von Krankheitssymptomen nach einer Infektion mit *S. endobioticum* (STACHEWICZ, 2002).

Bei den Wucherungen handelt es sich um multizelluläre Gewebe, die in Größe und Form von ein paar Millimetern bis zu mehreren Zentimetern variieren. Sie bilden den Ort, an dem sich der Erreger vermehrt und sich Sporangien bilden. Die Wucherung besteht aus hypertrophen Zellen, die sich ähnlich zu Tumorzellen teilen. Diese Zellen umschließen dünnwandige Sommersporangien und dickwandige Wintersporangien (Sori) (BALLVORA *et al.*, 2011). Die Sporen von *S. endobioticum* können in der Erde bis zu einer Zeitspanne von 30 – 40 Jahren überdauern (LAIDLAW, 1985). Die Wucherungen dienen als Nahrungsquelle (BAAYEN *et al.*, 2005), und bei günstigen Klimabedingungen können die Sporen keimen und nachfolgende Infektionen auslösen. Somit repräsentiert der Erreger eine Langzeitkontamination von infizierten Feldern (BALLVORA *et al.*, 2011). Dies hat Konsequenzen für die Nutzung befallener Flächen für den Kartoffelanbau. Infizierte Kartoffelpflanzen müssen zerstört und befallene Felder dürfen für mindestens 20 Jahre oder länger nicht mehr für die Kartoffelproduktion genutzt werden. Ebenfalls muss eine Sicherheitszone um die befallenen Flächen eingerichtet werden, auf denen nur nach Genehmigung Kartoffelsorten angebaut werden dürfen, die gegen den entsprechenden Pathotyp resistent sind (BALLVORA *et al.*, 2011). Diese Sicherheitszone umfasst einen Bereich von 300 m um die befallene Fläche (BGB1. I S. 1006, Artikel 1, §2, 2001). Für eine Freigabe der Flächen muss eine Bodenprobe auf das Vorhandensein von Dauersporen untersucht werden nach den Richtlinien der EPPO (European and Mediterranean Plant Protection Organization). Eine mögliche Infektion von anfälligen Kartoffelsorten muss danach ausgeschlossen werden (EPPO STANDARDS, 2004; VAN DEN BOOGERT *et al.*, 2005).

1.2.2. Taxonomie und Biologie von *S. endobioticum*

Synchytrium endobioticum ist ein obligat biotropher, bodenbürtiger Pilz, welcher die unterirdischen Teile der Kartoffel (Knollen, Stolone und Spross) infiziert (BALLVORA *et al.*, 2011). Die Wurzeln der Kartoffelpflanze können als einziger Pflanzenteil nicht infiziert werden (STACHEWICZ, 2002). *S. endobioticum* ist ein Mitglied der Ordnung Chytridiales innerhalb des Phylums Chytridiomycota. Als Mitglied dieser Ordnung zeichnet sich *S. endobioticum* dadurch aus, dass keine Hyphen gebildet werden, allerdings Sporangien, welche bewegliche Zoosporen produzieren (ABDULLAHI *et al.*, 2005). Diese Sporangien entlassen 200 – 300 Zoosporen. Diese sind zwischen 1,5-2,5 µm im Durchmesser und haben ein hinteres Flagellum (FRANC, 2007). Die Zoosporen sind in der Lage, kurze Distanzen über das Bodenwasser zurückzulegen und so neue Kartoffelgewebe zur Infektion zu erreichen. Die Zoosporen sind nur kurzlebig und müssen innerhalb von ein bis zwei Stunden nach ihrer Bildung neue Gewebe infizieren. Nach Eindringen der Zoosporen beginnen sich die Zellen des Wirtsgewebes zu vergrößern und es bilden sich haploide Sori in den Kartoffelzellen. Die benachbarten Zellen beginnen zu proliferieren, was in den typischen Wucherungen als Krankheitssymptom resultiert. Meristematische Gewebe bieten neue Infektionsherde für *S. endobioticum* (FRANC, 2007). Beim Vorhandensein meristematischer Gewebe ist eine Infektion während der gesamten Vegetationsperiode der Kartoffel möglich (STACHEWICZ, 2002). Jeder Sorus beinhaltet ein bis neun Sommersporangien, welche wiederum neue haploide Zoosporen produzieren für eine Reinfektion des anfälligen Gewebes (FRANC, 2007). Eine hohe Bodenfeuchtigkeit (50 % - 80 %) und Temperaturen zwischen 8 – 20 °C bilden ideale Bedingungen für eine Infektion mit *Synchytrium* (STACHEWICZ, 2002). Unter idealen klimatischen Bedingungen genügt weniger als eine Dauerspore pro Gramm Boden als Inokulum aus, um eine Infektion hervorzurufen (FRANC, 2007). Aufgrund der zerstörerischen Natur dieser Krankheit handelt es sich bei *Synchytrium endobioticum* weltweit um einen wichtigen Quarantäneschaderreger (EPPO STANDARDS, 2004). Ebenso macht die Tatsache, dass eine chemische Bekämpfung des Erregers nicht möglich ist (BALLVORA *et al.*, 2011) die Eindämmung und Bekämpfung schwierig. Über eine Zeitspanne von 80 Jahren wurden verschiedenste Chemikalien zur Bekämpfung von *S. endobioticum* getestet; allerdings waren diese Behandlungen nicht ausreichend, um den Erreger vollständig in infizierter Erde zu eliminieren (OBIDIEGWU *et al.*, 2014). HAMPSON (1977) berichtet von mehr als 120 anorganischen oder organischen Chemikalien, die entweder in Kombination oder alleine zur Bekämpfung eingesetzt wurden. Früh wurde erkannt, dass die Schwachstelle des Krankheitsverlaufs die Bewegung der Zoosporen zu den anfälligen Wirtsgeweben war und eine Bekämpfung der Krankheit auf dieser Ebene am erfolgversprechendsten wäre. Allerdings waren die Mittel, die gegen *Synchytrium* erfolgreich wirkten, entweder toxisch gegenüber Pflanzen oder wirkten sterilisierend auf den Boden (HAMPSON, 1977). Eine Auswahl der getesteten Chemikalien ist in OBIDIEGWU *et al.* (2014)

zusammengefasst. Auch FRANC (2007) postulierte, dass es einfacher ist, dem Erreger vorzubeugen als ihn zu kontrollieren.

Bei Kartoffeln handelt es sich um den eigentlichen Wirt von *Synchytrium endobioticum*, allerdings können auch andere Pflanzen der Familie Solanaceae infiziert werden, wobei hier keine sichtbaren Symptome zu beobachten sind (ABDULLAHI *et al.*, 2005). Die Pathogenese dieses Erregers ist allerdings noch nicht im Detail geklärt.

1.2.3. Geschichte des Kartoffelkrebses

Bei Kartoffelkrebs handelt es sich im Wesentlichen um eine Erkrankung der Kartoffelknolle, die von dem Erreger *Synchytrium endobioticum* (Schilberszky) Percival verursacht wird. Der Ursprung dieser Krankheit wurde in den Anden in Südamerika lokalisiert, von wo aus sich die Krankheit in Teile Nordamerikas sowie Europa Ende des 19. Jahrhunderts ausbreitete (EPPO STANDARDS, 2004; SMITH *et al.*, 1997). Der Kartoffelkrebs verbreitete sich schnell innerhalb Europas zwischen 1891 und 1920 und ist seit dem Jahr 1908 in Deutschland bekannt. Das höchste Vorkommen Europas wurde in England dokumentiert (STACHEWICZ, 2002; MOORE, 1957). Aber auch außerhalb Englands verbreitete sich der Kartoffelkrebs schnell und wurde in einer Vielzahl von Ländern detektiert. Die globale Verbreitung von Kartoffelkrebs ist in Abbildung 3 dargestellt. Es wurde ein sporadisches Auftreten von *S. endobioticum* in folgenden europäischen Ländern von ANON (2005) dokumentiert: Österreich, Weißrussland, Tschechische Republik, Dänemark, Estland, Färöer-Inseln, Finnland, Deutschland, Irland, Italien, Lettland, Litauen, Niederlande, Norwegen, Polen, Rumänien, Russland, Slowenien, Schweden, Schweiz, Ukraine und Montenegro.

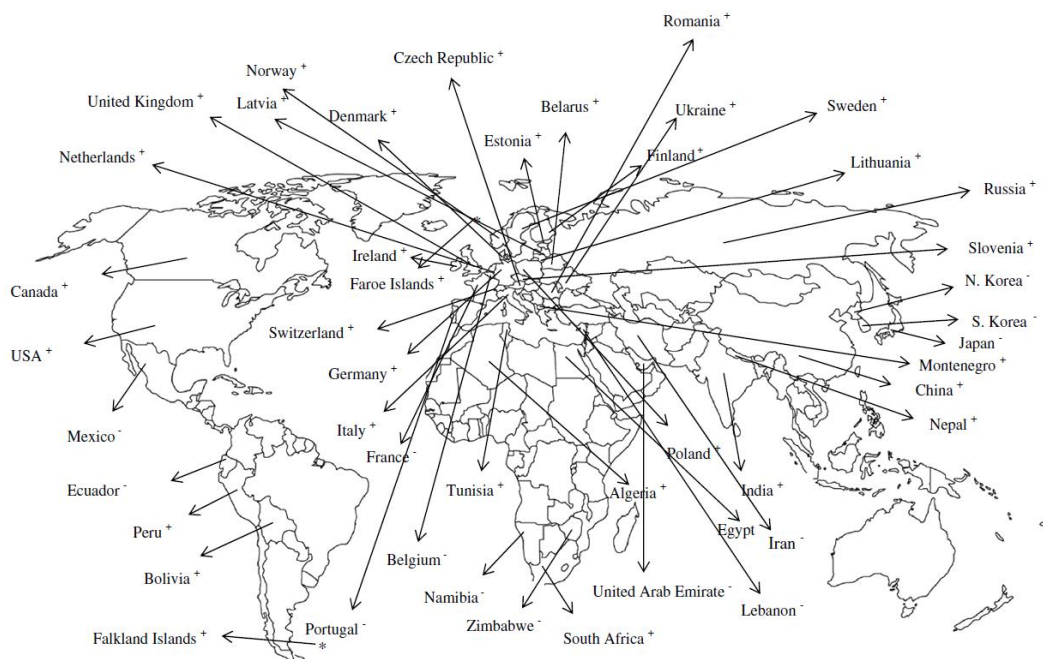


Abbildung 3: Globale Verbreitung von Kartoffelkrebs (OBIDIEGWU *et al.*, 2014). Legende: + bestätigte Funde, - unbestätigte Berichte.

Der primäre Verbreitungsweg des Pathogens war der Handel infizierter Knollen, welche entweder selbst befallen waren oder an denen infizierte Erde anhaftete. Ebenso war eine Verbreitung des Erregers durch Ackergeräte möglich, an denen kontaminierte Erde verblieb. Die Verbreitung von Erde über Windböen war ein weiterer Weg der Verschleppung des Kartoffelkrebses. Zu Beginn wurde nur ein Pathotyp von *Synchytrium endobioticum* gefunden, sodass eine Kontrolle der Krankheit durch resistente Sorten möglich war. Allerdings wurden ab dem Jahr 1941 erstmals vermeintlich resistente Sorten gefunden, die Krankheitssymptome aufwiesen, was das Vorhandensein neuer Pathotypen vermuten ließ (BAAYEN *et al.*, 2005). In Europa kommen 38 Pathotypen von *S. endobioticum* vor, von denen die Pathotypen 1, 2, 6 und 18 die relevantesten darstellen. Eine Infektion mit *S. endobioticum* kann zu Ernteverlusten von 50 – 100 % führen (BALLVORA *et al.*, 2011). Im Jahr 2002 waren 1.686 Krebsherde mit einer Gesamtfläche von 795,88 ha in Deutschland registriert. Schätzungen nach waren zu diesem Zeitpunkt bereits 50 % der Infektionsherde älter als 25 Jahre und lediglich 0,2 % der Herde konnten Pathotyp 1 zugeordnet werden (STACHEWICZ, 2002), was die Relevanz und Aggressivität der Pathotypen 2, 6 und 18 unterstreicht.

1.2.4. Resistenz gegen *S. endobioticum* und die Möglichkeit der Eindämmung des Erregers

Die Kontrolle von *Synchytrium endobioticum*, dem Erreger des Kartoffelkrebses, gestaltet sich schwierig. Eine Möglichkeit zur Eindämmung dieser Krankheit ist die Kultivierung von resistenten Kartoffelsorten. Allerdings ist dies nicht einfach umzusetzen, da lediglich 4 % der gegenwärtig in Deutschland zugelassenen Kartoffelsorten resistent gegen alle vier relevanten Pathotypen von *S. endobioticum* sind. Ein weiterer Nachteil besteht darin, dass diese Sorten nicht von wirtschaftlicher Relevanz sind, da ihnen die für moderne Sorten wichtigen agronomischen Eigenschaften fehlen (BALLVORA *et al.*, 2011). Im Vergleich dazu waren im Jahr 2001 von 198 zugelassenen Sorten 54,5 % resistent gegen Pathotyp 1 (STACHEWICZ, 2002). Daher ist die Züchtung neuer resistenter Sorten von Nöten, welche die Resistenz gegen die relevanten Pathotypen von *Synchytrium* mit den anderen wichtigen Sorteneigenschaften kombinieren (BALLVORA *et al.*, 2011). Eine Möglichkeit, dieses Ziel zu erreichen, wäre die Nutzung von Kartoffelwildarten als Kreuzungselter, da diese ein Reservoir für genetische Diversität von Resistenzgenen darstellen (SIMKO *et al.*, 2007). Die Bedeutung von Kartoffelkrebs in der Kartoffelproduktion vor 100 Jahren wird noch einmal dadurch verdeutlicht, dass die Resistenz gegen Kartoffelkrebs eines der ersten Merkmale war, die in Pflanzen auf mendelsche Vererbung untersucht wurde (OBIDIEGWU *et al.*, 2014; SALAMAN & LESLY, 1923). Die genetische Analyse der Resistenz von Kartoffelgenotypen gegen *S. endobioticum* geht somit weit zurück. Bereits im Jahr 1999 identifizierten und kartierten HEHL *et al.* das dominante Gen *Sen1* auf Chromosom XI in einer Region des Kartoffelgenoms, die als Hotspot für Resistenzen gegen verschiedene Pathogene wie beispielsweise das Tabak-Mosaik-Virus gilt. Zusätzlich identifizierten BRUGMANS *et al.* (2006) einen unabhängigen zweiten Lokus für

die Resistenz gegen Pathotyp 1 auf Chromosom IV, benannt *Sen1-4*. BALLVORA *et al.* postulierten im Jahr 2011, dass die Resistenz gegen *S. endobioticum* in der untersuchten Population durch ein Minimum von drei Loci kontrolliert wird, welche auf den Chromosomen I, IX und XI lokalisiert sind. In einer weiteren Studie von GROTH *et al.* (2013) wurde in einer tetraploiden Nachkommenschaft, die für die Resistenz gegen *S. endobioticum* Pathotyp 1, 2, 6 und 18 spaltet, gezeigt, dass eine quantitative phänotypische Verteilung für die Resistenz vorliegt. GROTH *et al.* (2013) zeigten wie BALLVORA *et al.* (2011) das Vorhandensein eines Hauptlokus für die Resistenz gegen Pathotyp 1 auf Chromosom XI, welcher eng an den *Sen1*-Lokus gekoppelt ist oder diesen repräsentiert. Ebenso korrelierte in beiden Studien die Resistenz gegen die Pathotypen 2, 6 und 18 stark miteinander. OBIDIEGWU *et al.* (2015) bestätigte durch Markeranalysen in einer spaltenden Nachkommenschaft den Multiallel-Lokus *Sen1/Rse-Xia* auf Chromosom XI als Hauptlokus für die Resistenz gegen alle vier Pathotypen von *S. endobioticum*.

Eine weitere wichtige Strategie zur Kontrolle der Ausbreitung von *Synchytrium* ist, neben dem Anbau resistenter Sorten, die Anwendung phytosanitärer Maßnahmen und strikter Quarantäne.

1.2.5. Resistenztestung von Kartoffeln

Zur Beurteilung, ob ein bestimmter Genotyp anfällig oder resistent gegen einen oder mehrere Pathotypen von *S. endobioticum* ist, wird im Wesentlichen die sogenannte Glynne-Lemmerzahl-Methode verwendet. Diese Testmethode wurde bereits 1925 von GLYNNE entwickelt und nachfolgend modifiziert. Sie stellt den offiziellen Test zur Charakterisierung von Kartoffelgenotypen dar, wie er vom Julius Kühn-Institut genutzt wird.

Heutzutage wird eine modifizierte Glynne-Lemmerzahl-Methode (GLYNNE, 1925; LEMMERZAHL, 1930) verwendet, wie sie von LANGERFELD & STACHEWICZ (1994) beschrieben wurde.

Im Wesentlichen besteht diese Methode aus vier Schritten, die verkürzt aus der Abbildung 4 entnommen werden können. In einem ersten Schritt werden die Kartoffelknollen zu Augenplatten geschnitten (Augenplatten = Stücke der Kartoffelknolle, die ein Auge mit einem auskeimenden Spross von 1 – 2 mm Länge besitzen), anschließend wird die Augenplatte mit einem Vaselining um das Auge versehen. Dieser Ring wird mit destilliertem Wasser gefüllt und ein Stück einer etablierten Wucherung wird aufgelegt, sodass die im Wasser freigesetzten Zoosporen das unterliegende Gewebe infizieren können (Abbildung 4A 1). Eine Abwandlung dieses ersten Schrittes wird in Polen praktiziert. Hierbei werden keine Augenplatten geschnitten, sondern intakte Knollen werden mit einem Vaselining versehen und mit den Wucherungen inokuliert (Abbildung 4B). Nach einer Inkubationszeit von zwei Tagen werden die Wucherung sowie der Vaselining entfernt und die Augenplatten werden mit sterilem Kompost abgedeckt (Abbildung 4A 2). Die so vorbereiteten Augenplatten werden bei 15 – 17 °C und hoher Feuchtigkeit inkubiert (BALLVORA *et al.*, 2011, OBIDIEGWU *et al.*, 2014).



Abbildung 4: Übersicht über die Schritte der Glynn-Lemmerzahl-Methode (OBIDIEGWU *et al.*, 2014). Dargestellt sind die Varianten wie sie in Deutschland und Polen zur Resistenztestung von Kartoffeln gegen *S. endobioticum* genutzt werden. (A1) Augenplatten, mit Wasser gefüllter Vaseline zur Inokulation mit frischen Wucherungen, (A2) Abdeckung mit sterilem Kompost, (A3) ausgeprägte Wucherungen an den inokulierten Augenplatten. (B) Polnische Variante der Glynn-Lemmerzahl-Methode (B1) Intakte Knollen mit Vaseline und aufgelegten Wucherungen, (B2) Abdeckung mit sterilem Sand, (B3) finales Stadium zur Resistenzbewertung (OBIDIEGWU *et al.*, 2014).

Nach drei bis vier Wochen kann eine Beurteilung der Krankheitssymptome, beziehungsweise der Resistenzreaktion, vorgenommen werden. Es wird eine Einteilung der Phänotypen in verschiedene Klassen vorgenommen (Abbildung 5).

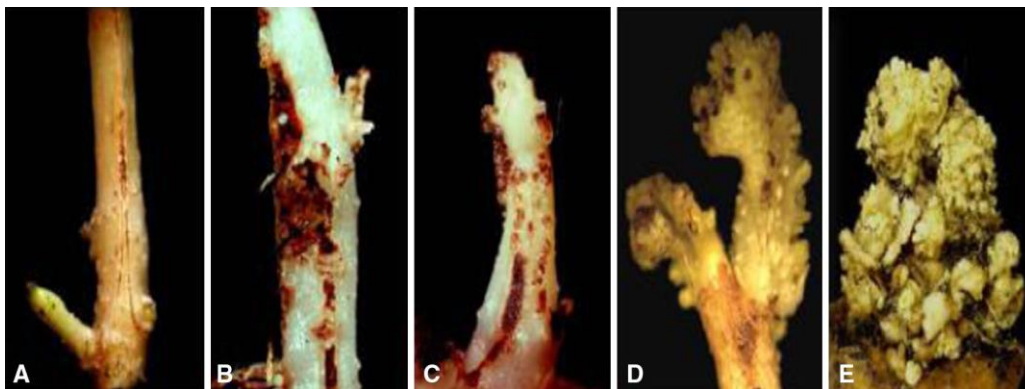


Abbildung 5: Darstellung verschiedener Phänotypen aus der Interaktion von *S. endobioticum* mit Kartoffel entsprechend der Klassifizierung in der Resistenztestung (BALLVORA *et al.*, 2011). (A) extrem resistent (Score 1 = Resistenzgruppe R1), (B) resistent mit späten Abwehrnekrosen (Score 2 = R1), (C) schwach resistent, sehr späte Abwehrnekrosen mit bis zu fünf nicht-nekrotischen Sori (Score 3 = R2), (D) schwach anfällig, vereinzelte Infektionen (Score 4 = Anfälligkeitsgruppe S1), (E) extrem anfällig, vorherrschende Tumorbildung (Score 5 = S2) (BALLVORA *et al.*, 2011).

Die Einteilung der Phänotypen aus der Interaktion von *Solanum tuberosum* und *Synchytrium endobioticum* erfolgt in fünf Klassen mit einem Score von 1 bis 5 (BALLVORA *et al.*, 2011; Abbildung 5). Die Einteilung basiert auf der Ausprägung von frühen (Score 1) und späten (Score 2) Abwehrnekrosen, sowie der Bildung von Sori (Score 3 und 4) und Wucherungen (Score 5).

Neben der zuvor beschriebenen Glynne-Lemmerzahl-Methode zur Resistenztestung ist die Spieckermann-Methode (SPIECKERMANN & KOTHOFF, 1924) eine weitere Möglichkeit zur künstlichen Erzeugung von Infektionen mit *S. endobioticum*. Zusammengefasst wurde diese Methode in den EPPO STANDARDS VON 2004:

Die Spieckermann-Methode basiert auf dem Einsatz von Kompost, der Dauersporen von *S. endobioticum* enthält. In einem ersten Schritt muss der Kompost aus frischen Wucherungen hergestellt werden. Hierfür werden die Wucherungen in kleinere Stücke geschnitten und mit sauberem Seesand gemischt. Zur Herstellung von 3 kg Kompost, wird 1 kg infiziertes Material benötigt. Das Wucherung-Sand-Gemisch wird täglich angefeuchtet und bei einer Temperatur von 18-25 °C inkubiert. Während der ersten beiden Monate der Inkubationsphase wird der Kompost täglich durchmischt, wobei in den darauffolgenden beiden Monaten eine wöchentliche Durchmischung ausreichend ist. Nach diesen vier Monaten wird der Kompost luftgetrocknet für eine Zeitspanne von weiteren zwei Monaten. Nach einer Gesamtdauer von sechs Monaten ist der Kompost für Infektionsversuche einsatzbereit. Bei einer Lagertemperatur von 10-18 °C kann der Kompost zwischen 10-30 Jahren verwendet werden (EPPO STANDARDS, 2004). In der Spieckermann-Methode werden ebenfalls Augenplatten angefertigt und nach einer Vorbehandlung zur Desinfektion mit dem Kompost bedeckt. Bei Temperaturen zwischen 16 – 18 °C und hoher Luftfeuchtigkeit (80 %) werden die Augenplatten für insgesamt acht Wochen inkubiert. Zwischenzeitlich werden sich entwickelnde Sprosse zurückgeschnitten und nach Ablauf der Inkubationszeit visuell untersucht (EPPO STANDARDS, 2004).

1.3. Wirt-Pathogen-Interaktionen: Das pflanzliche Immunsystem

Die Pflanze ist einer Vielzahl von Pathogenen ausgesetzt. Aufgrund ihrer sessilen Lebensform mussten Pflanzen Strategien zur Abwehr von Schadorganismen entwickeln. Zu den Schadorganismen, die biotischen Stress auslösen, zählen: Pilze, Bakterien, Nematoden und Insekten (DANGL *et al.*, 2013, Abbildung 6).

Pflanzen schützen sich passiv durch ihre Kutikula als physikalische Barriere und antimikrobielle Zellbestandteile gegen nicht spezialisierte Pathogene (DANGL & JONES, 2001; BIGEARD *et al.*, 2015); gegen adaptierte Pathogene wurde ein aktives Abwehrsystem entwickelt. Diese adaptierten Pathogene, welche die allgemeinen Barrieren erfolgreich überwunden haben, müssen sich hochentwickelten Mechanismen zur Pathogenerkennung und -abwehr stellen (BIGEARD *et al.*, 2015). Das pflanzliche Immunsystem wird durch ein komplexes Signalnetzwerk kontrolliert (KATAGIRI & TSUDA, 2010).

Im Allgemeinen baut die Immunität von Pflanzen gegenüber Pathogenen auf zwei Ebenen der Resistenz. Die erste Ebene basiert auf der Erkennung von konservierten mikrobiellen Molekülen, bekannt als *Pathogen Associated Molecular Patterns* (PAMPs, Abbildung 6, Schritt 1), durch an der

Zelloberfläche lokalisierte *Pattern Recognition Receptors* (PRRs) (DANGL *et al.*, 2013). Diese erste Ebene der Immunität ist unter dem Begriff *PAMP-triggered immunity* (PTI) bekannt (BOLLER & HE, 2009). Eine andere gängige Bezeichnung für PAMP ist *microbe-associated molecular pattern* (MAMP), da die erkannten Muster häufig aus Nicht-Pathogenen stammen und daher zutreffender als mikrobiell bezeichnet werden sollten (AUSUBEL, 2005). Ebenso ist die Pflanze in der Lage, sogenannte *damage-associated molecular patterns* (DAMPs) zu erkennen, bei denen es sich um pflanzliche Abbauprodukte handelt in Folge eines eindringenden Pathogenes (BOLLER & FELIX, 2009). Die Erkennung dieser DAMPs führt zu einer Immunantwort ähnlich der PTI (YAMAGUCHI & HUFFAKER, 2011). Die zweite Ebene der Immunantwort zur Abwehr adaptierter Pathogene ist bekannt als *effector-triggered immunity* (ETI). Die ETI (Abbildung 6, Schritt 4/5) wird durch Resistenzproteine (R) vermittelt, die entweder direkt oder indirekt die Effektoren des Pathogenes erkennen (DANGL *et al.*, 2013; BERNOUX *et al.*, 2011). Es wird die Immunantwort ausgelöst.

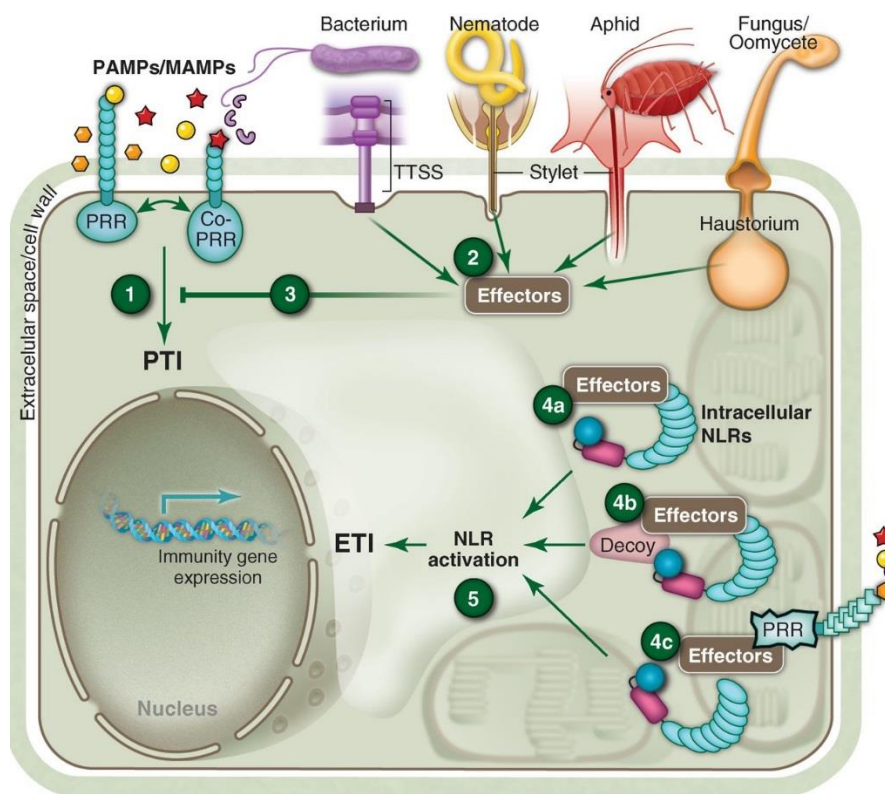


Abbildung 6: Schematische Übersicht des pflanzlichen Immunsystems (DANGL *et al.*, 2013). Die verschiedensten Pathogene exprimieren PAMPs und MAMPs, wenn sie eine Pflanze kolonisieren (farbliche Zuordnung zu den Pathogenen). Pflanzen erkennen diese durch extrazelluläre PRRs und leiten eine PRR-vermittelte Immunantwort ein (PTI, Schritt 1). Pathogene sekretieren Effektoren in das Pflanzeninnere, wo sie die PTI unterdrücken können (Schritt 3). Intrazelluläre NLR-Rezeptoren erkennen die Effektoren über verschiedene Mechanismen (Schritt 4a-c), die nicht endgültig geklärt sind. Es kommt zu einer *effector-triggered immunity* (ETI) (DANGL *et al.*, 2013).

Eine Übersicht dieser Abläufe ist vereinfacht in dem sogenannten ZickZack-Modell von JONES & DANGL (2006) dargestellt (Abbildung 7).

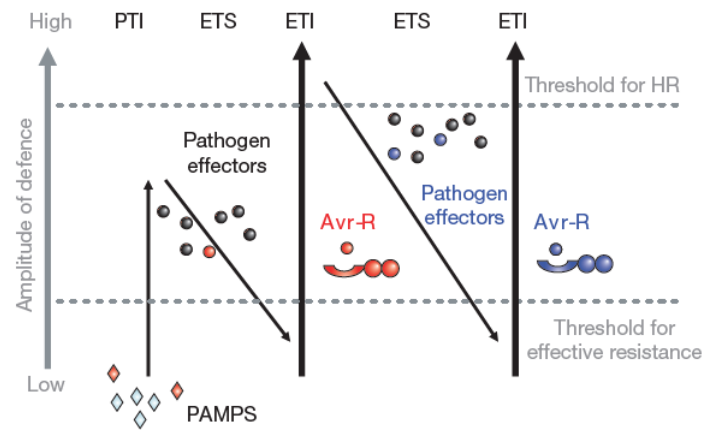


Abbildung 7: Zickzack-Modell zur Veranschaulichung des quantitativen Outputs des pflanzlichen Immunsystems (JONES & DANGL, 2006). Phase 1: Erkennung von MAMPs/PAMPs mit Aktivierung der PTI. Phase 2: Erfolgreiche Pathogene sekretieren Effektoren, die eine PTI behindern und eine Ausbreitung des Pathogens ermöglichen, bekannt als *effector-triggered susceptibility* (ETS). Phase 3: Ein NB-LRR Protein erkennt einen Effektor und aktiviert die ETI, eine verstärkte Version der PTI, die oftmals einen Grenzwert zur Aktivierung des lokalen Zelltods überschreitet. Phase 4: Isolate bestimmter Pathogene verlieren Effektoren (rot) und erhalten neue Effektoren durch horizontalen Gentransfer (blau), es kommt zur Anfälligkeit gegenüber dem Erreger. Phase 5: Neue NB-LRRs erkennen die neuen Effektoren, eine ETI wird ausgelöst (JONES & DANGL, 2006).

In der ersten Phase wird eine PTI durch die Erkennung von PAMPs eingeleitet und kann eine weitere Ausbreitung nicht adaptierter Erreger verhindern. In der zweiten Phase entlassen spezialisierte Pathogene Effektoren, die zur Virulenz des Erregers beitragen. Die Effektoren können die PTI unterdrücken, es kommt zur sogenannten *effector-triggered susceptibility* (ETS), einer Anfälligkeit des Wirts gegenüber dem Erreger. Die Phase 3 des Modells beschreibt den Fall, dass Effektoren von Rezeptoren der Pflanzenzelle erkannt werden und die ETI einleiten. In der vierten Phase versuchen Erreger durch Selektion die ETI zu umgehen. Sie sekretieren neue Effektoren. Es kann erneut zu einer Anfälligkeit gegenüber dem Erreger kommen. Aber auch die Wirtszellen durchlaufen eine Entwicklung, die zu neuen Resistenzproteinen führt, die dann erneut eine ETI auslösen (Abbildung 6, JONES & DANGL, 2006).

Auch wenn die Charakteristika der Immunität aus PTI und ETI verschieden sind, so sind viele molekulare Antworten sowohl mit der PTI als auch der ETI assoziiert (ABRAMOVITCH *et al.*, 2006, KATAGIRI & TSUDA, 2010). Aufgrund der Komplexität des pflanzlichen Immunsystems sollen die beiden Ebenen der Immunantwort, sowie im Besonderen die Rolle von Effektoren in der Wirt-Pathogen-Interaktion, im Folgenden näher betrachtet werden.

1.3.1. *Pathogen associated molecular pattern* (PAMP) recognition in der PTI

Wie bereits zuvor erwähnt, basiert die PTI auf der Erkennung von PAMPs mit Hilfe von Rezeptoren (PRRs) an der Zelloberfläche. Diese molekularen Muster (PAMPs) sind zwischen Pathogenen und nicht-infektiösen Mikroben konserviert (BOLLER & FELIX, 2009). PAMPs sind in der Regel natürlicher Weise nicht in der Wirtszelle vorhanden (NÜRNBERGER *et al.*, 2004). Nach der Erkennung dieser

molekularen Muster durch die Rezeptoren an der Zelloberfläche wird eine MAP-Kinase Kaskade aktiviert. Ebenfalls wird die Transkription von Genen als Antwort auf die Pathogenerkennung induziert, aber auch die Produktion von reaktivem Sauerstoff wird eingeleitet. Eine Ablagerung von Callose soll eine Verstärkung der Zellwand an den Infektionsstellen bewirken, über welche die Erreger in die Zelle eingedrungen sind. Alle Maßnahmen zusammen sollen eine Ausbreitung des Erregers verhindern (NÜRNBERGER *et al.*, 2004).

1.3.2. Effector-triggered immunity (ETI)

Die zweite Ebene der Pathogenabwehr umfasst die *effector-triggered immunity* (ETI), ein Abwehrmechanismus, der auf der Erkennung von Virulenzfaktoren (Effektoren) basiert. Eine Aktivierung der ETI führt im Vergleich zur PTI zu einer längeren, schnelleren und robusteren Immunantwort (TSUDA & KATAGIRI, 2010; DODDS & RATHJEN, 2010).

Im Allgemeinen ist die ETI charakterisiert durch einen schnellen Calciumionenfluss, extrazellulärem reaktiven Sauerstoff, transkriptioneller Umprogrammierung innerhalb der infizierten Zellen, sowie in den umliegenden Zellen, und einem lokalen programmierten Zelltod (Abbildung 8). Dieses Phänomen ist bekannt als hypersensitive Reaktion. Es wird angenommen, dass all diese Reaktionen zusammen zu einer Eingrenzung des Pathogenes führen und eine Ausbreitung verhindern (BELKHADIR *et al.*, 2004).

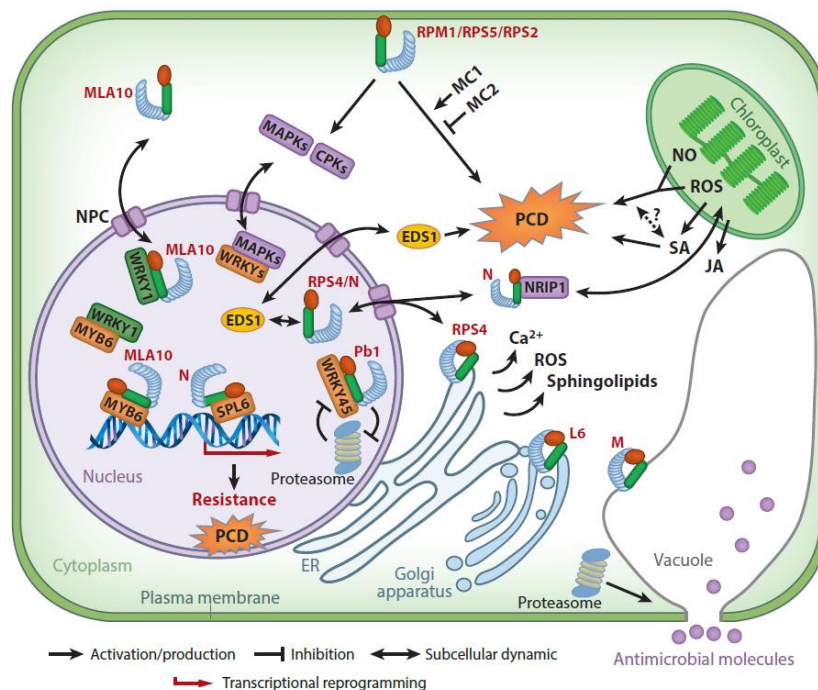


Abbildung 8: Schematische Darstellung der zellulären Signalwege in der effector-triggered immunity (ETI) (Cui *et al.*, 2014). Aktivierte Rezeptoren starten Kaskaden von Ca²⁺-abhängigen Proteinkinasen (CPKs) und Mitogen-aktivierten Protein Kinasen (MAPK), sowie die Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) und Stickstoffmonoxid (NO). Die Akkumulation der Phytohormone Salizylsäure (SA) und Jasmonsäure (JA), sowie die transkriptionelle Umprogrammierung der Abwehrgene führen zu einem programmierten Zelltod (PCD) (Cui *et al.*, 2014).

Die ETI basiert auf der intrazellulären Erkennung von Effektoren, die von adaptierten Pathogenen in die Zelle sekretiert werden. Die Erkennung der Effektoren wird im Wesentlichen durch eine Klasse von Rezeptorproteinen vermittelt, die eine Nukleotidbindestelle (NB) besitzen und reich an Leucin-Wiederholungen (*leucine-rich repeat*: LRR) sind. Pflanzliche NB-LRR-Proteine vermitteln eine Resistenz gegen diverse Pathogene, wie beispielsweise Pilze, Oomyceten, Bakterien, Viren und Insekten (DODDS & RATHJEN, 2010). Viele pflanzliche NB-LRR-Proteine enthalten entweder eine N-terminale TIR (*Toll, interleukin-1 receptor, resistance protein*) Domäne oder eine CC (*coiled-coil*) Domäne. Die Struktur von NB-LRR-Proteinen ist schematisch in der Abbildung 9 dargestellt.

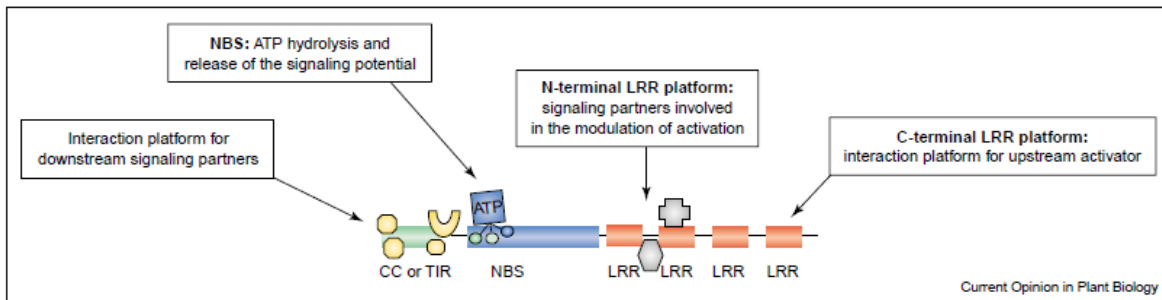


Abbildung 9: Schematische Darstellung der NB-LRR-Proteine (BELKHADIR *et al.*, 2004). Dargestellt sind die Leucin-Wiederholungen, die Nukleotidbindestelle sowie die TIR- oder CC-Domäne am N-Terminus.

Die Erkennung von Effektoren durch die Rezeptoren in der Wirtszelle kann direkt oder indirekt erfolgen (Abbildung 10).

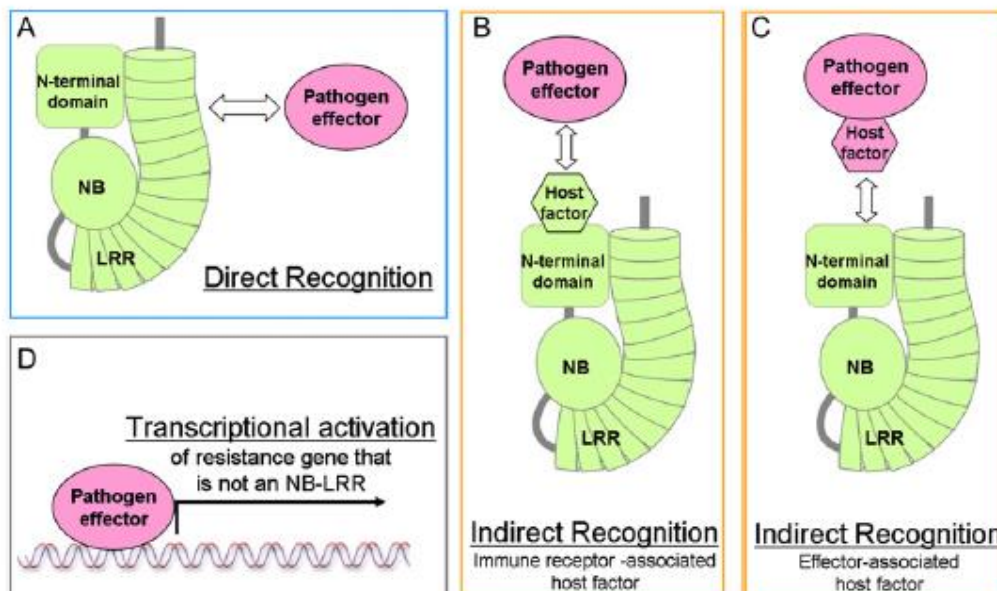


Abbildung 10: Schematische Darstellung der drei Wege der Effektorerkennung durch NB-LRRs (CAPLAN *et al.*, 2008). (A) Die Erkennung von Pathogenen kann erfolgen durch direktes Binden des Immunrezeptors (grün) an den Effektor (pink). Alternativ können NB-LRRs Pathogene indirekt durch intermediäre Wirtsfaktoren erkennen. (B) Der Wirtsfaktor kann mit dem Immunrezeptor assoziieren und den Effektor binden oder (C) zuerst an den Effektor binden und anschließend den Immunrezeptor erkennen. (D) Der Effektor agiert als Transkriptionsfaktor und induziert direkt die Expression von Resistenzgenen (CAPLAN *et al.*, 2008).

Es gibt mehrere Wege der Interaktion zwischen Effektoren und Rezeptoren zur Induktion der Immunantwort. Die Erkennung von Effektoren kann durch eine direkte Bindung des Effektors an die NB-LRR Rezeptoren erfolgen (Abbildung 10A), aber auch eine indirekte Interaktion durch die Mitwirkung intermediärer Wirtsfaktoren ist möglich (Abbildung 10B/C). Der Wirtsfaktor kann entweder mit dem Rezeptor assoziiert sein und den Effektor binden (Abbildung 10B) oder alternativ in einem ersten Schritt den Effektor binden und anschließend den Rezeptor zur Induktion der ETI (Abbildung 10C). Ebenso ist es möglich, dass Effektoren als Transkriptionsfaktoren agieren und die Expression von Resistenzgenen, die in der Regel keine NB-LRR-Gene sind, (Abbildung 10D) induzieren (CAPLAN *et al.*, 2008). Ein Modell der Aktivierung der Abwehrreaktion durch NB-LRRs ist in einem Modell von CAPLAN *et al.* (2008) in Abbildung 11 beschrieben.

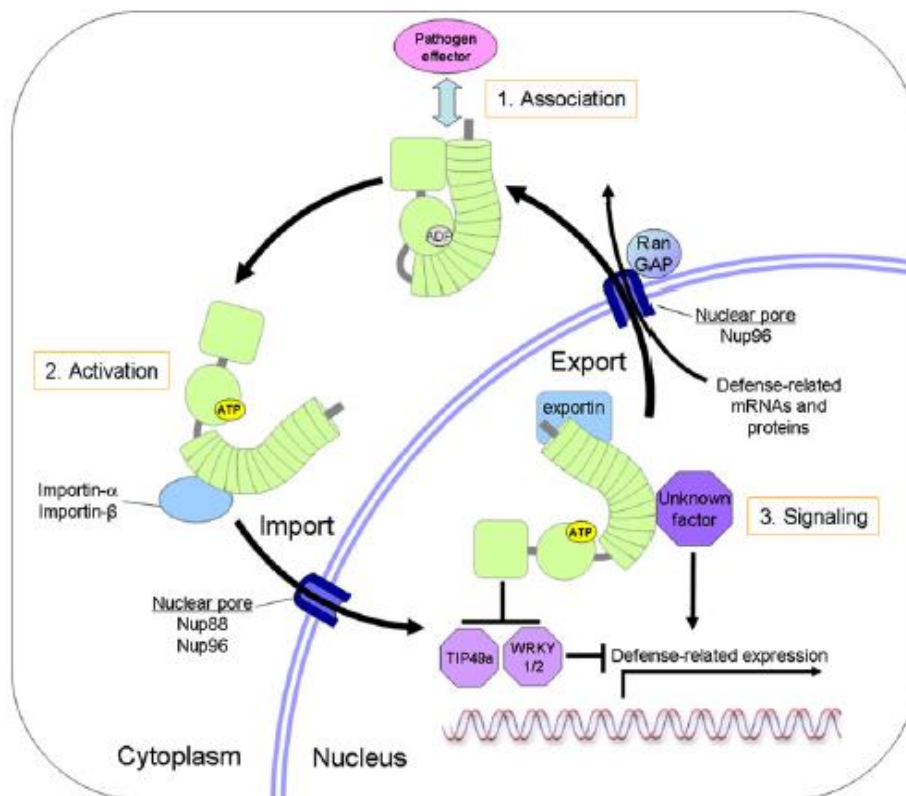


Abbildung 11: Modell der Aktivierung der Abwehrreaktion durch NB-LRRs (CAPLAN *et al.*, 2008). Dieses Modell zur Aktivierung der Abwehrreaktion beinhaltet drei Schritte, beginnend bei der Bindung des Effektors an den Immunrezeptor (1), gefolgt von seiner Aktivierung und den Transport in den Zellkern (2), wo die Regulierung der Expression von Resistenzgenen stattfindet (3) (CAPLAN *et al.*, 2008).

Nach der Bindung des Effektors an den Immunrezeptor (Abbildung 11/1), wird in einem zweiten Schritt der Immunrezeptor aktiviert. Dies erfolgt durch Konformationsänderungen und die Bindung von ATP an die NB-Domäne (Abbildung 11/2). In der dritten Phase agieren die aktivierten Immunrezeptoren im Zellkern (Abbildung 11/3) und aktivieren die Expression von Abwehrgenen (CAPLAN *et al.*, 2008). Aktivierte Rezeptoren starten Kaskaden von Ca^{2+} -abhängigen Proteinkinasen

(CPKs) und Mitogen-aktivierten Protein Kinasen (MAPK), sowie die Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) und Stickstoffmonoxid (NO). Die Akkumulation der Phytohormone Salicylsäure und Jasmonsäure sowie transkriptionelle Umprogrammierung der Abwehrgene führen zu einem programmierten Zelltod (PCD) (Abbildung 8, Cui *et al.*, 2014). In vielen Fällen ist Salicylsäure für die Resistenz gegen biotrophe Erreger von Bedeutung, wohingegen Jasmonsäure und Ethylen für die Abwehr nekrotropher Pathogene wichtig ist (DOU & ZHOU, 2012). Durch eine hohe Spezifität in der Erkennung von Effektorproteinen kann bereits in frühen Stadien einer Infektion die Abwehrreaktion initiiert werden (TSUDA & KATAGIRI, 2010).

1.3.3. Rolle und Eigenschaften von Effektorproteinen in der Wirt-Pathogen-Interaktion

Wie bereits zuvor beschrieben, nehmen Effektoren eine wichtige Rolle in der Wirt-Pathogen-Interaktion ein. Zur Klärung des Begriffs „Effektor“ kann festgehalten werden, dass als Effektor jedes sekretierte Molekül angesehen wird, welches die Interaktion zwischen dem Pathogen und seinem Wirt moduliert (PRESTI *et al.*, 2015). Pathogene sekretieren Effektoren in den Apoplasten oder das Cytoplasma des Wirts, wo sie wirksam werden und die Wirtsphysiologie so verändern, dass eine Vermehrung des Pathogenes möglich ist (DE JONG *et al.*, 2011).

Die Pflanze-Pathogen-Interaktion, besonders die mit Beteiligung biotropher Erreger, wird geleitet durch die spezifische Interaktion zwischen *avr* (Avirulenz) Genloci des Pathogenes (Effektoren) und den Allelen des korrespondierenden pflanzlichen Resistenzlokus (*R*). Sind sowohl *avr* als auch *R* in Wirt und Pathogen vorhanden, kommt es zu einer Resistenzreaktion. Ist einer beider Faktoren inaktiv oder nicht vorhanden, kommt es zur Infektion und Krankheitsausprägung (DANGL & JONES, 2001; THOMMA *et al.*, 2011).

Das Set an Effektoren, das in dem Genom eines bestimmten Erregers kodiert ist, kann stark variieren. Beispielsweise haben Studien bakterieller Phytopathogene ergeben, dass zwischen 20 und 30 Effektoren kodiert werden (DODDS & RATHJEN, 2010). Dahingegen werden von dem pilzlichen Schaderreger *Phytophthora infestans* 563 Effektoren im Genom kodiert (DODDS & RATHJEN, 2010). Dieser enorme Unterschied im Repertoire der Effektorproteine zwischen Bakterien und Eukaryoten kann ein Hinweis sein, dass eukaryotische Pathogene beispielsweise hoch spezialisierte Strategien in der Nährstoffgewinnung haben und somit diverse Effektoren mit verschiedenen Funktionen benötigen (DODDS & RATHJEN, 2010). Im Allgemeinen werden die Effektoren erst nach dem Kontakt mit der Pflanze exprimiert. Ihr Expressionsprofil ist stark abhängig vom Infektionsstadium und vom infizierten Zelltyp (OKMEN & DOEHLEMANN, 2014).

Den Effektorproteinen werden eine Vielzahl von Eigenschaften zugeschrieben, die allerdings nicht allgemein gültig sind, da es viele bekannte Effektoren gibt, die den Charakteristika nicht entsprechen (SPERSCHNEIDER *et al.*, 2015).

In den meisten Fällen werden Effektorproteine konventionell über die Route des endoplasmatischen Retikulums und des Golgi-Apparates sekretiert. Um in diesen Sekretionsweg eintreten zu können, haben die Effektoren ein N-terminales Sekretionssignal (PRESTI *et al.*, 2015). Das gesamte Sekretom, also die Gesamtheit aller vorhergesagten sekretierten Proteine, der meisten Arten macht zwischen 5 – 10 % des gesamten Proteoms aus (PRESTI *et al.*, 2015). In den meisten Fällen werden Effektorproteine als kleine sekretierte Proteine definiert, die eine Größe von 300 Aminosäuren nicht überschreiten, allerdings sind auch in einigen Fällen größere Proteine als Effektor wirksam (GAN *et al.*, 2013; PRESTI *et al.*, 2015). Viele der Effektorproteine sind Cysteinereich (GAN *et al.*, 2013), sodass ihre Tertiärstruktur durch Disulfidbrücken stabilisiert wird. Auf diese Weise sind sie widerstandsfähiger gegen die harschen Bedingungen im Apoplasten (PRESTI *et al.*, 2015). Allerdings sind auch diese Kriterien nicht ohne Ausnahmen anwendbar, sodass nicht alle kleinen, Cysteinereichen Proteine als Effektor wirken müssen, ebenso sind im Umkehrschluss nicht alle Effektoren kleine, Cysteinereiche Proteine (SPERSCHNEIDER *et al.*, 2015). Ein weiteres Kriterium, das häufig zur Vorhersage von Effektoren angewendet wird, ist, dass keine Orthologe außerhalb des Genus vorgefunden werden (VAN DE WOUW & HOWLETT, 2011); aber auch hier sind Ausnahmen bekannt, in denen konservierte, funktionelle Domänen Teil der Effektorproteine sind (PRESTI *et al.*, 2015). Zum Beispiel haben Effektoren von Oomyceten charakteristischer Weise ein internes Aminosäuremotiv, bestehend aus Arginin-X-Leucin-Arginin (RXLR, wobei X eine beliebige Aminosäure darstellt), welches für den Transport in die Pflanzenzelle notwendig ist (DODDS & RATHJEN, 2010). Die Effektoren werden aufgrund ihres Wirkortes in zwei Klassen eingeteilt. Hierbei handelt es sich um die apoplastischen und cytoplasmatischen Effektoren (KAMOUN, 2006). Eine Übersicht über bisher angewendete Kriterien zur Bestimmung von Effektorkandidaten mit Beispielen aus Forschungsartikeln ist der Abbildung 12 zu entnehmen.

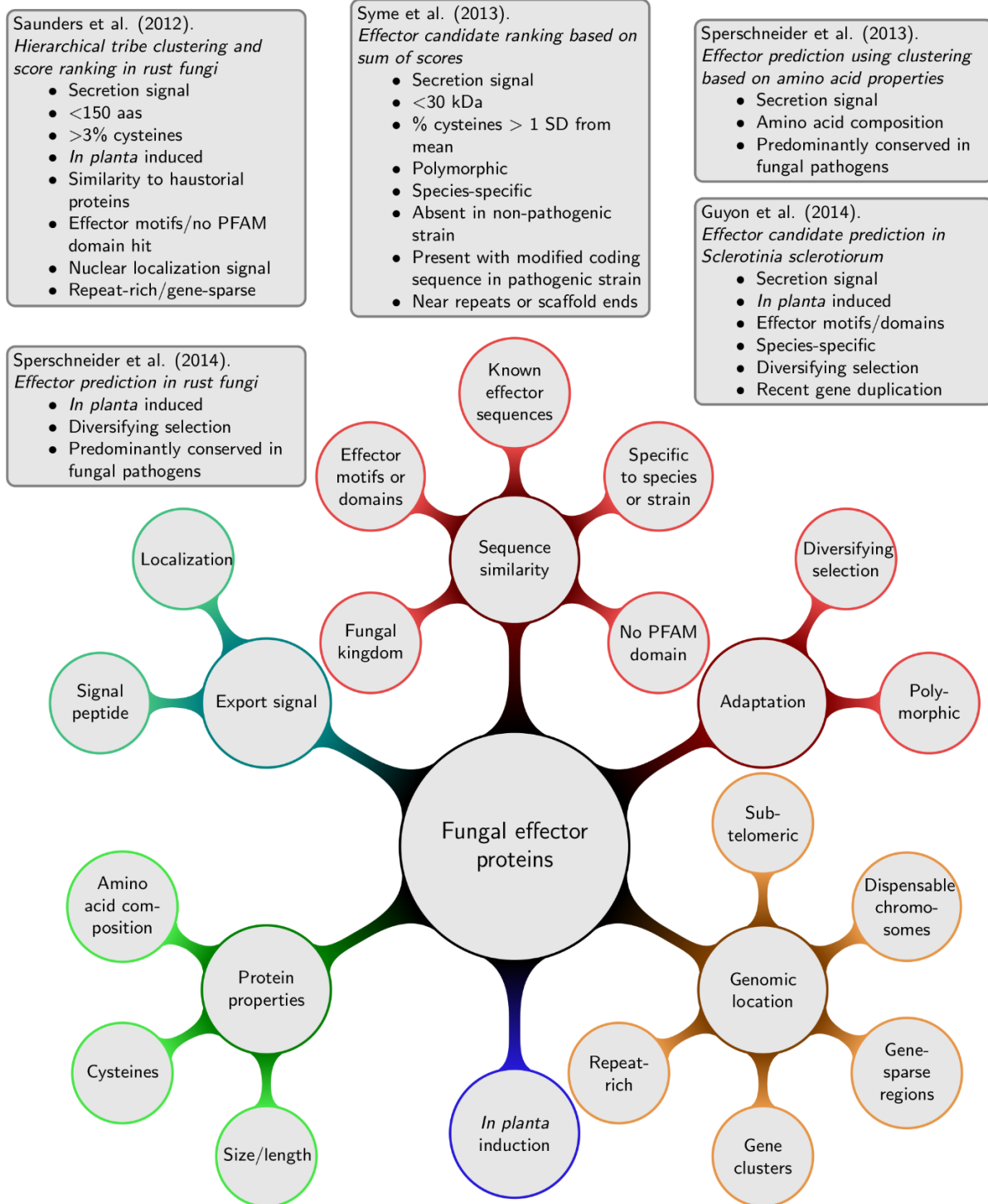


Abbildung 12: Exemplarische Darstellung von Kriterien zur Vorhersage von pilzlichen Effektoren und Beispiele für ihre Anwendung (SPERSCHNEIDER *et al.*, 2015).

Die zuvor beschriebenen und in Abbildung 12 zusammengefassten Kriterien können bioinformatisch genutzt werden, um anhand vorhandener Sequenzinformationen putative Effektoren zu bestimmen. Durch die Kombination verschiedener Algorithmen können Effektorkandidaten in einer Kollektion von Sequenzdaten vorhergesagt werden. Heutzutage sind einige Tools zur Sequenzanalyse online frei verfügbar. Die Bestimmung von N-terminalen

Signalpeptiden ist mit den Onlinesoftware SignalP (NIELSEN *et al.*, 1997; NORDAHL PETERSEN *et al.*, 2011) und Phobius (KÄLL *et al.*, 2007) möglich. Die Bestimmung der Anzahl von Disulfidbrücken in einer Aminosäuresequenz kann mit dem DISULFIND-Webserver, entwickelt von CERONI *et al.* (2006), durchgeführt werden. Ebenso kann eine bestimmte Sequenz auf das Vorhandensein funktionaler Domänen untersucht werden. Dies kann mit dem Webserver PS_SCAN, bereitgestellt von der Health Protection Agency UK, online zu erreichen unter http://www.hpa-bioinfotools.org.uk/cgi-bin/ps_scan/ps_scanCGI.pl, durchgeführt werden. Eine abschließende Überprüfung der vorselektierten Effektorkandidaten kann mittels des Webserver EffectorP (SPERSCHNEIDER *et al.*, 2016) erfolgen. Es handelt sich bei dieser Software um ein Programm, das die Unterscheidung von pilzlichen Effektorproteinen zu sekretierten Proteinen des Pilzes in der Interaktion von pflanzenpathogenen Pilzen mit der Pflanze ermöglicht.

Eine Vorhersage von Effektorkandidaten ist in den meisten Fällen nicht einfach, da neben den zuvor aufgelisteten Regeln ebenso viele Ausnahmen bestehen. Das einzig universelle Merkmal, das allen pilzlichen Effektoren bisher zugeschrieben wurde, ist die Sekretion in die Wirtszelle sowie die differentielle Expression *in planta* während der Infektion (SPERSCHNEIDER *et al.*, 2015).

Bei der Kollektion an Effektorproteinen eines Organismus handelt es sich keinesfalls um ein feststehendes Repertoire an Proteinen. Auch Effektoren unterliegen der evolutionären Entwicklung. Sie müssen einen Kompromiss schaffen zwischen einer optimierten Infektion und der Möglichkeit, einer Erkennung durch das Immunsystem der Pflanze zu entgehen. Die Fitness eines Pathogenes baut auf lange Sicht auf die Entwicklung neuer Effektoren (PRESTI *et al.*, 2015).

1.4. „Omics“ in der Kartoffelforschung

Der Begriff „Omics“ stammt von dem lateinischen Wort *ome*, was so viel bedeutet wie „Masse“ oder „Viele“ (LAY JR. *et al.*, 2006). Im Allgemeinen umfassen die „Omics“-Studien die Untersuchung einer großen Anzahl an verschiedenen Parametern, wie typischer Weise den Genen (*Genomics*), der Transkripte (*Transcriptomics*), der Proteine (*Proteomics*), der Lipide (*Lipidomics*) oder der Metabolite (*Metabolomics*). Die Hauptfelder der „Omics“-Studien bilden *Genomics*, *Transcriptomics*, *Proteomics* und *Metabolomics* (LAY JR. *et al.*, 2006), welche zusammengefasst werden unter dem Begriff *omics cascade* (DETTMER *et al.*, 2007). *Genomics* nutzt die Informationen der DNA-Sequenz, um die Struktur und Funktionen von Genen zu verstehen. *Transcriptomics* nutzt verschiedene Methoden der Messung von RNA, wie Microarrays oder RNAseq, um Informationen über die Regulation und Kinetik der Genexpression zu erhalten. In der *Proteomic* finden diverse biochemische Methoden, aber hauptsächlich die Massenspektrometrie (MS), Anwendung. Sie dienen der Identifikation von Proteinen, ebenso der Lokalisation, Menge und Fluss in verschiedenen metabolischen Stoffwechselwegen (HOLLYWOOD *et al.*, 2006). Diese Kaskade bildet den Kern der Systembiologie, deren Ziel es ist, große Mengen molekularer Beobachtungen zu

machen, um so beschreibende Modelle zu entwickeln, welche die molekularen mit makroskopischen Beobachtungen oder Verhaltensweisen verbinden (HEGEMAN, 2011; KELL, 2006).

Diese Technologien fanden und finden ebenfalls in der Kartoffelforschung ihre Anwendung, was im Folgenden näher betrachtet werden soll.

1.4.1. *Genomics* – Genanalysen an Kartoffeln

In der Genomik steht die Untersuchung des Genoms im Zentrum des Interesses. Das Genom umfasst die gesamte Erbinformation einer Zelle oder eines Gewebes.

Die Sequenzierung von Kulturpflanzen wurde immer mehr zur Routine, da eine Reduktion der Kosten stattfand und ein hoher Durchsatz möglich war, bedingt durch den Fortschritt der Sequenzierungstechnologien (SHARMA *et al.*, 2013). Erste Sequenzierungen ganzer Pflanzengenome wurden im Jahr 2000 von *Arabidopsis thaliana* durch die *Arabidopsis Genome Initiative 2000* vorgenommen, gefolgt von Reis im Jahr 2005 durch das *International Rice Genome Sequencing Project 2005* (SHARMA *et al.*, 2013). Im Jahr 2011 folgte die Sequenzierung von Kartoffel durch das *Potato Genome Sequencing Consortium*. Es wurde die doppelt monoploide *Solanum tuberosum* Gruppe Phureja, Klon DM1-3 516 R44, sequenziert (THE POTATO GENOME SEQUENCING CONSORTIUM 2011; SHARMA *et al.*, 2013). Es wurden das Kerngenom und die Genome der Organellen unter Nutzung von zwei *Next Generation Sequencing* Plattformen sequenziert. Es wurden so 96,6 Gb Rohsequenzen generiert. Die finale Genomassemblierung ergab 727 Mb, von denen 93,9 % eine fortlaufende Sequenz ohne Lücken war. Neunzig Prozent der Assemblierung entfielen auf 443 *Scaffolds* mit einer Länge von mehr als 349 kb. Die geschätzte Genomgröße von 844 Mb lag somit 117 Mb über dem erreichten Wert der Assemblierung (THE POTATO GENOME SEQUENCING CONSORTIUM, 2011). Basierend auf diesen Sequenzen wurden 39.031 Gene vorhergesagt (GÁLVEZ *et al.*, 2017). Im Jahr 2013 konstruierten SHARMA *et al.* die erste physikalische Karte mit 12 chromosomalen Pseudomolekülen, korrespondierend zu den 12 Kartoffelchromosomen.

Die Verfügbarkeit von vollständigen Genomsequenzen vieler Organismen und die Identifikation ihrer Gene führten zu einem Wechsel von der reinen Sequenzanalyse hin zur Funktionsanalyse von Genen (HENIKOFF & COMAI, 2003).

1.4.2. *Transcriptomics* – Expressionsanalysen an Kartoffeln

Transcriptomics beschreibt die Studie eines Transkriptoms, welches von dem Genom einer einzelnen Zelle oder einer Population von Zellen eines bestimmten Organismus zu einem bestimmten Zeitpunkt produziert wird. Als Transkriptom definiert man das gesamte Set von Transkripten oder ein spezifisches Subset, wie beispielsweise mRNA (*messenger RNA*) (LI, 2011). Den Begriff Transkriptom nutzte und prägte erstmals Charles Auffray im Jahr 1996 (PIÉTU *et al.*,

1999). Bereits im Jahr 1997 wurde der Begriff erstmals für wissenschaftliche Veröffentlichungen über Hefe verwendet (VELCULESCU *et al.*, 1997). Hier beschreiben VELCULESCU *et al.* (1997) das Transkriptom als eine dynamische Verbindung zwischen dem eher statischen Genom und den ausgeprägten Eigenschaften. Ebenso beschrieben sie, dass das Transkriptom internen als auch externen Einflussfaktoren unterliegt.

Es fand eine stetige Entwicklung in der Anwendung der Transkriptomanalyse statt, ebenso sind verschiedene Technologien, wie Microarrays und RNAseq verfügbar, wobei sich RNAseq zur Methode der Wahl entwickelte (MCGETTIGAN, 2012). RNAseq ist eine Methode, welche die Hochdurchsatz-Sequenzierungstechnologien nutzt, um den RNA-Gehalt und die Zusammensetzung der RNA in einer definierten Probe zu charakterisieren. Dieser Ansatz ist auch bekannt als *whole-transcriptome shotgun sequencing* (WOLF, 2013). In den meisten Fällen werden RNAseq Analysen mit aufgereinigter und geschnittener RNA durchgeführt. Die RNA wird in cDNA konvertiert und auf Hochdurchsatz Plattformen wie Illumina GA/ HiSeq, SOLiD oder Roche 454 sequenziert. Hierbei werden Millionen von kurzen Sequenz-Reads (25 – 300 bp) von einem Ende der cDNA beginnend oder von beiden Seiten ausgehend (*paired-end*) generiert (OSHLACK *et al.*, 2010). Vorteil der Nutzung des *paired-end* Modus in der Sequenzierung ist, dass eine Verknüpfung der Sequenzstücke zu Contigs und Sequenzgerüsten (*Scaffolds*) möglich ist (SCHIELSKY *et al.*, 2012). Ein großer Vorteil von RNAseq gegenüber anderen Methoden der Expressionsanalyse wie beispielsweise Chips und Arrays, ist, dass nicht nur die auf dem Chip/Array repräsentierten Sequenzen gefunden werden können; es besteht die Möglichkeit neue Transkripte zu identifizieren (WANG *et al.*, 2009). Ein weiterer Vorteil von RNAseq gegenüber hybridisierungsbasierten Techniken ist, dass eine höhere Auflösung erreicht werden kann. Mit einer ausreichenden Abdeckung des Transkriptoms kann eine breitere Spannbreite an Expressionswerten abgedeckt werden (WOLF, 2013).

Transcriptomics als Werkzeug der Genexpressionsanalyse findet auch in der Kartoffelforschung seine Anwendung. Da die meisten Kartoffeln autotetraploid sind, wird angenommen, dass auch das Kartoffeltranskriptom hoch komplex ist (LI, 2011). Das Kartoffeltranskriptom und seine Änderung unter verschiedenen Stressfaktoren oder in verschiedenen Entwicklungsstadien bildete den Fokus vieler Studien, von denen einige wenige im Nachfolgenden vorgestellt werden.

Im Jahr 2011 veröffentlichten MASSA *et al.* eine Referenz für das Kartoffeltranskriptom. Sie analysierten hierfür die doppelt monoploide *Solanum tuberosum* Group Phureja Klon DM1-3 516R44, für welche die Genomsequenz bereits vorlag. In dieser Studie wurden 32 Gewebe und Wachstumsbedingungen untersucht. Es war die Detektion und Quantifizierung von über 22.000 Genen aus mehr als 550 Millionen RNAseq Reads möglich.

Ebenfalls einen RNAseq-Ansatz verwendeten ZHANG *et al.* (2014). Sie analysierten Blattgewebe der Kartoffelsorte 'Longshu3' unter Trockenstress. Die Auswertung von 89.965.482 RNAseq-Reads

fürte zur Identifikation von 842 Kandidatengen, welche bei Trockenstress hochreguliert waren, und 494 herunterregulierten Kandidatengen.

Aber auch hybridisierungsbasierte Ansätze finden in der Transkriptomanalyse von Kartoffeln ihre Anwendung. Das Institut für „Genomic Research“ entwickelte einen cDNA Microarray, basierend auf ungefähr 12.000 Kartoffelklonen. Dieser Microarray wurde schon in mehr als 50 Studien für die Untersuchung der Genexpression in der Kartoffelentwicklung und unter biotischen und abiotischen Stressbedingungen genutzt (MASSA *et al.*, 2011).

1.4.3. *Proteomics* – Analysen der Proteinzusammensetzung in Kartoffeln

Das Proteom beschreibt die Sammlung aller Proteine, die von einer Zelle oder einem Gewebe zu einem bestimmten Zeitpunkt exprimiert werden (BERNOT, 2005). Mit Hilfe der Proteomik ist es möglich, Proteine zu identifizieren, quantifizieren, posttranslationale Modifikationen und Interaktionspartner zu bestimmen und stellt damit eine essentielle Quelle für Informationen über biologische Systeme dar (BAGINSKY, 2009).

Der Begriff des Proteoms wurde erstmals bei einer Konferenz über 2-dimensionale Gelelektrophorese in Siena (Italien) im Jahr 1994 verwendet, als einen effizienten Weg das gesamte Set potentieller Proteine eines spezifischen Genoms zu beschreiben (PATTERSON & AEBERSOLD, 2003). Zu Beginn der Proteomik bildete die 2-dimensionale Gelelektrophorese das Zentrum der Analysen. Diese Technik wurde Mitte der 1970er Jahre entwickelt und ermöglichte die Visualisierung von hunderten von Proteinspots aus komplexen Proteinmischungen, war aber limitiert durch das Fehlen von schnellen, sensitiven Proteinidentifikationsprogrammen. Mit der Entwicklung der Massenspektrometrie war die Möglichkeit gegeben, intakte Proteine und Peptide zu analysieren (HEGEMAN, 2011). Die Entwicklung von nicht-Gelbasierten Techniken, wie die *shotgun Proteomic* stellt ein effektives Werkzeug dar, um im großen Maßstab die Proteinexpression und Charakterisierung in komplexen biologischen Proben vornehmen zu können (ZHU *et al.*, 2009). Die Proteinanalyse in Pflanzen war zu Beginn größtenteils ein qualitativer Ansatz zur Beschreibung von Proteinprofilen in verschiedenen Geweben und Organellen unter Nutzung der 2-dimensionalen Gelelektrophorese (VANDERSCHUREN *et al.*, 2013). Durch die Verfügbarkeit der Massenspektrometrie und der Hochdurchsatzanalyse wurde es möglich, Proteine zu quantifizieren. Auch wenn die MS-basierten Analysen nur eine bestimmte dynamische Bandbreite abdecken und nicht alle Proteine und Proteinmodifikationen einer Zelle widerspiegeln, ist die Pflanzenproteomik nicht länger nur beschreibend, sondern kann identifizierte Proteine relativ oder absolut quantifizieren (SCHULZE & USADEL, 2010).

Das Proteom ist ein hoch komplexes Netzwerk, das Zentrum vieler Untersuchungen war. Einige dieser Analysen sollen beispielhaft im Folgenden angeführt werden, um einige der bisher genutzten Möglichkeiten der Proteinanalyse in der Kartoffelforschung zu beleuchten. Die schnelle

technologische Entwicklung in der Proteomik und der Zugang zu vielen Genomsequenzinformationen bietet unvergleichbare Möglichkeiten in der differenziellen Proteomanalyse in Pflanzenproben (YANG *et al.*, 2011, SCHULZE & USADEL, 2010).

LEHESRANTA *et al.* (2005) publizierten eine Studie, in der sie die Proteome von Knollen verschiedener Kartoffelsorten, Landrassen und genetisch modifizierter (GM) Linien verglichen. In den Experimenten nutzen sie eine Kombination der 2-dimensionalen Gelelektrophorese und Massenspektrometrie. Sie waren in der Lage klare qualitative und quantitative Unterschiede in den Proteinmustern der Sorten und Landrassen zu identifizieren. Es zeigten 1.077 aus 1.111 analysierten Proteinspots signifikante Unterschiede.

Ein weiteres Beispiel für Proteinanalysen in Kartoffeln liefern CHAVES *et al.* (2009). Sie werteten Wundheilungsprozesse in Geweben der Kartoffelknolle aus. Sie verwendeten dormante Knollen der Kartoffelsorte Sorte 'Asterix'. Es wurde Gesamtprotein isoliert und mittels 2-dimensionaler Gelelektrophorese analysiert. Interessante Proteinspots wurden weitergehend mittels Massenspektrometrie untersucht. Die meist abundanten Proteine wurden identifiziert und funktionalen Gruppen zugeordnet.

Auch die Interaktion mit Pathogenen ist Gegenstand vieler Proteomanalysen. Ein Beispiel dafür geben ALI *et al.* (2014). Sie beschreiben eine quantitative Proteomanalyse in Kombination mit einer Transkriptomanalyse der kompatiblen und inkompatiblen Interaktion von Kartoffeln mit *Phytophthora infestans*. Es wurden zwei inkompatible Interaktionen sowie eine kompatible Interaktion in einem zeitlichen Verlauf (6 days post inoculation (dpi), 24 dpi, 72 dpi) untersucht. Für die transkriptionelle Untersuchung der Proben wurde ein genomweiter Microarray verwendet und die Proteomanalyse fand mit einem *shotgun* Ansatz statt, um die quantitativen Änderungen der apoplastischen Proteinfraction zu bestimmen. Über alle drei Zeitpunkte hinweg konnten insgesamt 1.639 Proteine identifiziert werden, von denen 1.075 zu mindestens einem Zeitpunkt differentiell abundant waren. Die quantitativen Unterschiede auf Proteomebene konnten zu 50 % auch auf Transkriptebene bestätigt werden.

1.5. Zielsetzung der Arbeit

Das hier bearbeitete Forschungsprojekt war Teil eines Verbundprojekts zur Entwicklung diagnostischer Marker für eine Ressourcen-schonende Kartoffelstärkeproduktion (DiRK), welches von der Fachagentur Nachwachsende Rohstoffe e. V. (FNR) gefördert wurde. Gerade in der Züchtung von Stärkekartoffeln sind Programme zur Erzeugung resistenter Sorten von Nöten, da hier nur ein geringer Teil resistenter Sorten vorhanden ist und oftmals die Resistenzen gegen die verschiedenen Pathotypen von *S. endobioticum* nicht gemeinsam vorliegen. Somit sind jegliche Informationen zur Identifikation von Resistenzquellen oder zum Befallsmechanismus hilfreich zur Entwicklung neuer Sorten. Gerade Informationen auf Sequenzebene sind sehr wichtig, um die

Marker-gestützte Selektion resistenter Kartoffelgenotypen zu ermöglichen. Dies würde zu einer enormen Erleichterung der Züchtung führen und die Entwicklung neuer Sorten stark verkürzen.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit soll die Charakterisierung der Interaktion von *Solanum tuberosum* mit *Synchytrium endobioticum* in anfälligen und resistenten Kartoffelgenotypen sein, sowie die weiterführende Beschreibung des Erregers basierend auf Sequenzdaten.

Bei *Synchytrium endobioticum* handelt es sich um einen pilzlichen Erreger mit einigen Besonderheiten in seiner Biologie, was ihn somit zu einem interessanten Pathosystem macht und von anderen Systemen unterscheidet. Hierbei handelt es sich beispielsweise um das fehlende Myzel, die sehr kleinen Zoosporen, welche eine frühe Detektion erschweren oder seine strikt obligat biotrophe Lebensweise.

Bisher waren keine Sequenzinformationen von *Synchytrium endobioticum* zugänglich, die eine genetische Charakterisierung ermöglichen würden. Eines der Ziele dieses Projekts sollte die Identifikation von ersten Sequenzen des Erregers durch Nutzung von Transkriptomdaten infizierter Kartoffelgewebe sein. Es wird davon ausgegangen, dass die Transkriptomanalyse mittels RNAseq es ermöglicht, unbekannte Sequenzen des Erregers von Kartoffelsequenzen zu trennen und weitergehend zu analysieren. Ein Augenmerk sollte hierbei auf die Vorhersage von Effektorproteinen gelegt werden, um die Interaktion von *Synchytrium* mit anfälligen Kartoffelgenotypen zu beleuchten. Es wird davon ausgegangen, dass seitens des Erregers Proteine vorhanden sind, die als Effektoren agieren und den Befall anfälliger Kartoffeln ermöglichen. Andererseits löst eine Erkennung dieser Proteine durch Resistenzfaktoren eine Abwehrreaktion in resistenten Genotypen aus. Eine Funktionsanalyse soll einen möglichen Einfluss dieser Proteine auf die Immunantwort der Wirtspflanze identifizieren. Über einen *shotgun* Proteomik – Ansatz sollen Effektorproteine in infizierten Geweben nachgewiesen, sowie differentiell abundante Kartoffelproteine in kompatiblen und inkompatiblen Interaktionen von *Synchytrium endobioticum* mit Kartoffel identifiziert werden.

Daraus lassen sich folgende Arbeitshypothesen ableiten:

- (1) Es ist möglich, erste Sequenzen von *Synchytrium endobioticum* aus Transkriptomdaten, basierend auf einer RNAseq-Analyse infizierter Kartoffelknollen, bioinformatisch zu identifizieren.
- (2) Für eine erfolgreiche Infektion der Wirtspflanze sekretiert *Synchytrium endobioticum* Effektorproteine in die Pflanzenzelle, welche in den Sequenzdaten bioinformatisch vorhergesagt werden können.
- (3) Die identifizierten Effektorkandidaten haben einen Einfluss auf die Immunantwort der Wirtszelle und erhöhen die Anfälligkeit der Pflanze gegenüber Infektionen, das heißt die Pathogenabwehr wird reduziert.

- (4) Effektorkandidaten sind auf Proteinebene in einer *shotgun* Analyse in infizierten Geweben nachweisbar.
- (5) Mit Hilfe der *shotgun* Proteomik können die kompatible und inkompatible Interaktion zwischen *S. endobioticum* und Kartoffeln näher charakterisiert werden. In einer kompatiblen Interaktion sind Zellzyklusproteine nachweisbar mit Beteiligung an der Ausbildung von Wucherungen. In resistenten Genotypen sind Proteine mit Beteiligung an der ETI nachweisbar, sodass der Resistenzmechanismus von Kartoffeln gegen Kartoffelkrebs näher beleuchtet werden kann.

2. Material und Methoden

2.1. Probenmaterial: Pilz, Pflanzen, Bakterien

2.1.1. *Synchytrium endobioticum*

Da es sich bei *Synchytrium endobioticum* um einen obligat biotrophen Erreger handelt, lag Probenmaterial des Pilzes in Form von infizierten Kartoffelknollen vor. Es wurden die Pathotypen 1, 2, 6, 8 und 18 verwendet. Diese Materialien wurden vom Julius Kühn-Institut (Kleinmachnow) bereitgestellt.

2.1.2. *Solanum tuberosum* L.

Es wurde die tetraploide Sorte 'Karolin' (NORIKA Nordring-Kartoffelzucht- und Vermehrungs-GmbH, Sanitz; ohne derzeitige Zulassung) verwendet, welche als resistent gegen die Pathotypen 1, 2, 6 und 18 eingestuft wurde. Die tetraploide Sorte 'Tomensa' (Nordkartoffel Zuchtgesellschaft, Ebstorf; zugelassen seit 1989) wurde als anfällig gegen alle vier Pathotypen eingestuft. Es wurden ausschließlich Kartoffelknollen verwendet. Die inokulierten Proben wurden zwischen 14 dpi und 16 dpi bei einer Temperatur von 15 °C bis 17 °C und hoher Luftfeuchtigkeit inkubiert.

Das Probenmaterial, welches mit *Synchytrium endobioticum* inokuliert wurde, sowie die zugehörigen Kontrollinokulationen (mit Wasser inokulierte Proben), wurden vom Julius Kühn-Institut (Kleinmachnow) bereitgestellt. Eine exemplarische Darstellung des Probenmaterials wurde in Abbildung 13 gezeigt.

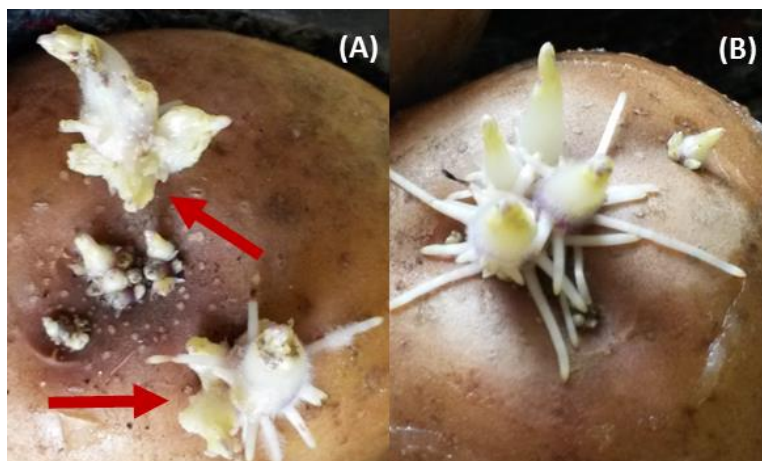


Abbildung 13: Exemplarische Darstellung infizierter Kartoffelknollen. Es handelt sich um Knollen der Sorte 'Tomensa' 14 dpi nach Inokulation mit *S. endobioticum* Pathotyp 1 (A), sowie die entsprechende Kontrolle (B). Rote Pfeile kennzeichnen die bereits sichtbaren Wucherungen des auskeimenden Sprosses.

Das Probenmaterial wurde nach einer modifizierten Glynne-Lemmerzahl-Methode (GLYNNE, 1925; LEMMERZAHL, 1930), wie sie in LANGERFELD und STACHEWICZ (1994), sowie BALLVORA *et al.* (2011) beschrieben wurde, hergestellt.

2.1.3. *Nicotiana benthamiana*

Es wurden circa fünf bis acht Wochen alte Gewächshauspflanzen von *Nicotiana benthamiana* verwendet. Die Anzucht fand statt in Einheitserde® Typ P. Die Gewächshausbedingungen bei der Anzucht und Kultur der Pflanzen betragen 18 °C Heiztemperatur, 20 °C Lüftungstemperatur und 13 °C Kühltemperatur.

2.1.4. *Agrobacterium tumefaciens*

Für die transienten Transformationen von Tabakblättern wurde *Agrobacterium tumefaciens* Stamm GV3101 verwendet. Es handelte sich hierbei um einen Stamm, der auf dem chromosomalen Hintergrund des *Agrobacterium tumefaciens* Stamms C58 basierte und zur Selektion eine Rifampicin-Resistenz trug.

2.1.5. *Escherichia coli* (*E. coli*)

Für die Vermehrung von Plasmiden wurden chemisch kompetente Stellar® Competent Cells der Firma Clontech (Takara Bio USA Inc., USA) verwendet. Diese Bakterien waren optimiert für eine Transformation von Plasmiden nach einer In-Fusion®-Klonierung. Es handelte sich um den *E. coli* HST08 Stamm (Genotyp *F*–, *endA1*, *supE44*, *thi-1*, *recA1*, *relA1*, *gyrA96*, *phoA*, $\Phi 80d$ *lacZΔ M15*, $\Delta(lacZYA-argF)$ U169, $\Delta(mrr-hsdRMS-mcrBC)$, $\Delta mcrA$, λ –) mit hoher Transformationseffizienz. Diese Zellen waren Bestandteil des In-Fusion® HD Cloning Kits (Clontech, Takara Bio USA Inc., USA).

2.2. Vektoren

2.2.1. Expressionsvektor zur Effektoranalyse

Für die funktionale Untersuchung der Effektorkandidaten, wurden die entsprechenden Sequenzen in den Expressionsvektor pRedU10-35 S (Abbildung A 1) kloniert. Dieser Vektor wurde vom DCS DNA Cloning Service (Hamburg, Deutschland) hergestellt. Die Expression der Zielgene fand unter der Kontrolle eines 35S-Promotors statt. Als Reportergen diente das *red fluorescent protein* (DsRed) unter der Kontrolle eines Ubiquitin-Promotors. Zur Plasmidselektion diente eine Spectinomycin-Resistenz.

2.2.2. *Tobacco rattle virus* (TRV)

Bei TRV, dem *Tobacco rattle virus*, handelt es sich um einen Plusstrang RNA-Virus mit einem zweiteiligen Genom. Proteine, welche von der RNA 1 kodiert werden, reichen für die Replikation und die Bewegung innerhalb der Wirtspflanze aus; RNA 2 wird für die Bildung der Viruspartikel benötigt (Liu *et al.*, 2002). Die Bildung der Viruspartikel war an die Expression des Reportergens *green fluorescent protein* (GFP) gekoppelt.

2.3. Publierte Sequenzdaten – Referenzdatensätze zur Sequenzanalyse

2.3.1. Nukleinsäuresequenzen

2.3.1.1 *Solanum tuberosum*: Transkriptom- und Genomdaten

Als Referenzdatensätze wurde die vom *Potato Genome Sequencing Consortium* (PGSC) veröffentlichten Transkriptsequenzen genutzt (PGSC, <http://solanaceae.plantbiology.msu>). Sequenziert wurden zwei Kartoffelarten, die heterozygote, diploide *S. tuberosum* Gruppe Tuberosum cultivar RH89-039-16 (RH), sowie die aufgedoppelte monoploide *S. tuberosum* Gruppe Phureja, wobei es sich um den Klon DM1-3 (DM) handelte. Es wurde die Version PGSC_DM_v3.4_transcript-update verwendet. Es handelte sich hierbei um eine fasta-Datei mit 56.218 Transkriptsequenzen, welche die untranslatierten Regionen und Exons umfassten.

Ebenso wurden die veröffentlichten 39.031 Genomsequenzen (PGSC_DM_v3.4_gene.fasta) genutzt (PGSC, <http://solanaceae.plantbiology.msu>).

2.3.1.2 *Solanum lycopersicum* – Genomsequenzen

Für Sequenzanalysen wurden ebenfalls die öffentlich zur Verfügung stehenden 30.868 Genomsequenzen von *Solanum lycopersicum* 'Heinz 1706' genutzt. Die Sequenzen waren unter https://solgenomics.net/organism/Solanum_lycopersicum/genome zugänglich.

2.3.1.3 *Batrachochytrium dendrobatidis* – Genom- und Transkriptomdaten

Es wurde das Genom des diploiden *Batrachochytrium dendrobatidis* Stamms JEL423 mit 7,4x Abdeckung in einem *whole genome shotgun* Ansatz durch das Broad Institut (Cambridge, USA) sequenziert. Auf genomischer Ebene standen 14.695 identifizierte Gene als Referenz zur Verfügung, auf Transkriptomebene waren es 8.819 Sequenzen (Broad Institute, <ftp://ftp.broadinstitute.org>).

2.3.2. Aminosäuresequenzen

2.3.2.1 *Solanum tuberosum* - Sequenzsammlung zur Proteomanalyse

Für die Auswertung der *shotgun* Proteomanalyse wurde eine Datenbank genutzt, welche in der Abteilung Pflanzenproteomik der Leibniz Universität Hannover etabliert war. Es handelte sich hierbei um eine Kollektion von 196.219 Aminosäuresequenzen von *S. tuberosum*, die online beim *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) hinterlegt waren.

2.3.2.2 *Batrachochytrium dendrobatidis* – Proteinsequenzen

Es wurden die vom *Broad Institute* (Cambridge, USA) veröffentlichten Aminosäuresequenzen von *B. dendrobatidis* verwendet. Diese Proteinsammlung umfasste 8.818 Aminosäuresequenzen (Broad Institute, ftp://ftp.broadinstitute.org).

2.4. Sequenzierungen - Transkriptomdaten aus RNAseq-Experimenten

2.4.1. Transkriptomdaten aus einer anfälligen, mit Pathotyp 18 infizierten Kartoffelsorte

Die Transkriptomdaten aus einer kompatiblen Interaktion zwischen *Synchytrium endobioticum* Pathotyp 18 (P18) und der Kartoffelsorte 'Tomensa' wurden 16 dpi erhoben. Die hochmolekulare RNA wurde für ein *whole-genome transcriptome sequencing* an Eurofins Genomics (Eurofins Genomics GmbH, Ebersberg, Deutschland) versendet. Die weitere Bearbeitung der RNA, wie die Erstellung der cDNA-Bibliotheken wurde von Eurofins Genomics durchgeführt. Die Sequenzierung fand auf einem Illumina HiSeq 2500 im *2-by-150 bp-paired end* Modus statt.

In einer weiteren Sequenzierung wurden die Proben analog zu den zuvor beschriebenen Proben vorbereitet. In diesem Fall wurde die Sequenzierung einer normalisierten cDNA-Bibliothek vorgenommen. Die Sequenzierung wurde von GATC Biotech AG (European Custom Sequencing Centre, Köln, Deutschland) durchgeführt. Es fand eine Illumina-Sequenzierung im *paired-end* Modus statt.

2.4.2. Transkriptomdaten aus einer mit *S. endobioticum* Pathotyp 1 inokulierten tetraploiden Nachkommenschaft

Es wurden Transkriptomdaten von Dr. Christiane Gebhardt (Max-Planck-Institut, Abteilung Pflanzenzüchtung und Genetik, Köln) zur Verfügung gestellt. Das verwendete Probenmaterial, auf dem die Sequenzdaten basierten, wurde in BALLVORA *et al.* (2011) beschrieben. Es wurden vier hoch resistente und vier hoch anfällige Genotypen für eine RNAseq-Analyse genutzt. Die Sequenzierung der Proben fand für die resistenten und anfälligen Proben (getrennt für inokulierte Proben und Kontrollen) gepoolt statt. Eine Übersicht der analysierten Proben und die erhaltenen Read-Zahlen in der Sequenzierung wurden in der Tabelle 1 zusammengefasst.

Tabelle 1: Zusammenfassung der Proben und der erzielten Read-Zahlen in der RNAseq-Analyse.

Probenpool	Anzahl der RNAseq-Reads			
	2 dpi inokuliert	7 dpi Kontrolle	14 dpi inokuliert	14 dpi Kontrolle
resistent	51.721.978	48.762.580	57.451.298	40.463.974
anfällig	63.730.168	43.339.138	85.464.868	54.490.222

2.5. Molekularbiologische Methoden

2.5.1. Isolierung von Nukleinsäuren

2.5.1.1 Extraktion von Ribonukleinsäuren (RNA) aus Pflanzengeweben

Zur Isolierung von RNA aus verschiedenen Geweben wurde das RNeasy® Plant Mini Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland) wie im Herstellerprotokoll angegeben angewendet. Es wurde je nach Verfügbarkeit bis zu 100 mg Pflanzenmaterial eingesetzt. Der Zellaufschluss fand in 2 mL-Reaktionsgefäßen mit drei Stahlkugeln (\varnothing 5 mm) für drei Minuten bei einer Frequenz von 25⁻⁵ im TissueLyser II (Qiagen, Hilden, Deutschland) statt. Für den Zellaufschluss des homogenisierten Materials wurde der Puffer RLT mit Zugabe von β -Mercaptoethanol (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland) verwendet. Die RNA wurde in einem Gesamtvolumen von 60 μ L Nuklease freiem Wasser eluiert.

Die aufgereinigte RNA wurde unter Nutzung des DNA-free™ DNA Removal Kits (Ambion, ThermoFisher Scientific Inc., USA) von möglicherweise verbliebener DNA laut Herstellerprotokoll gereinigt.

Zur Abschätzung der Qualität und Quantität der RNA wurde 1 μ L RNA mittels Agarosegelelektrophorese (1,5 % [w/v] Agarose) aufgetrennt und die Konzentration und Reinheit (A260/280, A260/230) mittels NanoDrop 2000 Spectrophotometer (ThermoFisher Scientific Inc., USA) bestimmt.

Die aufgereinigte RNA wurde bei -80 °C gelagert.

2.5.1.2 Aufreinigung von Desoxyribonukleinsäuren (DNA) aus Pflanzenmaterial

Für die Aufreinigung von DNA wurden 30 mg getrocknetes Pflanzenmaterial in 2 mL-Reaktionsgefäße eingewogen und mit drei Keramikkugeln (\varnothing 3 mm) für 2,5 Minuten bei einer Frequenz von 25⁻⁵ im TissueLyser II (Qiagen, Hilden, Deutschland) homogenisiert. Die Extraktion der DNA fand mittels DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland) nach Herstellerprotokoll statt. Die Konzentrations- und Reinheitsbestimmung der DNA wurde mittels NanoDrop 2000 Spectrophotometer (ThermoFisher Scientific Inc., USA) vorgenommen.

2.5.1.3 Plasmidaufreinigung

Für die Aufreinigung von Plasmid-DNA von *High-Copy*-Plasmiden aus *E. coli* wurde das NucleoSpin® Plasmid (No Lid) Kit (Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren, Deutschland) verwendet. Die Plasmide wurden laut Herstellerprotokoll mit optionalem Waschschrift aufgereinigt. Die Plasmid-DNA wurde in 50 μ L AE Puffer eluiert.

Die Plasmidkonzentration wurde anschließend mit einem NanoDrop 2000 Spectrophotometer (ThermoFisher Scientific Inc., USA) und mit Hilfe einer λ -DNA Standardreihe (10 ng, 20 ng, 40 ng, 60 ng, 80 ng und 100 ng) in einem Agarosegel (1,5 % [w/v]) bestimmt.

2.5.2. Polymerasekettenreaktion (PCR)

2.5.2.1 Primerdesign

Für die Entwicklung von Primersequenzen wurde der Webserver Primer3Plus, abrufbar unter <http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi/>, verwendet (UNTERGASSER *et al.*, 2007). Es wurden die voreingestellten Parameter zur Ableitung der Primersequenzen genutzt.

Die entsprechenden Primer wurden bei Microsynth The Swiss DNA Company (Microsynth AG, Lindau, Deutschland) synthetisiert.

2.5.2.2 Standardprotokoll der Polymerasekettenreaktion

Für die Amplifikation von Nukleinsäuresequenzen wurde ein Standardreaktionsmix für die PCR, wie in Tabelle 2 aufgelistet, verwendet. Es wurde die DCSPol DNA Polymerase (DCS, DNA Cloning Service, Hamburg, Deutschland) verwendet.

Tabelle 2: Zusammensetzung des Standardreaktionsmixes in der PCR.

Reagenz	Stammlösung	eingesetztes Volumen	pro Reaktion enthalten
Williams Puffer (Tabelle A 4)	10 x	2,5 μ L	1x
dNTPs	2 mM	1,5 μ L	0,12 mM
forward Primer	5 μ M	2,5 μ L	0,5 mM
reverse Primer	5 μ M	2,5 μ L	0,5 mM
Taq-Polymerase	5 U/ μ L	0,2 μ L	1 U
DNA cDNA	DNA (10 ng/ μ L) cDNA (unverdünnt)	1 μ L	DNA (10 ng/ μ L) cDNA (unverdünnt)
Aq _{bidest.}		<i>ad</i> 25 μ L	<i>ad</i> 25 μ L

Sofern nicht anders vermerkt, wurden folgende Reaktionsbedingungen für die Amplifikation genutzt: initiale Denaturierung bei 94 °C für 4 Min., 35 Zyklen bestehend aus 45 s bei 94 °C, 1 Min. bei einer primerspezifischen Annealingtemperatur und 1,5 Min. bei 72 °C; finale Elongation für 10 Min. bei 72 °C. Die PCR wurde in einem Thermocycler des Typs advanced primus 96 (Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland) durchgeführt.

Jegliche Primersequenzen mit den entsprechenden Annealingtemperaturen wurden dem Anhang unter Abschnitt A 4 beigefügt.

2.5.2.3 Effektoramplifikation für eine gerichtete In-Fusion® Klonierung von PCR-Fragmenten

Die Amplifikation der vollständigen Effektorkandidaten fand durch genspezifische Primer statt, die einen Überhang komplementär zum Zielvektor enthielten, um eine gerichtete Klonierung zu ermöglichen. Die Sequenzen der Überhänge ergaben sich aus dem enzymatischen Verdau des Vektors mit BamHI-HF® und HindIII-HF® (New England Biolabs GmbH, Frankfurt am Main, Deutschland) und sind der Tabelle 3 zu entnehmen.

Tabelle 3: Sequenzen der komplementären Überhänge für eine gerichtete In-Fusion® Klonierung von PCR-Fragmenten in den Expressionsvektor pRedU10-35S.

Überhang	Sequenz 5' → 3'
forward	GCACTAGTTGGATC
reverse	CGACACGCGTAAGCT

Für die Amplifikation der Effektorkandidaten wurden genspezifische Primer verwendet, die mit den entsprechenden Sequenzen der Überhänge ergänzt wurden. Eine Auflistung der Primersequenzen aller Effektorkandidaten, die kloniert wurden, ist in Tabelle A 11 des Anhangs zu finden. Es wurde das Standardprotokoll der PCR (2.5.2.2) mit einer Annealingtemperatur von 63 °C verwendet.

2.5.2.4 Kolonie-PCR zum Nachweis klonierter Fragmente

Zur Überprüfung des Erfolgs einer Klonierung von PCR-Fragmenten in den Expressionsvektor pRedU10-35S (Abbildung A 1), wurde eine PCR der Bakterienkolonien durchgeführt. Hierfür wurde ein Standardreaktionsmix (Tabelle 2) verwendet. Als Template für die Amplifikation wurden mit Hilfe eines sterilen Holzstäbchens Bakterien aus der jeweiligen Kolonie direkt in den Reaktionsmix durch eintauchen des Holzstäbchens überführt. Die für die Amplifikation verwendeten Primer sind der Tabelle 4 zu entnehmen.

Tabelle 4: Primersequenzen zur Überprüfung der Klonierung in den Vektor pRedU10-35S.

Primer	Sequenz 5' → 3'	Annealingtemperatur
pRedU10_F	ACAGTGGTCCCAAAGATGGA	63 °C
pRedU10_R	GCCTGTCGAGGACAATCAGT	

Es wurden die unter 2.5.2.2 beschriebenen Reaktionsbedingungen mit der Primer spezifischen Annealingtemperatur verwendet. Ohne die Insertion eines klonierten Fragments in den Vektor war ein Amplikon von 420 bp zu erwarten.

2.5.3. Agarosegelelektrophorese

Nukleinsäuren oder PCR-Produkte wurde gelelektrophoretisch mittels Agarosegelelektrophorese aufgetrennt. Diese wurde in horizontalen Elektrophoresekammern durchgeführt, für welche Gele mit einem Agarosegehalt von 1 % [w/v] bis 1,5 % [w/v] Agarose verwendet wurden. Zum Anfärben der Nukleinsäuren wurde das Gel nach Lösen der Agarose in 1 x TAE-Puffer (80 mM Tris-aminomethan (Tris), 38 mM Essigsäure, 1 mM Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA, pH 8,0)) mit 0,002 % [v/v] Midori Green Advance (Nippon Genetics Europe GmbH, Düren, Deutschland) versetzt. Die Elektrophorese wurde mit einer Spannung von 10 V/cm durchgeführt. Die zu trennenden Proben wurden mit 1/10 des Volumens OrangeG-Ladepuffer (30 % [v/v] Glycerin, 0,025 % [w/v] OrangeG (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland), ad $A_{Q_{dest}}$) versetzt. Als Größenstandards zur Abschätzung der aufgetrennten Fragmentgrößen wurde ein 100 bp Marker oder 1 kb Plus Marker (ThermoFisher Scientific Inc., USA) verwendet. Die aufgetrennten Fragmente wurden mit Hilfe eines LED-Leuchttisches detektiert.

2.5.4. Aufreinigung von PCR-Fragmenten aus Agarosegelen

Für die Aufreinigung von PCR-Fragmenten aus Agarosegelen wurde das NucleoSpin® Gel and PCR Clean-Up Kit (Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren, Deutschland) verwendet. Die Fragmente wurden aus Gelen mit maximal 1 % [w/v] Agarose ausgeschnitten und nach Herstellerprotokoll aufgereinigt.

2.5.5. Klonierung von PCR-Fragmenten mittels In-Fusion® HD Cloning

Für eine gerichtete Klonierung von PCR-Fragmenten mittels Rekombination, wurde das In-Fusion® HD Cloning Kit (Clontech, Takara Bio USA Inc., USA) verwendet. Die aufgereinigten PCR-Fragmente, wurden in den in Abbildung A 1 dargestellten Expressionsvektor kloniert.

Der Vektor wurde mit BamHI-HF® und HindIII-HF® (New England Biolabs GmbH, Frankfurt am Main, Deutschland) in dem in Tabelle 5 beschriebenen Reaktionsansatz geschnitten und so linearisiert.

Tabelle 5: Reaktionsansatz für den Doppelverdau des Expressionsvektors.

Reagenz	pro Reaktion enthalten
DNA	1 µg
10 x CutSmart Puffer	1 x
BamHI-HF®	10 U
HindIII-HF®	10 U
Nuklease freies Wasser	ad 50 µL
Gesamtvolumen	50 µL

Der Reaktionsansatz wurde für eine Stunde bei 37 °C inkubiert und anschließend wurde die Enzymaktivität für 20 Minuten bei 80 °C inaktiviert.

Der linearisierte Vektor wurde mittels des NucleoSpin® Gel and PCR Clean-Up Kits (Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren, Deutschland) aufgereinigt und in die nachfolgende Klonierung eingesetzt. Die Aufreinigung wurde laut Herstellerprotokoll (Aufreinigung für PCR-Produkte) durchgeführt.

Für die In-Fusion® Klonierung wurden ~40 ng aufgereinigtes PCR-Fragment und 100 ng linearisierter Vektor in einem 10 µL-Reaktionsansatz eingesetzt. Die Klonierung wurde laut Herstellerprotokoll ohne Änderungen durchgeführt. Die Proben wurden bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

2.5.6. Reverse Transkription

Die RNA-Proben wurden unter Nutzung des High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kits (Applied Biosystems™, ThermoFisher Scientific Inc., USA) in cDNA umgeschrieben. Es wurde der Reaktionsansatz mit Zugabe des RNase Inhibitors (Fermentas, ThermoFisher Scientific Inc., USA) laut Herstellerprotokolls verwendet. Es wurden 500 ng Gesamt-RNA eingesetzt. Für die Synthese wurden OligodT-Primer (Microsynth AG, Lindau, Deutschland) verwendet.

Die cDNA-Synthese wurde mit einer Test-PCR mit entsprechenden Primern für Housekeeping-Gene überprüft.

2.5.7. Sequenzierungen zur Kontrolle klonierter Fragmente

Zur Überprüfung der klonierten Fragmente im Expressionsvektor wurden diese bei GATC Biotech AG (European Custom Sequencing Centre, Köln, Deutschland) mittels Sanger Sequenzierung sequenziert. Hierfür wurde aufgereinigtes Plasmid laut den Vorgaben des Unternehmens mit einem entsprechenden Primer versetzt. Zur Überprüfung der Klonierung von Fragmenten in den unter Abschnitt 2.2.1 beschriebenen Expressionsvektor, wurden separat die in Tabelle 4 aufgelisteten Primer pRedU10 für die jeweiligen Reaktionen verwendet.

2.5.8. Proteomik

Die weiterführende Probenaufbereitung nach Isolation des Gesamtproteins sowie die Massenspektrometrie und Datenprozessierung wurde von der Abteilung Pflanzenproteomik der Leibniz Universität Hannover durchgeführt.

2.5.8.1 Isolierung von Gesamtprotein für *shotgun Proteomics*

Für die Extraktion von Gesamtprotein aus resistenten und anfälligen Kartoffelknollen, die mit *S. endobioticum* Pathotyp 1 inokuliert wurden (14 dpi), sowie den dazugehörigen Kontrollen, wurde eine modifizierte Phenolextraktion nach HURKMAN und TANAKA (1986) wie in COLDITZ *et al.* (2004) beschrieben durchgeführt. Es wurden Proben aus fünf unabhängigen Inokulationsversuchen für die Proteinisolation verwendet.

2.5.8.2 Probenvorbereitung Massenspektrometrie und Flüssigkeitschromatographie

Die Probenvorbereitung für die Massenspektrometrie wurde wie in FROMM *et al.* (2016) beschrieben durchgeführt. Allerdings wurden die extrahierten Proteine abweichend über ein glycine / sodium dodecyl sulfate (SDS) Polyacrylamidgel bestehend aus einem Sammelgel mit 4 % [v/v] Acrylamid (Tabelle A 5) und einem Trenngel mit einem Anteil von 14 % [v/v] Acrylamid (Tabelle A 6) getrennt. Die Zusammensetzungen der verwendeten Puffer wurden dem Anhang unter Abschnitt A 3 beigefügt. Der tryptische Verdau im Gel wurde wie bei KLODMANN *et al.* (2010) beschrieben vorgenommen. Die Flüssigkeitschromatographie wurde wie bei FROMM *et al.* (2016) mit folgenden Änderungen durchgeführt: Die Elution der Peptide erfolgte in einem nichtlinearen 5 % [v/v] - 30 % [v/v] Acetonitril-Gradienten in 0,1 % [v/v] Ameisensäure mit einer Flussrate von 300 nL min⁻¹ und einer Temperatur von 33 °C über eine Dauer von 70 Minuten. Die Säulenäquilibrierung fand in 5 % [v/v] Acetonitril für 10 Minuten statt.

2.5.8.3 Markierungsfreie quantitative *shotgun* Massenspektrometrie

Der Transfer der eluierten Peptide in das Massenspektrometer sowie die Analyse fanden wie bei FROMM *et al.* (2016) beschrieben statt.

2.5.8.4 Datenverarbeitung Proteinidentifikation

Die aufgezeichneten MS-Daten (Xcalibur, Thermo Fisher Scientific, Dreieich, Deutschland) wurden mit Hilfe des Software Pakets MaxQuant (Version 1.6.0.1, TYANOVA *et al.*, 2016) mit einer Datenbank der Proteinsequenzen von *Solanum tuberosum*, *Batrachochytrium dendrobatidis* sowie den Effektorkandidaten abgeglichen. Die gruppenspezifischen Parameter wurden unter den Standardeinstellungen und wie bei FROMM *et al.* (2016) beschrieben genutzt. Es wurden als variable Modifikationen neben Oxidation (M) und Acetyl (Protein N-term) auch Deamidation (N) in den Einstellungen zugelassen.

Die weitere Datenverarbeitung fand unter Nutzung der Software Perseus (Version 1.5.5.3, TYANOVA *et al.*, 2016) statt. Die LFQ-Intensitäten der MaxQuant Analyse wurden für die statistische Auswertung in Perseus importiert. Die Intensitätswerte wurden log₂ transformiert. Die

identifizierten Proteine wurden für weitere Analysen beachtet, wenn sie in mindestens vier der fünf biologischen Wiederholungen einer Gruppe vorhanden waren. Für eine weitere Validierung der Daten wurde intern ein Student's T-test mit einem Grenzwert von $p < 0,01$ durchgeführt.

2.6. Bakterientransformation und -kulturen

2.6.1. Bakterientransformation

2.6.1.1 Transformation von Bakterien zur Plasmidvermehrung mittels Hitzeschock

Für das Erreichen maximaler Transformationseffizienzen nach einer In-Fusion® Klonierung wurde die Verwendung von Stellar® Competent Cells (Takara Bio USA Inc., USA) zur Plasmidvermehrung empfohlen. Die Transformation wurde laut Herstellerprotokoll durchgeführt. Es wurden 2 μL des Ligationsmixes aus der Klonierung eingesetzt. Aufgrund der Durchführung der Transformation in 1,5 mL-Reaktionsgefäßen wurde die Dauer des Hitzeschocks auf 60 s verlängert, wie vom Hersteller empfohlen. Nach einer einstündigen Inkubationszeit wurden 50 μL und 100 μL des Ansatzes auf LB-Medium (Tabelle A 2) mit den entsprechenden selektiven Antibiotika ausplattiert und bei 37 °C kultiviert.

2.6.1.2 Transformation von *Agrobacterium tumefaciens* durch Elektroporation

Für die Transformation von *Agrobacterium tumefaciens* wurden elektrokompetente Zellen nach einem Protokoll von WISE *et al.* (2006b) hergestellt.

Die Transformation von *Agrobacterium tumefaciens* Stamm GV3101 mittels Elektroporation wurde wie im Wesentlichen bei WISE *et al.* (2006b) beschrieben, mit leichten Änderungen, durchgeführt. Es wurden 40 μL der kompetenten Zellen mit 100 ng des Expressionsvektors gemischt und in die Küvetten überführt. Nach dem elektrischen Impuls wurden die Zellen unverzüglich mit 1 mL YEP-Medium gemischt und in die vorbereiteten Reaktionsgefäße (mit 1 mL YEP-Medium befüllt) überführt. Diese wurden anschließend für zwei bis vier Stunden bei 28 °C unter Schütteln kultiviert. Nach dieser Wachstumsphase wurde die Bakteriensuspension auf YEP-Festmedium (mit selektiven Antibiotika) ausplattiert und bei 28 °C kultiviert.

2.6.2. Bakterienkultur auf Festmedium

Für eine kurzzeitige Kultur von *E. coli* wurden Vereinzelungsausstriche aus der Glycerinkultur auf Festmedium vorgenommen. Hierfür wurde LB-Medium (Tabelle A 2) und die entsprechenden selektiven Antibiotika mit 15 g/L Bacto™ Agar (Becton, Dickinson and Company, USA) verfestigt. Die Platten wurden bei 37 °C für ein bis zwei Tage kultiviert.

Für eine Kultur von *Agrobacterium tumefaciens* auf Festmedien wurden Vereinzelungsausstriche aus Dauerkulturen auf YEP-Medium (Tabelle A 1) angefertigt, welche die entsprechenden

selektiven Antibiotika enthielten. Die Bakterienplatten wurden zwei bis drei Tage bei 28 °C kultiviert.

2.6.3. Flüssigkulturen von Bakterien

2.6.3.1 Übernachtskulturen von *E. coli* zur Plasmidaufreinigung

Für die Flüssigkultur von *E. coli* Kulturen / Stellar® Zellen nach der Transformation wurden Einzelkolonien von Bakterienplatten mit einem sterilen Holzstäbchen abgenommen und in LB-Medium (Tabelle A 2) mit entsprechenden selektiven Antibiotika inkubiert. Die Bakterienkulturen wurden für maximal 16 Stunden bei 37 °C und 150 rpm kultiviert.

2.6.3.2 Kultur von *E. coli* zur mittelfristigen Lagerung

Zum Anlegen von Bakterienkulturen zur mittelfristigen Lagerung wurden Einzelkolonien der ausplattierten Bakterien mit sterilen Holzstäbchen von der Platte abgenommen und in 200 µL FB-Medium (Tabelle A 3) mit den entsprechenden selektiven Antibiotika in 96 Well Mikrottestplatten (Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland) inkubiert. Die Mikrottestplatten wurden bei 37 °C für maximal 16 Stunden kultiviert und anschließend für maximal eine Woche bei 4 °C gelagert oder für eine mittelfristige Aufbewahrung bei -20 °C gelagert.

2.6.3.3 Bakterienkultur von *Agrobacterium tumefaciens*

Für eine Flüssigkultur von *Agrobacterium tumefaciens* wurden die Bakterien in YEP-Medium (Tabelle A 1) mit selektiven Antibiotika mit einer Einzelkolonie von der Bakterienplatte angeimpft. Die Bakteriensuspension wurde für ein bis zwei Tage bei 28 °C und unter Schütteln bei 150 rpm kultiviert.

2.6.4. Glycerinkulturen zur Langzeitlagerung von Bakterien

Für die Langzeitlagerung von Bakterien bei -80 °C wurden Glycerinkulturen (Dauerkulturen) angelegt. Diese wurden nach einem modifizierten Protokoll von WISE *et al.* (2006a) hergestellt. Es wurde eine Übernachtskultur der Bakterien mit den entsprechenden selektiven Antibiotika angezogen und beim Erreichen einer $OD_{600} \sim 1$ auf Eis gekühlt. Es wurde 1 mL dieser Bakteriensuspension mit 500 µL eiskaltem, sterilem Glycerin (60 % [v/v]) gemischt und schockgefroren. Die anschließende Lagerung fand bei -80 °C statt.

2.7. Funktionsanalysen durch transiente Expressionsstudien

2.7.1. Infiltration von *A. tumefaciens* in Blattgewebe zur transienten Genexpression

Für Infiltrationsversuche wurden Blätter, die in Abschnitt 2.1.3 aufgeführten Gewächshauspflanzen von *N. benthamiana* verwendet. Es wurden die obersten vier Blätter des Haupttriebs von der Pflanze abgetrennt und in feuchten Boxen gelagert.

Es wurde eine Übernachtskultur der Agrobakterien wie unter 2.6.2.3 beschrieben vorbereitet. Am Tag der Infiltration wurde eine Bakterienhauptkultur angeimpft, ausgehend von der Übernachtskultur. Diese Hauptkultur ohne selektive Antibiotika wurde bis zum Erreichen einer OD₆₀₀ von ungefähr 0,8 (28 °C und 120 rpm) kultiviert.

Nach Abzentrifugieren der Bakteriensuspension (4.500 rpm, 15 Minuten, Rotina 420R, Hettich Zentrifugen, Lauenau, Deutschland) wurde der Überstand verworfen. Das Bakterienpellet wurde in Infiltrationspuffer (10 mM MgCl₂, 10 mM MES, pH 5,6 (BENDAHMANE *et al.*, 2000) resuspendiert. Ausgehend von dieser konzentrierten Suspension wurde eine Infiltrationslösung (in Infiltrationspuffer) mit einer OD₆₀₀ von 0,2 ±0,02 eingestellt. Die Infiltrationslösung wurde mit einer 1 mL-Spritze ohne Kanüle (Omnifix®-F Braun, Melsungen, Deutschland) in die Blattunterseite eingebracht.

Die Blätter wurden zuerst mit den Konstrukten der Effektorkandidaten infiltriert und mit einem zeitlichen Abstand von drei Tagen mit TRV an dieselbe Stelle wie zuvor erneut infiltriert. Die für die Virusvermehrung notwendigen Bestandteile des Viruspartikels waren auf zwei verschiedenen Vektoren kodiert. Die Bakterien, welche je ein Genomteil enthielten, wurden getrennt angezogen und beide Kulturen für die Infiltration zu gleichen Teilen miteinander gemischt wurden. Es wurde eine optische Dichte bei 600 nm von 0,2 eingestellt.

Die infiltrierten Blätter wurden in Plastikboxen mit feuchten Tüchern bei 18 °C bis zur Bonitur 6 dpi beziehungsweise 3 dpi gelagert.

2.7.2. Visualisierung der Reportergenexpression in transienten Transformationen

Als Reportergene dienten in den transienten Expressionsversuchen das *red fluorescent protein* (DsRed) und das *green fluorescent protein* (GFP). Aufgrund der Absorptionsspektren beider Proteine war eine simultane Detektion der Fluoreszenzen möglich. Die Spektren der Reportergene wurden dem Anhang in Abbildung A 2 beigelegt. Zur Detektion wurde die FastGene® Blue/Green LED Flashlight, eine LED-Handlampe der Firma NIPPON GENETICS EUROPE GmbH (Düren, Deutschland) mit entsprechendem Filter, verwendet. Die Handlampe deckte einen Wellenlängenbereich von 480 – 530 nm ab.

2.8. Bioinformatische Sequenzanalysen

2.8.1. Transkriptomanalyse - RNAseq-Analyse mittels CLC Genomic Workbench 7.5/ 9.5

Die RNAseq-Analyse der Transkriptomdaten wurde mit CLC Genomic Workbench 7.5/9.5 (CLC bio, Qiagen, Dänemark) durchgeführt. Für jegliche Sequenzdaten wurden in einem ersten Schritt die Adaptersequenzen der Sequenzierung entfernt. Es wurden Sequenzen mit einem *Phred Quality Score* unter 30 verworfen. Für das *Read Mapping* wurden die Standardeinstellungen mit einer *Length Fraction* von 0,95 und einer *Similarity Fraction* von 0,9 verwendet. Die maximale Anzahl an Hits pro Read wurde auf 5 festgelegt.

2.8.2. *de novo* Assemblierung von Sequenzdaten

Zur Konstruktion von cDNA und gDNA Contigs aus *paired-end* Reads wurde eine *de novo* Assemblierung vorgenommen. Die *de novo* Assemblierung von Sequenzreads wurde mittels CLC Genomic Workbench 7.5/9.5 durchgeführt. Es wurden folgende Parameter verwendet: *Mismatch Cost* = 1, *Insertion Cost* = 2, *Deletion Cost* = 2, *Length Fraction* = 0,7 und *Similarity Fraction* = 0,95.

2.8.3. Abschätzung der Vollständigkeit von Transkriptomdaten mittels BUSCO

Zur Abschätzung in wie weit ein Transkriptomdatensatz das gesamte erwartete Transkriptom eines Organismus abdeckt, wurde das Programm BUSCO v2 (*Benchmarking Universal Single-Copy Orthologs*) genutzt (SIMÃO *et al.*, 2015; <http://busco.ezlab.org/>). Es wurde das Trainingssets *Fungi* unter Nutzung der Standardeinstellungen zur Transkriptomanalyse verwendet.

2.8.4. Annotation von Sequenzdaten mittels Blast2GO

Für die automatische Annotation von assemblierten Sequenzdaten wurde eine *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST) Suche in der Datenbank auf NCBI (ALTSCHUL *et al.*, 1997) durchgeführt mit der Software Blast2GO (CONESA *et al.*, 2005; GÖTZ *et al.*, 2008) unter Anwendung eines *Threshold Value* von 0,1.

2.8.5. Teilen von Sequenzdatensätzen mittels Splitter

Um Sequenzdatensätze zu teilen, wurde das Online-Tool Splitter (<http://emboss.bioinformatics.nl/cgi-bin/emboss/splitter>) verwendet. Hiermit wurden kürzere Sequenzstücke von 1.000 bp generiert mit Überlappungen von 100 bp.

2.9. Bioinformatische Verfahren zur Vorhersage von Effektorproteinen

Für die Identifizierung von Effektorkandidaten wurden anhand von Transkriptomdaten aus einer RNAseq-Analyse und den daraus resultierenden cDNA Contigs die entsprechenden Proteine abgeleitet und bioinformatisch untersucht. Dies wurde in Abbildung 14 veranschaulicht.

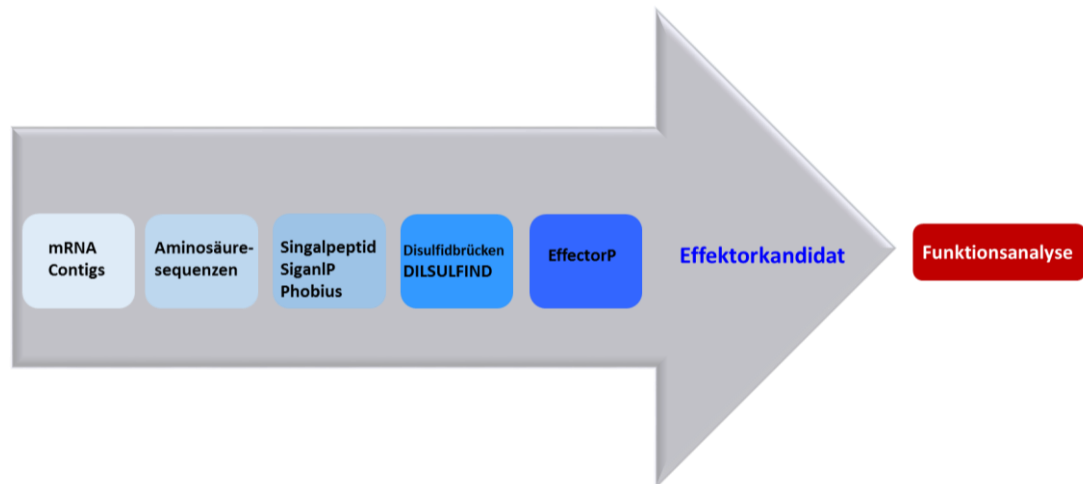


Abbildung 14: Pipeline zur bioinformatischen Vorhersage von Effektorkandidaten.

2.9.1. Translation der cDNA-Sequenzen

Für die Ableitung der Aminosäuresequenzen wurden die cDNA Contigs aus der Transkriptomanalyse mit Hilfe des Programms BioEdit (HALL, 1999) in alle sechs Leseraster übersetzt. Die Bestimmung der *Open Reading Frames* (ORF) und der abgeleiteten Aminosäuren wurde mit Hilfe des online verfügbaren *Open Reading Frame Finders* von ExPASy (<https://web.expasy.org/translate/>) bestätigt.

2.9.2. TargetP - Vorhersage der subzellulären Lokalisation von Proteinen

Zur Vorhersage der subzellulären Lokalisation der abgeleiteten Proteine wurde der TargetP 1.1 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TargetP/>), entwickelt von EMANUELSSON *et al.* (2000), verwendet. Es wurden die für Eukaryonten voreingestellten Parameter für die Sequenzanalysen verwendet.

2.9.3. SignalP – Vorhersage von Signalpeptiden in Aminosäuresequenzen

Für die bioinformatische Vorhersage von Signalpeptiden in Aminosäuresequenzen, wurde der frei verfügbare SignalP 4.1 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) von NIELSEN *et al.* (1997) und NORDAHL PETERSEN *et al.* (2011) verwendet. Es wurden die voreingestellten Parameter für Eukaryoten verwendet.

2.9.4. Phobius – Vorhersage von Signalpeptiden in Aminosäuresequenzen

Zur Bestätigung der Signalpeptide aus der Vorhersage mit SignalP 4.1 wurde eine bioinformatische Bestimmung von Signalpeptiden mit Phobius (<http://phobius.sbc.su.se/index.html>) vorgenommen (KÄLL *et al.*, 2007). Die Vorhersage wurde unter Beibehaltung der voreingestellten Parameter vorgenommen.

2.9.5. DISULFIND - Vorhersage von Disulfidbrücken in Proteinen

Zur Vorhersage von Disulfidbrücken wurde der DISULFIND-Webserver (<http://disulfind.dsi.unifi.it/>), entwickelt von CERONI *et al.* (2006), verwendet. Es wurde der voreingestellte Modus genutzt.

2.9.6. PS_Scan – Identifikation von Proteindomänen

Es wurden die Proteinsequenzen auf das Vorhandensein von Proteindomänen/ -mustern untersucht. Hierfür wurde der Webserver PS_SCAN (<http://www.hpa-bioinfotools.org.uk>), bereitgestellt von der *Health Protection Agency UK*, verwendet. Die Aminosäuresequenzen wurden auf alle PROSITE Muster untersucht.

2.9.7. EffectorP – Bestimmung von Effektoren in Sekretomen

Zur Bewertung der zuvor selektierten Sequenzen als mögliche Effektoren wurde der Webserver EffectorP 1.0 (<http://effectorp.csiro.au/>), publiziert von SPERSCHNEIDER *et al.* (2016), verwendet. Es wurden die Standardeinstellungen genutzt.

2.10. Statistische Verfahren

Sofern nicht anders angegeben, wurde die statistische Auswertung der Daten mit der freiverfügbaren Software R Version 3.2.2 durchgeführt (Copyright (C) 2015, The R Foundation for Statistical Computing, www.R-project.org; R DEVELOPMENT CORE TEAM, 2011).

2.10.1. Testung des Effekts der transienten Effektorexpression auf die TRV-Expression

Um eine Auswertung des Effekts der Effektorexpression auf die TRV-Expression vornehmen zu können, wurden einige Annahmen getroffen aufgrund derer eine Binominalverteilung der Daten angenommen werden konnte. Hierfür wurde das Vorhandensein des GFP-Signals, welches gekoppelt an die TRV-Expression war, als Erfolg und eine alleinige DsRed-Expression (Effektorexpression) als Misserfolg gewertet. Die Datenauswertung erfolgte über ein Generalisiertes Lineares Modell (GLM), wobei die Aussagen nicht mehr für die Beobachtungen

getätigt wurden, sondern für einen Verteilungsfehler (binomiale Proportion (p)). Um die Proportionen zu linearisieren wurden diese mit dem *logit* Link (1) transformiert (BATES *et al.*, 2011).

$$\eta = \log\left(\frac{p}{1-p}\right) \quad (1)$$

Durch diese transformierten Proportionen wurde eine Gerade gelegt. Diese wurde durch Rücktransformation auf die Originalskala der Beobachtungen (2) zu einer nichtlinearen Gerade umgewandelt.

$$\text{expit} = \frac{e^{\eta}}{1 + e^{\eta}} \quad (2)$$

Das Modell wurde unter der Annahme der Überdispersion angepasst, wobei sich der geschätzte Dispersionsparameter (ϕ), wie bei McCULLAGH & NELDER (1989) beschrieben, ergab. Anschließend wurde eine Devianzanalyse wie bei VENABLES & RIPLEY (2002) beschrieben angewendet. Hierbei wurde das Prinzip der ANOVA (*analysis of variance*) auf anders verteilte Daten verallgemeinert. Abschließend wurden paarweise Mittelwertvergleiche für die Proportionen durchgeführt. Der R-Code wurde dem elektronischen Anhang E 2.1 beigefügt.

2.10.2. Hauptkomponentenanalyse

Die Hauptkomponentenanalyse, im englischen *principal component analysis* (PCA), wurde angewendet, um einen komplexen Datensatz zu strukturieren. Die erste Hauptkomponente wurde in dem Fall so konstruiert, dass sie den größten Teil der Variation der Daten erklärte. Der R-Code wurde dem elektronischen Anhang E 2.2 beigefügt.

2.10.3. Gene Ontology Enrichment mittels AgriGO

Für ein *Gene Ontology* (GO)-Enrichment wurde der Webserver agriGO verwendet (Du *et al.*, 2010; TIAN *et al.*, 2017), welcher online unter <http://bioinfo.cau.edu.cn/agriGO/> abgerufen werden konnte. Es wurde eine *Singular Enrichment Analysis* (SEA) durchgeführt. Es wurde die Option *suggested Backgrounds* verwendet.

2.11. Datenvisualisierung

2.11.1. Datenvisualisierung mittels Venny 2.1

Zur Veranschaulichung von Schnittmengen zwischen untersuchten Datensets wurde der Webserver Venny 2.1 zur Erstellung von Venn-Diagrammen verwendet (OLIVEROS, 2007-2015).

2.11.2. Visualisierung des *GO-Enrichments*

Zur Visualisierung des *GO-Enrichments*, welches mittels agriGO (Abschnitt 2.12.3) durchgeführt wurde, wurde der Webserver REVIGO (*reduce + visualize gene ontology*, SUPEK *et al.*, 2011) genutzt. REVIGO wurde unter Nutzung der voreingestellten Parameter verwendet.

3. Ergebnisse

3.1. Identifizierung erster Sequenzen von *Synchytrium endobioticum*

Mit Hilfe von Daten aus *whole-genome* und *transcriptome shotgun* Sequenzierungen sollten erste Sequenzen von *Synchytrium endobioticum* Pathotyp 18 identifiziert werden. Anhand der Sequenzsammlung sollten putative Effektorkandidaten ermittelt und funktional untersucht werden.

3.1.1. *Whole-genome* und *transcriptome shotgun* Sequenzierungen

Für die Sequenzierungen wurden DNA und RNA aus infizierten Kartoffelknollen der Sorte 'Tomensa' 16 Tage nach Inokulation aufgereinigt. Für die Auswahl des Probenmaterials wurde darauf geachtet, dass eine deutlich ausgeprägte Wucherung an dem auskeimenden Spross der Kartoffelknolle erkennbar war.

Die aufgereinigte DNA wies nach einer Konzentrationsbestimmung mittels NanoDrop 2000 Spectrophotometer (ThermoFisher Scientific Inc., USA) eine Konzentration von 154,3 ng/ μ L (A260/280: 1,77; A260/230: 1,36) für Probe P18_C auf. Zur Überprüfung der Integrität der aufgereinigten DNA wurde diese gelelektrophoretisch aufgetrennt. Nach erfolgreicher Überprüfung der Qualität, wurde die Probe für die Sequenzierung eingesetzt.

Parallel wurde RNA aus infizierten Kartoffelknollen der Sorte 'Tomensa' 16 Tage nach Inokulation aufgereinigt (Probe P18_C_RNA).

Die Konzentrationsbestimmung mittels NanoDrop 2000 Spectrophotometer (ThermoFisher Scientific Inc., USA) ergab 873,6 ng/ μ L RNA (A260/280: 2,07; A260/230: 1,28). Zur Überprüfung der Qualität der RNA wurde diese gelelektrophoretisch aufgetrennt. Dies wurde exemplarisch in der Abbildung 15 veranschaulicht.

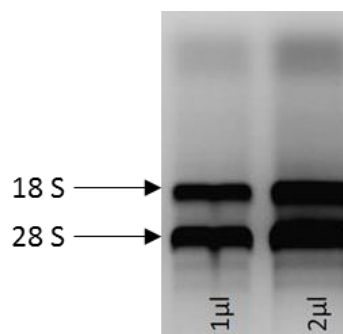


Abbildung 15: Auftrennung der aufgereinigten RNA der Probe P18_C_RNA mittels Agarosegelelektrophorese. Die RNA wurde aus Knollen der Sorte 'Tomensa' nach Inokulation mit *S. endobioticum* Pathotyp 1 (16 dpi) aufgereinigt. Aufgetrennt wurden 1 μ L beziehungsweise 2 μ L unverdünnte RNA. Es zeigte sich, dass die 28 S und 18 S rRNA aufgetrennt wurden. Laufbedingungen: 1,5 % [w/v] Agarose, 10 V/cm, 60 Minuten.

Anhand der Abbildung 15 ließ sich erkennen, dass intakte RNA isoliert wurde. Um Kontaminationen der RNA-Probe mit DNA auszuschließen, wurde aus der Probe cDNA synthetisiert, welche in einer PCR mit Actin-Primern (Tabelle A 9) untersucht wurde. Die Actin-Primer wurden so angefertigt, dass für genomische DNA und cDNA verschieden große Fragmente amplifiziert würden. Nach der Qualitätskontrolle wurde die RNA für die Sequenzierung eingesendet.

Die hochmolekulare RNA (P18_C_RNA) und DNA (P18_C) (20 µg) wurden an Eurofins Genomics (Eurofins Genomics GmbH, Ebersberg, Deutschland) zur Herstellung der Bibliotheken aus der genomischen DNA und cDNA mit anschließender Sequenzierung versendet. Die Sequenzierung wurde auf einem Illumina HiSeq 2500 im *2-by-150 bp paired-end* Modus durchgeführt.

In einer späteren Sequenzierung wurde eine normalisierte cDNA-Bibliothek verwendet, um den Anteil der überrepräsentierten Kartoffelgene zu reduzieren. Bei der verwendeten Probe handelte es sich um eine Mischprobe aus Kartoffel und *Synchytrium*. Hierbei konnte davon ausgegangen werden, dass der Anteil infizierter Zellen den geringsten Probenanteil ausmachte. Durch die Reduktion der überrepräsentierten Kartoffelgene sollte auf diese Weise der Anteil der gering abundanten Gene von *Synchytrium* erhöht werden. So sollte ein höherer Informationsgehalt für Sequenzen des Erregers erhalten werden.

Es wurde nochmals RNA aus gut sichtbar infizierten Kartoffelknollen der Sorte 'Tomensa' isoliert (16 dpi). Hierfür wurden zwei Proben aus verschiedenen Wucherungen isoliert. Die RNA wurde mit Hilfe des RNeasy® Plant Mini Kits (Qiagen, Hilden, Deutschland) aufgereinigt. Die Bestimmung der Quantität und Qualität wurde mittels NanoDrop 2000 Spectrophotometer (ThermoFisher Scientific Inc., USA) durchgeführt. Die ermittelten Werte wurden in der Tabelle 6 zusammengefasst.

Tabelle 6: Werte der Konzentrationsbestimmung der Proben P18-1 und P18-9. Die Bestimmung wurde mittels NanoDrop 2000 Spectrophotometer vorgenommen.

Probe	Konzentration	A260/280	A260/230
P18-1	403 ng/µL	2,13	0,91
P18-9	400 ng/µL	2,16	0,54

Die Integrität der isolierten RNA wurde durch eine gelelektrophoretische Auftrennung der Proben überprüft. Ebenfalls wurden die Proben mittels Actin-PCR (Tabelle A 9) auf DNA-Verunreinigungen untersucht.

Die Überprüfung der RNA zeigte eine gute Qualität der aufgereinigten Proben, sodass beide Proben vereint wurden und zur Herstellung einer normalisierten cDNA-Bank und zur Sequenzierung an GATC Biotech AG (European Custom Sequencing Centre, Köln, Deutschland)

übermittelt wurden. Es fand eine Illumina-Sequenzierung im *paired-end* Modus statt. Im Weiteren wurde diese gepoolte Probe als P18-2 bezeichnet.

3.1.2. Erste Sequenzen von *S. endobioticum* basierend auf nicht normalisierten Transkriptom- und Genomdaten

Die Sequenzierung der Probe P18_C lieferte im *whole-transcriptome shotgun sequencing* insgesamt 149.333.302 Sequenzreads. Die Datenauswertung fand mit CLC Genomic Workbench 7.5/9.5 (CLC bio, Qiagen, Dänemark) statt. Mit Hilfe dieses Programms wurde eine technische Qualitätskontrolle der Sequenzreads durchgeführt. Dies resultierte in 141.656.030 Reads, welche für weitere Untersuchungen genutzt werden konnten. Die Strategie zur Identifikation von Sequenzen von *Synchytrium endobioticum* wurde in Abbildung 16 (blauer Abbildungsteil) zusammengefasst.

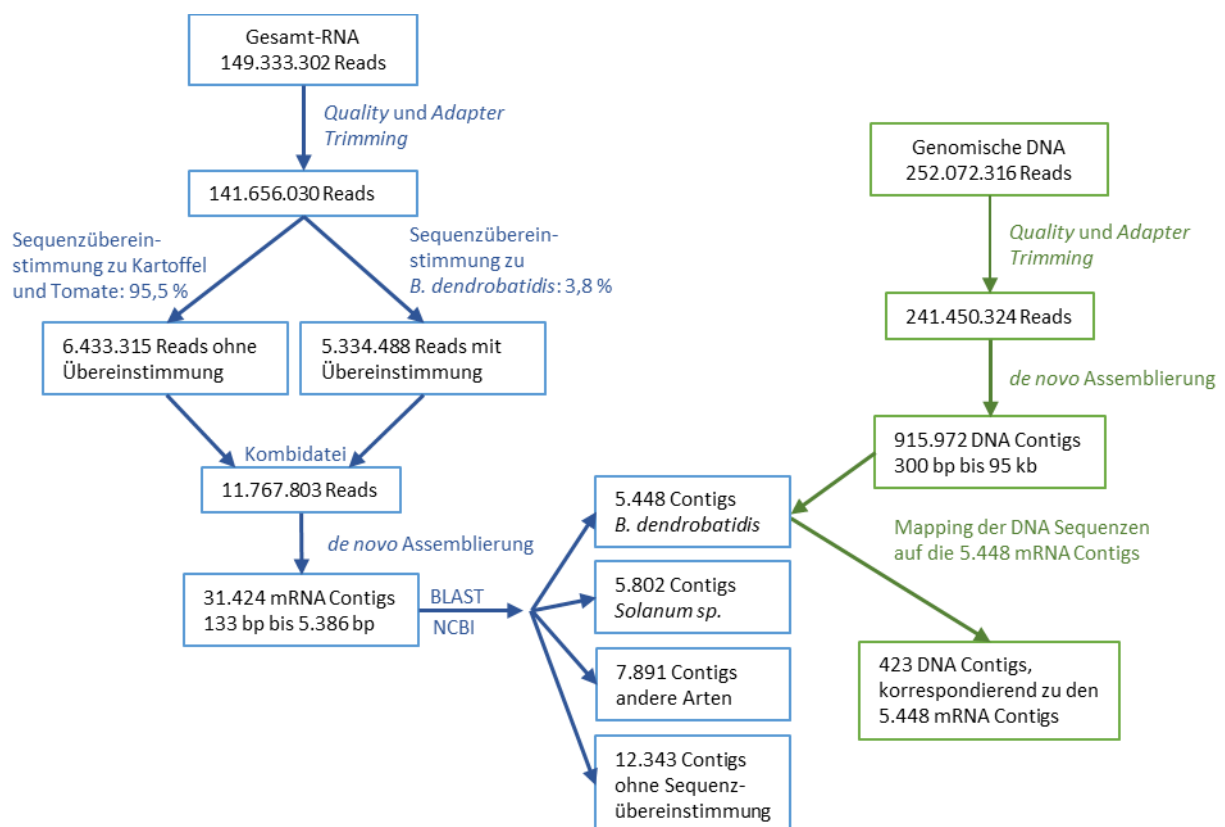


Abbildung 16: Schematische Darstellung der Filterschritte über Read Mappings zur Identifikation von Sequenzen von *S. endobioticum* P18 aus Transkriptom- und Genomdaten. Durchgeführt wurden die Mappings in CLC Genomic Workbench 7.5 (CLC bio, Qiagen, Dänemark) unter Nutzung der voreingestellten Parameter. Blau dargestellt wurden die Filterschritte basierend auf den Transkriptsequenzen der nicht normalisierten Daten. Grün dargestellt wurden die Schritte zur Identifikation von genomischen Sequenzen aus *S. endobioticum*.

Wie anhand der Abbildung 16 (blauer Abbildungsteil) zu erkennen ist, wurden in einem ersten Schritt die Kartoffelsequenzen der Mischprobe über ein Mapping zu den Referenzsequenzen von Kartoffel und Tomate (Abschnitt 2.3.1) aus dem Sequenzpool von Kartoffel, *S. endobioticum* und

möglichen Kontaminanten gefiltert. Parallel wurden die Gesamtreads nach der Qualitätskontrolle gegen die Transkriptreferenz von *Batrachochytrium dendrobatidis* gemapped (Abschnitt 2.3.1.3), einer Chytridiomycetenart, deren Genom in Datenbanken verfügbar war. Hierbei wurde bei 3,8 % der Reads eine Übereinstimmung gefunden. Diese Reads, sowie die verbliebenen 4,5 % der Reads ohne Übereinstimmung zu Kartoffel oder Tomate, wurden in einer gemeinsamen Sequenzdatei vereint. Diese Datei umfasste 11.767.803 Reads, welche in einem nächsten Schritt zu 31.424 mRNA Contigs assembliert wurden. Die Contigs waren zwischen 133 bp und 5.386 bp lang (N50: 328 bp). Eine automatische Annotation der Contigs wurde durch eine BLAST-Suche auf NCBI unter Nutzung der Software Blast2GO (Götz *et al.*, 2008) mit einem BLAST *Threshold Value* von 0,1 durchgeführt. Hieraus ergab sich, dass 5.448 Contigs einen Treffer zu *Batrachochytrium dendrobatidis* zeigten. Diese Contigs wurden im Weiteren als Sequenzen von *Synchytrium endobioticum* angenommen. Die BLAST-Analyse zeigte des Weiteren, dass innerhalb der gesamten Gruppe von Contigs 5.802 Contigs mit Treffer zu anderen *Solanum sp.* vorhanden waren, ebenso wurden 7.891 Contigs anderen Arten zugeordnet. Eine weitere Gruppe bildeten 12.343 Contigs, die keinerlei Sequenzübereinstimmung zu bekannten Taxa lieferten. Die 5.448 Contigs, welche als *Expressed Sequence Tags* (EST) von *S. endobioticum* identifiziert wurden, wiesen eine Contiglänge von 200 bp bis 2.979 bp auf. Es waren 3.849 EST länger als 300 bp. Dieses Transkriptom *shotgun assembly* Projekt wurde auf DDJB/EMBL/GenBank unter Accession GDBM00000000, Version GDBM01000000 abgelegt. Für 3.583 EST der 5.448 Contigs von *S. endobioticum*, wurden *GO* - Terms zugeordnet. Hiervon wurden 434 Contigs *GO-Terms* für metabolische Prozesse und Oxidations-/ Reduktionsprozesse in der Kategorie „biologische Prozesse“ zugeordnet. In der Kategorie „molekulare Funktionen“ wurden 1.010 ESTs *GO-Terms* zugeordnet, die an der Bindung von ATP und Proteinen beteiligt waren. Ebenso wurden 452 ESTs in der Kategorie „zelluläre Bestandteile“ *GO-Terms* des Zellkerns und Zytoplasmas zugeschrieben.

Um die bioinformatisch identifizierten Contigs von *S. endobioticum* zu verifizieren, wurden 96 zufällig ausgewählte ESTs (Tabelle A 12) per PCR in DNA von infiziertem Kartoffelgewebe nachgewiesen. Ziel war es die identifizierten ESTs nur in infizierten Kartoffelknollen nachzuweisen, allerdings nicht in Kartoffelknollen ohne vorherige Inokulation mit *Synchytrium*. Insgesamt war es möglich für 95 der ausgewählten ESTs ein Amplifikat in der PCR zu erhalten. Exemplarisch wurde die gelelektrophoretische Auftrennung für 38 PCR-Produkte in Abbildung 17 dargestellt.

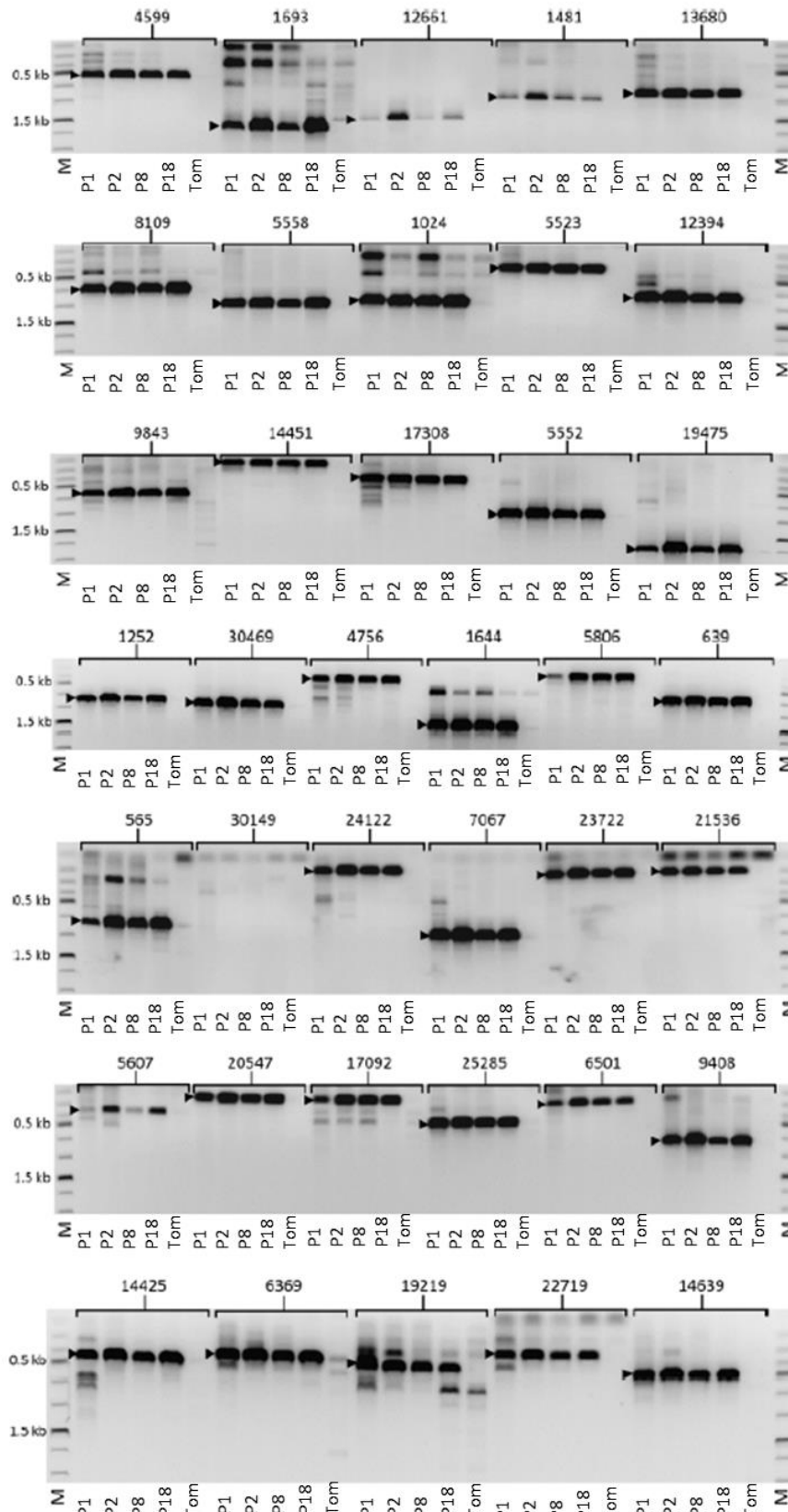


Abbildung 17: Gelelektrophoretische Auftrennung der PCR-Produkte von 38 Primern der 96 EST von *Synchytrium endobioticum* zur Verifizierung der bioinformatisch bestimmten Contigs. Die PCR lieferte Amplifikate in der erwarteten Größe für alle vier untersuchten Pathotypen (Pfeilspitze). Es wurden keine Amplifikate in der DNA von nicht inokulierten Knollen der Sorte 'Tomensa' detektiert. Primer 30149 zeigte keine Amplifikation in allen Proben. P1: Pathotyp 1, P2: Pathotyp 2, P8: Pathotyp 8, P18: Pathotyp 18, Tom: gDNA 'Tomensa' (nicht inokuliert), M: Marker 1-kb Plus. Laufbedingungen: 1,5 % [w/v] Agarose, 10 V/cm, 60 Minuten.

Es wurde für 37 der 38 dargestellten Primer ein Amplifikat der erwarteten Größe detektiert (Abbildung 17). Lediglich Primer 30149 zeigte in keiner der untersuchten Proben eine Amplifikation. Es fand ein Nachweis der Sequenzen in den Pathotypen 1, 2, 8 und 18 statt. Als Kontrolle, ob eine Amplifikation lediglich in DNA infizierter Proben möglich war, wurde gDNA der Kartoffelsorte 'Tomensa' ohne vorherige Inokulation mit *Synchytrium* verwendet. Hier wurde in keiner Primerkombination eine Amplifikation detektiert.

Parallel zu den Transkriptomdaten wurden die Daten der Genomsequenzierung der Probe P18_C bioinformatisch bearbeitet. Die Strategie zur Datenauswertung wurde in der Abbildung 16 (grüner Abbildungsteil) dargestellt. In der Genomsequenzierung wurden 252.072.316 Reads generiert. Diese wurden ebenfalls einer technischen Qualitätskontrolle unterzogen. Die *de novo* Assemblierung der verbliebenen Reads lieferte 915.972 DNA Contigs. Die Contigs umfassten 300 bp bis 95 kb. In einem nachfolgenden Schritt wurden diese genomischen Contigs den entsprechenden EST aus den Transkriptomdaten zugeordnet. Das Mapping der genomischen Contigs gegen die 5.448 ESTs (Abbildung 16) lieferte 423 genomische Contigs, welche als Sequenzen von *S. endobioticum* gewertet wurden. In der Summe deckten die 423 genomischen Contigs einen Bereich von 2.081.121 bp ab. Der GC-Gehalt dieses Bereichs betrug 47 %. Die identifizierten Sequenzen aus diesem *whole genome shotgun sequencing* Projekt wurden auf DDBJ/EMBL/GenBank unter der Accession LDOR00000000, Version LDOR01000000 abgelegt.

3.1.3. Analyse der normalisierten Transkriptomdaten zur Identifikation weiterer Sequenzen von *S. endobioticum*

Um weitere Sequenzen des Erregers identifizieren zu können, wurde die Sequenzierung mit einer normalisierten cDNA-Bibliothek durchgeführt. Ziel dieses Ansatzes war es zusätzliche Sequenzen von *Synchytrium* zu identifizieren, da eine erste bioinformatische Untersuchung des vorherigen Datensatzes vermuten ließ, dass nur ein geringer Teil des Transkriptoms abgedeckt wurde. In dieser Variante wurden die überrepräsentierten Kartoffelgene in der Probe reduziert, um so eine bessere Auflösung für niedrig exprimierte Gene zu erhalten. Hierfür wurde die Probe P18-2 verwendet. Eine Übersicht über die Schritte zur Identifikation ergänzender Sequenzen von *S. endobioticum* wurde in Abbildung 18 zusammengefasst.

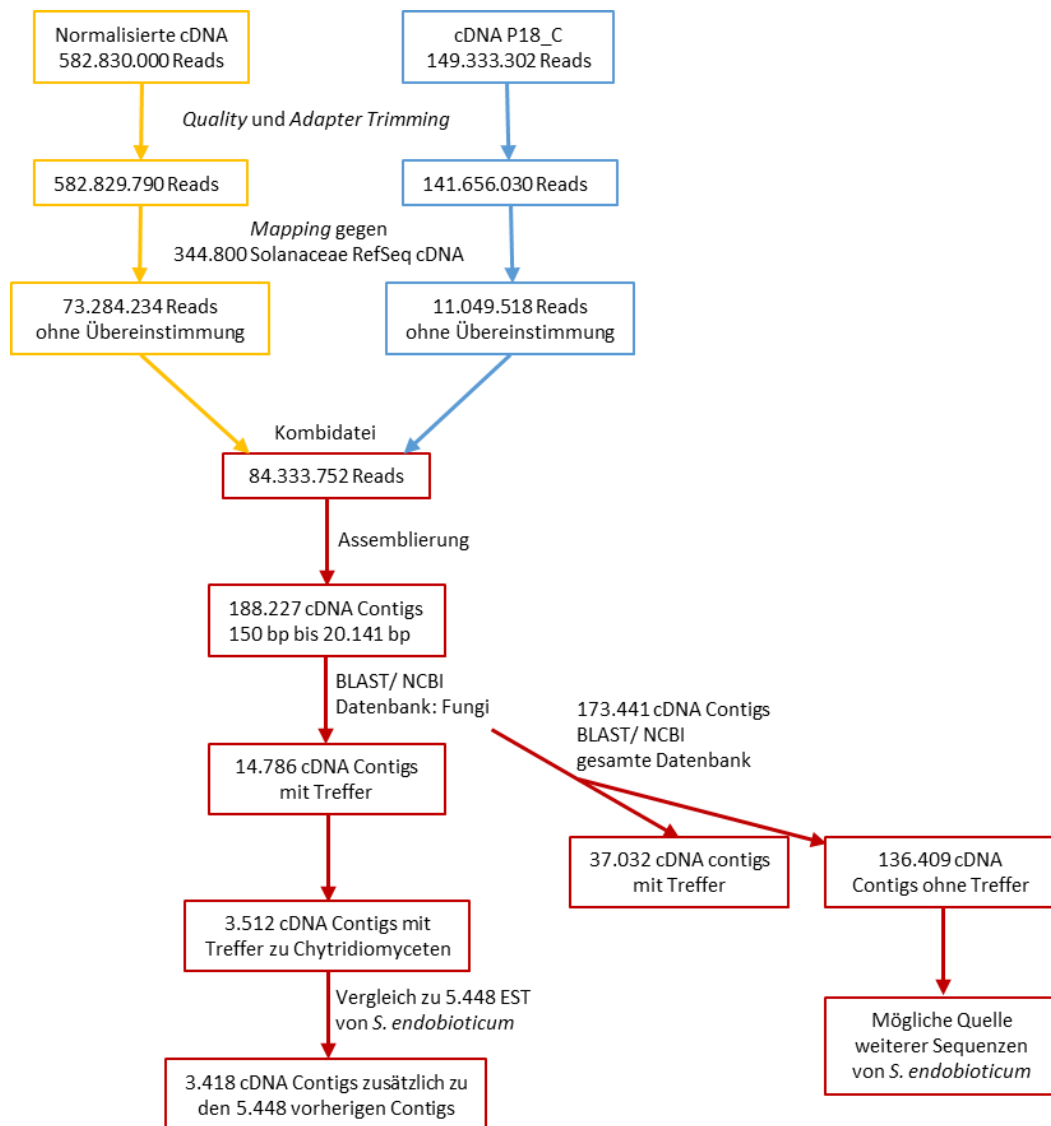


Abbildung 18: Übersichtsschema zur Identifikation weiterer Sequenzen von *S. endobioticum* basierend auf Sequenzdaten eines normalisierten RNAseq-Experiments. Sequenziert wurde RNA einer Kartoffelknolle der Sorte 'Tomensa', die mit *S. endobioticum* P18 infiziert war (Probe: P18-2). Es wurden 3.418 zusätzliche cDNA Contigs von *S. endobioticum* identifiziert. Mapping Parameter: Mismatch Cost = 2, Insertion Cost = 3, Deletion Cost = 3, Length Fraction = 0,5, Similarity Fraction = 0,8. Assemblierungsparameter: Mismatch Cost = 1, Insertion Cost = 2, Deletion Cost = 2, Length Fraction = 0,7, Similarity Fraction = 0,95.

Nach der Qualitätskontrolle verblieben 582.829.790 Reads für nachfolgende Analysen, wie in Abbildung 18 beschrieben. In einem ersten Schritt wurden die verbliebenen Reads gegen 344.800 cDNA Sequenzen der RefSeq-Datenbank (NCBI) der Solanaceae gemapped, um die pflanzlichen Sequenzen zu entfernen. Parallel wurden die Daten des vorherigen Transkriptomdatensatzes (Probe P18_C_RNA) in gleicher Weise behandelt. Jene Reads ohne Treffer in der Datenbank (73.284.234 Reads der Probe P18-2, 11.049.518 Reads der Probe P18_C) wurden in einer Datei kombiniert, um einen maximalen Gehalt an möglichen Sequenzen von *S. endobioticum* zu erhalten. Im Nachfolgenden wurde somit eine Gesamtanzahl von 84.333.752 Reads analysiert. Eine Assemblierung (Parameter: Mismatch Cost = 1, Insertion Cost = 2, Deletion Cost = 2, Length Fraction = 0,7, Similarity Fraction = 0,95) der Reads lieferte 188.227 cDNA Contigs mit einer Länge

zwischen 150 bp und 20.141 bp. Diese Contigs wurden gegen die pilzliche Datenbank von NCBI geblastet, was in 14.786 Contigs mit Treffern zu pilzlichen Sequenzen resultierte. Von diesen Contigs zeigten 3.152 Contigs einen Treffer zu Sequenzen von Chytridiomyzeten. Ein Vergleich mit den zuvor identifizierten 5.448 Sequenzen von *S. endobioticum* führte zur Identifikation von 3.418 zusätzlichen cDNA Contigs von *S. endobioticum*. Alle Contigs, die im vorherigen Schritt keine Treffer zu pilzlichen Sequenzen im BLAST zeigen, wurden gegen die gesamte Datenbank von NCBI verglichen. Dies lieferte 136.409 Contigs ohne einen Treffer zu bekannten Sequenzen. Auch dies könnte eine weitere Quelle von Sequenzen von *S. endobioticum* sein, die aufgrund fehlender Referenzsequenzen bisher nicht *Synchytrium* zugeordnet werden konnten.

3.1.4. Abschätzung der Transkriptomabdeckung von *S. endobioticum*

Die zuvor identifizierten cDNA Sequenzen von *S. endobioticum* wurden mit Hilfe der Software BUSCO auf den Grad der Transkriptomabdeckung untersucht. Mit Hilfe eines pilzlichen Trainingssets bestehend aus *single copy* Orthologen, wurde abgeschätzt zu welchem Anteil das Transkriptom von *S. endobioticum* wahrscheinlich in den vorhandenen Daten abgebildet wurde. Die BUSCO-Analyse zeigte, dass der vorhandene Datensatz von *S. endobioticum* P18 das erwartete Transkriptom zu ungefähr 50 % abdeckte.

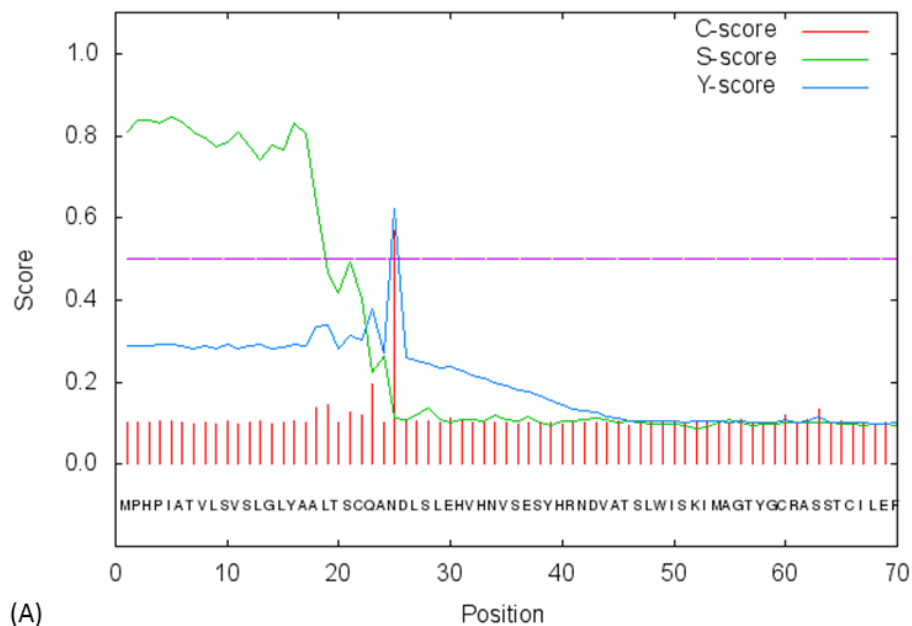
3.2. Effektorkandidaten von *Synchytrium endobioticum*

3.2.1. Identifikation von Effektorproteinen von *S. endobioticum* Pathotyp 18

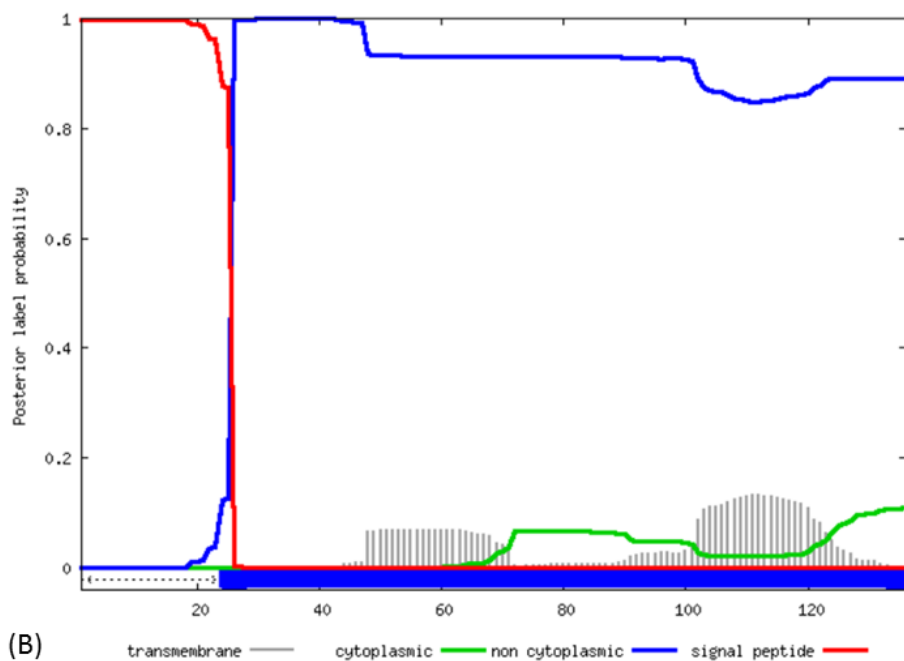
Mit Hilfe der in Abbildung 14 dargestellten Analysepipeline war es möglich potentielle Effektoren von *S. endobioticum* P18 zu identifizieren. Hierfür wurden die Aminosäuresequenzen aller sechs *Reading Frames* der cDNA Contigs abgeleitet und bioinformatisch analysiert. Eine Gesamtbetrachtung der untersuchten Parameter führte zur Klassifizierung von Sequenzen als mögliche Effektoren von *S. endobioticum* P18.

In einem ersten Schritt wurden alle abgeleiteten Aminosäuresequenzen auf das Vorhandensein von Signalpeptiden und somit einer möglichen Sekretion aus der Zelle untersucht. Zur Bestimmung von Signalpeptiden innerhalb der Aminosäuresequenzen wurden zwei verschiedene Webserver verwendet. Es wurden SignalP und Phobius für die Vorhersage von N-terminalen Signalpeptiden genutzt. Die Vorhersage mittels SignalP basierte auf neuronalen Netzen, wohingegen die Vorhersage von Signalpeptiden und Transmembrandomänen in Phobius auf einem Hidden Markov Model (HMM) basierte. Die Vorhersagen der Signalpeptide waren auf die Erkennung der Schnittstelle des Signalpeptids gegründet, sowie der Analyse von hydrophoben Regionen. Diese sind bei Transmembrandomänen länger als bei Signalpeptiden. Für weitere Analysen wurden lediglich jene Proteine beachtet, die in beiden Programmen ein vorhergesagtes

Signalpeptid aufwiesen. Diese Ergebnisse wurden exemplarisch in der Abbildung 19 für das Contig P18_C_Contig_24410_Frame_2 veranschaulicht.



(A)



(B)

Abbildung 19: Exemplarische Darstellung des Outputs der Sequenzanalyse mittels SignalP (A) und Phobius (B) für das Contig P18_C_Contig_24410_Frame_2. Vorhergesagt wurden Signalpeptide mit zugehöriger Schnittstelle in der Aminosäuresequenz. (A) Vorhersage eines Signalpeptids in SignalP mit Schnittstelle an Position 24 der Aminosäuresequenz. C-Score: *raw cleavage site score*, zur Unterscheidung von Signalpeptiden zu anderen Peptiden (Wert ist direkt nach der Schnittstelle des Signalpeptids am höchsten); S-Score: *signal peptide score*, zur Unterscheidung der Positionen innerhalb des Signalpeptids zu Peptiden des ausgereiften Proteins; Y-Score: *combined cleavage site score*, geometrisches Mittel des C-Scores und der Steigung des S-Scores zur verbesserten Abschätzung der Schnittstelle des Signalpeptids. (B) Vorhersage eines Signalpeptids in Phobius mit Schnittstelle an Position 24 der Aminosäuresequenz. Farbcodierung der Wahrscheinlichkeit von vorhergesagten Eigenschaften: Rot: Signalpeptid, Blau: nicht im Zytoplasma, Grün: Zytoplasma, Grau: Transmembran.

In Abbildung 19 wurde beispielhaft der graphische Output der Sequenzanalyse mittels SignalP (Abbildung 19 (A)) und Phobius (Abbildung 19 (B)) für eine Beispielsequenz dargestellt. In beiden Programmen wurde ein Signalpeptid von ungefähr 24 Aminosäuren vorausgesagt. Diese Analyse wurde mit allen abgeleiteten Aminosäuresequenzen der von *S. endobioticum* P18 vorhandenen cDNA-Sequenzen durchgeführt. Es ergab sich daraus, dass das Sekretom, welches alle sekretierten Proteine beinhaltet, insgesamt 475 Proteine umfasst. Die vorhergesagten Signalpeptide waren im Schnitt um die 20 Aminosäuren lang.

Diese Sequenzen wurden weiterführend bioinformatisch analysiert. Im Nachfolgenden wurden allerdings lediglich die Ergebnisse für die letztlich identifizierten 66 Effektorkandidaten dargestellt. Eine tabellarische Zusammenfassung der Effektorkandidaten mit Annotation des Contigs wurde in Tabelle 7 vorgenommen.

Tabelle 7: Übersicht über die 66 Effektorkandidaten, welche für die weiterführenden Sequenzanalysen genutzt wurden.

Effektorkandidat	Annotation
P18_C_contig_13241_Gesamtsequenz Effektor_154AS	f-box and wd-40 domain-containing protein cdc 4
P18_C_contig_158_Gesamtsequenz Effektor_131AS	nucleolar protein nop56
P18_C_contig_4522_Gesamtsequenz Effektor_107AS	fha domain-containing protein
P18_C_contig_20688_Gesamtsequenz Effektor_50AS	cell division cycle protein 23 homolog
P18_C_contig_5544_Gesamtsequenz Effektor_AS_341AS	mrp-l28 domain protein
P18_C_contig_6038_Gesamtsequenz Effektor_118AS	p-loop containing nucleosidetriphosphatasehydrolase protein
P18_C_contig_13822_Gesamtsequenz Effektor_134AS	hypothetical protein BATDEDRAFT 34112
P18_C_contig_20874_Gesamtsequenz Effektor_137AS	alg5p
P18_C_contig_3998_Gesamtsequenz Effektor_62AS	tpa: afu orthologue afua
P18_C_contig_17205_Gesamtsequenz Effektor_72AS	mboat-domain-containing protein
P18_C_Contig_15923_Gesamtsequenz Effektor_74AS	hypothetical protein BATDEDRAFT 34789
P18_C_contig_17586_Gesamtsequenz Effektor_69AS	hypothetical protein BATDEDRAFT 85767
P18_C_contig_17636_Gesamtsequenz Effektor_103AS	mitochondrial chaperone bcs1
P18_C_contig_24410_Gesamtsequenz Effektor_136AS	wd40 repeat-containing protein
P18_C_contig_23258_Gesamtsequenz Effektor_AS_271AS	---NA---
P18_C_contig_18768_Gesamtsequenz Effektor_107AS	thymidylate synthase
P18_C_contig_12058_Gesamtsequenz Effektor_72AS	---NA---
P18_C_contig_21903_Gesamtsequenz Effektor_115AS	---NA---
P18_C_contig_11376_Gesamtsequenz Effektor_106AS	transmembrane 9 superfamily member partial
P18_C_contig_14452_Gesamtsequenz Effektor_94AS	---NA---
P18_C_contig_820_Gesamtsequenz Effektor_112AS	karyopherin alpha
P18_C_contig_59_Gesamtsequenz Effektor_73AS	rna-binding domain-containing protein
P18_C_contig_3147_Gesamtsequenz Effektor_50AS	ctd small phosphatase-like protein 2 isoform x2

Fortsetzung Tabelle 7: Übersicht über die 66 Effektorkandidaten, welche für die weiterführenden Sequenzanalysen genutzt wurden.

Effektorkandidat	Annotation
P18_C_contig_404_Gesamtsequenz Effektor_51AS	nucleolar gtp-binding protein 2
P18_C_contig_2158_Gesamtsequenz Effektor_72AS	diphosphomevalonate decarboxylase
P18_C_contig_1644_Gesamtsequenz Effektor_52AS	S-adenosylmethionine synthase Batrachochytrium
P18_C_contig_232_Gesamtsequenz Effektor_111AS	serine threonine-protein phosphatase pp-x isozyme 2
P18_C_contig_4632_Gesamtsequenz Effektor_101AS	translation initiation factor eif2 alpha subunit
P18_C_contig_1590_Gesamtsequenz Effektor_71AS	mcm-domain-containingprotein
P18_C_contig_9555_Gesamtsequenz Effektor_51AS	9546fthfs-domain-containing protein
P18_C_contig_9742_Gesamtsequenz Effektor_74AS	glycosyl transferase family 32 protein
P18_C_contig_3052_Gesamtsequenz Effektor_62AS	mitochondrial genome maintenance protein mgm 101
P18_C_contig_5644_Gesamtsequenz Effektor_52AS	Imbr1 domain-containing protein 2
P18_C_contig_4838_Gesamtsequenz Effektor_56AS	mitochondrial import innermembrane translocase subunit tim 8a
P18_C_contig_7924_Gesamtsequenz Effektor_215AS	stromal cell-derived factor2-like
P18_C_contig_12020_Gesamtsequenz Effektor_223 AS	ubiquinone biosynthesis protein coq 7 homolog
P18_C_contig_7931_Gesamtsequenz Effektor_180AS	hypothetical protein BATDEDRAFT 24269
P18_C_contig_13242_Gesamtsequenz Effektor_74AS	serine palmitoyl transferase
P18_C_contig_21259_Gesamtsequenz Effektor_161AS	hypothetica lprotein BATDEDRAFT 34178
P18_C_contig_9561_Gesamtsequenz Effektor_101AS	peptidylprolyl isomerase family protein cpr5
P18_C_contig_708_Gesamtsequenz Effektor_91AS	diphthamide biosynthesis protein 1
P18_C_contig_16505_Gesamtsequenz Effektor_79AS	hypothetical protein BATDEDRAFT 92269
P18_C_contig_4564_Gesamtsequenz Effektor_70AS	phosphopantothenoyl cysteine decarboxylase
P18_C_contig_6477_Gesamtsequenz Effektor_173AS	ssu72-like protein
P18_C_contig_7419_Gesamtsequenz Effektor_59AS	probable peroxisomal half abc transporter
P18_C_contig_10703_Gesamtsequenz Effektor_65AS	cell cycle control protein
P18_C_contig_11138_Gesamtsequenz Effektor_145AS	protein disulfide-isomerase domain- containing variant 1
P18_C_contig_818_Gesamtsequenz Effektor_143AS	fk506-binding protein 2
P18_C_contig_867_Gesamtsequenz Effektor_71AS	s-phasekinase-associated protein 1
P18_C_contig_8819_Gesamtsequenz Effektor_54AS	ornithine carbamoyl transferase
P18_C_contig_15062_Gesamtsequenz Effektor_60AS	guanine nucleotide-binding3-like protein
P18_C_contig_18396_Gesamtsequenz Effektor_94AS	cyclin-domain-containing protein
P18_C_contig_13808_Gesamtsequenz Effektor_50AS	armadillo repeat protein
P18_C_contig_8695_Gesamtsequenz Effektor_123AS	dna-directed rna polymerase complex i subunit rpa 12
P18_C_contig_7076_Gesamtsequenz Effektor_70AS	ubiquitin-like1-activating enzyme e1a
P18_C_contig_9511_Gesamtsequenz Effektor_87AS	---NA---

Fortsetzung Tabelle 7: Übersicht über die 66 Effektorkandidaten, welche für die weiterführenden Sequenzanalysen genutzt wurden.

Effektorkandidat	Annotation
P18_C_contig_7174_Gesamtsequenz Effektor_55AS	hypothetical protein BATDEDRAFT 26370
P18_C_contig_23059_Gesamtsequenz Effektor_77AS	---NA---
P18_C_contig_16314_Gesamtsequenz_105AS	cysteinyl-trna synthetase
P18_C_contig_16558_Gesamtsequenzen Effektor_100AS	transmembrane protein 32 family protein
P18_C_contig_7431_Gesamtsequenz Effektor_54AS	---NA---
P18_C_contig_8270_Gesamtsequenz Effektor_52AS	hypothetical protein RirG27190
P18_C_contig_15704_Gesamtsequenz Effektor_51AS	translation elongation factor
P18_C_contig_17637_Gesamtsequenz Effektor_73AS	---NA---
P18_C_contig_14425_Gesamtsequenz Effektor_94 AS	tumor differentially expressed protein
P18_C_contig_4592_Gesamtsequenz Effektor_56AS	dna mismatch repair protein msh6

Ein weiterer Schritt für die Vorhersage einer Beteiligung am sekretorischen Weg der abgeleiteten Proteine war die Sequenzanalyse mittels TargetP. Hier wurde die Wahrscheinlichkeit berechnet, mit der ein Protein eine bestimmte Route innerhalb der Zelle einschlägt. Die Bestimmung der Lokalisation innerhalb der Zelle basierte auf der Vorhersage N-terminaler Pre-Sequenzen wie Transitpeptide von Chloroplasten, mitochondriale Zielsequenzen oder Signalpeptide des sekretorischen Weges. Die Wahrscheinlichkeit, mit der die vorhergesagte Lokalisierung in der Zelle zutreffend war, wurde durch die *reliability class* (RC) angegeben. Je kleiner dieser Wert, desto gesicherter die Vorhersage. Die Ergebnisse für die Sequenzen, welche als Effektorkandidaten angenommen wurden, wurden in Tabelle A 14 des Anhangs zusammengefasst. Es zeigte sich, dass für 61 der analysierten Sequenzen eine Beteiligung am sekretorischen Weg in der Zelle vorhergesagt wurde. Für lediglich vier Sequenzen wurde ein mitochondriales Transitpeptid vorhergesagt, für eine Sequenz konnte keine Lokalisation bestimmt werden. Von den 61 Sequenzen mit Lokalisation im sekretorischen Weg waren 33 der *reliability class* 1 zugeordnet, 15 der *reliability class* 2, sieben der *reliability class* 3, vier der *reliability class* 4 und zwei der *reliability class* 5.

Ebenfalls wurde die Anzahl von Disulfidbrücken innerhalb der Proteinsequenzen mittels DISULFIND vorhergesagt. Disulfidbrücken bilden sich zwischen Cysteinen innerhalb eines Proteins aus und dienen zur Stabilisierung der Struktur und machen das Protein widerstandsfähiger gegenüber den harschen Bedingungen im Apoplasten der Pflanzenzelle. Die Anzahlen der vorhergesagten Disulfidbrücken in den 66 analysierten Sequenzen wurden in Tabelle A 15 des Anhangs zusammengefasst. Exemplarisch wurde die Vorhersage der Disulfidbrücken für das Contig P18_C_Contig_24410_Frame_2 in Abbildung 20 veranschaulicht.

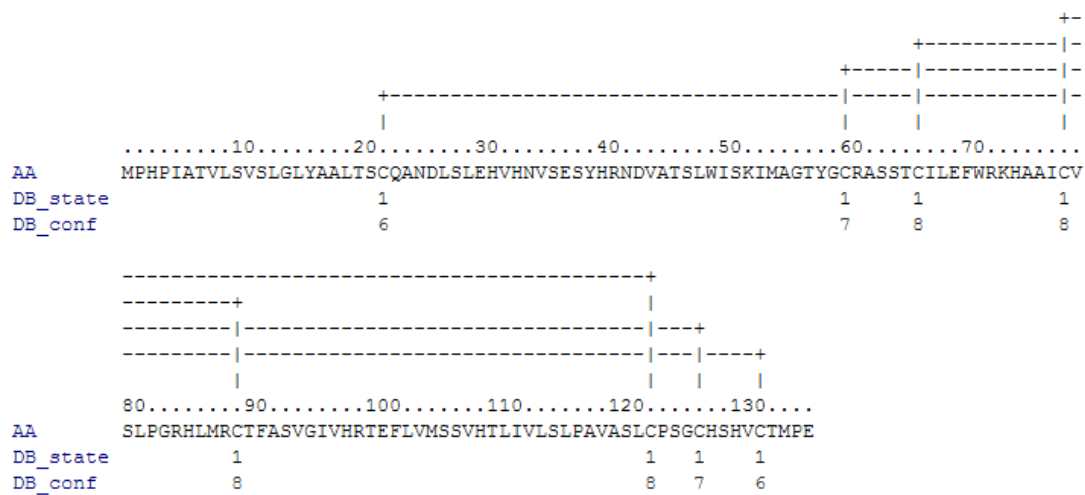


Abbildung 20: Vorhersage der Disulfidbrücken innerhalb der Proteinsequenz des Contigs P18_C_Contig_24410_Frame_2. DB_state: Vorhergesagte Bindung (1= Bindung ausgeprägt, 0 = Keine Bindung), DB_conf: Wahrscheinlichkeit der Bindung (0 = niedrig, 9 = hoch).

In dem in Abbildung 20 dargestellten Beispiel zur Bestimmung von Disulfidbrückenbindungen wurden vier Disulfidbrücken vorhergesagt. Sie wurden mit einem Wahrscheinlichkeitswert (DB_conf) zwischen 6 und 8 angegeben. Dies sprach für eine hohe Wahrscheinlichkeit der Ausprägung dieser Bindungen zwischen den Cysteinen.

Die Ergebnisse wurden zusammenfassend mit den Ergebnissen der Analyse aus SignalP, Phobius und EffectorP in der Tabelle A 15 des Anhangs dargestellt. Eine Übersicht über die Verteilung der Disulfidbrücken wurde in Abbildung 21 dargestellt.

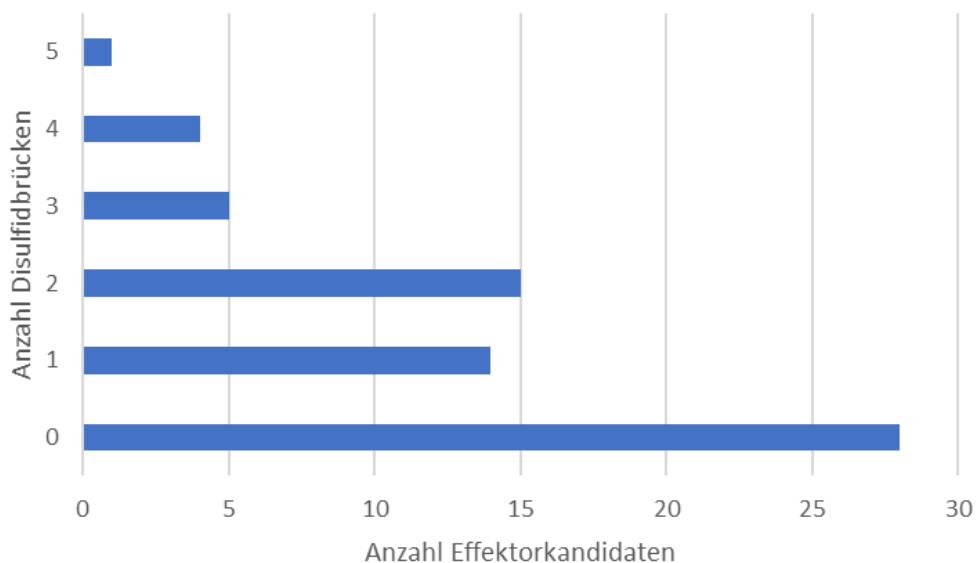


Abbildung 21: Übersicht über die Verteilung der Disulfidbrücken zwischen den untersuchten Sequenzen. Es wurden zwischen null und fünf Disulfidbrücken vorhergesagt, wobei für die Mehrzahl der untersuchten Proteine keine Ausbildung von Disulfidbrücken berechnet wurde.

Anhand der Abbildung 21 wurde deutlich, dass für nur einen geringen Teil der Sequenzen mehrere Disulfidbrücken vorhergesagt wurden. Für zehn Sequenzen wurden drei oder mehr Disulfidbrücken vorhergesagt. Achtundzwanzig Sequenzen wiesen keine Disulfidbrücken auf.

Diese Sequenzen wurden weiterführend mit EffectorP analysiert. Hierbei wurde eine Wahrscheinlichkeit berechnet, mit welcher die untersuchte Sequenz als Effektor wirksam sein könnte. EffectorP basierte auf der Hypothese, dass pilzliche Effektoren in die Wirtszelle transloziert werden und anschließend funktional in der Wirtszelle vorliegen. Es handelte sich bei dieser Software um die erste *machine learning* basierte Methode. Das Training dieser Methode basierte auf der Kombination verschiedener Programme wie SignalP (NORDAHL PETERSEN *et al.*, 2011), TMHMM v.2.0 (KROGH *et al.*, 2001) zur Vorhersage von Transmembranproteinen, sowie weiteren Programmen zur Bestimmung der Aminosäurefrequenzen.

Es wurden 66 Sequenzen identifiziert, für die eine Wirkung als Effektor vorhergesagt wurde. Diese Sequenzen enthielten ein Signalpeptid (vorhergesagt in SignalP und Phobius), waren größtenteils am sekretorischen Weg beteiligt und wurden als Effektor in EffectorP klassifiziert. Diese Sequenzen wurden als mögliche Effektoren von *S. endobioticum* P18 bewertet.

Eine Übersicht über den Umfang des vorhergesagten Sekretoms und der darin enthaltenen Effektorkandidaten wurde in der Abbildung 22 zusammengefasst.

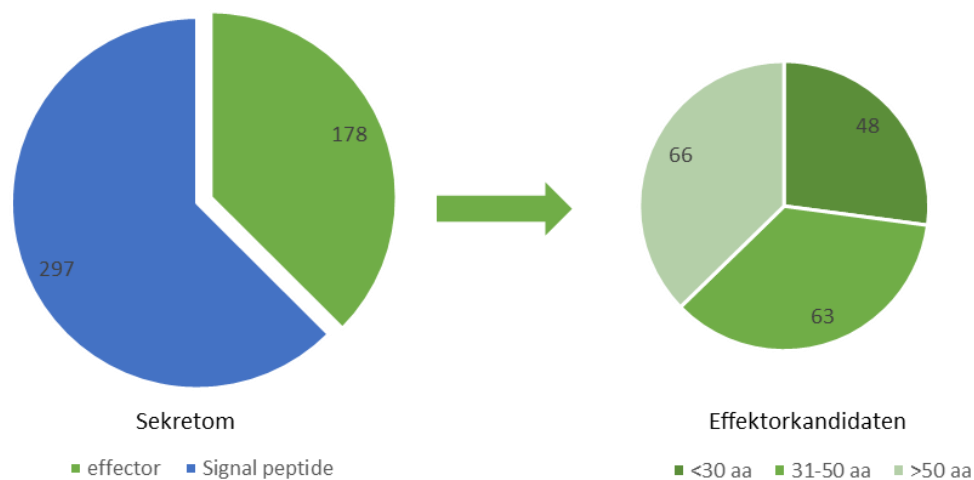


Abbildung 22: Sekretom und Effektorkandidaten der abgeleiteten Aminosäuresequenzen aus *S. endobioticum* P18. Dargestellt wurden alle Proteine, für die in SignalP und Phobius ein Signalpeptid vorhergesagt wurde.

Insgesamt umfasste das Sekretom 475 Proteine, von denen in einer ersten Analyse 178 als Effektor in Frage kämen. Allerdings umfasste diese Proteingruppe viele vorhergesagte Peptide/Proteine mit weniger als 50 Aminosäuren (Abbildung 22). Es waren 63 Proteine mit weniger als 30 Aminosäuren und 48 Proteine mit weniger als 50 Aminosäuren. Die 66 Sequenzen mit mehr als 50 Aminosäuren wurden als Effektorkandidaten gewertet.

Diese Effektorkandidaten wurden mittels PS_Scan auf das Vorhandensein von funktionalen Aminosäuremuster analysiert. Es wurden 21 verschiedene funktionale Aminosäuremuster innerhalb der 66 Sequenzen identifiziert (Abbildung 23).

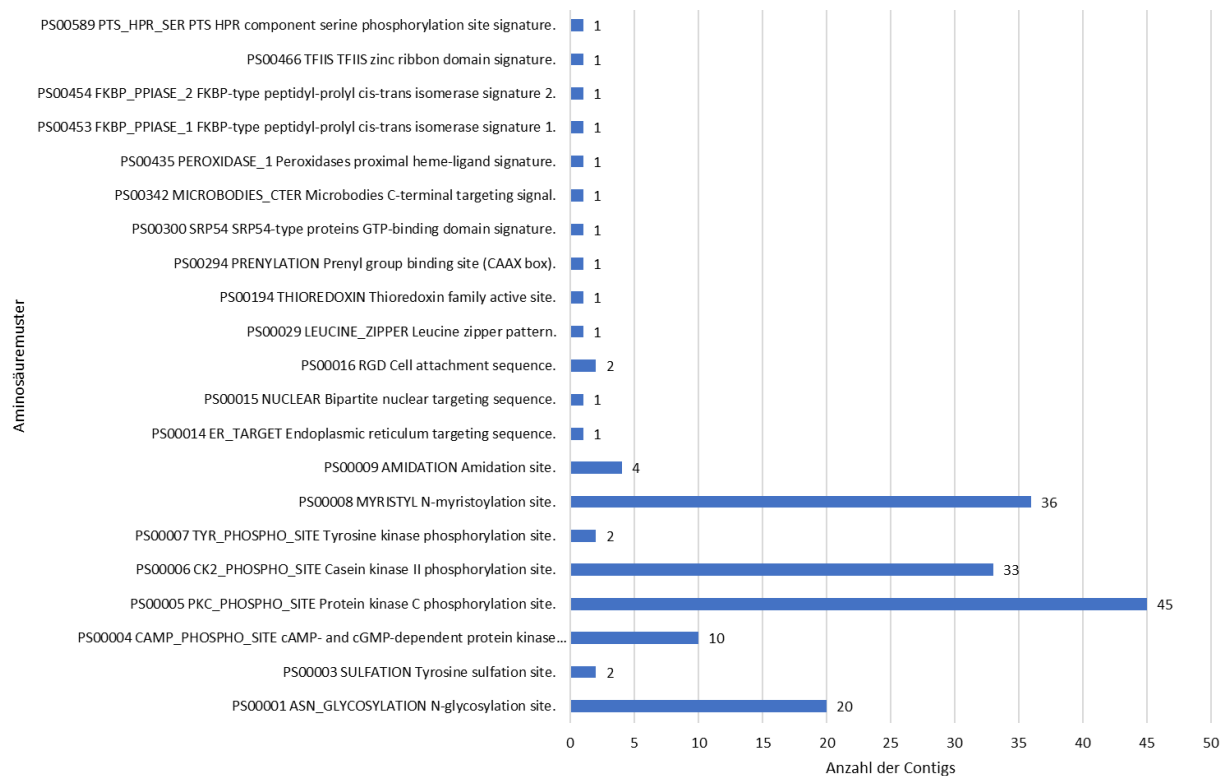


Abbildung 23: Sequenzanalyse der Effektorkandidaten des Sequenzpools von *S. endobioticum* P18 auf das Vorhandensein funktionaler Aminosäuremuster mittels PS_Scan.

Für die Effektorkandidaten aus dem Sequenzpool der *S. endobioticum* zugeordneten Contigs ergab sich, dass die Mehrzahl der Sequenzen Phosphorylierungs- und Glycosylierungsstellen aufwies (Abbildung 23). Mit 45 Effektorkandidaten war die Proteinkinase C Phosphorylierungsstelle das am häufigsten vorkommende Aminosäuremuster. Zusätzlich waren Myristoylierungsstellen in 36 Effektorkandidaten als häufig vertretenes Muster vorhanden, gefolgt von Casein Kinase II Phosphorylierungsstellen und Glycosylierungsstellen.

Die cDNA Contigs von *S. endobioticum* aus der Analyse des normalisierten Datensatzes wurden wie die 5.448 Sequenzen der ursprünglichen Analyse untersucht. Hierbei ergaben sich keine neuen Effektorkandidaten innerhalb der zusätzlichen 3.418 Contigs, allerdings wurde der gesamte Datensatz genutzt, um die bereits bestehenden Contigs in einigen Fällen zu verlängern. Auf diese Weise wurden in einigen Fällen die Gensequenzen vervollständigt.

Zusätzlich zu den oben aufgeführten Analysen wurde ein BLAST gegen die PHI-Datenbank (BALDWIN *et al.*, 2006) durchgeführt, um Sequenzähnlichkeiten zu bereits identifizierten Effektoren anderer Pathogene zu identifizieren. Hierbei wurde allerdings lediglich zwei Treffer für die Contigs P18_C_Contig_8562 und P18_C_Contig_1526 erzielt. Diese Contigs entsprachen allerdings nicht

den vorab definierten Kriterien zur Bewertung einer Sequenz als Effektorkandidat und wurden daher nicht in die Liste möglicher Kandidaten aufgenommen.

Ein weiterer Ansatz war es Sequenzübereinstimmungen zu *vir* (Virulenz)-Genen von *A. tumefaciens* zu finden, um Rückschlüsse auf Ähnlichkeiten in der Ausbildung von Zellwucherungen ziehen zu können. Hierfür wurde ein BLAST gegen die bekannten Sequenzen von *A. tumefaciens* durchgeführt, welche allerdings kein positives Ergebnis lieferten.

3.2.2. Identifizierung von Effektorkandidaten aus einem Sequenzpool ohne Sequenzübereinstimmungen zu bekannten Taxa

Neben den Sequenzen, die *Synchytrium endobioticum* P18 zugeordnet werden konnten, waren ebenfalls Sequenzen vorhanden, welche keine Homologien zu anderen bekannten Sequenzen aufwiesen. Dieser Sequenzpool umfasste 12.343 Contigs, von denen ebenfalls die Aminosäuren für alle sechs *Reading Frames* abgeleitet wurden. Diese Sequenzen wurden ebenfalls mit der in Abbildung 14 dargestellten Analysepipeline bioinformatisch untersucht. Es konnten 45 Sequenzen bestimmt werden, die ein Signalpeptid beinhalteten und in EffectorP als Effektor klassifiziert wurden. Allerdings handele es sich bei 39 Sequenzen um unvollständige Sequenzen, welche kein Stop-Codon in der Sequenz beinhalteten. Sechs Sequenzen enthielten Start- und Stop-Codon, welche in rot in der Tabelle 8 gekennzeichnet wurden. Somit konnten endgültig als Effektorkandidat nur diese sechs Sequenzen gewertet werden. Eine Übersicht über die 45 Contigs wurde in Tabelle 8 dargestellt.

Tabelle 8: Zusammenfassung der Effektorkandidaten aus dem Sequenzpool ohne Homologien zu bekannten Sequenzen. Angegeben wurden die Anzahl der Aminosäuren und Disulfidbrücken, sowie die Wahrscheinlichkeit, mit der die Sequenz als Effektor bestimmt durch EffectorP wirksam wird. Rot hervorgehoben wurden die Contigs mit vollständiger Aminosäuresequenz.

Contig	Anzahl AS	Disulfidbrücken	EffectorP
P18_C_contig_18105_RACE_81 AS	81	0	0,994
P18_C_contig_12409_RACE_66 AS	66	3	1
P18_C_contig_26170_RACE_87 AS	87	0	0,901
P18_C_contig_13994_RACE_87 AS	87	2	1
P18_C_contig_18190 Gesamtsequenz Effektor_86 AS	86	0	0,996
P18_C_contig_30075_Gesamtsequenz Effektor_67 AS	67	1	0,734
P18_C_contig_30075_RACE_53 AS	53	2	1
P18_C_contig_10293_RACE_82 AS	82	0	1
P18_C_contig_21085_RACE_83 AS	83	0	0,925
P18_C_contig_16348_RACE_58 AS	58	2	1
P18_C_contig_11541_Gesamtsequenz Effektor_72 AS	72	2	0,95
P18_C_contig_19104_RACE_51 AS	51	0	0,789

Fortsetzung Tabelle 8: Zusammenfassung der Effektorkandidaten aus dem Sequenzpool ohne Homologien zu bekannten Sequenzen.

Contig	Anzahl AS	Disulfidbrücken	EffectorP
P18_C_contig_17547_Gesamtsequenz Effektor_237 AS	69	2	0,932
P18_C_contig_19966_RACE_63 AS	63	3	0,999
P18_C_contig_31363_RACE_82 AS	82	2	0,637
P18_C_contig_8429_RACE_70 AS	70	0	0,98
P18_C_contig_10585_RACE_67 AS	67	1	0,947
P18_C_contig_11637_RACE_79 AS	79	0	0,773
P18_C_contig_23184_RACE_67 AS	67	0	0,523
P18_C_contig_29191_RACE_69 AS	69	2	0,98
P18_C_contig_13441_RACE_75 AS	75	0	0,991
P18_C_contig_10387_RACE_76 AS	76	0	0,586
P18_C_contig_9779_RACE_73 AS	73	0	0,96
P18_C_contig_5667_RACE_72 AS	72	0	0,988
P18_C_contig_14434_RACE_74 AS	74	0	1
P18_C_contig_21603_RACE_71 AS	71	0	0,985
P18_C_contig_19879_RACE_56 AS	56	0	0,674
P18_C_contig_24871_RACE_54 AS	54	3	1
P18_C_contig_11569_Gesamtsequenz Effektor_54 AS	54	3	1
P18_C_contig_7103_RACE_64 AS	64	1	0,962
P18_C_contig_20732_RACE_55 AS	55	1	0,669
P18_C_contig_25185_RACE_66 AS	66	2	0,998
P18_C_contig_25185_RACE_65 AS	65	4	1
P18_C_contig_27160_RACE_57 AS	57	0	0,999
P18_C_contig_16579_RACE_58 AS	58	1	0,996
P18_C_contig_21718_RACE_69 AS	69	0	1
P18_C_contig_23790_RACE_54 AS	54	0	0,996
P18_C_contig_12492_RACE_69 AS	69	0	0,947
P18_C_contig_6358_RACE_59 AS	59	0	0,891
P18_C_contig_28209_RACE_59 AS	59	1	0,77
P18_C_contig_23891_Gesamtsequenz Effektor_59 AS	59	3	1
P18_C_contig_10104_RACE_52 AS	52	0	0,766
P18_C_contig_26700_RACE_68 AS	68	0	0,866
P18_C_contig_17457_RACE_65 AS	65	0	0,874
P18_C_contig_13994_RACE_86 AS	86	2	1

Diese 45 Sequenzen wurden ebenfalls mittels PS_Scan auf das Vorhandensein von funktionalen Aminosäuremustern untersucht (Abbildung 24).

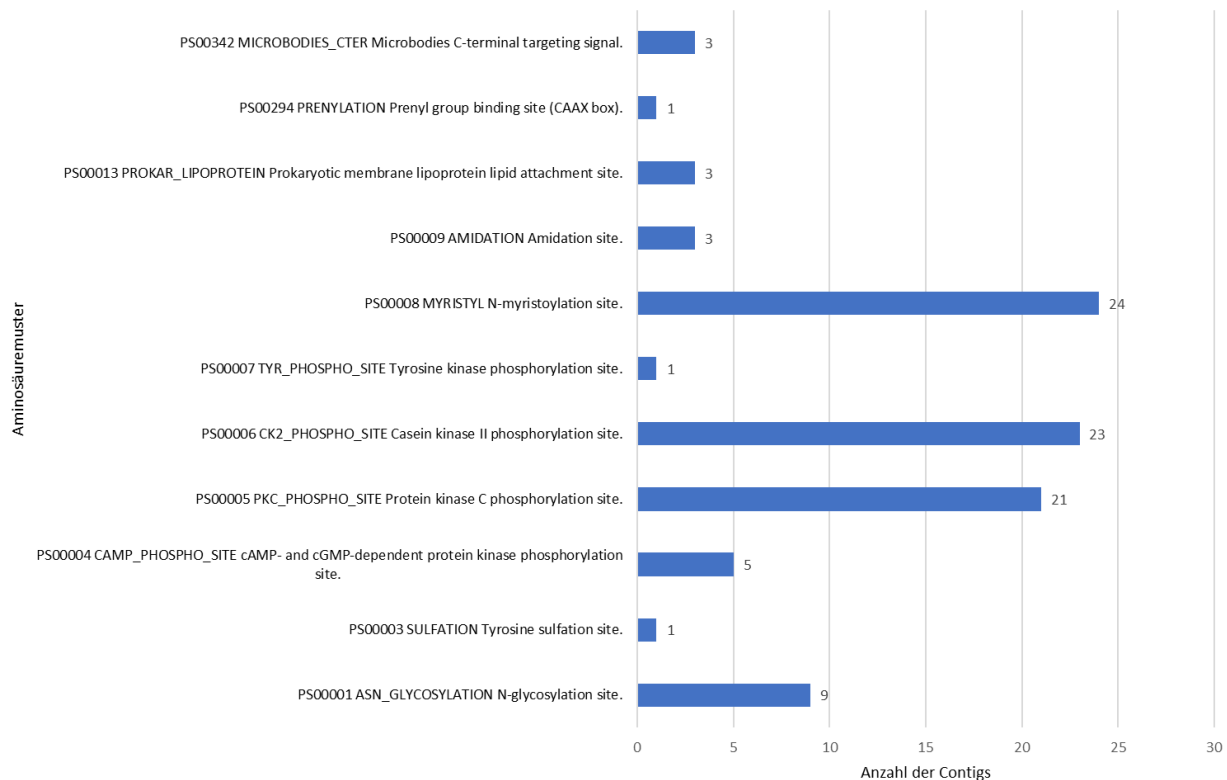


Abbildung 24: Sequenzanalyse der Effektorandidaten des Sequenzpools ohne Sequenzähnlichkeiten zu anderen Proteinen auf das Vorhandensein funktionaler Aminosäuremuster mittels PS_Scan (http://www.hpa-bioinfotools.org.uk/cgi-bin/ps_scan/ps_scanCGI.pl).

Die am häufigsten vorkommenden Muster waren auch in diesem Pool Phosphorylierungs-, Myristoylierungs- und Glycosylierungsstellen.

3.3. Bioinformatischer und molekularbiologischer Nachweis von Effektorandidaten in verschiedenen Pathotypen von *S. endobioticum*

Zur Abschätzung der Expressionsstärke der Effektorandidaten in Pathotyp 18 und Pathotyp 1 wurde eine RNAseq-Analyse mit diesen Sequenzen vorgenommen. Mit dieser Methode wurden die Effektorandidaten bioinformatisch in den Pathotypen 1 und 18 nachgewiesen. Hierfür wurden die Originaldaten der Datensätze aus Abschnitt 2.4 verwendet und auf die Effektorandidaten gemapped, welche als Referenz dienten. Eine Zusammenfassung dieser RNAseq-Analyse der potentiellen Effektoren aus dem Sequenzpool von *S. endobioticum* wurde in Tabelle 9 dargestellt.

Tabelle 9: Bioinformatischer Nachweis der Effektorkandidaten von *S. endobioticum* P18 in den Pathotypen P1 und P18. Angegeben wurden die Gesamtzahlen der RNAseq-Reads, die auf den jeweiligen Effektorkandidat gemapped wurden.

ID	P18 RNAseq	P1 RNAseq
P18_C_contig_5544_345_to_1_Frame_-2	41	2
P18_C_contig_23258_195_to_1_Frame_-2	3	2
P18_C_contig_12020_717_to_49_Frame_-3	67	0
P18_C_contig_7924_745_to_101_Frame_-3	35	0
P18_C_contig_7931_85_to_624_Frame_1	108	2
P18_C_contig_6477_584_to_66_Frame_-1	40	0
P18_C_contig_21259_119_to_601_Frame_2	40	0
P18_C_contig_13241_404_to_6_Frame_-1	25	0
P18_C_contig_11138_549_to_115_Frame_-2	54	0
P18_C_contig_818_37_to_465_Frame_1	66	0
P18_C_contig_20874_181_to_5_Frame_-2	19	0
P18_C_contig_24410_17_to_265_Frame_2	2	0
P18_C_contig_13822_407_to_6_Frame_-1	38	0
P18_C_contig_158_880_to_1161_Frame_1	73	1
P18_C_contig_8695_35_to_403_Frame_2	19	0
P18_C_contig_6038_339_to_1_Frame_-1	27	0
P18_C_contig_21903_31_to_213_Frame_1	7	0
P18_C_contig_820_1809_to_1474_Frame_-3	388	6
P18_C_contig_232_845_to_1177_Frame_2	350	49
P18_C_contig_4522_230_to_6_Frame_-3	35	0
P18_C_contig_18768_86_to_253_Frame_2	12	0
P18_C_contig_11376_188_to_6_Frame_-3	19	0
P18_C_contig_16314_21_to_335_Frame_3	23	0
P18_C_contig_17636_86_to_307_Frame_2	11	0
P18_C_contig_4632_40_to_342_Frame_1	164	0
P18_C_contig_9561_20_to_322_Frame_2	50	0
P18_C_contig_16558_319_to_20_Frame_-2	15	0
P18_C_contig_14452_492_to_211_Frame_-3	22	0
P18_C_contig_18396_92_to_373_Frame_2	28	0
P18_C_contig_14425_175_to_5_Frame_-2	19	0
P18_C_contig_708_381_to_109_Frame_-3	20	0
P18_C_contig_9511_20_to_280_Frame_2	19	0
P18_C_contig_17205_221_to_6_Frame_-3	13	0
P18_C_contig_16505_40_to_276_Frame_1	17	0
P18_C_contig_23059_334_to_104_Frame_-1	5	0
P18_C_contig_9742_433_to_212_Frame_-2	42	0
P18_C_contig_13242_443_to_222_Frame_-2	29	1
P18_C_contig_15923_213_to_1_Frame_-3	11	0
P18_C_contig_59_514_to_732_Frame_1	271	16
P18_C_contig_17637_41_to_259_Frame_2	10	0
P18_C_contig_2158_869_to_654_Frame_-2	120	0
P18_C_contig_12058_48_to_239_Frame_3	14	0

Fortsetzung Tabelle 9: Bioinformatischer Nachweis der Effektorkandidaten von *S. endobioticum* P18 in den Pathotypen P1 und P18.

ID	P18 RNAseq	P1 RNAseq
P18_C_contig_1590_166_to_378_Frame_1	398	81
P18_C_contig_867_324_to_112_Frame_-2	79	0
P18_C_contig_4564_334_to_125_Frame_-1	4	0
P18_C_contig_7076_28_to_237_Frame_1	34	0
P18_C_contig_17586_164_to_316_Frame_2	2	0
P18_C_contig_10703_518_to_324_Frame_-1	25	0
P18_C_contig_3052_311_to_126_Frame_-3	159	3
P18_C_contig_3998_332_to_499_Frame_2	21	0
P18_C_contig_15062_300_to_479_Frame_3	31	0
P18_C_contig_7419_373_to_549_Frame_1	25	0
P18_C_contig_4838_590_to_423_Frame_-1	64	1
P18_C_contig_4592_399_to_566_Frame_3	115	0
P18_C_contig_7174_128_to_292_Frame_2	22	0
P18_C_contig_8819_150_to_311_Frame_3	20	0
P18_C_contig_7431_109_to_270_Frame_1	10	0
P18_C_contig_1644_257_to_412_Frame_2	545	9
P18_C_contig_5644_416_to_261_Frame_-3	45	0
P18_C_contig_8270_47_to_202_Frame_2	7	0
P18_C_contig_404_332_to_484_Frame_2	288	1
P18_C_contig_9555_36_to_188_Frame_3	-	-
P18_C_contig_15704_163_to_11_Frame_-2	8	0
P18_C_contig_3147_650_to_799_Frame_2	190	0
P18_C_contig_20688_482_to_6_Frame_-3	-	-
P18_C_contig_13808_345_to_196_Frame_-2	34	0

Der bioinformatische Nachweis der Effektorkandidaten auf cDNA-Ebene in den Pathotypen 1 und 18 ergab, dass die untersuchten Effektoren mit Ausnahme der Effektorkandidaten P18_C_Contig_9555 und P18_C_Contig_20688 in Pathotyp 18 exprimiert wurden. Für Pathotyp 1 zeigte sich ein anderes Bild, lediglich 13 Effektorkandidaten zeigten eine Expression in P1 mit wenigen Reads pro Referenzsequenz.

Neben der bioinformatischen Analyse der 66 Effektorkandidaten, wurde ein molekularbiologischer Nachweis in den Pathotypen 1, 2, 6 und 18 mittels PCR vorgenommen. Hierfür wurden Primer (Tabelle A 13) entwickelt, die innerhalb der Effektorsequenz ein Fragment von 100 – 150 bp amplifizierten. Als Ausgangsmaterial für die PCR wurde cDNA eingesetzt, die aus 500 ng reiner RNA aus infizierten Knollen synthetisiert wurde. Als Kontrollproben wurden, neben der Wasserkontrolle, genomische DNA verwendet, sowie cDNA aus wasserinokulierten Knollen. Es wurden drei unabhängige biologische Proben untersucht.

Der Effektor kandidat wurde als exprimiert gewertet, wenn ein Amplifikat mit erwarteter Fragmentgröße nur in den inokulierten Proben nachweisbar war und nicht in den Kontrollproben. Auch bei einer unspezifischen Amplifikation wurden für die inokulierten Proben spezifische Banden als Effektorbande gewertet. Exemplarisch wurde die Amplifikation mit den Primern P18C_21259 und P18C_11138 in Abbildung 25 dargestellt. Hierbei handelte es sich um Beispiele für eine spezifische Amplifikation.

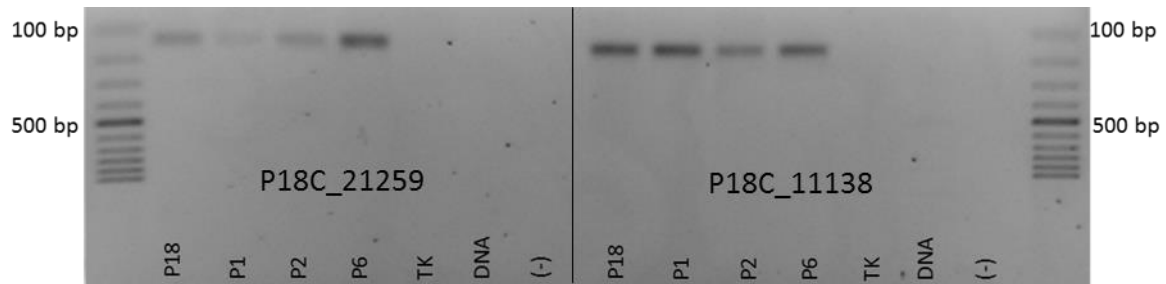


Abbildung 25: Exemplarische Darstellung der aufgetrennten Fragmente nach Amplifikation mit den Primern P18C_21259 und P18C_11138 auf einem 1,5 %igen [w/v] Agarosegel. Laufbedingungen: 10 V/cm, 1 Stunde. P18 = mit Pathotyp 18 inokulierte Knollen der Sorte 'Tomensa', P1 = mit Pathotyp 1 inokulierte Knollen der Sorte 'Tomensa', P2 = mit Pathotyp 2 inokulierte Knollen der Sorte 'Tomensa', P6 = mit Pathotyp 6 inokulierte Knollen der Sorte 'Tomensa', TK = mit Wasser inokulierte Knollen der Sorte 'Tomensa', DNA = gDNA der Sorte 'Tomensa', (-) = Wasserkontrolle. Es wurde ein 100 bp-Marker verwendet.

Für die beiden in Abbildung 25 dargestellten PCR-Amplifikationen (Primer: P18C_21259 und P18C_11138) war jeweils eine spezifische Bande in den Proben P18, P1, P2 und P6 detektierbar. In den Kontrollproben waren keine Amplifikate nachweisbar.

Zwei Beispiele für eine unspezifische Primerbindung, aber eindeutiger Amplifikation des Effektors, wurden in Abbildung 26 dargestellt. Hierbei handelte es sich um PCR-Produkte aus der Amplifikation mit den Primern P18C_9511 und P18C_21903.

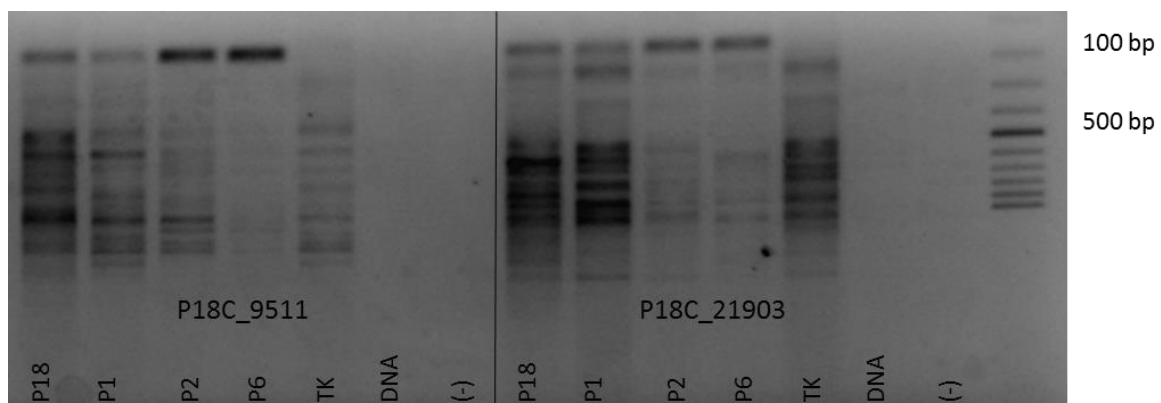


Abbildung 26: Exemplarische Darstellung der aufgetrennten Fragmente nach unspezifischer Amplifikation mit den Primern P18C_9511 und P18C_21903. Laufbedingungen: 1,5 % [w/v] Agarose, 10 V/cm, 1 Stunde. P18 = mit Pathotyp 18 inokulierte Knollen der Sorte 'Tomensa', P1 = mit Pathotyp 1 inokulierte Knollen der Sorte 'Tomensa', P2 = mit Pathotyp 2 inokulierte Knollen der Sorte 'Tomensa', P6 = mit Pathotyp 6 inokulierte Knollen der Sorte 'Tomensa', TK = mit Wasser inokulierte Knollen der Sorte 'Tomensa', DNA = gDNA der Sorte 'Tomensa', (-) = Wasserkontrolle. Es wurde ein 100 bp-Marker verwendet.

Für beide Primer war eine starke Hintergrundamplifikation von Kartoffelsequenzen zu erkennen (Abbildung 26). Es waren allerdings klare Banden in den infizierten Proben vorhanden, die nicht in den Kontrollen vorhanden waren.

Die Amplifikation der 66 Effektorkandidaten in Knollen, die mit P1, P2, P6 und P18 inokuliert wurden, ergab, dass für 55 der Sequenzen eine Amplifikation in mindestens zwei der drei biologischen Wiederholungen für alle Pathotypen möglich war. Für die verbleibenden Sequenzen war eine Amplifikation nicht für alle Pathotypen über mindestens zwei biologische Wiederholungen konsistent. Hierbei war für einige Effektoren und einige Pathotypen lediglich ein Nachweis in einer biologischen Wiederholung möglich. Eine Überprüfung, ob erfolgreich cDNA einer Probe hergestellt werden konnte, wurde mittels Actin-PCR überprüft. Eine Übersicht über die Amplifikation in den verschiedenen Pathotypen wurde dem elektronischen Anhang in der Tabelle E 1 beigefügt.

3.4. Klonierung von Effektorkandidaten

Für eine nachfolgende Funktionsanalyse wurden insgesamt 14 Sequenzen kloniert. Hierbei handelte es sich um zwei Sequenzen aus dem Pool der zuvor bestimmten Effektorkandidaten. Dies waren die Sequenzen P18_C_contig_24410_Gesamtsequenz_Effektor_136_AS und P18_C_contig_12020_Gesamtsequenz_Effektor_223_AS. Neben diesen wurden sieben Sequenzen kloniert, welche ebenfalls aus der Sequenzsammlung von *S. endobioticum* stammten, allerdings nicht alle in EffectorP als Effektor vorhergesagt wurden. Diese Arbeiten wurden bereits durchgeführt, bevor EffectorP verfügbar war. Ebenso wiesen diese Sequenzen teilweise weniger als 50 Aminosäuren in der Gesamtlänge auf. Die Sequenzen wurden dem beiliegenden Datenträger zugefügt und waren nicht in den 66 zuvor beschriebenen Kandidaten enthalten. Ebenfalls wurden fünf Sequenzen aus dem Pool der Sequenzen ohne Homologien kloniert. Hierbei handelte es sich um die Sequenz P18_C_contig_11569_Gesamtsequenz_Effektor_54_AS aus den zuvor beschriebenen Kandidaten der Tabelle 8. Ebenfalls wurden auch hier vier weitere Sequenzen kloniert, die aus vorherigen Analysen stammten und den endgültigen Kriterien nicht entsprachen. Hierbei handelte es sich um die Contigs P18_C_contig_8451, P18C_Contig_6408, P18_C_Contig_18919 und P18_C_contig_2634. Eine Übersicht über die klonierten Sequenzen ist der Tabelle 10 zu entnehmen.

Tabelle 10: Übersicht über die klonierten Effektorkandidaten für die Funktionsanalyse in Tabak. P18: *S. endobioticum* P18, oH: ohne Hit (Sequenzpool ohne Sequenzähnlichkeit). *Größenangabe ohne In-Fusion®-Überhänge.

Effektorkandidat	Quelle	Proben-codierung	Fragmentgröße in PCR*
P18_C_contig_24410_Gesamtsequenz Effektor_136_AS	P18	P18_24410	~825 bp
P18_C_contig_12020_Gesamtsequenz Effektor_223_AS	P18	P18_12020	~722 bp
P18_C_Contig_8451	oH	E1	~250 bp
P18_C_Contig_2634	oH	E2	~212 bp
P18_C_Contig_7092	P18	E8	~209 bp
P18_C_Contig_1481	P18	E9	~218 bp
P18_C_Contig_6758	P18	E10	~244 bp
P18_C_Contig_7485	P18	E11	~170 bp
P18_C_Contig_1471	P18	E12	~290 bp
P18_C_Contig_1832	P18	E13	~212 bp
P18_C_Contig_1360	P18	E14	~271 bp
P18_C_Contig_6408	oH	E18	~278 bp
P18_C_Contig_18919	oH	E22	~198 bp
P18_C_contig_11569_Gesamtsequenz Effektor_54_AS	oH	oH_11569	~196 bp

Für die Klonierung der Fragmente wurden die vollständigen Sequenzen der Effektorkandidaten aus mit *Synchytrium* P18 infiziertem Probenmaterial amplifiziert. Hierfür wurde in einem ersten Schritt RNA isoliert und in die cDNA-Synthese eingesetzt, welche als Ausgangsmaterial für die Amplifikation verwendet wurde. Für die Amplifikation wurden die genspezifischen Primer mit In-Fusion®-Überhang verwendet (Tabelle A 11). Exemplarisch wurden die Amplifikate der PCR zur Fragmentaufreinigung für die Klonierung für fünf Kandidaten in Abbildung 27 dargestellt.

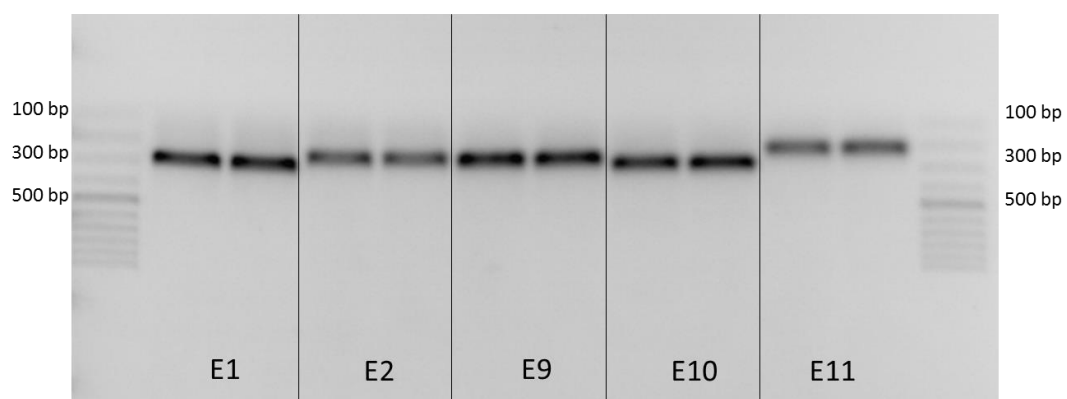


Abbildung 27: Exemplarische Darstellung der PCR-Amplifikate für eine Fragmentaufreinigung zur anschließenden Klonierung der Sequenzen. Aufgetragen wurden die Amplifikate der Effektorkandidaten E1, E2, E9, E10 und E11 und ein 100 bp Marker. Bedingungen der Gelelektrophorese: Agarose (1 % [w/v]), 10 V/cm, 60 Minuten.

Beispielhaft wurden in Abbildung 27 die Amplifikate der Effektorkandidaten E1, E2, E9, E10 und E11 dargestellt. Es wurden jeweils zwei Proben pro Effektorkandidat zur Aufreinigung aufgetragen. Die Banden wurden aus dem Gel ausgeschnitten und mittels des NucleoSpin® Gel and PCR Clean-Up Kits (Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren, Deutschland) aufgereinigt. Es wurden Fragmente mit Konzentrationen zwischen 4,7 ng/μL und 46,6 ng/μL DNA aufgereinigt. Für die In-Fusion®-Klonierung wurde der Expressionsvektor durch einen Doppelverdau mit BamHI-HF® und HindIII-HF® (New England Biolabs GmbH, Frankfurt am Main, Deutschland) linearisiert. Nach der Aufreinigung des Vektors über eine Säule (NucleoSpin® Gel and PCR Clean-Up Kits, Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren, Deutschland) ergab eine Quantitäts- und Qualitätsbestimmung mittels NanoDrop 2000 Spectrophotometer (ThermoFisher Scientific Inc., USA) eine Konzentration von 25,8 ng/μL linearisierten Vektors (A260/280: 1,96; A260/230: 0,11). Für die In-Fusion®-Klonierung wurden 100 ng des linearisierten Vektors eingesetzt, sowie 40 ng der aufgereinigten PCR-Fragmente.

Anschließend wurden die Vektorkonstrukte in Stellar® Competent Cells (Takara Bio USA Inc., USA) zur Plasmidvermehrung transformiert. Von den Einzelkolonien der ausplattierten Bakterien wurde eine Kolonie-PCR durchgeführt. Es wurden die Primer der Tabelle 4 verwendet.

Die Ergebnisse der Kolonie-PCR für den Effektorkandidat E1 wurden exemplarisch in der Abbildung 28 dargestellt.

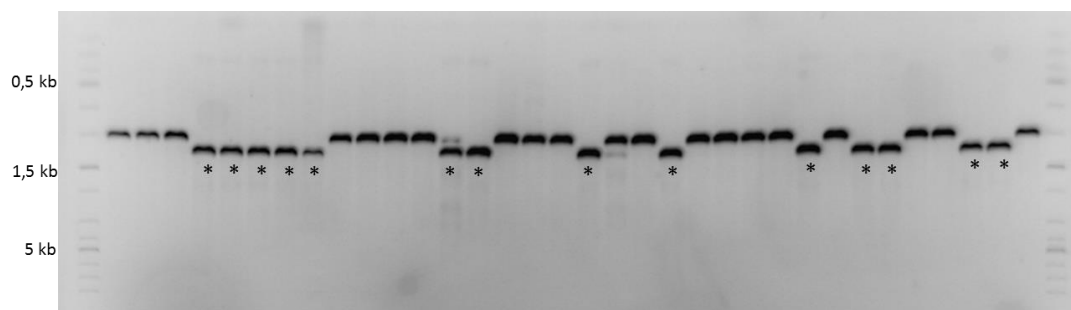


Abbildung 28: Exemplarische Darstellung des Agarosegels der Kolonie-PCR des klonierten Fragments des Effektorkandidaten E1. Aufgetragen wurden die PCR-Amplifikate der Kolonie-PCR des Effektorkandidaten E1, sowie ein 1 kb Plus Marker zur Größenabschätzung. Bedingungen der Gelelektrophorese: 1,5 % [w/v] Agarose, 10 V/cm, 1 Stunde. *Kolonien mit kloniertem Fragment.

Für den Effektorkandidat E1 wurden dreizehn von insgesamt 34 getesteten Kolonien identifiziert, welche ein erfolgreich kloniertes Fragment beinhalten (Abbildung 28, mit * gekennzeichnet). Plasmide mit kloniertem Fragment (~1 μg Plasmid-DNA) wurden zur Überprüfung sequenziert und bei fehlerfreier Sequenz in *Agrobacterium tumefaciens* GV3101 transformiert. Dies wurde für alle Effektorkandidaten durchgeführt (Daten nicht gezeigt).

Die Expression der klonierten Sequenzen wurde mittels PCR (Tabelle A 11) überprüft. Hierfür wurden Tabakblätter mit den Effektorkonstrukten sowie dem leeren Expressionsvektor infiltriert. Es wurden fünf Tage nach der Infiltration Proben für RNA-Extraktionen genommen. Für die Test-

PCR wurde RNA als Template eingesetzt, sowie cDNA der infiltrierten Proben (mit Effektor-konstrukt und Kontrollkonstrukt) und Plasmid mit dem jeweiligen klonierten Fragment. Das Ergebnis der Test-PCR für Effektorkandidat P18_C_Contig_12020 wurde exemplarisch in Abbildung 29 dargestellt.

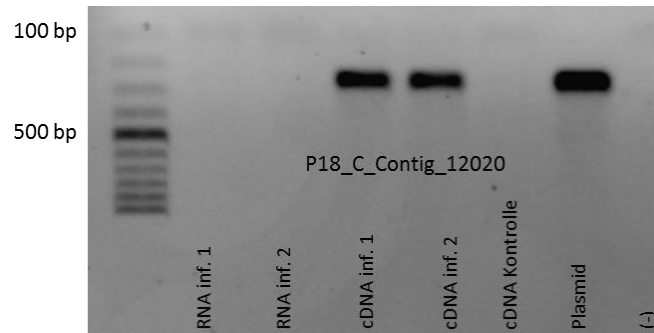


Abbildung 29: Test auf Expression der klonierten Fragmente in infiltrierten Tabakblättern. Probennahme fand 5 dpi statt. Aufgetragen wurden die Amplifikate aus der PCR mit dem Primer P18C_12020. Proben: RNA inf. 1= RNA infiltriert Probe 1, RNA inf. 2 = RNA infiltriert Probe 2, cDNA inf. 1 = cDNA infiltriert Probe 1, cDNA inf. 2 = cDNA infiltriert Probe 2, cDNA Kontrolle = cDNA aus Kontrollpflanzen, Plasmid = Expressionsvektor mit kloniertem Fragment des Effektorkandidaten P18_C_Contig_12020, (-) = Wasserkontrolle. Bedingungen: 1,5 % [w/v] Agarose, 10 V/cm, 1 Stunde.

Für die Test-PCR auf Expression des Effektorkandidaten P18_C_Contig_12020 (Abbildung 29) konnte gezeigt werden, dass bei Einsatz von RNA als Ausgangsmaterial für die PCR keine Amplifikation stattfand. Bei Einsatz von cDNA wurde jeweils eine Bande in der gleichen Größe wie mit Plasmid als Template amplifiziert. In der Wasserkontrolle waren keine Amplifikate zu detektieren sowie in der cDNA der Kontrollpflanzen. Diese Test-PCR wurde für jeden Effektorkandidat durchgeführt. Für die Effektorkandidaten der Tabelle 10 wurden lediglich Amplifikate in der Positivkontrolle (Plasmid) und den cDNA-Proben in gewünschter Größe detektiert.

Um eine Kontamination der isolierten RNA mit persistierenden Agrobakterien auszuschließen, wurden die zuvor untersuchten Proben ebenfalls in eine PCR eingesetzt, bei welcher Primer spezifisch für Agrobakterien verwendet wurden (Tabelle A 10). Alle untersuchten Proben zeigten keine Amplifikation mit Ausnahme der Positivkontrolle.

3.5. Funktionsanalyse der Effektorkandidaten

Zur Überprüfung der Arbeitshypothese, dass die Expression der Effektorkandidaten einen Einfluss auf die Pathogenabwehr gegenüber Erregern hat und diese in einem Maß reduziert, dass eine erhöhte Anfälligkeit beobachtet werden kann, wurden ausgewählte Kandidaten in transienten Expressionsstudien analysiert. Es wurde untersucht, ob die Expression der Effektorkandidaten in *Nicotiana benthamiana* einen Einfluss auf die Ausbreitung von TRV und somit die Immunantwort

hat. Gemäß der Arbeitshypothese wurde erwartet, dass eine Expression der Effektorkandidaten eine Ausbreitung des TRV im Vergleich zur Kontrollinokulation begünstigte.

Es wurden hierfür Tabakblätter mit den Effektorkandidaten und nachfolgend mit TRV infiltriert. Mindestens drei unabhängige Infiltrationsversuche wurden pro Effektorkandidat durchgeführt.

In einem ersten Experiment wurden die drei Effektorkandidaten mit den vielversprechendsten Ergebnissen in der bioinformatischen Analyse getestet. Hierbei handelte es sich um die Effektorkandidaten P18_12020, P18_24410 und oH_11569. Sie wurden zusammen mit dem leeren Vektor pRedU10-35S (alle Konstrukte in *Agrobacterium tumefaciens* GV3101) in Tabak infiltriert und analysiert. Es wurden jeweils 30 Blätter infiltriert.

In einer zweiten Gruppe wurden die Effektorkandidaten E1, E2, E8, E9, E10, E11, E12, E13, E14, E18 und E22 zusammen mit dem leeren Vektor pRedU10-35S als Kontrolle in Tabak infiltriert. In dieser Gruppe wurden jeweils 20 Blätter infiltriert. Das zweite Experiment beinhaltete auch jene Effektorkandidaten, die nach neueren Erkenntnissen in der bioinformatischen Analyse nicht allen Kriterien entsprachen. Dennoch sollte auch der Einfluss dieser Sequenzen überprüft werden. Die Auswertung fand jeweils 6 dpi nach Infiltration des Effektorkandidaten statt und somit 3 dpi nach Infiltration mit TRV; sowie zu einem zweiten Boniturtermin 9 dpi nach Infiltration mit den Effektorkandidaten und 6 dpi nach Infiltration mit TRV. Die Expression der Reportergene und die damit verbundene Fluoreszenz wurden exemplarisch in der Abbildung 30 dargestellt.

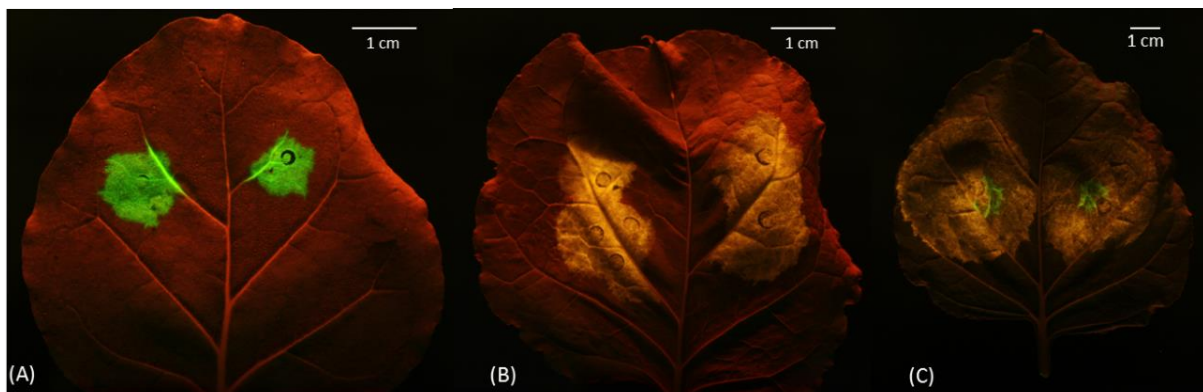


Abbildung 30: Detektion der Reportergenexpression in infiltrierten Tabakblättern 6 dpi nach Infiltration mit dem Effektorkandidat P18_12020 und 3 dpi nach TRV-Infiltration. (A) GFP-Expression bei alleiniger Infiltration mit TRV 3 dpi, (B) DsRed-Expression 6 dpi nach Infiltration mit dem leeren Vektor pRedU10-35S, (C) Ko-Expression von DsRed und GFP 6 dpi beziehungsweise 3 dpi. Anregung bei Beleuchtung mit einer LED-Handlampe mit einem Wellenlängenbereich von 480 nm bis 530 nm.

Bei einer Infiltration mit TRV konnte bereits 3 Tage nach Infiltration eine deutliche GFP-Expression detektiert werden (Abbildung 30 (A)). Die Infiltration des leeren Vektors, sowie der Effektorkandidaten lieferte 6 dpi ebenfalls eine deutliche DsRed-Expression (Abbildung 30 (B)). Bei einer gleichzeitigen Expression des Effektorkandidaten und TRV konnte die Expression von DsRed und GFP in der Infiltrationsstelle beobachtet werden (Abbildung 30 (C)).

Die Auswertung der Infiltrationen der ersten Gruppe von Effektorkandidaten (P18_12020, P18_24410 und oH_11569) wurde in Abbildung 31 visualisiert. Hierbei handelte es sich um jene Gruppe klonierter Effektorkandidaten, welche bioinformatisch die Kriterien zur Selektion von Effektorkandidaten am besten erfüllten. Es wurden die mittleren Anzahlen der Blätter dokumentiert, welche nach Ko-Infiltration von den Effektorkandidaten/Kontrolle und TRV eine alleinige DsRed-Expression, eine zeitgleiche DsRed- und GFP-Expression oder kein Fluoreszenzsignal zeigten. Die Auswertung wurde an zwei Boniturterminen (6 dpi/ 3 dpi und 9 dpi/ 6 dpi) vorgenommen und in Abbildung 31 getrennt dargestellt.

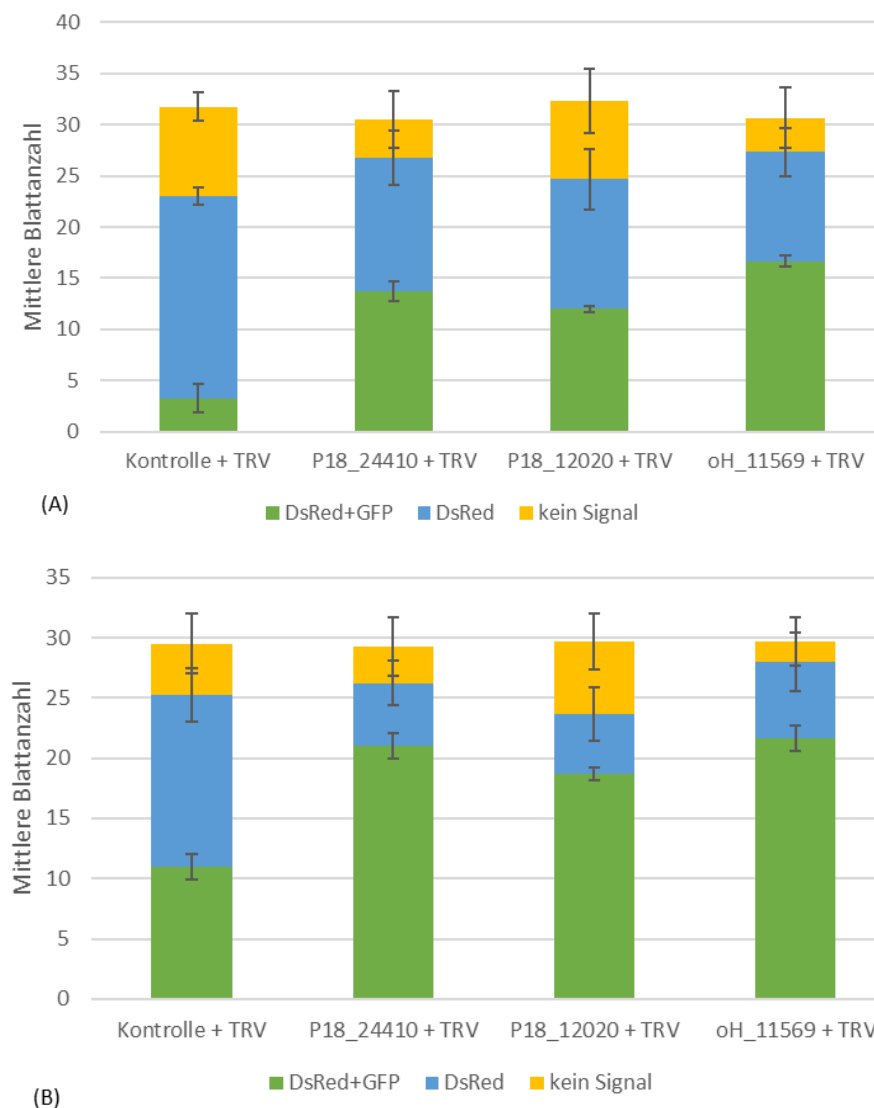


Abbildung 31: Zusammenfassung der Auswertung der Infiltrationen mit den Effektorkandidaten P18_12020, P18_24410 und oH_11569 und TRV. (A) erster Boniturtermin sechs Tage nach Infiltration der Effektorkandidaten und drei Tage nach Infiltration mit TRV, (B) zweiter Boniturtermin neun Tage nach Infiltration der Effektorkandidaten und sechs Tage nach Infiltration mit TRV. Aufgenommen wurden die Anzahlen der infiltrierten Blätter mit Effektorexpression (DsRed Expression) und zeitgleicher TRV-Expression (GFP), alleinige DsRed-Expression und alleinige GFP-Expression, sowie die Anzahl der Blätter ohne Fluoreszenzsignal. Dargestellt wurden die jeweiligen Mittelwerte mit Standardabweichung.

Für die Effektorkandidaten P18_12020 und oH_11569 konnten in jeweils einer der vier biologischen Wiederholungen keine Daten erhoben werden. In den verbleibenden drei biologischen Wiederholungen wurden die Expressionen der Reportergene DsRed und GFP dokumentiert. Im Mittel zeigten am ersten Boniturtermin 3,25 Blätter eine Expression beider Reportergene (~10 %) in der Kontrollvariante. Bei Betrachtung der dokumentierten Werte für die Infiltration der drei Effektorkandidaten (P18_12020, P18_24410 und oH_11569) zeigten sich im Mittel mehr Blätter mit gleichzeitiger DsRed- und GFP-Expression. Der Anteil dieser Blätter lag zwischen 39 % und 54 % (Abbildung 31 (A)).

Am zweiten Boniturtermin (neun Tage nach Infiltration der Effektorkandidaten und sechs Tage nach TRV-Infiltration) zeigten im Mittel in der Kontrollvariante 11 Blätter (~37 %) eine DsRed- und GFP-Expression. Bei einer Expression von P18_24410 und TRV wurden im Mittel am zweiten Boniturtermin 21 Blätter (~72 %) mit DsRed- und GFP-Signal dokumentiert. Bei einer Ko-Infiltration des Effektorkandidaten P18_12020 und TRV wurden im Mittel am zweiten Boniturtermin 18,67 Blätter (~63 %) mit Expression beider Reportergene dokumentiert. Für den Effektorkandidat oH_11569 wurden im Mittel 21,67 Blätter (~73 %) beobachtet, an denen eine DsRed- und GFP-Expression zu erkennen war (Abbildung 31 (B)).

Zur Testung, ob es einen signifikanten Unterschied zwischen den verschiedenen Varianten gab, wurden die erhobenen Daten gemeinsam über beide Boniturtermine hinweg statistisch ausgewertet. So sollte gezeigt werden, ob ein Effekt der Expression der Effektorkandidaten auf die Expression und Verbreitung des TRV vorhanden war. Eine Devianzanalyse mit paarweisen Mittelwertvergleichen zeigte einen signifikanten Unterschied zwischen der Infiltration des Kontrollkonstrukts (leerer Vektor) mit TRV und den getesteten Effektorkandidaten (P18_24410, P18_12020 und oH_11569) mit TRV. Das Ergebnis der statistischen Auswertung wurde in Abbildung 32 visualisiert.

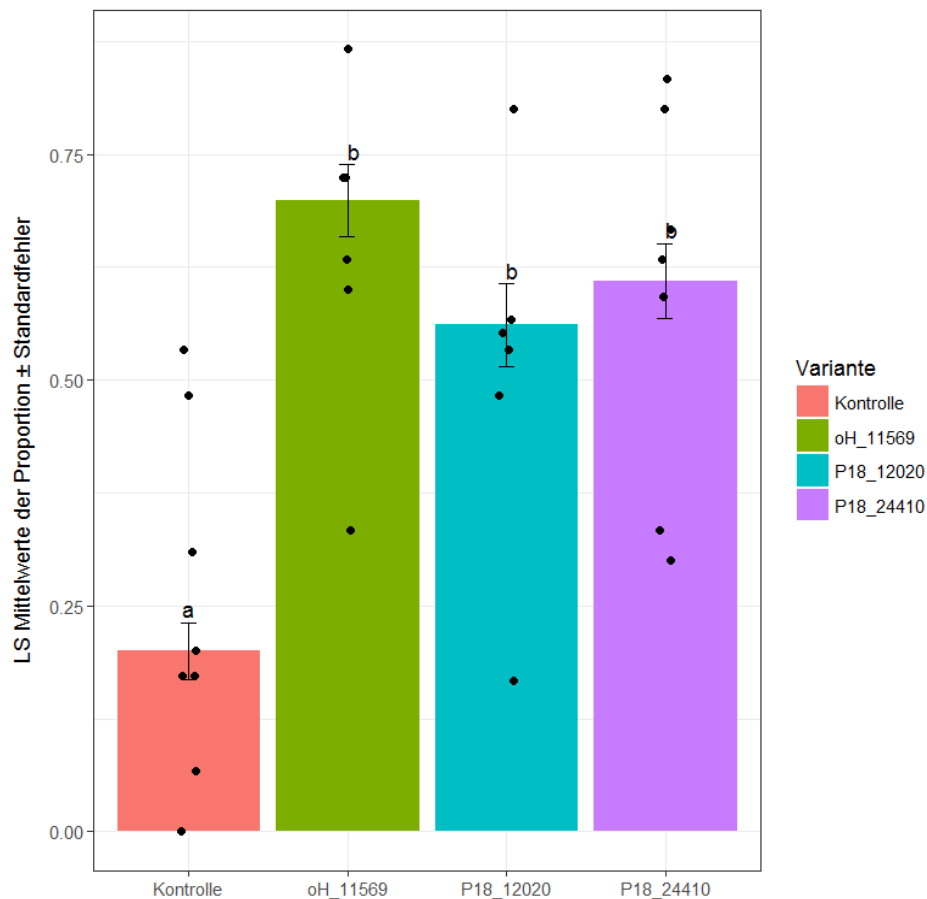


Abbildung 32: Graphische Darstellung der statistischen Auswertung des Effekts der Effektorkandidaten-expression auf die Expression und Ausbreitung von TRV. Dargestellt wurden die Ergebnisse der paarweisen Mittelwertvergleiche, gegeben des Modells und gegeben der Daten aus drei unabhängigen Versuchswiederholungen (Buchstaben zur Visualisierung der signifikanten Unterschiede). Dargestellt wurden die Mittelwerte der Proportionen mit Standardfehler. Die Variantenbezeichnung basierte auf der Infiltration der Effektorkandidaten beziehungsweise der Kontrolle und beinhaltete immer eine zeitverzögerte Ko-Infiltration mit TRV.

Gegeben des Modells und gegeben der Daten konnte ein All-Paar-Vergleich durchgeführt werden, dessen Ergebnis mittels Buchstabenvergabe zusammengefasst wurde (Abbildung 32). Es zeigte sich, dass eine Ko-Infiltration der drei untersuchten Effektorkandidaten mit TRV in der GFP-Expression signifikant verschieden war im Vergleich zur Infiltration des leeren Expressionsvektors mit TRV. In der Kontrollvariante waren somit signifikant weniger Blätter mit einer GFP-Expression, welche an die Expression des TRV gekoppelt war, detektierbar.

Ebenfalls wurden die 95 %-Konfidenzintervalle berechnet. Diese wurden in der Abbildung 33 dargestellt.

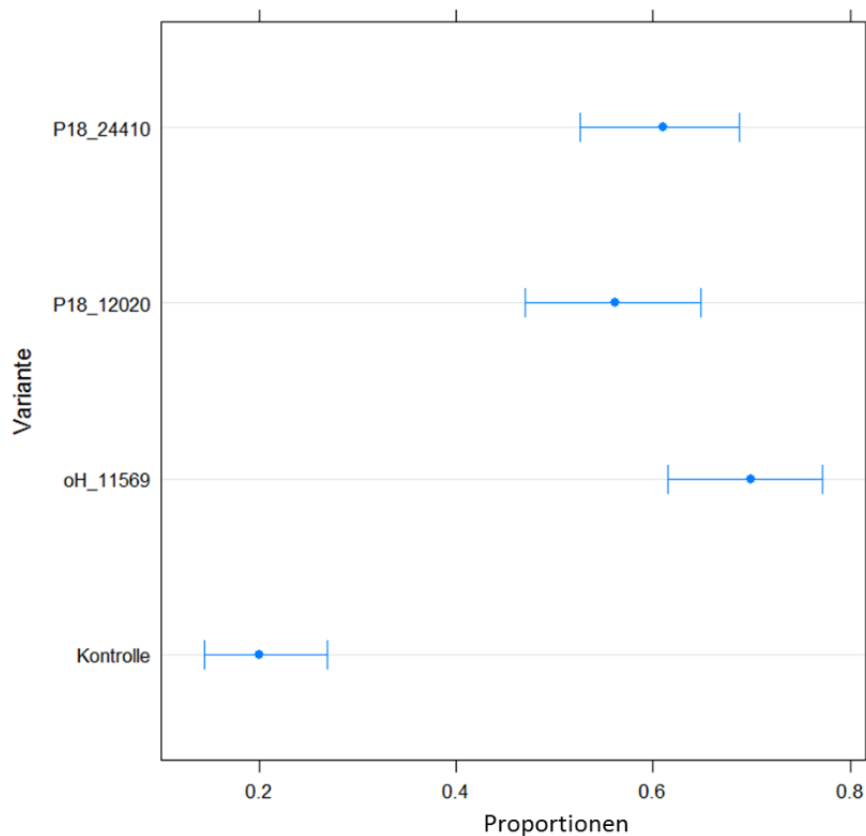


Abbildung 33: 95 %-Konfidenzintervalle zur Lageschätzung der Mittelwerte der Proportionen. Die Variantenbezeichnung basierte auf der Infiltration der Effektorkandidaten P18_24410, P18_12020 und oH_11569, beziehungsweise der Kontrolle und beinhaltete immer eine zeitverzögerte Ko-Infiltration mit TRV.

Die Lage der 95 %-Konfidenzintervalle zeigte eine Überlappung der Bereiche für die Varianten P18_24410+TRV, P18_12020+TRV und oH_11569+TRV und eine deutlich abgegrenzte Lage des 95 %-Konfidenzintervalls der Kontrollvariante (Abbildung 33).

Es zeigte sich, dass ein signifikanter Einfluss der Effektorexpression auf die TRV Ausbreitung vorhanden war. Bei Expression der Effektorkandidaten war eine Begünstigung der TRV-Expression und Ausbreitung zu erkennen.

In einem zweiten Experiment wurden die verbleibenden Effektorkandidaten aus der Tabelle 10 für eine Funktionsanalyse in Tabakblätter mit TRV ko-infiltriert und analog zu den zuvor beschriebenen Effektorkandidaten ausgewertet. Bei dieser Gruppe von Effektorkandidaten handelte es sich um die Effektorkandidaten aus früheren Analysen, welche die bioinformatischen Kriterien zur Vorhersage von Effektoren nicht vollständig erfüllten.

Es wurden die mittleren Blattanzahlen mit DsRed+GFP-Expression, DsRed-Expression und ohne Fluoreszenzsignal dokumentiert und berechnet. Diese Ergebnisse wurden in der Abbildung 34 visualisiert.

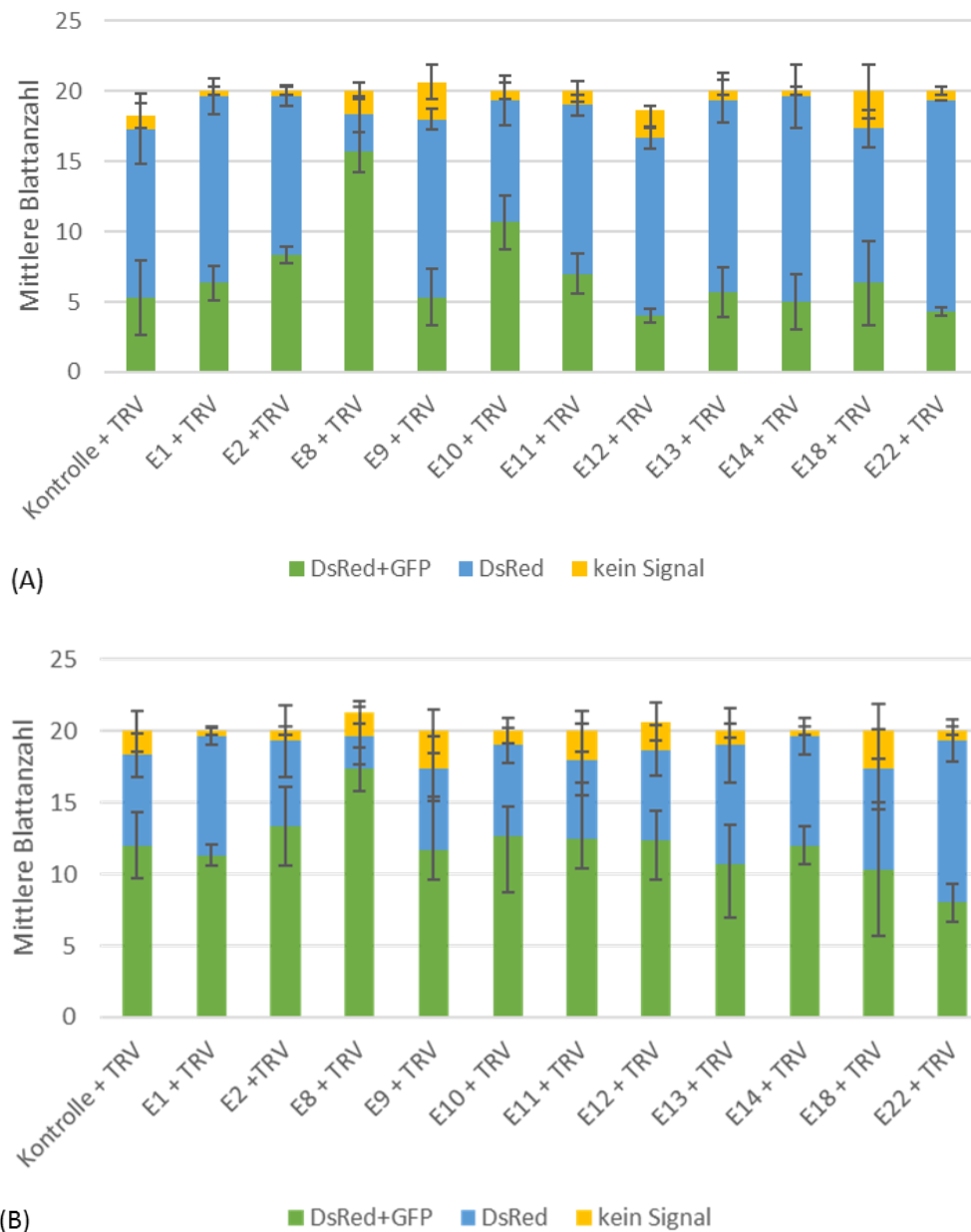


Abbildung 34: Zusammenfassung der Auswertung der Ko-Infiltrationen mit den Effektor Kandidaten E1, E2, E8, E9, E10, E11, E12, E13, E14, E18 und E22 mit TRV. (A) erster Boniturtermin sechs Tage nach Infiltration der Effektor Kandidaten und drei Tage nach Infiltration mit TRV, (B) zweiter Boniturtermin neun Tage nach Infiltration der Effektor Kandidaten und sechs Tage nach Infiltration mit TRV. Aufgenommen wurden die Anzahlen der infiltrierten Blätter mit Effektorexpression (DsRed Expression) und zeitgleicher TRV-Expression (GFP), alleinige DsRed-Expression und alleinige GFP-Expression, sowie die Anzahl der Blätter ohne Fluoreszenzsignal. Dargestellt wurden die jeweiligen Mittelwerte mit Standardabweichung.

Es wurden die Fluoreszenzsignale der Reportergene DsRed und GFP an zwei Boniturterminen dokumentiert. Hierfür wurden die Effektor Kandidaten E1, E2, E8, E9, E10, E11, E12, E13, E14, E18 und E22 mit TRV zeitversetzt ko-infiltriert. Ebenfalls fand eine Ko-Infiltration des leeren Expressionsvektors als Kontrollvariante zeitlich verzögert mit TRV statt.

Eine erste Auswertung fand sechs Tage nach Infiltration mit den Effektor Kandidaten/ Kontrolle und drei Tage nach TRV-Infiltration statt (Abbildung 34 (A)). Es wurden die mittleren Blattanzahlen

über drei unabhängige Inokulationen berechnet. Für die Infiltration des Kontrollvektors und TRV ergab sich für den ersten Boniturtermin (6 dpi/ 3 dpi) eine mittlere Blattanzahl von 5,3 Blättern (~29 %) mit DsRed- und GFP-Signal. Für die Effektorkandidaten E1, E2, E9, E10, E11, E12, E13, E14, E18 und E22 ergaben sich mittlere Anteile an Blättern mit zeitgleicher DsRed- und GFP-Expression von 11 % bis 53 %. Bei einer Expression des Effektorkandidaten E8 mit zeitversetzter Expression des TRV waren im Mittel 78 % (15,6 Blätter) der Blätter mit DsRed- und GFP-Expression vorhanden.

Am zweiten Boniturtermin (neun Tage nach Infiltration der Effektorkandidaten beziehungsweise Kontrolle und sechs Tage nach TRV-Infiltration) war ein genereller Anstieg der mittleren Anzahlen der Blätter mit DsRed- und GFP-Signal zu erkennen (Abbildung 34 (B)). Für die Effektorkandidaten E1, E2, E9, E10, E11, E12, E13, E14, E18 und E22 lagen die mittleren Anzahlen der Blätter mit DsRed- und GFP-Fluoreszenz zwischen acht und dreizehn Blättern. Bei der Ko-Infiltration von Effektorkandidat E8 und TRV waren im Mittel 17 Blätter mit zeitgleicher DsRed- und GFP-Expression zu beobachten.

Diese Daten wurden statistisch über beide Boniturtermine hinweg ausgewertet, um signifikante Unterschiede in der Ausbreitung des TRV zu detektieren. So sollte gezeigt werden, ob die Expression eines Effektorkandidaten die Pathogenabwehr herabsetzen konnte. Eine Devianzanalyse mit paarweisen Mittelwertvergleichen zeigte bezüglich der zeitgleichen Expression von DsRed und GFP zwei signifikant voneinander verschiedene Gruppen. Diese Ergebnisse wurden in der Abbildung 35 graphisch dargestellt.

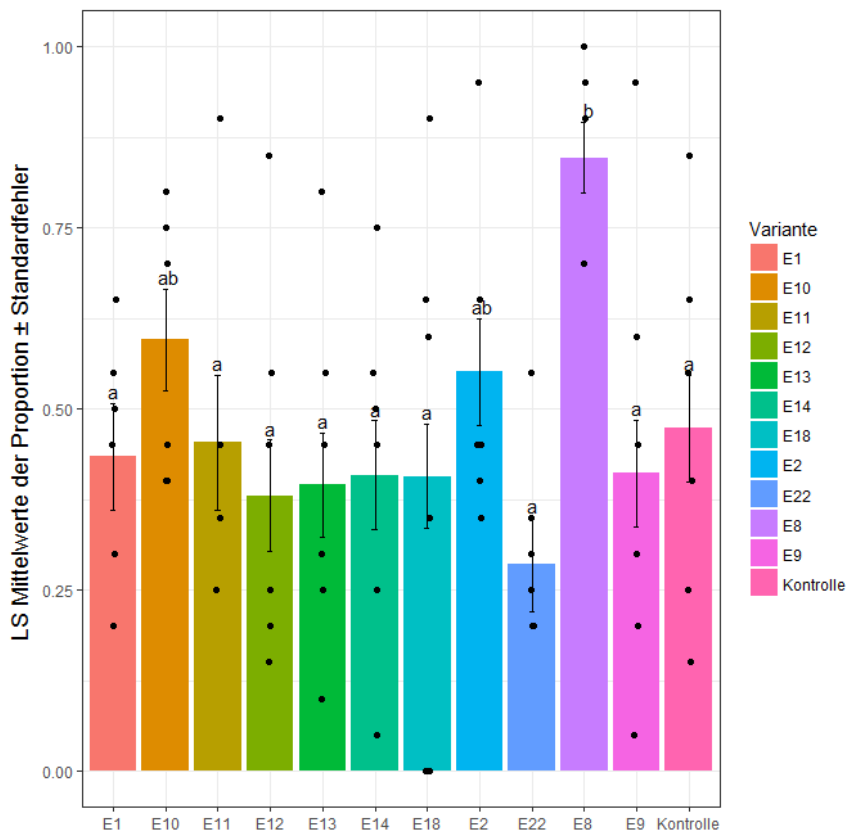


Abbildung 35: Graphische Darstellung der statistischen Auswertung des Effekts der Effektorkandidaten-expression auf die Expression und Ausbreitung von TRV. Dargestellt wurden die Ergebnisse der paarweisen Mittelwertvergleiche (Buchstaben zur Visualisierung der signifikanten Unterschiede). Dargestellt wurden die Mittelwerte der Proportionen mit Standardfehler. Die Variantenbezeichnung basierte auf der Infiltration der Effektorkandidaten beziehungsweise der Kontrolle und beinhaltet immer eine zeitverzögerte Ko-Infiltration mit TRV.

Gegeben des Modells und gegeben der Daten konnte ein All-Paar-Vergleich durchgeführt werden, dessen Ergebnis mittels Buchstabenvergabe zusammengefasst werden konnte (Abbildung 35). Es zeigte sich, dass eine Ko-Infiltration von Effektorkandidat E8 und TRV signifikant verschieden war (b) zu einer Ko-Infiltration der Kontrolle und TRV, sowie der Effektorkandidaten E1, E11, E12, E13, E14, E18, E22 und E9 mit TRV (a). Für eine Ko-Infiltration der Effektorkandidaten E10 mit TRV und E2 mit TRV zeigte sich in der statistischen Analyse eine dritte Gruppe, welche durch „ab“ in der Buchstabenvergabe gekennzeichnet wurde. Es zeigte sich somit, dass bei der Infiltration von E8 und TRV signifikant mehr Blätter mit einer zeitgleichen DsRed- und GFP-Expression als in anderen Varianten beobachtet werden konnten. Die Ergebnisse der statistischen Analyse wurden dem elektronischen Anhang unter dem Abschnitt E2 beigefügt.

Auch in diesem Experiment wurden ebenfalls die 95 %-Konfidenzintervalle berechnet. Diese wurden in der Abbildung 36 dargestellt.

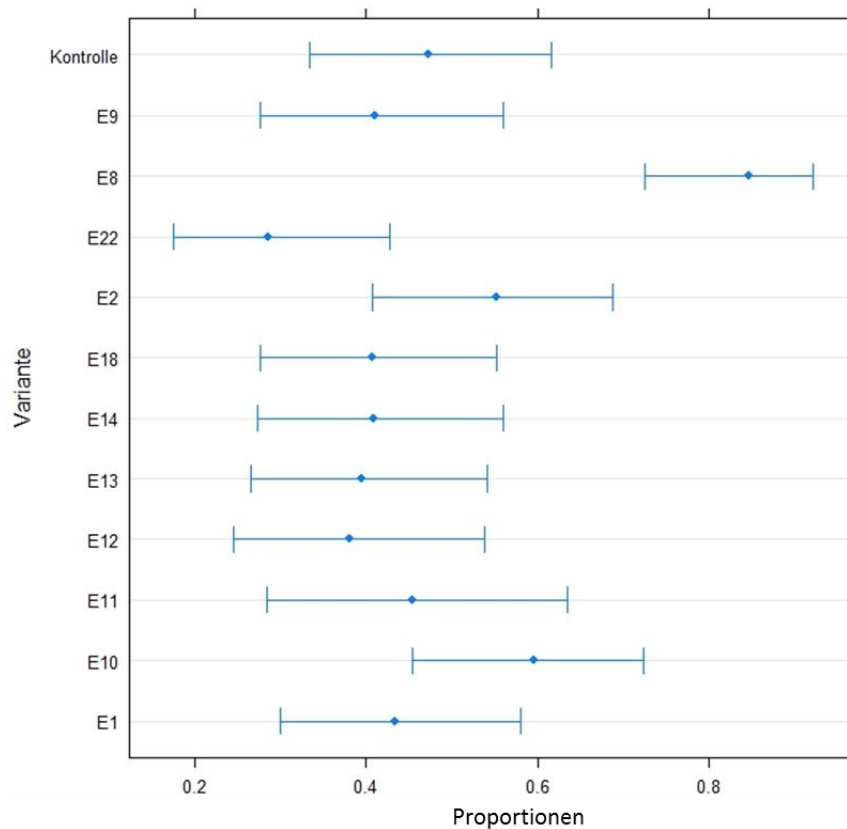


Abbildung 36: 95 %-Konfidenzintervalle zur Lageschätzung der Mittelwerte der Proportionen. Die Variantenbezeichnung basierte auf der Infiltration der Effektorkandidaten beziehungsweise der Kontrolle und beinhaltete immer eine zeitverzögerte Ko-Infiltration mit TRV.

Es zeigte sich, dass die Lage des 95 %-Konfidenzintervalls für die Variante E8 und TRV abgegrenzt von der Lage der anderen Konfidenzintervalle war. Die 95 %-Konfidenzintervalle der anderen Versuchsvarianten einschließlich der Kontrollvariante überschneiden sich (Abbildung 36).

Zusammenfassend betrachtet zeigten die Effektorkandidaten P18_24410, P18_12020, oH_11569 und E8 in einer zeitversetzten Infiltration mit TRV signifikante Unterschiede in der Ausbreitung und Expression von GFP, welches an das TRV gekoppelt war, im Vergleich zur Ko-Infiltration des leeren Expressionsvektors und TRV.

Da die Vermutung nahe lag, dass eine erfolgreiche Infektion der Wirtszelle auf der Sekretion eines definierten Sets an Effektoren basiert und nicht nur auf einzelnen Effektoren, wurden alle möglichen Kombinationen der Effektorkandidaten P18_24410, P18_12020 und oH_11569 gemeinsam in Tabakblätter infiltriert. Allerdings konnte hier kein synergetischer Effekt beobachtet werden. Es wurden nicht mehr GFP-positive Blätter dokumentiert als bei einer getrennten Infiltration der Effektorkandidaten.

3.6. Proteomanalyse der Interaktion zwischen *S. endobioticum* und seinem Wirt

Es wurde eine *shotgun* Proteomanalyse durchgeführt zur Charakterisierung der kompatiblen und inkompatiblen Interaktion zwischen *S. endobioticum* Pathotyp 1 und seinem Wirt. Es wurden fünf biologische Wiederholungen aus unabhängigen Inokulationsexperimenten zur Proteinaufreinigung verwendet. Hierbei wurde eine kompatible ('Tomensa') und eine inkompatible ('Karolin') Interaktion mit den jeweiligen Kontrollinokulationen 14 dpi untersucht.

3.6.1. Differentiell abundante Wirtsproteine in der Interaktion von *S. endobioticum* Pathotyp 1 und Kartoffel

Die Ausreinigung von Gesamtprotein aus den inokulierten Kartoffelknollen und den Kontrollinokulationen lieferte die in Tabelle 11 dargestellten Proteinmengen. Hierfür wurde das getrocknete Proteinpellet gewogen.

Tabelle 11: Gewichte der isolierten Proteinpellets aus jeweils fünf biologischen Wiederholungen der inokulierten Proben und der jeweiligen Kontrollen 14 dpi. TI: 'Tomensa' inokuliert, TK: 'Tomensa' Kontrolle, KI: 'Karolin' inokuliert, KK: 'Karolin' Kontrolle; fortlaufende Nummerierung zur Probenidentifikation.

Probe	1. Probe	2. Probe	3. Probe	4. Probe	5. Probe
Tomensa + P1	TI_21 1,2 mg	TI_9 7,1 mg	TI_13 5,8 mg	TI_17 0,7 mg	TI_A2 2,8 mg
Tomensa Kontrolle	TK_22 1,9 mg	TK_10 3,0 mg	TK_14 19,5 mg	TK_18 2,3 mg	TK_A1 2,8 mg
Karolin + P1	KI_23 2,3 mg	KI_11 1,7 mg	KI_15 4,7 mg	KI_19 4,0 mg	KI_A4 1,9 mg
Karolin Kontrolle	KK_24 2,4 mg	KK_12 4,4 mg	KK_16 3,3 mg	KK_20 2,6 mg	KI_A3 56,2 mg

Die Proben wurden nach weiterer Aufarbeitung für eine massenspektrometrische Analyse verwendet. Die in der MS identifizierten Proteine mussten für eine weitere Bearbeitung in mindestens vier der fünf biologischen Wiederholungen einer Gruppe vorhanden sein, sodass nicht alle identifizierten Proteine in die weitere Auswertung eingingen (Abbildung 37).

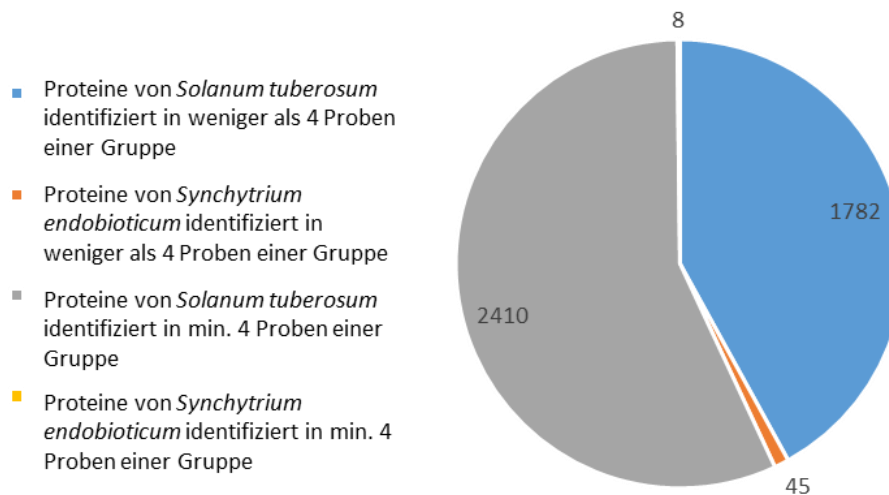


Abbildung 37: Übersicht über die Anzahl identifizierter Proteine von *Solanum tuberosum* und *Synchytrium endobioticum*. Dargestellt wurden die Proteinanzahlen mit und ohne Anwendung des Selektionskriteriums, dass die Proteine in mindestens vier der fünf Wiederholungen einer Gruppe identifiziert werden mussten.

Ohne Berücksichtigung der Häufigkeit von Proteinen in einer Behandlungsgruppe wurden insgesamt 4.245 Proteine identifiziert. Diese verteilten sich wie in Abbildung 37 dargestellt. Es wurden insgesamt 4.192 Proteine aus Kartoffel identifiziert. Mit Anwendung des Kriteriums, dass Proteine in mindestens vier von fünf biologischen Wiederholungen einer Gruppe vorhanden sein mussten, verblieben insgesamt 2.410 Kartoffelproteine über alle Proben hinweg. Somit entfielen 1.782 Proteine der Kartoffel, da sie in zu wenigen Proben einer Gruppe nachgewiesen wurden. Es wurden insgesamt, ohne vorheriges Filtern der Daten, 53 Proteine von *Synchytrium endobioticum* identifiziert. Hiervon waren acht Proteine in mindestens vier biologischen Wiederholungen einer Gruppe nachweisbar.

Für einen ersten Überblick über die Daten wurde eine Hauptkomponentenanalyse durchgeführt (Abbildung 38).

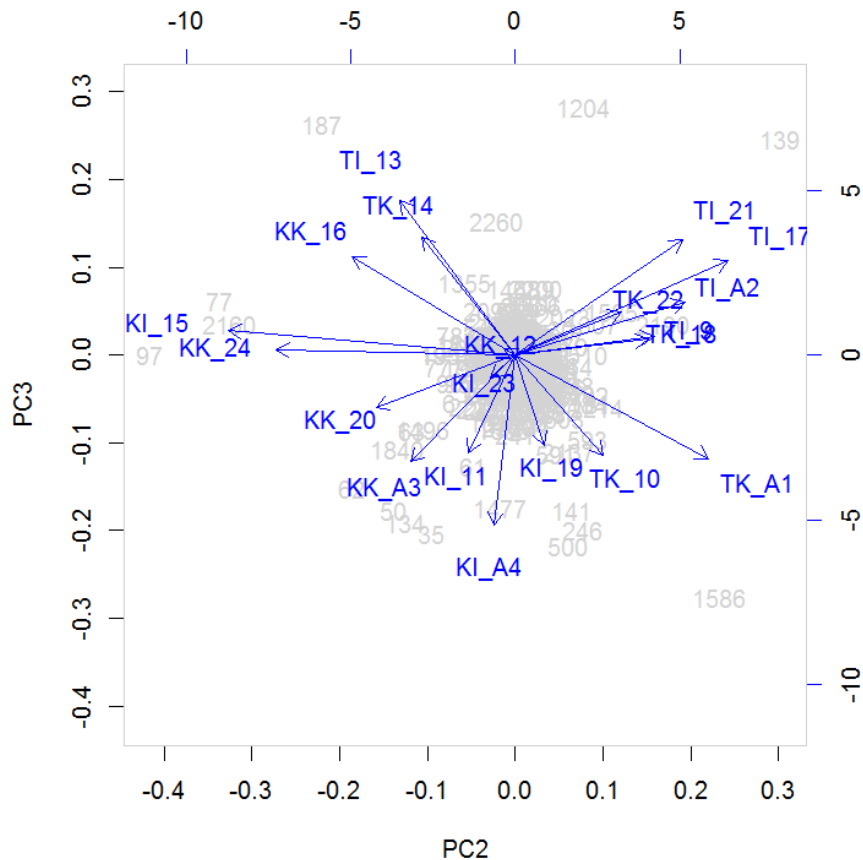


Abbildung 38: Hauptkomponentenanalyse der Rohintensitäten der Massenspektrometrie aus der MaxQuant Analyse. Probenkodierung: `Tomensa` inokuliert - TI, `Tomensa` Kontrolle - TK, `Karolin` inokuliert - KI, `Karolin` Kontrolle - KK (fortlaufende Nummerierung zur Probenidentifikation). Die Achsen repräsentieren die Hauptkomponenten.

Anhand der Abbildung 38 ließ sich erkennen, dass in den Rohintensitäten der Massenspektrometrie keine klare Clusterbildung der Probenvarianten zu erkennen war.

Um in paarweisen Vergleichen signifikant verschieden abundante Proteine zu identifizieren, wurde ein Student's T-test durchgeführt mit anschließender FDR-Adjustierung. Alle Proteine mit einem Grenzwert von $p < 0,01$ wurden berücksichtigt. Es wurden vier Vergleiche vorgenommen:

- (A) `Tomensa` inokuliert (TI) - `Tomensa` Kontrolle (TK)
- (B) `Karolin` inokuliert (KI) - `Karolin` Kontrolle (KK)
- (C) `Tomensa` inokuliert - `Karolin` inokuliert
- (D) `Karolin` Kontrolle - `Tomensa` Kontrolle

Zur Veranschaulichung der Änderungen der Proteinabundanz in den paarweisen Vergleichen wurden Volcano Plots für jeden der vier Vergleiche angefertigt (Abbildung 39).

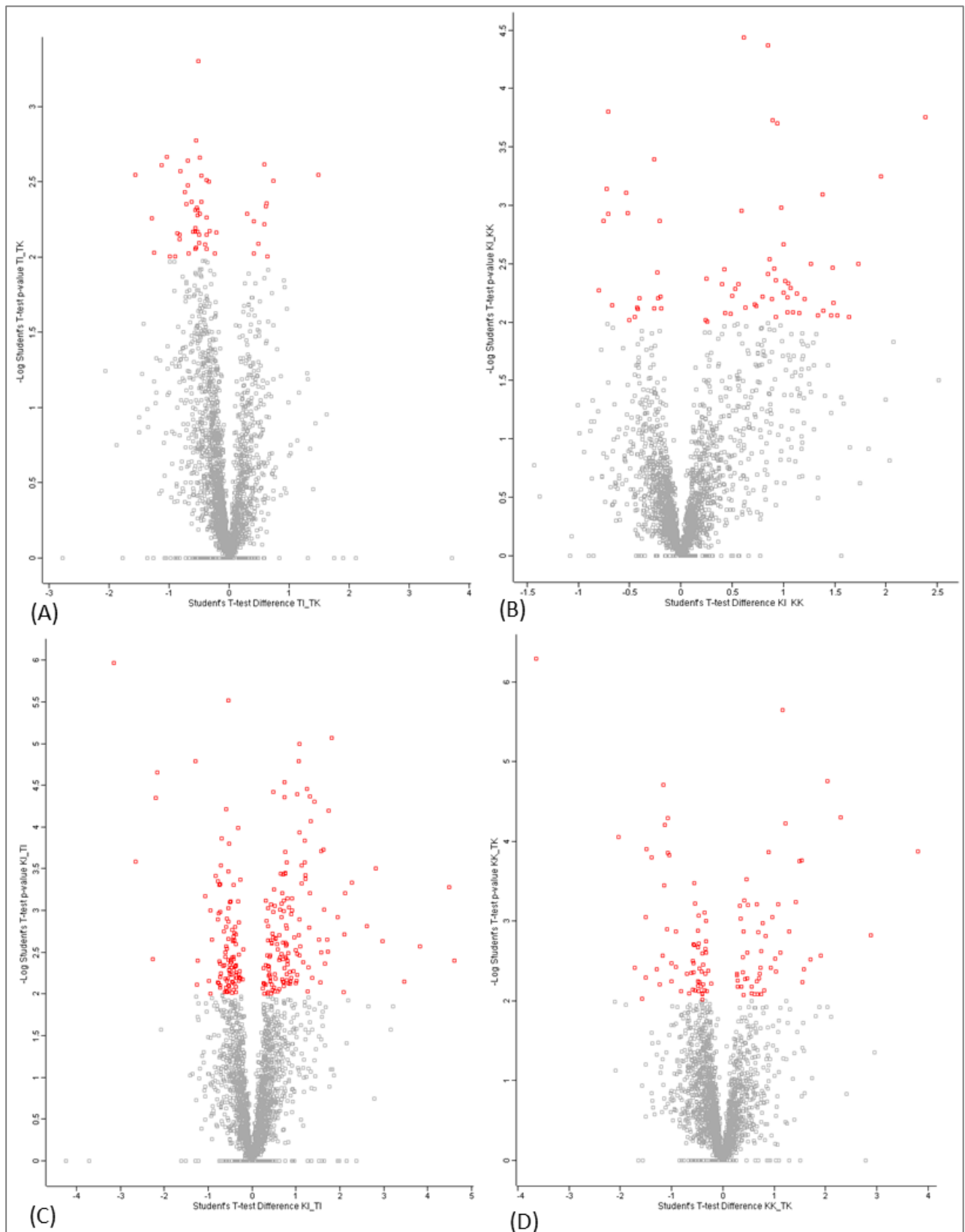


Abbildung 39: Volcano Plots zur Veranschaulichung der Proteinunterschiede in den paarweisen Vergleichen der MS-Daten. Auf der x-Achse wurden die Student's T-test Unterschiede aufgetragen und auf der y-Achse die $-\log p$ -Werte des Student's T-tests. Rot dargestellt wurden Proteine mit signifikant verschiedener Abundanz in den Vergleichen, Signifikanzniveau $-\log p > 2$. (A) Vergleich 'Tomensa' inokuliert vs. 'Tomensa' Kontrolle, (B) Vergleich 'Karolin' inokuliert vs. 'Karolin' Kontrolle, (C) 'Karolin' inokuliert vs. 'Tomensa' inokuliert, (D) 'Karolin' Kontrolle vs. 'Tomensa' Kontrolle.

Für den Vergleich der Proben `Tomensa` inokuliert (TI) und `Tomensa` Kontrolle (TK) wurde die Differenz der Student's T-test Unterschiede in Abhängigkeit von den -Log p-Werten in einem Volcano Plot aufgetragen und in Abbildung 39 (A) dargestellt. In diesem Vergleich wurden 55 signifikant abundante Proteine identifiziert. Es zeigten 45 Proteine eine höhere Abundanz in der Probe `Tomensa` Kontrolle im Vergleich zur inokulierten Probe. Zehn Proteine zeigten wiederum eine höhere Abundanz in der Probe `Tomensa` inokuliert im Vergleich zur entsprechenden Kontrolle. Im Allgemeinen konnte eine enge Streuung der Daten um den Nullwert der x-Achse beobachtet werden.

Im Vergleich `Karolin` inokuliert (KI) gegen `Karolin` Kontrolle (KK) konnten 69 signifikant verschieden abundante Proteine identifiziert werden (Abbildung 39 (B)). Es wurden 20 Proteine mit einer signifikant höheren Abundanz in der Kontrolle beobachtet und 49 Proteine zeigten eine signifikant höhere Abundanz in den inokulierten Proben. Bei diesen Vergleichen konnte eine breitere Streuung der Daten im Volcano Plot beobachtet werden.

Für den Vergleich der beiden inokulierten Proben beider Genotypen (KI gegen TI), wurden die Differenzen des Student's T-test in Abhängigkeit von den -Log p-Werten in Abbildung 39 (C) aufgetragen. Es wurde eine geringe Breite der Datenstreuung beobachtet. Es wurden insgesamt 261 signifikant verschieden abundante Proteine identifiziert, von denen 111 in höherem Maß in TI als in KI vorkamen und dahingegen kamen 150 Proteine signifikant häufiger in KI vor als in TI.

Im Vergleich der Kontrollproben beider Genotypen (Vergleich (D)) wurden insgesamt 115 differentiell abundante Proteine gefunden (Abbildung 39 (D)). Es waren 53 Proteine signifikant höher abundant in KK als in TK. Dahingegen waren 62 Proteine signifikant höher abundant in TK als in KK.

Bei einem Vergleich der signifikant verschieden abundanten Proteine aus den paarweisen Vergleichen zwischen TI vs. TK und KI vs. KK, zeigten sich nur Überschneidungen der Proteinmengen von 1,6 %, das heißt 2 Proteinen (Abbildung 40).

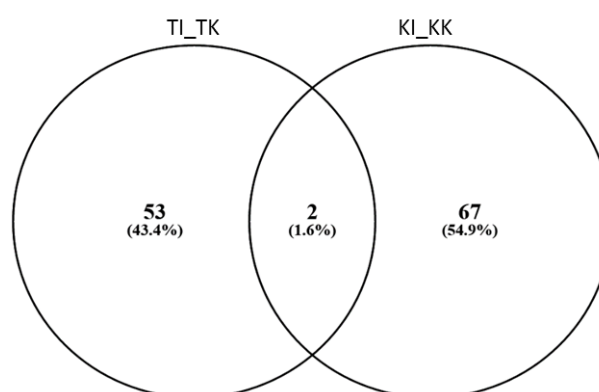


Abbildung 40: Venn-Diagramm der signifikanten Proteine aus dem paarweisen Vergleich beider Genotypen. Vergleichen wurden die Proteinmengen aus den Vergleichen `Tomensa` inokuliert (TI) vs. `Tomensa` Kontrolle (TK) und `Karolin` inokuliert (KI) vs. `Karolin` Kontrolle (KK).

Es zeigte sich somit bei der Betrachtung des Venn-Diagramms, dass 53 Proteine nur in dem Vergleich TI vs. TK vorkamen und 67 Proteine allein in dem Vergleich KI vs. KK signifikant verschieden abundant waren (Abbildung 40).

Mit allen signifikant verschieden abundanten Proteinen aus den paarweisen Vergleichen wurde ein *Gene Ontology (GO)-Enrichment* durchgeführt, um signifikant überrepräsentierte *GO-Terms* innerhalb dieser Proteingruppen zu identifizieren. Ein *GO-Enrichment* basiert auf der Zuordnung von Proteinen in vorab definierte funktionale Kategorien.

Für den Vergleich (A) wurde ein *GO-Enrichment* für jene 45 Proteine durchgeführt, welche in `Tomensa´ Kontrolle höher abundant waren als in `Tomensa´ inokuliert. In der inokulierten Probe waren lediglich zehn Proteine höher abundant, sodass kein *GO-Enrichment* durchgeführt werden konnte. Es wurden insgesamt sechs signifikant überrepräsentierte *GO-Terms* in dem Set von Proteinen der Probe `Tomensa´ Kontrolle identifiziert, welche in Abbildung 41 mittels REVIGO veranschaulicht wurden.

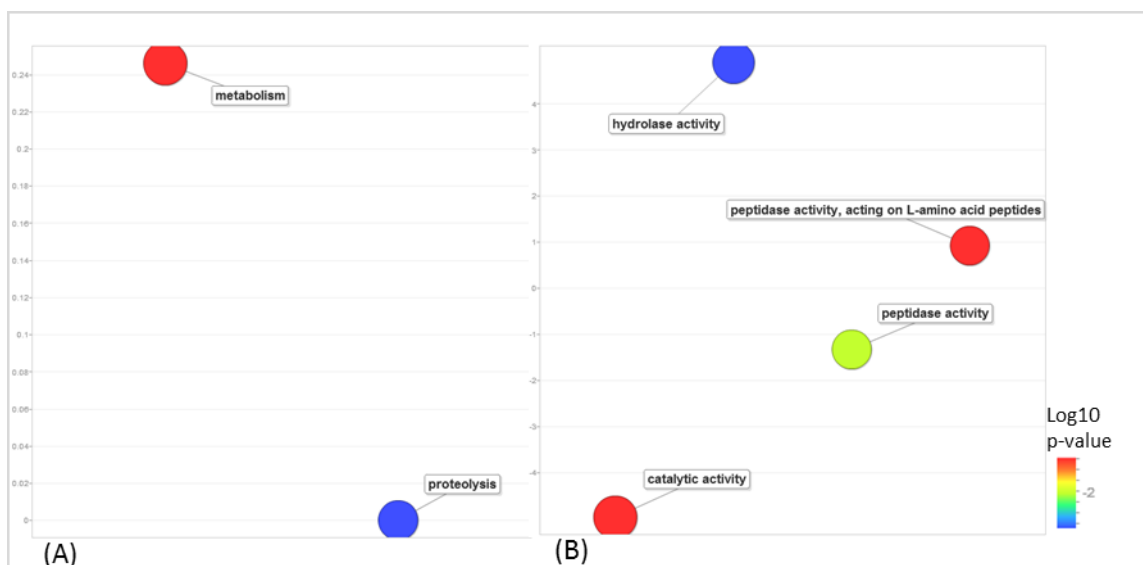


Abbildung 41: Graphische Darstellung der signifikant überrepräsentierten *GO-Terms* in der Probe `Tomensa´ Kontrolle im Vergleich zur Probe `Tomensa´ inokuliert. (A) *GO-Terms* der Kategorie „Biologische Prozesse“, (B) *GO-Terms* der Kategorie „Molekulare Funktionen“. Für die X-Achse wurde eine alphabetische Anordnung der Datenpunkte gewählt. Die Y-Achse hatte eine semantische Anordnung, ohne Dimension. Die Farbcodierung repräsentierte den Log10 p-Wert des *GO-Enrichment*.

Bei den überrepräsentierten *GO-Terms* der Kategorie „Biologische Prozesse“ handelte es sich um: Proteolyse und Metabolismus. In der Kategorie „Molekulare Funktion“ waren die *GO-Terms* Hydrolase-Aktivität, Peptidase-Aktivität, Katalyse-Aktivität und Peptidase-Aktivität an L-Amino-peptiden überrepräsentiert.

Im Vergleich (B) wurde ein *GO-Enrichment* mit 49 Proteinen durchgeführt, die im paarweisen Vergleich zwischen `Karolin´ inokuliert und `Karolin´ Kontrolle in den inokulierten Proben

signifikant hochreguliert waren. Insgesamt waren 26 *GO-Terms* signifikant überrepräsentiert. Eine Übersicht über die *GO-Terms* dieses Proteinsets wurde in Abbildung 42 dargestellt.

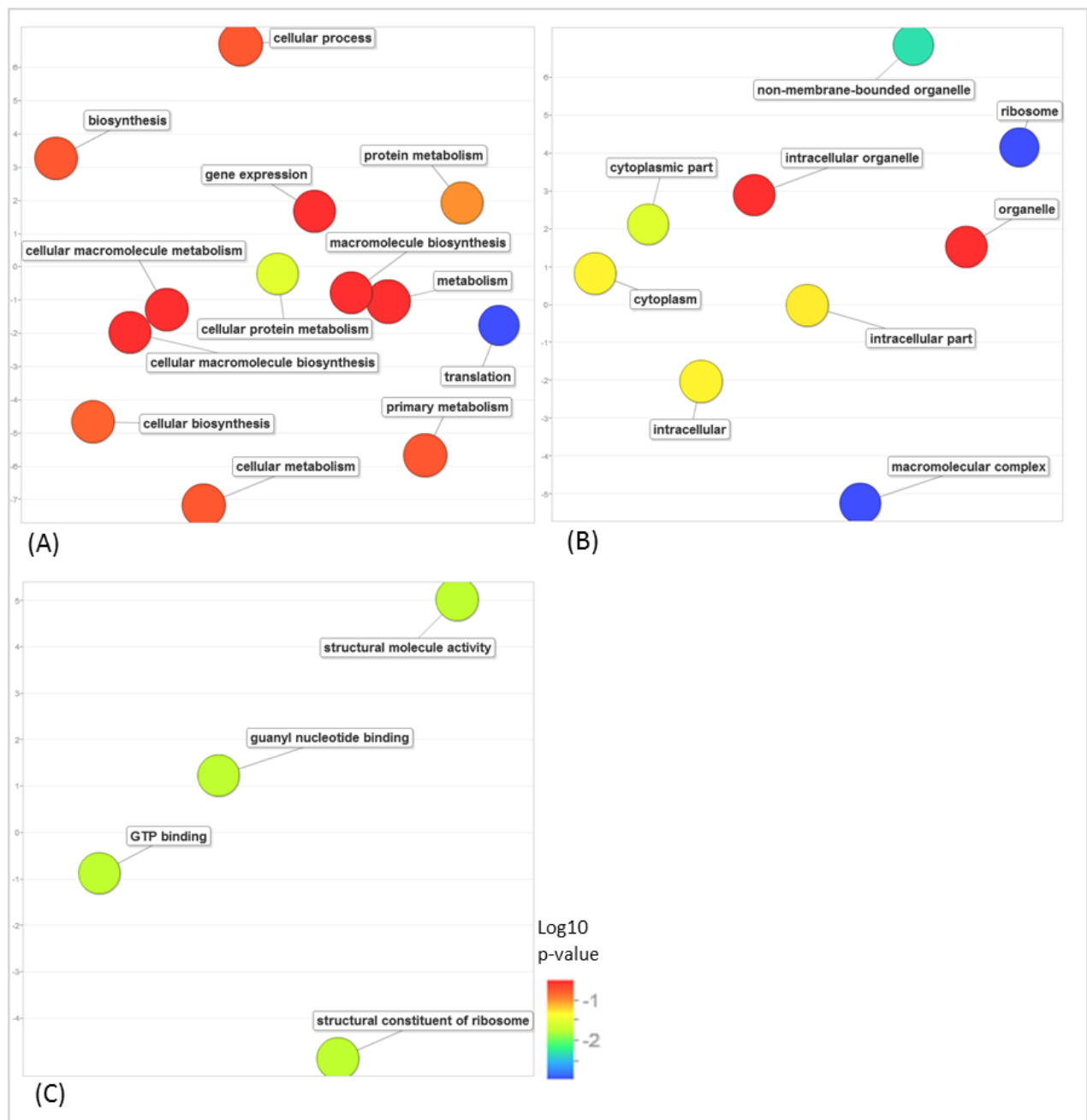


Abbildung 42: Scatterplot des *GO-Enrichment* der Proteine mit einer höheren Abundanz in 'Karolin' inokuliert als in 'Karolin' Kontrolle. (A) *GO-Terms* der Kategorie „Biologische Prozesse“, (B) *GO-Terms* der Kategorie „Zellbestandteile“, (C) *GO-Terms* der Kategorie „Molekulare Funktionen“. Für die X-Achse wurde eine alphabetische Anordnung der Datenpunkte gewählt. Die Y-Achse hatte eine semantische Anordnung, ohne Dimension. Die Farbcodierung repräsentierte den Log10 p-Wert des *GO-Enrichment*.

In der Kategorie „Biologische Prozesse“ waren die *GO-Terms* Biosynthese, zelluläre Prozesse, Genexpression, Proteinmetabolismus, Translation, Metabolismus, Makromolekülbiosynthese, primärer Metabolismus, zellulärer Metabolismus, zelluläre Biosynthese, zelluläre Makromolekülbiosynthese, zellulärer Proteinmetabolismus und zellulärer

Makromolekülmetabolismus überrepräsentiert (Abbildung 42 (A)). Die neun signifikant überrepräsentierten *GO-Terms* der Kategorie „Zellbestandteile“ waren: nicht-membrangebundene Organellen, Ribosomen, Organellen, intrazelluläre Organellen, Zytoplasmabestandteile, Zytoplasma, Intrazellulär, intrazelluläre Bestandteile und Makromolekülkomplexe (Abbildung 42 (B)). In der dritten Kategorie „Molekulare Funktionen“ (Abbildung 42 (C)) waren vier der *GO-Terms* überrepräsentiert: GTP-Bindung, struktureller Bestandteil von Ribosomen, strukturelle Molekülaktivität und Guanyl-Nukleotid-Bindung.

In dem Vergleich (C) zwischen `Tomensa´ inokuliert (TI) und `Karolin´ inokuliert (KI) wurden sowohl für die in TI hochregulierten Proteine ein *GO-Enrichment* durchgeführt, sowie für die herunterregulierten Proteine, das heißt Proteine mit höherer Abundanz in KI als TI. Es waren in der Proteingruppe mit Hochregulation in TI 111 Proteine vorhanden. Ein *GO-Enrichment* lieferte insgesamt über alle drei Kategorien hinweg 29 signifikant überrepräsentierte *GO-Terms*. Die Kategorie „Biologische Prozesse“ des *GO-Enrichment* beinhaltete folgende *GO-Terms*: Biosynthese, Katabolismus, Kohlenhydratmetabolismus, Metabolismus kleiner Moleküle, Makromolekülmetabolismus, zellulärer Ketonmetabolismus, Proteinmetabolismus, Carboxylsäuremetabolismus, Proteolyse, Metabolismus organischer Säuren, ncRNA Metabolismus, tRNA Aminoacetylierung, Translation, Aminosäureaktivierung, Aminmetabolismus und zellulärer Stickstoffmetabolismus. In der Kategorie „Zellbestandteile“ waren die beiden *GO-Terms* Zytoplasma und Intrazellularraum überrepräsentiert. In der Kategorie „Molekulare Funktionen“ waren zehn der signifikant überrepräsentierten *GO-Terms* enthalten. Dies waren: Guanyl-Nukleotid-Bindung, Hydrolyse-Aktivität, Nukleotidbindung, GTPase-Aktivität, GTP-Bindung, Nukleosidtriphosphat-Aktivität, Ligase-Aktivität, Ligase-Aktivität zur Bildung von aminoacyl-tRNA, Katalyse und Hydrolyseaktivität an Säureanhydriden.

Ein Zusammenhang beziehungsweise die Interaktion zwischen diesen *GO-Terms* innerhalb einer Kategorie wurde für die Kategorien „Biologische Prozesse“ und „Molekulare Funktion“ in der Abbildung 43 dargestellt.

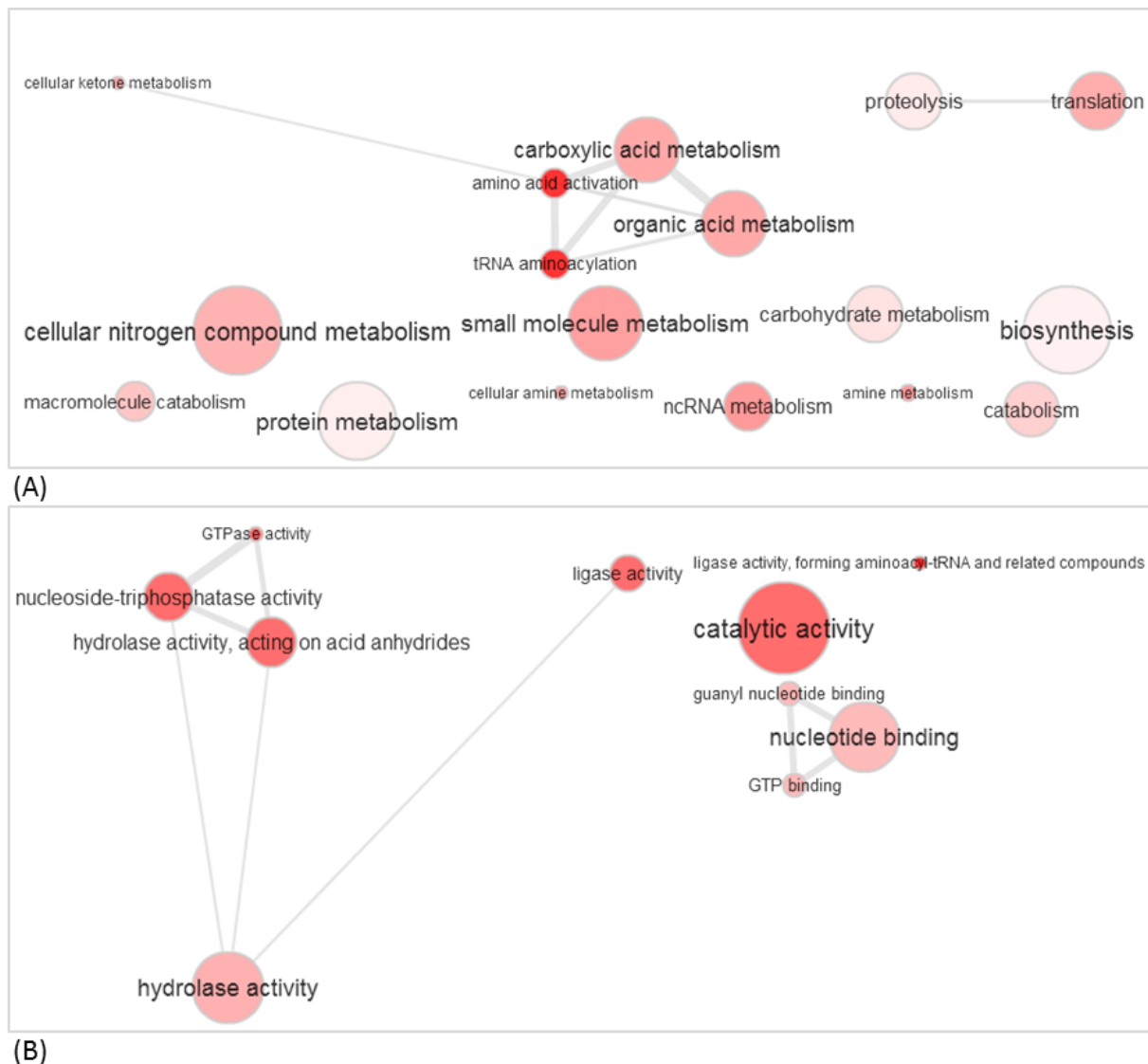


Abbildung 43: Graphische Darstellung der Interaktion zwischen GO-Terms der Proteingruppe mit höherer Abundanz in 'Tomensa' inokuliert als 'Karolin' inokuliert. (A) Interaktion der GO-Terms der Kategorie „Biologische Prozesse“, (B) Interaktion der GO-Terms der Kategorie „Molekulare Funktionen“. Proteine wurden durch Kreise repräsentiert, deren Größe dem Log10 p-Wert des GO-Enrichment entsprach (je größer der Kreis, desto kleiner der zugehörige p-Wert).

In der Abbildung 43 (A) wurde graphisch die Interaktion der signifikant überrepräsentierten GO-Terms in der Probe T1 der Kategorie „Biologische Prozesse“ dargestellt. Es zeigte sich, dass zehn der insgesamt 17 GO-Terms keine Interaktionen untereinander aufwiesen. Die verbliebenen sieben GO-Terms teilten sich auf in zwei getrennte Netzwerke. Die erste Interaktion wurde vorhergesagt für die GO-Terms Proteolyse und Translation. Die restlichen fünf GO-Terms bildeten ein komplexeres Netzwerk. Es handelte sich hierbei um die GO-Terms tRNA Aminoacetylierung, Metabolismus organischer Säuren, Aminosäureaktivierung, Carboxylsäuremetabolismus und zellulärer Ketonmetabolismus. In der Kategorie „Molekulare Funktionen“ waren zwei GO-Terms (Katalyse und Ligase-Aktivität zur Bildung von aminoacyl-tRNA) ohne vorhergesagte Interaktionen (Abbildung 43 (B)). Für acht weitere GO-Terms wurden zwei Netzwerke für die Interaktionen

untereinander vorhergesagt. Das erste Netzwerk bestand aus den folgenden *GO-Terms*: GTPase-Aktivität, Nukleosidtriphosphat-Aktivität, Hydrolyseaktivität an Säureanhydriden und Hydrolyse. Die *GO-Terms* Guanyl-Nukleotid-Bindung, Nukleotidbindung und GTP-Bindung bildeten das zweite Interaktionsnetzwerk (Abbildung 43 (B)).

In der Proteingruppe mit höherer Abundanz in der Probe 'Karolin' inokuliert im Vergleich zu 'Tomensa' inokuliert befanden sich 150 Proteine. Ein *GO-Enrichment* der Proteine dieser Gruppe lieferte 21 *GO-Terms*, die in dieser Proteingruppe signifikant überrepräsentiert waren. Die identifizierten *GO-Terms* waren verteilt auf die Kategorien „Biologische Prozesse“ und „Molekulare Funktionen“. Folgende *GO-Terms* der Kategorie „Biologische Prozesse“ wurden identifiziert: Kohlenhydratmetabolismus, Metabolismus, zellulärer Kohlenhydratmetabolismus, Bildung von Vorläufermetaboliten und Energie, Oxidations-/ Reduktionsprozesse, Metabolismus kleiner Moleküle, heterozyklischer Metabolismus, zellulärer Katabolismus, Metabolismus organischer Säuren, Biosynthese kleiner Moleküle, zellulärer Aminosäuremetabolismus, zellulärer Stickstoffmetabolismus, zellulärer Ketonmetabolismus, Aminmetabolismus und zellulärer Aminmetabolismus. In der Kategorie „Molekulare Funktionen“ waren sechs *GO-Terms* signifikant überrepräsentiert. Hierbei handelte es sich um die *GO-Terms*: Bindung von Co-Faktoren, katalytische Aktivität, Coenzymbindung, Oxidoreduktaseaktivität, Isomeraseaktivität und antioxidative Aktivität.

Um einen Überblick auch über die Interaktion zwischen den überrepräsentierten *GO-Terms* der Probe 'Karolin' inokuliert (KI) im Vergleich zu 'Tomensa' inokuliert (TI) innerhalb der verschiedenen Kategorien zu erlangen, wurde mittels REVIGO ein interaktives Diagramm angefertigt. Dieses wurde in der Abbildung 44 dargestellt.

in zwei separate Interaktionsnetzwerke. Eines bildeten Oxidations-/Reduktionsprozesse und Metabolismus kleiner Moleküle. Das andere Netzwerk bestand aus den *GO-Terms* Biosynthese kleiner Moleküle, zellulärer Aminosäuremetabolismus, Metabolismus organischer Säuren und zellulärer Ketonmetabolismus. In der Kategorie „Molekulare Funktionen“ waren zwei der insgesamt sechs *GO-Terms* ohne vorhergesagte Interaktion (Abbildung 44 (B)). Dies waren katalytische Aktivität und antioxidative Aktivität. Die erste Interaktion wurde vorhergesagt für die *GO-Terms* Oxidoreduktaseaktivität und Isomeraseaktivität. Die zweite Interaktion wurde für die *GO-Terms* Coenzymbindung und Bindung von Co-Faktoren ermittelt.

Der Vergleich (D), `Karolin´ Kontrolle und `Tomensa´ Kontrolle, lieferte wie bereits zuvor erwähnt 53 Proteine mit einer Hochregulation in der Variante `Karolin´ Kontrolle. Ein *GO-Enrichment* dieser Proteingruppe lieferte insgesamt fünf signifikant überrepräsentierte *GO-Terms* in den drei Kategorien. Diese waren Kohlenhydratmetabolismus, katalytische Aktivität, Membranbereich, Metabolismus kleiner Moleküle und Oxidoreduktaseaktivität.

Unter den 62 Proteinen, welche in der Variante `Karolin´ Kontrolle herunterreguliert waren, waren insgesamt zwei *GO-Terms* signifikant überrepräsentiert. Hierbei handelte es sich um die *GO-Terms* Aminmetabolismus und katalytische Aktivität.

Eine vollständige Liste der identifizierten, signifikant verschiedenen Proteine mit entsprechenden p-Werten aus der statistischen Auswertung wurde dem elektronischen Anhang in Abschnitt E 2 beigelegt.

Eine Auswahl der identifizierten Proteine wurde in Abbildung 45 dargestellt. Hierbei handelte es sich um die Top 5 der hoch- und herunterregulierten Proteine aus den Vergleichen (A) bis (D). Dargestellt wurden die Proteine als Kreise, mit den zugehörigen $\log_2(x)$ *fold changes* der paarweisen Student's T-test Vergleiche.

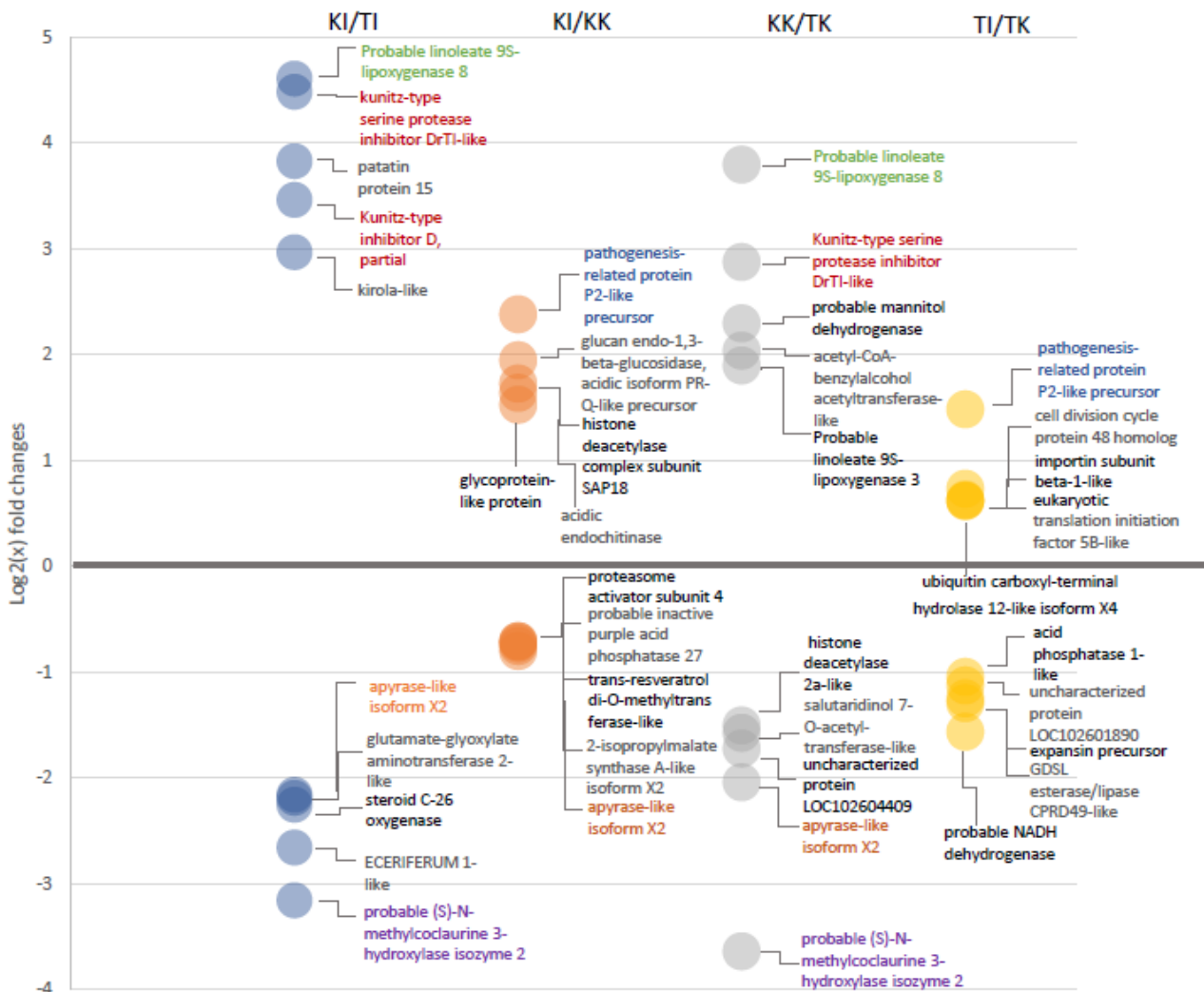


Abbildung 45: Top 5 der hoch- und herunterregulierten Proteine in den paarweisen Vergleichen 14 Tage nach Inokulation beziehungsweise Kontrollbehandlung. Die Proteine wurden durch Kreise mit den zugehörigen $\text{Log}_2(x)$ fold changes der paarweisen Student's t-Tests – Vergleiche dargestellt. Die Vergleiche wurden auf der x-Achse aufgetragen. Farblich hervorgehoben wurden Proteine, die in mehreren Vergleichen unter den Top 5 vorkamen. KI = 'Karolin' inokuliert, TI = 'Tomensa' inokuliert, KK = 'Karolin' Kontrolle, TK = 'Tomensa' Kontrolle.

In dem Vergleich 'Karolin' inokuliert (KI) gegen 'Tomensa' inokuliert (TI) waren die fünf am stärksten hochregulierten Proteine (Abbildung 45): Probable linoleate 9S-lipoxygenase 8, Kunitz-type Serine Protease Inhibitor Dr-TI-like, Patatin Protein 15, Kunitz-type Inhibitor D (partial) und Kirola-like. Die in KI herunterregulierten Proteine waren: Probable (S)-N-Methylcoclaurine 3-Hydroxylase Isozym 2, ECERIFERUM 1-like, Steroid C-26-Oxygenase, Glutamat-Glyoxylat Aminotransferase 2-like und Apyrase-like Isoform X2.

In dem Vergleich 'Karolin' inokuliert (KI) gegen 'Karolin' Kontrolle (KK) zeigte sich eine geringe Streuung der Proteinabundanz bei den in KI herunterregulierten Proteinen. Bei den in KI hochregulierten Proteinen war eine etwas breitere Streuung der Expressionsänderungen der Proteine zu erkennen (Abbildung 45). Die Top 5 der in KI höher abundanten Proteine war: Pathogenesis-related Protein PR2-like Precursor, Glucan Endo-1,3-beta-Glucosidase (acid isoform PRQ-like Precursor), Histondeacetylase Komplex (Subunit SAP18), Acidic Endochitinase und

Glycoprotein-like Protein. Die in KI weniger abundanten Proteine waren: Proteasome Activator Subunit 4, Probable Inactive Purple Acid Phosphatase 27, Trans-resveratrol Di-O-methyltransferase-like, 2-Isopropylmalate Synthase A-like Isoform X2 und die Apyrase-like Isoform X2.

Der Vergleich beider Kontrollvarianten (KK und TK) zeigte eine breite Streuung der Expressionsänderung innerhalb der hoch- und herunterregulierten Proteine (Abbildung 45). Die Top 5 der in KK hochregulierten Proteine waren: Probable Linoleate 9S- Lipoxygenase 8, Kunitz-type Serine Protease Inhibitor DrTI-like, Probable Mannitol Dehydrogenase, Acetyl-CoA-benzylalcohol Acetyltransferase-like und Probable Linoleate 9S- Lipoxygenase 3. Die Top 5 der herunterregulierten Proteine in KK waren: Histon Deacetylase 2a-like, Salutaridinol 7-O-Acetyl-Transferase-like, uncharacterized Protein LOC102604409, Apyrase-like Isoform X2 und Probable (S)-N-methylcoclaurine 3-Hydroxylase Isozym 2.

Im vierten Vergleich zwischen 'Tomensa' inokuliert (TI) und 'Tomensa' Kontrolle (TK) war eine geringe Streuung der Änderung der Abundanzen zwischen den Varianten zu erkennen (Abbildung 45). Die Top 5 Proteine mit einer höheren Abundanz in der inokulierten Probe waren: Pathogenesis-related Protein PR2-like Precursor, Cell Division Cycle Protein 48 homolog, Importin Subunit beta-1-like eukaryotic, Translation Initiation Factor 58-like und Ubiquitin Carboxyl-terminal Hydrolase 12-like Isoform X4. Eine Auflistung der insgesamt zehn Proteine mit höherer Abundanz in TI als TK wurden dem elektronischen Anhang in Tabelle E4 beigefügt. Die in TI herunterregulierten Top 5 Proteine und somit in TK höher abundanten Proteine beinhalteten: Acid-Phosphatase 1-like, uncharacterized Protein LOC102601890, Expansin Precursor, GDGL Esterase/Lipase CPRD49-like und Probable NADH Dehydrogenase.

Zur Identifikation weiterer Proteine mit Beteiligung an Abwehrreaktionen in resistenten Genotypen wurden alle signifikant verschieden abundanten Proteine zwischen den Varianten KI und KK betrachtet. Hierbei wurden die in KI hochregulierten Proteine analysiert. Interessante Proteine innerhalb dieser Gruppe waren das Pathogenesis related Protein 10, ein Protein mit *coiled-coil*-Domäne (PGSC0003DMP400020282) und Ubiquitin-fold Modifier-conjugating Enzyme 1 (PGSC0003DMP11314). Ebenso zeigte sich, dass in der inokulierten Probe von 'Karolin' sieben Proteine im Vergleich zur nichtinokulierten Kontrolle hochreguliert waren, die am Stoffwechsel von Plastiden, wie Chloroplasten und Mitochondrien, beteiligt waren.

Ein weiterer Vergleich, der zu einer Identifikation von Proteinen führen könnte, die eine Rolle in der Resistenzreaktion spielen, war der Vergleich zwischen 'Karolin' inokuliert und 'Tomensa' inokuliert. Wie bereits zuvor verdeutlicht waren in diesem paarweisen Vergleich die meisten statistisch signifikant abundanten Proteine zu verzeichnen. Eine Betrachtung aller signifikant verschieden abundanten Proteine dieses Vergleichs (KI/TI) lieferte weitere interessante Kandidaten mit einer Beteiligung an der Resistenzreaktion. Hierbei handelte es sich um das

Pathogenesis-related Protein PR-1 (CAB58263.1), zwei Chitinasen (P52404.1, AAA17410.1), eine Gluthation S-Transferase (XP_006338167.1), eine Glucose-6-Phosphat Isomerase (AAU00726.1), eine Aspartic Protease (XP_006339720.1), 26S Proteasome (XP_006343823.1) und eine Sucrose-Synthase (AAO66719.1).

Aber auch jene Proteine ohne signifikanten Unterschied, aber interessanter Verteilung der Proteindetektion zwischen den Proben wurden betrachtet. Ein interessantes Protein in dieser Gruppe war das Pathogenesis-related Protein STH-2. Dieses Protein war in allen fünf biologischen Wiederholungen von KI vorhanden, sowie in drei biologischen Wiederholungen der Variante TI, mit nahezu ähnlichen Abundanzen. In der Variante TK war, dieses Protein allerdings nicht nachweisbar (mit Ausnahme einer Probe). Ebenfalls interessante Proteine waren fünf Kunitz-type Inhibitoren: Kunitz-type Inhibitor C, Kunitz-type Enzyme Inhibitor S9C11, Kunitz-type Proteinase Inhibitor group A1, Kunitz-Inhibitor A und Kunitz-type Proteinase Inhibitor Group A2. Von diesen wurden zwei ausschließlich in der Variante KI dokumentiert und die drei verbleibenden in beiden Proben von 'Karolin', allerdings nicht in 'Tomensa'.

Bei einer Betrachtung der signifikant verschieden abundanten Proteine in der kompatiblen Interaktion bestand die Möglichkeit zur Identifikation von Proteinen, die für die Ausbildung von Symptomen verantwortlich waren. Hierfür diente der paarweise Vergleich zwischen TI und TK. Es wurden neben dem Cell Division Cycle Protein 48 Homolog keine zusätzlichen interessanten Proteine identifiziert, welche eine höhere Abundanz in 'Tomensa' inokuliert aufwiesen als in der entsprechenden Kontrolle. Weitere interessante Proteine, mit einer Herunterregulation in der Probe TI verglichen zu TK, waren eine NADH-Dehydrogenase 1 und eine GDSL Esterase/Lipase.

Ebenfalls war auch hier der Vergleich zwischen beiden inokulierten Proben (KI und TI) interessant zur Identifikation von Kandidaten, die die Bildung von Wucherungen bedingen. Auch in diesem Vergleich tauchte unter den signifikant verschieden abundanten Proteinen das Cell Division Cycle Protein 48 Homolog auf. Unter den nicht signifikant verschieden abundanten Proteinen des Vergleichs TI und KI waren ebenfalls Proteine vorhanden, die interessant waren aufgrund der Proben, in denen sie identifiziert wurden. Ein Beispiel hierfür war das Cell Division Protein FtsZ Homolog. Dieses Protein wurde in vier von fünf biologischen Wiederholungen der Variante TI detektiert und in zwei Proben der Variante TK. Für den Genotyp 'Karolin' wurde dieses Protein in nur drei Proben aller untersuchten Proben dokumentiert.

3.6.2. Identifikation von Proteinen aus *S. endobioticum* mittels *shotgun* Proteomic

Bei Anwendung der zuvor definierten Kriterien zur Identifikation von Protein aus den Daten des *shotgun* Ansatzes, wurden acht Proteine von *S. endobioticum* ermittelt, die den Selektionskriterien entsprachen und in mindestens vier der fünf biologischen Wiederholungen vorhanden waren (Abbildung 37). Hierbei handelte es sich um die in Tabelle 12 aufgelisteten

Proteine. Diese Proteine wurden aufgrund von Sequenzübereinstimmungen mit *Batrachochytrium dendrobatidis* dem Erreger *Synchytrium endobioticum* zugeordnet.

Tabelle 12: Übersicht über die acht Proteine von *S. endobioticum* Pathotyp 1, die aufgrund zu Sequenzähnlichkeiten zu *Batrachochytrium dendrobatidis* anhand der *shotgun* Daten in mindestens vier biologischen Wiederholungen identifiziert werden konnten.

Protein	Referenz <i>B. dendrobatidis</i>
Tubulin alpha-6 chain (451 AS)	BDET_00078
hypothetical protein similar to MAGO protein (134 AS)	BDET_02474
conserved hypothetical protein (777 AS)	BDET_02866
conserved hypothetical protein (604 AS)	BDET_02997
predicted protein (215 AS)	BDET_04871
hypothetical protein similar to polysaccharide deacetylase family protein (443 AS)	BDET_04934
conserved hypothetical protein (1590 AS)	BDET_05551
60S ribosomal protein L6 (250 AS)	BDET_05651

Bei den in Tabelle 12 aufgeführten Proteinen von *S. endobioticum* handelte es sich bei sechs der Proteine um hypothetische beziehungsweise vorhergesagte Proteine. Bei den beiden verbleibenden Proteinen handelte es sich um Tubulin alpha-6 Chain und 60 S Ribosomal Protein L6.

Bei einer Betrachtung der Daten, ohne Anwendung der Bedingung, dass ein Protein in mindestens vier biologischen Wiederholungen vorhanden sein musste, wurden weitere 45 Proteine von *S. endobioticum* identifiziert. Diese wurden in der Tabelle A 16 des Anhangs zusammengefasst. Bei diesen Proteinen von *S. endobioticum*, handelte es sich bei 25 der 45 Proteine um hypothetische oder vorhergesagte Proteine ohne funktionale Annotation. Den verbleibenden 20 Proteinen konnte ein Protein mit bekannter Funktion zugeordnet werden. Hierbei handelte es sich hauptsächlich um Proteine des Energiehaushaltes sowie ribosomale Proteine.

4. Diskussion

Ziel dieser Arbeit war es, die kompatible sowie inkompatible Interaktion von *Synchytrium endobioticum*, dem Erreger des Kartoffelkrebses, mit *Solanum tuberosum* zu untersuchen. Bei Kartoffelkrebs handelt es sich zwar um eine seit langem bekannte und bereits früh beschriebene Pflanzenkrankheit (CURTIS, 1921), allerdings sind die Befallsmechanismen und die damit einhergehende Interaktion mit der Kartoffel bisher kaum bekannt. Im Rahmen dieser Arbeit war es möglich, erste Sequenzen des Erregers zu identifizieren, sowie diese bioinformatisch zur Bestimmung von Effektorkandidaten zu nutzen. Ebenso wurde eine Proteomanalyse inokulierter Knollen durchgeführt, um die kompatible und inkompatible Interaktion des Erregers mit der Kartoffel zu verstehen. Eine Proteomanalyse wurde bisher nicht für die Interaktion von *Solanum tuberosum* mit *Synchytrium endobioticum* durchgeführt.

4.1. Charakterisierung von cDNA Sequenzen von *Synchytrium endobioticum*

Im Rahmen einer *small-scale whole-transcriptome shotgun* Sequenzierung und einer *whole-genome* Sequenzierung war es möglich, erste Sequenzen von *Synchytrium endobioticum* P18 zu identifizieren. Bis zu diesem Zeitpunkt waren keine umfassenden Sequenzinformationen dieses Erregers verfügbar. Es waren lediglich acht Sequenzen von 18 S und 28 S ribosomalen Gensequenzen in den öffentlichen Datenbanken vorhanden.

Für die Sequenzierungen wurden RNA-Proben aus Kartoffelknollen, die mit *Synchytrium endobioticum* Pathotyp 18 infiziert waren, untersucht. Es wurden zwei zeitlich versetzte Sequenzierungen durchgeführt. In einem ersten Ansatz wurde eine nicht-normalisierte cDNA-Bibliothek sequenziert. Hierbei wurden alle Sequenzen, die sich aus der RNA-Extraktion und cDNA-Synthese ergaben, sequenziert. In einem zweiten, nachfolgenden Ansatz wurde eine normalisierte cDNA-Bibliothek für die Sequenzierung eingesetzt. Ein normalisierter Sequenzdatensatz bot die Möglichkeit, den Anteil der höher abundanten Kartoffelgene in dem Datensatz zu reduzieren und so die Auflösung für niedrig exprimierte Gene zu erhöhen; in diesem Fall die Gene des Erregers. Die RNAseq-Analyse als Methode der Wahl zur Transkriptomanalyse ermöglicht die Detektion einer hohen Spannbreite von Expressionsänderungen im Vergleich zu Microarrays (WOLF, 2013). Ein weiterer großer Vorteil der Nutzung eines RNAseq-Ansatzes gegenüber hybridisierungsbasierten Ansätzen liegt in der Möglichkeit neue Transkripte zu entdecken (WANG *et al.*, 2009). Da von *Synchytrium endobioticum* keine Sequenzinformationen und Genmodelle bekannt sind, wären hybridisierungsbasierte Ansätze nicht anwendbar. Daher besteht unter Nutzung der *Next Generation Sequencing* Methoden die Möglichkeit, bisher unbekannt Sequenzen unter Nutzung bekannter Sequenzen verwandter Arten über Read-Mappings zu identifizieren. Ein Beispiel hierfür liefert die hier verwendete Strategie. Über die in Abbildung 16 beschriebene Mapping-Strategie war es möglich, in einem ersten Ansatz 5.448 cDNA-Contigs zu

generieren. Durch die Analyse des normalisierten Datensatzes mit Hilfe einer ähnlichen Strategie konnten zusätzliche 3.418 cDNA Contigs identifiziert werden, sodass eine Gesamtsequenzsammlung von 8.866 Sequenzen von *S. endobioticum* vorliegt. Neben dem Zugewinn neuer Sequenzen, konnten die zuvor identifizierten Contigs in vielen Fällen verlängert werden, sodass die zweite Sequenzierung der normalisierten Bibliothek zu einer Verbesserung der Sequenzqualität aus der ursprünglichen Sequenzierung führte. Bei der Bestimmung der Sequenzen über diese Mapping-Strategie ist zu beachten, dass es sich bei der verwendeten Referenzsequenz von *Batrachochytrium dendrobatidis* zwar um einen Vertreter der gleichen Gattung handelt wie *Synchytrium endobioticum*, dieser allerdings mit dem Befall von Amphibien, insbesondere Fröschen (LONGCORE *et al.*, 1999), ein völlig anderes Wirtsspektrum aufweist und damit verbunden höchstwahrscheinlich andere Befallsmechanismen, die sich wahrscheinlich auch auf Sequenzebene widerspiegeln. Die Zuordnung von Sequenzen von *Synchytrium* anhand dieser Referenzsequenz wird somit wahrscheinlich nicht zu einer Identifikation aller Sequenzen von *Synchytrium* führen, die in der Probe enthalten sind. Es werden einige Contigs aufgrund zu starker Sequenzunterschiede zwischen *Batrachochytrium* und *Synchytrium* nicht identifiziert werden können. Mitglieder des Phylums Chytridiomycota sind phylogenetisch verwandt zu den echten Pilzen. Es handelt sich hierbei um eine wahrscheinlich sehr alte Gruppe mit wenigen Veränderungen seit Anbeginn der eukaryotischen Evolution (BARR, 2001). Die Notwendigkeit, über eine, wie zuvor beschriebene, aufwendige Mapping-Strategie zur Trennung pilzlicher Sequenzen von Kartoffelsequenzen zu gehen, liegt in dem Umstand begründet, dass eine reine Kultur von *S. endobioticum* aufgrund seiner biotrophen Lebensweise nicht angelegt werden konnte. Es musste somit auf die Mischprobe von Kartoffel und *Synchytrium* zurückgegriffen werden, in der der Sequenzanteil von *Synchytrium* den geringsten Teil ausmachte. *Synchytrium* produziert zwar Sporangien mit beweglichen Sporen, allerdings keine Hyphen oder andere Fruchtkörper (EPPO STANDARDS, 2004; WEBSTER & WEBER, 2007). Diese Tatsache unterscheidet ihn von anderen Pilzen und macht *Synchytrium* zu einem interessanten Pathosystem, was die Arbeit mit diesem Organismus allerdings erschwert. Eine Möglichkeit, die Qualität der erhaltenen Sequenzen von *S. endobioticum* zu verbessern, wäre die Isolation und Aufreinigung von RNA aus Zoosporen oder Dauersporen des Erregers für ein *Next Generation Sequencing*, da hier eine Probe rein aus Sequenzen des Erregers vorläge; allerdings würde auf diese Weise nur ein sehr enges Spektrum der Biologie von *Synchytrium* erfasst werden. Nur sehr spezielle biologische Stadien würden damit abgebildet werden. Eine konzentrierte Probe wäre daher die beste Möglichkeit, um Proben für Sequenzierungsansätze zu erhalten, die ein vollständiges Genom von *S. endobioticum* repräsentieren. Vollständige genomische Sequenzen wären interessant, um neben den exprimierten Genen alle Gene des Organismus, sowie regulatorische Elemente zu identifizieren. Die intensive Arbeit an Kulturen des Erregers auf artifiziellen Medien oder die Aufreinigung von Zoosporen aus infiziertem Gewebe würde die Möglichkeit für Sequenzanalysen erheblich voranbringen. Allerdings sollte nicht außer Acht gelassen werden, dass eine Analyse der

Mischprobe neben der Identifikation von Sequenzen des Erregers die Möglichkeit bietet, den Befallsmechanismus von *Synchytrium* zu verstehen und genotypspezifische Wirtsreaktionen (Resistenz/Anfälligkeit) zu charakterisieren.

Es war bereits möglich, auch erste genomische Sequenzen zu bestimmen. Die in diesem Projekt generierten genomischen Contigs wurden über eine Zuordnung zu den entsprechenden cDNA Contigs identifiziert. Auf diese Weise war es möglich, erstmals 423 genomische Sequenzen von *Synchytrium endobioticum* zu veröffentlichen. Diese Sequenzen bieten eine gute Grundlage, um Marker basierend auf Unterschieden auch in nicht-codierenden Bereichen zu entwickeln, um im Idealfall eine Unterscheidung von Pathotypen auf Sequenzebene vornehmen zu können. Eine Unterscheidung von Pathotypen auf Basis von Sequenzunterschieden wäre ein enormer Gewinn. Zur Bestimmung von Pathotypen in Befallsflächen wird zurzeit die Glynne-Lemmerzähl-Methode unter Nutzung eines definierten Differentialsortiments angewendet. Diese Methode ist allerdings sehr zeitintensiv und störanfällig (BALLVORA *et al.*, 2011). Die Boniturergebnisse sind nicht immer eindeutig (BALLVORA *et al.*, 2011), sodass eine molekularbiologische Bestimmung der Pathotypen anhand von Sequenzunterschieden eine eindeutige und zeitsparendere Methode wäre zur Identifikation von Pathotypen in jeglicher Art von Proben. Würde eine PCR-Methode entwickelt, die eine sehr hohe Sensitivität aufweist, könnten bereits wenige Sporen im Boden infizierter Flächen zur Identifikation von Kartoffelkrebs ausreichen. Ebenfalls könnte eine molekularbiologische Identifikation von *Synchytrium endobioticum* die mikroskopische Auswertung der Proben ersetzen. Hier ist ein zusätzlicher Unsicherheitsfaktor vorhanden. Die Dauersporen von *Synchytrium succisae* können leicht mit den Dauersporen von *Synchytrium endobioticum* verwechselt werden. Bei *Synchytrium succisae* handelt es sich um einen Krankheitserreger, der den gewöhnlichen Teufelsabbiss befällt. Dieser ist häufig in der Nähe von Kartoffelfeldern zu finden (SHARMA & CAMMACK, 1976), sodass es durchaus zu einer Kontamination von Bodenproben mit Sporen von *Synchytrium succisae* kommen kann.

Die zufällige Auswahl von 96 cDNA Contigs, welche in weiteren Pathotypen über eine PCR-Amplifikation nachgewiesen wurden, bekräftigte die Hypothese, dass es sich bei den identifizierten Sequenzen um Sequenzen des Erregers handelt. Die zu Beginn aufgestellte Arbeitshypothese, dass eine Identifikation von Sequenzen von *S. endobioticum* mit Hilfe eines RNAseq-Ansatzes aus einer Mischprobe aus Kartoffel und dem Pilz möglich wäre, konnte somit bestätigt werden.

Um einen Eindruck über die Vollständigkeit des Transkriptomdatensatzes zu erhalten, wurde eine BUSCO-Analyse durchgeführt. Aufgrund der phylogenetischen Nähe zu echten Pilzen, konnte das Trainingsset *Fungi* in der Analyse verwendet werden und lieferte eine ungefähre Abdeckung von 50 % des erwarteten Transkriptoms. Diese Berechnung basierte auf dem Vergleich von konservierten Orthologen, welche als Referenz in dem Trainingsset hinterlegt waren. Als eine der wenigen sequenzierten Chytridiomyzetenarten könnte *Batrachochytrium dendrobatidis* ebenfalls

Hinweise auf die Komplexität des zu erwartenden Transkriptoms/Genoms von *S. endobioticum* liefern. Für *B. dendrobatidis* wurden 8.819 Sequenzen auf Transkriptomebene in dem Sequenzierungsprojekt des Broad Instituts (Cambridge, USA) bestimmt. In der Genomsequenzierung von *B. dendrobatidis* wurden 14.695 Gene identifiziert. Hier liegt auch eine Diskrepanz zwischen den Transkriptom- und Genomdaten vor. In einem Transkriptomansatz können lediglich die zum Zeitpunkt der Probennahme exprimierte Gene erfasst werden. Anhand eines Transkriptomansatzes können somit nicht alle Gene eines Organismus detektiert werden. Die Transkriptomdaten von *B. dendrobatidis* machen daher auch nur einen Anteil von 60 % der insgesamt vorhandenen Gene des Organismus aus. Basierend auf der Annahme, dass verwandte Arten eine ähnliche genetische Komplexität aufweisen, führt ein reiner Vergleich dieser Sequenzzahlen für *S. endobioticum* zu einer Abdeckung von 62 %. Dies stellt kein deutlich verschiedenes Ergebnis zu der BUSCO-Analyse dar und bekräftigt den in BUSCO bestimmten Wert der Transkriptomabdeckung. Ein Transkriptomansatz kann für eine Charakterisierung des Erregers auf Sequenzebene die Genomsequenzierung nicht ersetzen, in der alle Gene des Organismus erfasst werden können. Der Anteil identifizierter Sequenzen aus dem Transkriptomansatz war somit für beide Chytridiomyzetenarten sehr ähnlich. Für *Synchytrium endobioticum* ist auf Basis des Vergleichs zu *Batrachochytrium dendrobatidis* eine ähnliche genetische Komplexität zu erwarten. Diese Tatsache, dass der hier weiter analysierte Datensatz von *S. endobioticum* voraussichtlich lediglich 50 % aller Sequenzen dieses Pilzes umfasst, muss für die weitere Analyse der Sequenzen und deren Interpretation beachtet werden. Weitere Sequenzierungen sind von Nöten, um die Lücke zwischen den bisher generierten Sequenzdaten und der tatsächlichen Anzahl von Genen zu schließen. Auch wenn das Transkriptom nur zur Hälfte in den Daten widerspiegelt wurde und eine Lücke zwischen Realität und generierten Daten vorliegt, liefert das Transkriptom der befallenen Knollen wichtige Einblicke, um die Interaktion von *S. endobioticum* und Kartoffel zu verstehen.

4.2. Effektorkandidaten von *S. endobioticum*

4.2.1. Bioinformatische Vorhersage von Effektorproteinen

Durch umfassende Sequenzanalysen der zuvor beschriebenen cDNA-Sammlung und den daraus abgeleiteten Aminosäuresequenzen wurden Effektorkandidaten von *S. endobioticum* bestimmt. Für die Bewertung von Aminosäuresequenzen als Effektorkandidat wurden im Vorfeld verschiedene Kriterien definiert. In der Literatur sind einige Kriterien für die Definition von Effektoren beschrieben. In den meisten Fällen weisen die Effektorproteine eine Größe von weniger als 300 Aminosäuren auf (GAN *et al.*, 2013; PRESTI *et al.*, 2015). Ebenso wurde ihnen die Eigenschaft zugeschrieben, reich an Cysteinen zu sein, um den harschen Bedingungen des Apoplasten durch die Ausbildung von Disulfidbrücken und der damit einhergehenden Stabilisierung der Tertiärstruktur standhalten zu können (PRESTI *et al.*, 2015). Um als Effektor in der

Wirtszelle wirksam werden zu können, müssen diese Proteine ein Signalpeptid aufweisen, was den Einstieg in den sekretorischen Weg ermöglicht und somit die Ausschleusung aus der Zelle (PRESTI *et al.*, 2015). Zur weiteren Charakterisierung wurden die abgeleiteten Aminosäuresequenzen auf das Vorhandensein von funktionalen Aminosäuremuster untersucht. Wie unter Abschnitt 1.3.3 beschrieben, wurden Algorithmen entwickelt, um Sequenzen auf jene Kriterien hin zu untersuchen. In dieser Arbeit wurden die oben genannten Sequenzen von *Synchytrium endobioticum* auf die beschriebenen Kriterien hin untersucht. Ebenso wurden auch Sequenzen aus der RNAseq-Analyse betrachtet, die keine Sequenzübereinstimmung zu anderen bekannten Proteinen hatten und keinem Organismus zugeordnet werden konnten, da auch dies eine der Eigenschaften von Effektoren sein kann (SCHMIDT & PANSTRUGA, 2011). Für den Sequenzpool, der *Synchytrium endobioticum* zugeordnet werden konnte, wurden 66 Effektorkandidaten identifiziert (Tabelle 7). Für 61 dieser Sequenzen wurde eine Beteiligung am sekretorischen Weg vorhergesagt. Für lediglich eine geringe Anzahl von zehn Sequenzen wurden mehr als drei Disulfidbrücken zwischen den Cysteinen der Proteine vorhergesagt. Die Beobachtung, dass in wenigen Fällen die Ausbildung mehrere Disulfidbrücken vorhergesagt wurde, widerspricht der vorherigen Annahme, dass Disulfidbrücken charakteristisch für Effektorproteine sind. Dies wurde auch bereits in der Literatur von SPERSCHNEIDER *et al.* (2015) beschrieben. Eine strikte Anwendung der definierten Kriterien ist nicht möglich. Im Bereich der Effektorvorhersage gilt mehr denn je: „Ausnahmen bestätigen die Regel“. Die beschriebenen Kriterien bieten gute Anhaltspunkte für die Identifikation, können allerdings nicht vollkommen strikt angewendet werden. Eine Abwägung, welche Sequenzen als Effektorkandidaten gewertet werden, muss oder sollte individuell vorgenommen werden. Eine Konsequenz aus der Tatsache, dass eine Vorhersage von Effektoren schwierig ist, ist, dass bioinformatisch bestimmte Kandidaten in einer Funktionsanalyse bestätigt werden müssen. Die verwendeten Algorithmen liefern zwar erste Hinweise, sind aber kein alleiniger Beweis für eine tatsächliche Funktion als Effektor. Zur weiteren Charakterisierung der Effektorkandidaten wurden die abgeleiteten Proteinsequenzen auf funktionale Aminosäuremuster untersucht. Hierbei zeigte sich, dass bei den vorhergesagten Effektorkandidaten beider Sequenzgruppen Phosphorylierungs- und Glycosylierungsstellen die am häufigsten vertretenen Proteinmuster waren. Sekretierte Proteine, die über die klassische Route des endoplasmatischen Retikulums und dem Golgi-Apparat aus der Zelle geschleust werden, werden häufig kotranslational ins endoplasmatische Retikulum transloziert, wobei sie dann häufig N- oder O-glycosyliert werden können (PRESTI *et al.*, 2015). Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass die Proteine für die Ausbildung der vollen Funktionalität posttranslational modifiziert werden. Diese Möglichkeit sollte bei der funktionalen Analyse der Effektorkandidaten in transienten Expressionsversuchen in Tabak hinsichtlich der Interpretation beachtet werden. Falls eine posttranslationale Modifikation notwendig sein sollte, kann dies bei einer heterologen Expression der Gene zu einer Limitierung des Tests führen. Isoliert exprimierte Proteine können sich in Bezug auf Modifikationen anders verhalten als bei einer Expression im Pilz. Es könnte somit

sein, dass eine heterologe Expression von Proteinen nicht die eigentliche Funktion des Proteins widerspiegeln kann. Für die Vorhersage der Effektorkandidaten wurden die Sequenzen ebenfalls auf das Vorhandensein von Sequenzmotiven, die in anderen Organismen mit dem Transport in die Wirtszelle assoziiert sind, untersucht (Daten nicht gezeigt). Dies war zum einen das Aminosäuremuster RXLR, was für die Translokation von Effektoren in Oomyzeten beschrieben wurde (MORGAN & KAMOUN, 2007) und Ähnlichkeiten zu dem Aufnahmesystem des Erregers von Malaria aufweist (PANSTRUGA & DODDS, 2009). Dies konnte in den ausgewählten Effektorkandidaten nicht nachgewiesen werden. Allerdings ist die Aufnahme von pilzlichen Effektoren in die Wirtszelle ein kontrovers und intensiv diskutiertes Thema. Beispielsweise haben CATANZARITI *et al.* (2006) Effektoren des Erregers von Rost an Flachs untersucht und ebenfalls festgestellt, dass eine Aufnahme der Proteine in die Wirtszelle auch ohne das Vorhandensein eines Sequenzmotivs möglich war. Auch SPERSCHNEIDER *et al.* (2016) beschreiben, dass für pilzliche Effektoren bislang keine Konsensussequenz wie in Oomyzeten für die Translokation gefunden wurde. Eine Aufklärung der dahinterstehenden Mechanismen wurde bisher durch das Fehlen belastbarer Tests zur Untersuchung der Aufnahme von Effektorproteinen behindert (PRESTI *et al.*, 2015). Ein weiterer interessanter Aspekt wäre es, den reinen Sequenzvergleich auf eine Analyse der ausgebildeten Strukturen der Effektorproteine auszuweiten. Es wurde festgestellt, dass die Anordnung von Elementen mit einer definierten Sekundärstruktur, zwischen verschiedenen Effektoren übereinstimmte (SELIN *et al.*, 2016). Eventuell könnten auf diese Weise Charakteristika zwischen den Effektoren identifiziert werden, welche den Mechanismus der Translokation in die Zelle erklären. In einem ersten Schritt wäre somit der Vergleich der Effektorproteine von *Synchytrium* untereinander interessant, um ähnliche Strukturen zu identifizieren. In einem zweiten Schritt wäre ein Strukturvergleich zu anderen bekannten Effektoren denkbar. Auch diese Beispiele verdeutlichen einmal mehr, wie divers Effektorproteine sein können und eine Regelmäßigkeit vermissen lassen. Im Sequenzpool ohne Homologien zu bekannten Proteinen wurden 45 Sequenzen als Effektorkandidat klassifiziert. Als Besonderheit dieser Sequenzen ist festzuhalten, dass es sich bei 39 Sequenzen um unvollständige Sequenzen ohne Stop-Codon in der Basenabfolge handelte. Lediglich sechs Sequenzen enthielten sowohl Start- als auch Stop-Codons in der Basenabfolge. Zur Bestimmung der fehlenden Sequenzabschnitte wäre die Durchführung einer 3'-RACE (*rapid amplification of cDNA-ends*) empfehlenswert. Bei Erlangung der fehlenden Abschnitte wäre eine neue Sequenzanalyse notwendig, um die Kriterien auf die Gesamtlänge der Sequenzen anzuwenden. Dies würde in einigen Fällen wahrscheinlich zu einem Wegfall der Sequenzen als Effektorkandidat führen, da sie eventuell die maximale Länge von 300 Aminosäuren überschreiten oder andere Kriterien nicht mehr eingehalten würden.

Die Basis für die Identifikation der Effektorkandidaten waren in diesem Fall Transkriptomdaten. Hierbei handelte es sich um die zum Zeitpunkt der Isolation exprimierte Gene. Informationen über regulatorische Elemente oder die Sequenz nicht exprimierter Bereiche gehen in diesem Fall

verloren. Somit wären mehr als die hier generierten 423 genomischen Contigs mit einer größeren Abdeckung des Genoms interessant für die Vorhersage der Genmodelle sowie zur Analyse der nicht exprimierten Bereiche. So würden sich zusätzliche Kriterien für die Vorhersage von Effektorkandidaten erschließen, welche die Identifikation selbiger genauer und sicherer machen würden. Beispielsweise wurden in Studien über *M. oryzae* und *L. maculans* Effektorkandidaten identifiziert, die vorzugweise in genarmen und AT-reichen genomischen Regionen lokalisiert waren (SCHMIDT & PANSTRUGA, 2011). Ebenso wurden Virulenz-assoziierte Gene in einigen Organismen (auch Tierpathogenen) in Bereichen der Telomere gefunden. Dies kann eventuell in dem erleichterten Austausch von Chromosomenstücken begründet liegen (BARRY *et al.*, 2003). Diese Möglichkeit erlaubt eventuell eine schnelle Bildung von Genvarianten und ermöglicht den Verlust von Effektoren, die von der Wirtszelle erkannt werden, durch einfache Rekombination (SCHMIDT & PANSTRUGA, 2011). Durch eine stetige und schnelle Anpassung der Effektoren können Resistenzen schneller überwunden werden und einen Befall ermöglichen. Ebenfalls ist bei *S. endobioticum* eine Pathotypenbildung zu erkennen. Zwischen diesen Pathotypen werden wahrscheinlich verschiedene Effektoren sekretiert werden, deren Bildung und Änderung auf zuvor beschriebene Mechanismen zurückgehen könnten. Ebenfalls wurde für einige phytopathogene Pilze beschrieben, dass Effektoren in Clustern innerhalb des Genoms vorliegen und häufig eine Rolle in der Biosynthese von Sekundärmetaboliten haben, einschließlich der Synthese von Toxinen (SCHMIDT & PANSTRUGA, 2011). Somit wären Genominformationen wichtig, um auf Grund der physikalischen Position Rückschlüsse auf die Möglichkeit eines Effektors ziehen zu können. Je mehr Informationen für eine Vorhersage zur Verfügung stehen, desto zuverlässiger können die Vorhersagen werden.

Auf Basis der Transkriptomdaten war, wie zuvor beschrieben, eine Vorhersage von Effektorkandidaten möglich. Es wurden die Sequenzen von *S. endobioticum* analysiert, sowie die Sequenzen ohne Homologien zu bekannten Taxa. Betrachtet man die beiden Gruppen von Effektorkandidaten gemeinsam, beläuft sich das bisher identifizierte Effektorrepertoire auf 111 Kandidaten. In der Literatur sind einige Beispiele für die Vorhersage von Effektorkandidaten für verschiedene Erreger beschrieben worden. Auch für *Batrachochytrium dendrobatidis* wurde das Sekretom und der Anteil von Effektoren charakterisiert. Das gesamte Sekretom beläuft sich auf 884 Proteine, was ungefähr 10 % der Gesamtproteinanzahl ausmacht. Hiervon wurden 109 Proteine als Effektoren vorhergesagt, was einem Anteil von 12,3 % des Sekretoms entspricht (BROAD INSTITUTE; SPERSCHNEIDER *et al.*, 2016). Die für *B. dendrobatidis* vorhergesagte Anzahl an Effektoren ist annähernd identisch zu der hier identifizierten Effektoranzahl von 111 Kandidaten. Es wurde für die Sequenzsammlung von *Synchytrium* ein Sekretom bestimmt, welches insgesamt 457 Proteine umfasste, zusätzlich der 45 Sequenzen ohne Homologien zu anderen Organismen. Die 111 Kandidaten entsprechen einem Anteil von 22,1 % des gesamten Sekretoms, was, verglichen mit dem Anteil von Effektoren von *B. dendrobatidis*, ein größerer Anteil wäre.

Allerdings ist zu berücksichtigen, dass das Sekretom von *Batrachochytrium* wesentlich umfassender ist. Die zur Verfügung stehenden Sequenzen von *Synchytrium* decken lediglich 50 % des erwarteten Transkriptoms ab, was vermuten lässt, dass in den bisher nicht bekannten Sequenzen weitere Proteine des Sekretoms vorhanden sind, als auch Effektoren. Eine Zusammenfassung einer Vielzahl an Organismen mit den jeweiligen Sekretomgrößen und vorhergesagten Effektorproteinen wurde von SPERSCHNEIDER *et al.* (2016) gegeben. Die Spannbreite an beschriebenen Effektoren für verschiedene Phytopathogene ist sehr groß. Basierend auf Daten von MARCET-HOUBEN *et al.* (2012) wurden das Sekretom und die Effektorproteine von *Penicillium digitatum* bestimmt, einem nekrotrophen Erreger. Das Sekretom umfasste 546 Proteine (Gesamtproteinzahl 9118), welches 77 vorhergesagte Effektoren beinhaltete. Ein weiteres Beispiel, mit einer deutlich höheren Anzahl an Effektoren, lieferten DUPLESSIS *et al.* im Jahr 2011. Sie beschrieben Sequenzen von *Puccinia graminis* sp. *tritici*, einem obligat biotrophen Erreger. Es wurde eine Gesamtmenge von 15.979 Proteinen bestimmt, wovon das Sekretom 1.946 Proteine umfasste. Hiervon wurden 846 Proteine als Effektoren vorhergesagt. Für individuelle bakterielle Pathogene wurden beispielsweise zwischen 20 und 30 Effektoren beschrieben (DOODS & RATHJEN, 2010), was deutlich weniger Effektoren sind. Für Oomyzeten hingegen wurden ähnliche Mengen an Effektoren beschrieben wie für pilzliche Erreger (SCHMIDT & PANSTRUGA, 2011). Diese Beispiele verdeutlichen, wie unterschiedlich die Menge an Effektoren für verschiedene Organismen ist und lassen vermuten, dass die Anzahl der Effektoren einen Rückschluss auf die Komplexität der Interaktionen zulässt. Dies würde bedeuten, dass die Interaktion pilzlicher Erreger komplexer wäre, als die bakterieller. Durch die sehr variable Anzahl an Effektoren, lässt sich der hier bestimmte Wert im Vergleich zur Literatur nicht bestätigen oder ablehnen. Die angegebenen Werte sind zwischen den Pathogenen sehr variable. Es handelt sich aber mit den insgesamt 111 identifizierten Effektorkandidaten von *Synchytrium* um eine durchaus realistische Anzahl.

Da es sich bei dem Repertoire an Effektoren um ein dynamisches Set von Proteinen handelt, könnte die Vermutung naheliegen, dass bereits zwischen verschiedenen Pathotypen eines Erregers verschiedene Effektoren codiert beziehungsweise exprimiert werden. Um dies zu prüfen, wurden die Effektoren in einem ersten Schritt bioinformatisch in Sequenzdaten der Pathotypen 1 und 18 (jeweils Daten aus einer Mischprobe von Kartoffel und *S. endobioticum*) analysiert. Dies wurde über ein Mapping der nicht assemblierten Reads gegen die Sequenzen der Effektorkandidaten durchgeführt. Gegeben der Tatsache, dass die Effektorkandidaten aus dem Datensatz des Pathotyps 18 generiert wurden, wurden alle Effektoren (mit Ausnahme zweier Sequenzen) bioinformatisch bestätigt. Es zeigten sich deutliche Unterschiede in der Expressionsstärke der Effektoren (gemessen an der Anzahl von Sequenzreads pro Effektorkandidat). Dies lässt vermuten, dass nicht alle Effektoren zeitgleich für eine Infektion benötigt werden und die Expression *in planta* abhängig vom Infektionsstadium ist (OKMEN & DOEHLEMANN, 2014). In einem weiteren Datensatz, der Sequenzen des Pathotyps 1 enthielt, war

auffällig, dass wenige Effektoren exprimiert wurden und jene mit Expression lediglich eine geringe Anzahl von Reads pro Effektor aufwiesen. Zu beachten ist allerdings, dass es sich bei dem untersuchten Probenmaterial um eine Mischprobe aus nicht befallenen und infizierten Kartoffelzellen handelte. Eine Möglichkeit wäre, dass eine ungleichmäßige Infektion der untersuchten Probe stattfand und wenige Zellen, die den Erreger enthielten, isoliert wurden. Ebenfalls handelt es sich bei der Glynne-Lemmerzahl-Methode zur Inokulation von Kartoffelgeweben um eine störanfällige und sensible Methode. Es werden frische etablierte Wucherungen für die Infektion verwendet und auf die Kartoffelknollen aufgelegt. Falls keine optimale Freisetzung von Zoosporen stattfindet, kann keine ausreichende Infektion des unterliegenden Gewebes stattfinden. Die Probennahme fand in diesem Fall 14 Tage nach Inokulation statt. Zu diesem Zeitpunkt können eine eindeutige Klassifizierung des Probenmaterials und eine Einstufung des Infektionsgrads schwierig sein, sodass eine spätere Probennahme empfehlenswert gewesen wäre. Ein weiterer Hinweis auf eine unzureichende Infektion des Probenmaterials liefern bioinformatische Analysen, bei denen die Datensätze von P1 und P18 über Mappings verglichen wurden (Daten nicht gezeigt). Hierbei waren so geringe Übereinstimmungen zu beobachten, die mit hoher Wahrscheinlichkeit nicht auf starke Sequenzunterschiede zwischen den Pathotypen zurückzuführen sind, sondern auf einen geringen Anteil von Sequenzen des Pathotyps 1 in der Probe. Aufgrund der geringen Belastbarkeit der bioinformatischen Expressionsanalyse der Effektorkandidaten wurde ein molekularbiologischer Nachweis in den Pathotypen 1, 2, 6 und 18 vorgenommen. Hierbei handelte es sich um einen qualitativen Nachweis. Eine quantitative Analyse mittels Real Time PCR wäre ebenfalls eine interessante Option zur Untersuchung der Effektorkandidaten. Hiermit könnten Expressionsunterschiede zwischen den Effektorkandidaten untersucht werden. Die Information, ob ein Effektor in stärkerem Maß exprimiert wird als ein anderer, könnte eine weitere Option sein, den Kreis interessanter Kandidaten einzuengen. Stark exprimierte Effektoren könnten, zumindest für das untersuchte Infektionsstadium, besonders wichtig für einen Befall sein. Diese Analyse würde allerdings keinen Hinweis auf eine Funktion als Effektor geben. Für die molekularbiologischen Analysen wurde RNA aus befallenen Kartoffelknollen 14 Tage nach Inokulation extrahiert. Der molekularbiologische Nachweis mittels PCR wurde somit auf Transkriptebene durchgeführt. Die synthetisierte cDNA wurde mit oligodT Primern hergestellt, um lediglich eukaryotische RNA als Template nutzen zu können und so bakterielle Kontaminationen ausschließen zu können. Die cDNA-Synthese wurde durch Nachweis von Actin bestätigt. Es wurden kurze Amplicons (100 bp – 150 bp) pro Effektor in der PCR synthetisiert. Für 55 der 66 analysierten Effektorkandidaten konnten in mindestens zwei der drei biologischen Wiederholungen das erwartete PCR-Fragment nachgewiesen werden. Diese Schwankungen sind höchstwahrscheinlich auf Schwankungen im verwendeten Probenmaterial zurückzuführen. Diese Analysen müssten demnach in weiterem Probenmaterial bestätigt werden. Es wäre interessant, Effektoren zu identifizieren, die einzigartig für einen bestimmten Pathotyp wären, um diese als Marker zur Unterscheidung von Pathotypen

nutzen zu können. In einigen Fällen wurden in einzelnen Pathotypen Zusatzbanden zu den erwarteten Produkten in der PCR-Amplifikation gefunden, welche ebenfalls nach Bestätigung in weiterem Probenmaterial interessante Marker Kandidaten wären zur Unterscheidung von Pathotypen. Diese Sequenzpolymorphismen könnten, unabhängig von einer Bestätigung als Effektor, zur Unterscheidung der Pathotypen interessant sein. Es wurden lediglich kurze Bereiche der Effektorkandidaten von 100 bp bis 150 bp betrachtet. Die Amplifikation größerer Fragmente oder eine Abrasterung der Gesamtsequenz durch kurze Amplifikate würde den Informationsgehalt erhöhen und könnte zur Identifikation von Kandidaten zur Markerentwicklung beitragen. Eventuell könnten auf diese Weise Polymorphismen zwischen den Pathotypen identifiziert werden, die eine Unterscheidung erlauben. Hier wäre somit ein weiterer Ansatzpunkt zur Entwicklung von sequenzgestützten Methoden, welche die Glynne-Lemmerzahl-Methode unter Nutzung des Differentialsortiments ersetzen könnten. Auf Basis der vorhandenen Daten scheint allerdings eine geringe Variabilität zwischen den untersuchten Sequenzen der Pathotypen vorzuliegen, da die Effektorkandidaten meist in allen Pathotypen in erwarteter Fragmentgröße nachgewiesen wurden. Dies kann eine Entwicklung von Markern basierend auf den Effektorsequenzen erschweren.

Auch wenn die Entdeckung erster Effektoren phytopathogener Erreger durch STASKAWICZ *et al.* (1984) bereits mehr als 30 Jahre zurückliegt, war es im Rahmen dieser Arbeit erstmals möglich, Effektorkandidaten von *S. endobioticum* zu bestimmen.

4.2.2. Funktionsanalyse der Effektorkandidaten

Eine bioinformatische Bestimmung von Effektorkandidaten allein ist nicht ausreichend für eine Bestätigung der Sequenzen als Effektor. In diesem Fall wurde eine Funktionsanalyse durch eine heterologe Expression der Effektorkandidaten in *Nicotiana benthamiana* durchgeführt. Hierfür wurde ein *Agrobacterium tumefaciens*-vermittelter, transienter Ansatz verwendet, welcher häufig als Alternative zu genetischen Komplementationen oder stabilen Transformationen angewendet wird. Ein großer Vorteil liegt darin, dass Transgene bereits nach wenigen Tagen analysiert werden können (WROBLEWSKI *et al.*, 2005).

Für die Erstellung der Transformationskonstrukte wurden die Effektorkandidaten aus infiziertem Probenmaterial per PCR amplifiziert und in einen Expressionsvektor kloniert. Hierfür wurde die In-Fusion®-Klonierung verwendet, welche eine gerichtete Klonierung der Fragmente ermöglichte. Die klonierten Fragmente, sowie Promotor und Terminatorregionen des Vektors wurden sequenziert und auf eine korrekte Basenabfolge hin untersucht. Der Expressionsvektor wurde in den *Agrobacterium tumefaciens* Stamm GV3101 transformiert, welcher für die Infiltrationen genutzt wurde. Es wurden abgetrennte Blätter von *N. benthamiana* für die transienten Expressionsversuche verwendet. Neben dem Expressionsvektor mit den jeweiligen klonierten

Effektorkandidaten wurde auch der leere Expressionsvektor in die Blätter infiltriert, um den Einfluss des Bakterienstamms und des Vektors auf den Phänotyp der Blätter beurteilen zu können.

In den Versuchen der vorliegenden Arbeit wurden die Blätter nach einem Zeitraum von drei Tagen, an selber Stelle wie zuvor, mit Agrobakterien (GV3101) infiltriert, die beide Genombestandteile des TRV enthielten, welche an GFP gekoppelt waren. Bei TRV handelt es sich um einen Plusstrang RNA-Virus mit einem zweiteiligen Genom. Proteine, welche von der RNA 1 kodiert werden, reichen für die Replikation und die Bewegung innerhalb der Wirtspflanze aus; RNA 2 wird für die Bildung der Viruspartikel benötigt (MACFARLANE, 1999; RATCLIFF *et al.*, 2001). Die Infiltration fand zeitversetzt statt, um eine vorherige Expression der Effektorkandidaten zu gewährleisten. In der Literatur wurde beschrieben, dass die Expression des Transgens in transienten Ansätzen zwei bis drei Tage nach Infiltration ein maximales Expressionsniveau erreicht hat (WYDRO *et al.*, 2006). Laut Arbeitshypothese wurde davon ausgegangen, dass eine Expression von Effektorkandidaten zu einer Reduzierung der Pathogenabwehr führt und das Gewebe für eine Infektion mit dem Erreger anfälliger macht. Um diese Hypothese überprüfen zu können, musste für diesen Ansatz auf eine Pflanzenart für die Infiltrationen zurückgegriffen werden, für die ein geeignetes Pathosystem für eine nachfolgende Infektion denkbar war. Dies war mit Tabak als Wirtspflanze und TRV als Pathogen gegeben. Aufgrund der Autopolyploidie und dem hohen Grad an Heterozygotie ist die genetische Analyse an Kartoffeln hinter anderen wichtigen Kulturpflanzen zurück. Zuverlässige und technisch unkomplizierte Methoden für funktionale Genanalysen waren für Kartoffeln lange nicht vorhanden (BHASKAR *et al.*, 2009). BHASKAR *et al.* beschrieben im Jahr 2009 die erfolgreiche Infiltration mit *A. tumefaciens* GV3101 für bestimmte Kartoffelsorten. Auch wenn in der Literatur Beispiele für transiente Expressionsanalysen in Kartoffeln beschrieben wurden, war es hier nicht möglich, eine transiente Expression in den Sorten 'Tomensa' und 'Karolin' zu erzeugen. Die Testung weiterer Kartoffelsorten und verschiedener Bakterienstämme (z.B. LB4404 (EL-BANNA & TALLER, 2017), AGL-1 (ZHU *et al.*, 2015)) wäre sinnvoll, um eine Möglichkeit zu bekommen, die Effektorkandidaten direkt in der eigentlichen Wirtspflanze zu untersuchen. Eine weitere Möglichkeit der transienten Transformation bietet das *Particle Bombardment*, auch unter dem Begriff „biolistische Transformation“ bekannt, bei dem DNA an Partikel gebunden wird und diese in die Pflanze geschossen werden (SANFORD *et al.*, 1987). Auf diese Weise könnte die Nutzung von Agrobakterien umgangen werden. Nichtsdestotrotz bietet Tabak als Mitglied der Familie Solanaceae die Möglichkeit, die Analysen in einer zur Kartoffel verwandten Art durchzuführen. Werden von den Effektorkandidaten allgemeine Mechanismen der Pathogenabwehr beeinflusst, sollten diese auch in diesem heterologen Expressionssystem detektierbar sein.

Insgesamt zeigte sich bei den durchgeführten Infiltrationen, dass vier der 14 getesteten Effektorkandidaten einen Einfluss auf die Expression von TRV und dessen Verbreitung zeigten, im Vergleich zur Kontrolle. Die Expression der Effektorkandidaten war an die Expression des Reportergens DsRed gekoppelt, wohingegen die Expression des TRV an das Reportergen GFP

gekoppelt war. Aufgrund der überlappenden Spektren der verwendeten Reportergene war eine simultane Detektion beider Fluoreszenzsignale möglich. Die Detektion der Reportergenexpression wurde somit mit der Expression des Transgens und des TRV gleichgesetzt. In ersten Infiltrationen wurde die Funktionalität der Expressionsvektoren molekularbiologisch überprüft. Hierfür wurde cDNA aus infiltriertem Gewebe synthetisiert und die Effektorkandidaten wurden über PCR nachgewiesen; ebenso wurde eine Verunreinigung der Probe mit Plasmid-DNA ausgeschlossen. Dies wurde durch die Verwendung von RNA als Template in der PCR vorgenommen. Bei Plasmid-Verunreinigungen wäre hier eine Amplifikation der Zielsequenz dennoch möglich gewesen. Ebenfalls wurden in jenen Proben persistierende Agrobakterien ausgeschlossen durch Nutzung von PCR-Primern, die spezifisch für Agrobakterien waren. Für die Effektorkandidaten P18_12020, P18_24410, oH_11569 und E8 wurden im Vergleich zur Kontrolle signifikant erhöhte TRV-Expressionen detektiert, das heißt eine größere Anzahl von Blättern mit TRV/GFP-Expression. In der Kontrollvariante, in der eine Infiltration des leeren Expressionsvektors stattfand, waren somit weniger Blätter mit einer TRV-Expression zu verzeichnen. Es wird angenommen, dass *N. benthamiana* gegen nahezu alle Viren anfällig und daher die meist genutzte Wirtspflanze in Experimenten der Pflanzenvirologie ist (GOODIN *et al.*, 2008). Würde heißen, dass bei einer Infiltration der Blätter ohne vorherige Infiltration des Expressionsvektors eine verstärkte Expression des TRV zu erwarten wäre. In Infiltrationen, bei denen TRV alleinig in Tabakblättern exprimiert wurde, war eine transiente Transformationseffizienz von 100 % zu beobachten. Dass bei einer Infiltration des leeren Vektors eine verminderte Expression von TRV stattfand, könnte durch die Tatsache erklärt werden, dass eine Infiltration mit *A. tumefaciens* in Blättern zur Induktion einer Basisresistenzreaktion führt. In Arbeiten von PRUSS *et al.* (2008) wurden Blätter von *Nicotiana tabacum* mit Agrobakterien infiltriert (ohne Transgen) und nach zwei bis drei Tagen mit dem *Tobacco Mosaic Virus*, gegen den Tabak anfällig ist, nochmals infiltriert. Eine Expressionsanalyse von *PR-1*, einem typischen Markergen der Pathogenabwehr, zeigte, dass in infiltrierten Bereichen eine erhöhte Expression im Vergleich zu nicht infiltrierten Geweben vorzufinden war. Somit löste die Infiltration von Agrobakterien eine Basisresistenzreaktion in den Blättern aus. Dies wurde durch die Beobachtung bestärkt, dass die zuvor infiltrierten Blattbereiche bei einer nachträglichen Infiltration mit dem *Tobacco Mosaic Virus* resistent gegen dieses waren. Die Tatsache, dass in der vorliegenden Arbeit eine teilweise Expression des TRV auch in den Kontrollen stattfand, lässt vermuten, dass der Grad der Resistenzreaktion gegen die Agrobakterien auch von dem verwendeten Genotyp der Pflanze abhängig sein kann. Auch der verwendete Bakterienstamm kann einen Einfluss darauf haben. Die Kontrolle zur Abschätzung des Bakterieneinflusses auf die Verteilung des TRV in den durchgeführten Experimenten ist somit unabdingbar, um den Grad des Einflusses des Transgens beurteilen zu können. Die Tatsache, dass in den Blättern mit Effektorkandidatenexpression mehr Blätter eine TRV-Expression zeigten, deutet darauf hin, dass der Effektor die Pflanze anfälliger gegenüber dem Pathogen macht und somit Einfluss auf die Immunantwort der Pflanze hat. Somit wäre eine den Effektoren zugeordnete

Eigenschaft, dass sie eine Infektion der Pflanzen mit Pathogenen begünstigen, erfüllt. Allerdings kann die Infiltration allein nicht als Beweis gewertet werden, dass es sich bei den untersuchten Sequenzen um Effektoren handelt. Die Kombination mit einem molekularbiologischen Nachweis von Markergenen für eine Pathogenabwehr wie *PR-1* wäre auf qualitativer und quantitativer Ebene wichtig. Allerdings wird diese Analyse durch die Beobachtung erschwert, dass das Expressionsniveau von *PR-1* durch die Infiltration mit Agrobakterien an sich erhöht ist (PRUSS *et al.*, 2008). Es bleibt dann jedoch fraglich, ob eine Differenzierung zwischen der Expression in den Kontrollen und den Effektorinfiltrationen möglich ist oder ein Plateau der Expression in beiden Proben erreicht wurde. Eventuell wäre hier die Nutzung anderer Gene von Vorteil. Zum Beispiel könnte hier *FRK1* genutzt werden. Hierbei handelt es sich um eine *Flg22-induced Receptor-like Kinase (FRK1)*, welche ein Markergen der PTI darstellt (NOMURA *et al.*, 2011). In diesem Pathosystem mit bakterieller Beteiligung, wäre ein Markergen der PTI geeigneter als eines der ETI. Neben einem Nachweis auf Basis der Expression von ausgewählten Markergenen, wäre auch die Nutzung physiologischer Marker denkbar. Ein typischer physiologischer Marker für Abwehrreaktionen ist beispielsweise der Anstieg von Callose nach einer Infektion (OH & COLLMER, 2005). Es wurden einige Tests entwickelt, die den Nachweis physiologischer Vorgänge im Zentrum hatten. Ein Test zur Analyse der basalen Resistenz in Tabak wurde von OH & COLLMER (2005) entwickelt. Hierbei wurde die veränderte Aufnahme von Neutralrot in das Xylem nach einer Infiltration mit *Pseudomonas syringae* analysiert. Neutralrot wird genutzt zur Bestimmung der Zellviabilität. Der Test beruht auf der Aufnahme von Neutralrot in die Lysosomen vitaler Zellen (REPETTO *et al.*, 2008). Bezogen auf die erzielten Ergebnisse der Infiltrationsversuche mit Effektorkandidaten von *S. endobioticum* wäre zu erwarten, dass eine erfolgreiche Expression der Effektoren mit einhergehender Reduktion der Pathogenabwehr zu einer erhöhten Akkumulation von Neutralrot führt, im Vergleich zur Kontrollinfiltration, in der eine Basisresistenzreaktion gegen die Agrobakterien ausgelöst wurde.

Ebenfalls denkbar wäre auch in diesem Experiment die transiente Transformation der Tabakblätter mit Hilfe des *Particle Bombardment* (SANFORD *et al.*, 1987). Der Einfluss der Agrobakterien auf die Ausprägung einer Immunantwort wäre somit umgangen. Nachteile dieser Methode, im Vergleich zur Agrobakterien-vermittelten Transformation, sind eine aufwendigere Vorbereitung der ummantelten Partikel und das Vorhalten geeigneter Instrumente zum Beschuss der Proben. Eine weitere Möglichkeit den Einfluss der Agrobakterien zu reduzieren, wäre die sogenannte Agroinjektion. Hierbei werden durch eine kleine Wundstelle Agrobakterien in die Zellen eingebracht, welche die Translokation von Viren in die Pflanze vermitteln. Der Virus verbreitet sich dann in angrenzende Pflanzenteile ohne die Anwesenheit der Agrobakterien. RNA Viren eignen sich besonders zur Expression von Transgenen in solchen Experimenten, da sie sich in infiziertem Gewebe sehr gut vermehren. Für die Analyse von Effektoren hat sich hier das *Potato Virus X (PVX)* bewährt (Du *et al.*, 2014; Lu *et al.*, 2003). Der Test der Effektorkandidaten mittels Agroinfiltration in einem anderen heterologen Expressionssystem, zu dem ein etabliertes

Pathosystem vorhanden ist, wäre ebenfalls interessant. Beispielsweise wäre eine transiente Expression der Effektorkandidaten in Rosenpetalen denkbar. Die Möglichkeit der heterologen Expression in diesem System durch Agroinfiltration wurde im Jahr 2010 von YASMIN & DEBENER beschrieben. Eine nachfolgende Inokulation mit einem Rosenpathogen wie *Diplocarpon rosae*, dem Erreger des Sternrußtaus (VON MALEK & DEBENER, 1998), wäre eine Option der Analyse der Abwehrreaktion in den Petalen.

Eine Kombination der Effektorkandidaten P18_24410, P18_12020 und oH_11569, durch Mischen der Bakterienkulturen zu gleichen Teilen, zeigte keinen synergetischen Effekt in den Infiltrationen. Es ist denkbar, dass bei der Vielzahl vorhergesagter Effektoren mehrere Effektoren für einen effektiven Befall nötig sind. Auch hier wäre die quantitative Analyse der Effektorkandidaten interessant, um jene Effektoren zu identifizieren, die zum gleichen Zeitpunkt am stärksten exprimiert sind. Diese könnten eventuell eine interessante Kombination von Analysen darstellen. Bei den hier getesteten Kombinationen handelte es sich um eine sehr kleine Auswahl an Effektorkandidaten. Um zuverlässige Ergebnisse erzielen zu können, wäre es ratsam eine größere Anzahl an Kombinationen zu testen.

In der Analyse der 14 Effektorkandidaten zeigten die verbleibenden zehn Kandidaten keine signifikant verschiedene Expression und Verbreitung des TRV im Vergleich zur Kontrolle. Ihnen konnte somit keine Funktion als Effektor basierend auf der Arbeitshypothese zugeordnet werden. Allerdings können diese Sequenzen weiterhin als Effektor in Frage kommen und einen Einfluss auf die Wirtszelle nehmen, durch welchen die Infektion begünstigt wird, ohne direkte Einflussnahme auf die Pathogenabwehr. Es ist zu beachten, dass es in der natürlichen Expression der Effektoren im Pilz andere posttranslationalen Modifikationen geben könnte, als es in der heterologen Expression in der Pflanze der Fall ist. Ebenso kann die Interaktion der Effektoren mit den Wirtsfaktoren so spezifisch sein, dass ohne Vorhandensein dieser Faktoren im heterologen System keine Reaktion der Pflanze erkennbar ist. Ein negatives Resultat in den Infiltrationsversuchen ist somit noch kein Ausschlusskriterium für eine Funktion der Proteine als Effektor. Daher wären weitere funktionale Untersuchungen von Nöten, um eine endgültige Aussage über die Wirkweise der vorhergesagten Effektorkandidaten treffen zu können.

Die hier verwendete transiente Transformation zur funktionalen Charakterisierung der Effektorkandidaten war die bisher einzige Möglichkeit für eine solche Analyse, auch wenn diese zur endgültigen Bestätigung als Effektor alleinig nicht ausreichend ist. Durch die anspruchsvolle Biologie von *S. endobioticum* und die damit verbundene Tatsache, dass eine Kultur des Erregers auf artifiziellen Medien nicht möglich ist, schließt gentechnische Ansätze auf Seiten des Erregers aus. Hier wäre sonst die Erstellung von Knockout-Mutanten eine wichtige Option zur Funktionsanalyse von Effektorkandidaten (BOZKURT *et al.*, 2012). Die reverse Genetik liefert den gängigsten Ansatz zur Funktionsanalyse von Effektoren; hierbei werden die Effektorgene durch eine Antibiotikaresistenz ersetzt oder durch homologe Rekombination entfernt. Das *gene*

silencing durch RNAi wurde ebenfalls für einige Pilze beschrieben (SELIN *et al.*, 2016). Nach Entfernen beziehungsweise Ausschalten der Effektorgene können die Auswirkungen auf die Kolonisierung des Wirts untersucht werden. Ebenso wurden als wichtige Methoden zur Funktionsanalyse von Effektoren die bimolekulare Fluoreszenzkomplementation (BiFC), Immunokolokalisierung oder das *Yeast-two-Hybrid* (Y2H) System beschrieben (SELIN *et al.*, 2016). Auch wenn einige Methoden für die Effektoranalyse zur Verfügung stehen, sind weitere Forschungsansätze von Nöten, um die Problematiken mit redundanten Effektorgen und -funktionen in großen Proteinfamilien zu berücksichtigen (SELIN *et al.*, 2016). Für eine weitere Bestätigung der Effektorkandidaten von *Synchytrium* wäre die Entwicklung einer Kultur des Pilzes auf artifiziellem Medium wichtig, um den Pilz eventuell für die zuvor beschriebenen, gentechnischen Ansätze zugänglich zu machen. Auch wenn keine abschließende Funktionsanalyse der hier bioinformatisch vorhergesagten Effektorkandidaten vorgenommen werden konnte, war es dennoch erstmals möglich, eine Methode zu etablieren, die eine erste Analyse der verbleibenden Effektorkandidaten zulässt und erste Hinweise auf eine Beteiligung in der Regulation der Pathogenabwehr in der Wirtspflanze gibt.

4.2.3. Nutzungsmöglichkeiten der Effektorkandidaten in der Erforschung und Eindämmung des Kartoffelkrebses

Die Identifikation von Effektoren von Pathogenen liefert wichtige Erkenntnisse, die auf vielfältige Weise genutzt werden können.

Effektorproteine bieten eine gute Möglichkeit, den Infektionsprozess von *S. endobioticum* besser verstehen zu können, in dem die Interaktionspartner des Wirtes identifiziert werden, welche einen Befall ermöglichen. Ebenfalls bieten Effektoren ein Werkzeug, die entsprechenden Resistenzgene des Wirts zu identifizieren und für Züchtungsarbeiten zu nutzen. Erfolgreich wurde dies beispielsweise bereits für die Identifizierung von Resistenzgenen der Kartoffel gegen den Erreger *Phytophthora infestans* durchgeführt. Hierfür wurde von VLEESHOUWERS *et al.* (2008) ein anfängliches Set von 54 bioinformatisch bestimmten Effektoren kloniert und eine Immunantwort in Wildarten von *Solanum* ausgelöst. Dies führte zur Identifikation von potentiellen *R*-Genen. Der bisher produktivste Ansatz zur Identifikation von Interaktionspartnern der Effektoren waren Protein-Protein-Interaktion-Tests, wie das *Yeast-two-Hybrid* System oder Co-Immuno-präzipitationen. Auf diese Weise identifizierte Interaktionspartner müssen durch Komplementationsansätze bestätigt werden (ALFANO, 2009). Bisher sind weniger Interaktionspartner von pilzlichen Effektoren bestimmt worden als von bakteriellen (GAWEHNS *et al.*, 2012). Wäre auf diese Weise die Identifikation der korrespondierenden *R*-Gene möglich, könnten diese weitergehend analysiert werden. Die identifizierten *R*-Gene sollten zum Beispiel über transgene Ansätze bestätigt werden. Hierbei bietet das Ausschalten des potentiellen *R*-Gens durch Techniken wie das *clustered regularly interspaced short palindromic repeat*

(CRISPR)/CRISPR-associated protein 9 (Cas9) System (BORTESI & FISCHER, 2015) die Möglichkeit der Funktionsanalyse. Handelt es sich um das entsprechende resistenzvermittelnde Gen, sollte ein Ausschalten dieses Gens zur Anfälligkeit der Pflanze gegenüber dem entsprechenden Pathogen führen. Ebenso sollte eine Überexpression des Gens in einem anfälligen Genotyp zu einer Resistenzreaktion führen. Die Identifikation von *R*-Genen in der Kartoffel durch zuvor bestimmte Effektoren von *Synchytrium* könnte somit zur Züchtung krebsresistenter Sorten eingesetzt werden. Hier wurde der Begriff *Effecotromics* eingeführt, welcher ein Hochdurchsatzverfahren der funktionalen Genomik definiert, in dem die Effektoren als Sonden eingesetzt werden zur Identifikation von *R*-Genen im Keimplasma (VLEESHOUWERS & OLIVER, 2014).

Eine weitere Strategie, die zur Züchtung resistenter Sorten beitragen könnte, wäre die Identifikation von sogenannten *S* (*Susceptibility*) -Genen, die einen Befall der Pflanzen mit dem korrespondierenden Pathogen ermöglichen. *S*-Gene kodieren Pflanzenproteine, welche von dem Pathogen manipuliert werden und zur Vermehrung genutzt werden (GAWEHNS *et al.*, 2012). Das Ausschalten dieser Gene kann eine rezessive Resistenz vermitteln. Ein bekanntes Beispiel hierfür liefert *Mlo* aus Gerste (JORGENSEN, 1992), welches für das Eindringen des Erregers des Mehltaus notwendig ist und somit als Pforte für den Erreger fungiert. Ein Ausschalten dieses Gens verhindert einen Befall. Somit wäre die Entwicklung resistenter Kartoffelsorten möglich, wenn es gelänge, die Interaktionspartner der Effektoren von *Synchytrium* zu identifizieren und gezielt auszuschalten. In der Literatur wurde beschrieben, dass eine Resistenz basierend auf *S*-Genen länger überdauern könnte, als jene basierend auf *R*-Genen (GAWEHNS *et al.*, 2012). Ein Grund dafür könnte die Bildung von Pathotypen und eine schnelle Veränderung der Effektorzusammensetzung sein, die von den resistenten Pflanzen aufgrund fehlender *R*-Gene nicht mehr erkannt werden könnten. Aus diesem Grund wäre die Entwicklung resistenter Sorten anhand des Ausschaltens von *S*-Genen eine interessante Strategie. Eventuell könnte auf diese Weise eine Resistenz gegen mehrere Pathotypen von *S. endobioticum* erreicht werden, falls der Befallsmechanismus zwischen den Pathotypen identische *S*-Gene im Wirt nutzt und hier eine weniger dynamische Veränderung stattfindet. Allerdings müssen bei dieser Strategie besonders das Auftreten pleiotroper Effekte berücksichtigt werden; ebenso könnte das Ausschalten der *S*-Gene eine erhöhte Resistenz gegen den gewünschten Erreger vermitteln, ihn allerdings für einen anderen anfällig machen (GAWEHNS *et al.*, 2012).

Das sogenannte *Host Induced Gene Silencing* bietet eine weitere Möglichkeit eine Resistenz gegen *Synchytrium* in einem transgenen Ansatz zu vermitteln. Es handelt sich hier um einen RNAi-basierten Prozess, in dem kleine RNAs in der Pflanze produziert werden und Gene des Erregers ausschalten (YIN & HULBERT, 2015). Auch hier könnten die Sequenzen der Effektoren als Ziele für ein *Gene Silencing* genutzt werden. Neben den generierten Effektordaten könnten aber auch die allgemeinen Sequenzinformationen von *Synchytrium* genutzt werden, um Konstrukte für ein Ausschalten von Genen zu entwickeln. Hier bieten Gene des Stoffwechsels von *Synchytrium*

geeignete Ziele für ein *Gene Silencing*. Beispielweise wurde in der Literatur von MAO *et al.* (2011) beschrieben, dass die Expression von doppelsträngiger RNA in Baumwolle, die das Cytochrom P450 Gen CYP6AE14 als Ziel hat, zu einer verstärkten Resistenz gegen die Baumwollkapselraupe führt. Die in diesem Projekt generierten Sequenzdaten von *Synchytrium* bieten somit eine breite Grundlage zur Entwicklung resistenter Sorten mit Hilfe transgener Ansätze.

Ein weiterer transgener Ansatz zur Erstellung resistenter Pflanzen unter Nutzung der Informationen der Effektorvorhersage wäre die zeitgleiche Expression eines Effektors mit dem korrespondierenden Immunrezeptor (STUIVER & CUSTERS, 2001). Hierfür wäre wieder die Identifikation des Immunrezeptors eine Voraussetzung unter Nutzung der vorhergesagten Effektoren. Die Expression beider Komponenten würde eine Resistenzreaktion in der Pflanze auslösen. Wichtig hierbei ist die Verwendung Pathogen-induzierbarer Promotoren oder synthetischer Promotoren, die aus *cis* Elementen von Pflanzenpromotoren konstruiert sind, welche mit der Erkennung von Mikroorganismen in Verbindung stehen (GURR & RUSHTON, 2005, GUST *et al.*, 2010). Diese Methode könnte nicht nur zur Erstellung krebsresistenter Sorten genutzt werden, sondern unter Nutzung der Effektoren von *Synchytrium* und den spezifischen Interaktionspartnern könnten, je nach Spezifität des Promotors, Resistenzen gegen verschiedene Pathogene vermittelt werden. Es wurde in der Literatur beschrieben, dass die Expression pilzlicher Effektoren mit den entsprechenden Immunrezeptoren in anfälligen Pflanzen zu einem gewissen Maß eine Resistenz mit einem breiten Spektrum vermitteln kann. Diese Technik wurde unter dem Begriff *ETI Engineering* zusammengefasst (STUIVER & CUSTERS, 2001; GUST *et al.*, 2010). Limitierender Faktor in dieser Methode der Entwicklung resistenter Pflanzen ist der genutzte Promotor mit zum Teil sehr spezifischer Regulation (GUST *et al.*, 2010).

Da eine chemische Bekämpfung von *S. endobioticum* bisher nicht möglich ist, bietet der Anbau resistenter Sorten neben strikten phytosanitären Maßnahmen den einzigen Weg der Eindämmung des Kartoffelkrebses. Wie zuvor beschrieben, können auch hier die Effektoren einen großen Beitrag zur Züchtung krebsresistenter Sorten liefern und zum Verständnis des Befallsmechanismus beitragen. Effektoren haben somit eine Schlüsselrolle bei der Erforschung des Kartoffelkrebses und der Entwicklung resistenter Sorten zur Kontrolle dieser wichtigen Quarantäneerkrankung an Kartoffeln. Aber auch in der Entwicklung von Pflanzenschutzmitteln liefern Effektoren mögliche Ziele, falls ein Ausschalten einzelner Effektorgene zu einem Verlust der Infektiosität des Erregers führt (VAN DE WOUW & HOWLETT, 2011). Bisher war die chemische Bekämpfung von Kartoffelkrebs nicht möglich, da alle in Frage kommenden Chemikalien entweder toxisch gegenüber der Pflanze waren oder den Boden sterilisierten (OBIDIEGWU *et al.*, 2014; HAMPSON, 1977). Vielleicht bieten die hier identifizierten Effektorkandidaten eine Grundlage zur Erforschung der Möglichkeit der chemischen Eindämmung des Erregers. Falls ein Durchdringen der Dauersporen ohne den Einsatz stark toxischer Mittel chemisch möglich wäre, könnten Chemikalien, die gezielt auf die Effektorsequenzen wirken, für eine Kontrolle des Erregers genutzt werden. Eine Erforschung der

Effektoren und ihre Beteiligung an der Ausprägung einer Infektion wären enorm erleichtert, wenn eine genetische Transformation des Pilzes möglich wäre. Somit würde die Etablierung einer reinen Kultur von *S. endobioticum* die Erforschung des Erregers wesentlich voranbringen.

Die Identifikation von Effektorandidaten eröffnet weitere Forschungsfelder und kann zum Verständnis des Erregers und seiner Interaktion mit Kartoffeln beitragen.

4.3. *Shotgun Proteomics* in der Kartoffelkrebsforschung

Ein anderer Ansatz, um den Kartoffelkrebs weiter charakterisieren zu können, war die Durchführung einer Proteomanalyse. Im Fokus standen hier die Analyse der Interaktion zwischen Kartoffel und *Synchytrium*, um den Befallsmechanismus und die Resistenzreaktion besser zu verstehen, sowie die Möglichkeit, den Erreger anhand eines Proteinprofils näher zu charakterisieren. Es sollten laut Arbeitshypothese Proteine von *S. endobioticum* und insbesondere Effektorproteine nachgewiesen werden. Die Proteomik stellt eine Verbindung zwischen der Physiologie und der Genetik dar und ermöglicht Einblicke in komplexe regulatorische Netzwerke (DOMON & AEBERSOLD, 2006). Dieses Potenzial sollte genutzt werden für die Analyse des Kartoffelkrebses.

4.3.1. Analyse der Interaktion von *S. endobioticum* und Kartoffel auf der Wirtsseite

Ziel der ersten Auswertung in der Proteomanalyse war es, die Resistenzreaktion der Kartoffel in der inkompatiblen Interaktion zu untersuchen, sowie die Pathogenese in der kompatiblen Interaktion näher zu beleuchten.

Es wurde Gesamtprotein der resistenten Sorte 'Karolin' 14 Tage nach Inokulation mit *S. endobioticum* P1 extrahiert. Parallel dazu wurde Gesamtprotein der anfälligen Kartoffelsorte 'Tomensa' 14 Tage nach der Inokulation mit *S. endobioticum* P1 aufgereinigt. Für beide Genotypen wurden die entsprechenden Kontrollen (Wasserinokulationen) parallel untersucht. Somit war es möglich, vier Vergleiche zwischen den Proben vorzunehmen. Dies waren zum einen die Vergleiche zwischen den inokulierten Proben und den Kontrollen innerhalb eines Genotyps, andererseits konnten Kreuzvergleiche zwischen den Kontrollen beider Genotypen und zwischen den inokulierten Proben der untersuchten Genotypen vorgenommen werden.

Es wurde ein *shotgun* Ansatz zur Proteomanalyse verwendet. Die Entwicklung von nicht-gelbasierten Techniken, wie die *shotgun Proteomic*, stellen ein effektives Werkzeug dar, um im großen Maßstab die Proteinexpression und Charakterisierung in komplexen biologischen Proben vornehmen zu können (ZHU *et al.*, 2009). Durch die Verfügbarkeit der Massenspektrometrie und der Hochdurchsatzanalyse wurde es möglich, Proteine zu quantifizieren. Auch wenn die MS-basierten Analysen nur eine bestimmte dynamische Bandbreite abdecken und nicht alle Proteine

und Proteinmodifikationen einer Zelle widerspiegeln, ist die Pflanzenproteomik somit in der Lage, identifizierte Proteine relativ oder absolut zu quantifizieren (SCHULZE & USADEL, 2010). Zur Identifikation der Kartoffelproteine wurde eine Datenbank verwendet, die eine Sammlung aller 196.219 Aminosäuresequenzen von *S. tuberosum*, die auf NCBI hinterlegt waren, beinhaltet. Diese enorme Anzahl an Proteinen kann, im Vergleich zu den 39.031 Gensequenzen von *Solanum phureja*, durch die Tatsache erklärt werden, dass ein Gen eine multiple Anzahl an Proteinen generieren kann. Dies kann das Ergebnis verschiedener Vorgänge sein, wie alternatives Spleißen primärer Transkripte, posttranslationale Modifikationen, Sequenzpolymorphismen oder anderen Mechanismen der Proteinprozessierung (DOMON & AEBERSOLD, 2006).

In der Proteomanalyse wurden über alle Gruppen hinweg 4.245 Proteine basierend auf den gemessenen Peptiden identifiziert; hiervon wurden 4.192 Proteine der Kartoffel zugeordnet. Bei Anwendung des Selektionskriteriums, dass Proteine in mindestens vier der fünf biologischen Wiederholungen repräsentiert sein mussten, verblieben 2.410 Kartoffelproteine. Dies ist im Vergleich der Gesamtanzahl von Proteinen der Kartoffel ein sehr geringer Anteil. In öffentlichen Datenbanken sind, wie zuvor erwähnt, 196.219 Aminosäuresequenzen von *S. tuberosum* hinterlegt. Bei der Proteomanalyse werden die Proteine beachtet, die zum Zeitpunkt der Probennahme gebildet wurden. Dies werden nie alle möglichen Proteine eines Organismus sein, sondern sie werden in Abhängigkeit von der Wachstumsphase und biotischen sowie abiotischen Einflüssen reguliert sein. Der Anteil der selektierten Kartoffelproteine beträgt hier somit lediglich 1,23 % der insgesamt bekannten Kartoffelproteine; einem sehr geringen Anteil exprimierter Proteine. Für die Gesamtanalyse bedeutet dies, dass nur ein sehr enges Spektrum von Proteine betrachtet wird und dies lediglich Proteine mit einer hohen Abundanz sind. Proteine, welche in geringerem Umfang in der Probe enthalten sind, werden somit nicht erfasst. Hierbei könnte es sich allerdings um sehr interessante Proteine handeln mit regulatorischer Funktion, welche häufig auf einem geringeren Niveau exprimiert werden (VANDERSCHUREN *et al.*, 2013). Allerdings ist festzuhalten, dass die Anzahl identifizierter Proteine mit anderen Studien der Proteinanalyse in Kartoffeln annähernd übereinstimmen. In einer Proteomanalyse von Kartoffelknollen zur Analyse des kälteinduzierten Süßens wurden 4.463 Proteine identifiziert (YANG *et al.*, 2011). Es handelt sich somit bei den hier identifizierten Proteinanzahlen um ein vergleichbares Spektrum, sodass man festhalten kann, dass die Methode der *shotgun* Proteomik in einem zufriedenstellenden Maß funktioniert hat.

Es wurde eine Hauptkomponentenanalyse basierend auf den gemessenen Rohintensitäten der verschiedenen Peptidfragmente vorgenommen, um die Clusterbildung der Proben beurteilen zu können. Es zeigte sich, dass keine klare Clusterbildung der einzelnen Probenvarianten vorhanden war, was darauf hinwies, dass die biologischen Wiederholungen innerhalb einer Probenvariante nicht homogen waren, sondern Ausreißer beinhalteten. Dies hatte insofern Auswirkungen auf die nachfolgenden Auswertungen, dass die Proteinprofile der Proben einer Versuchsvariante nicht

übereinstimmend waren. Es wurden somit Proteine in einzelnen Proben identifiziert, die in andern Proben dieser Gruppen nicht anzufinden waren. Beispielsweise clusterten einzelne inokulierte Proben zusammen mit den dazugehörigen Kontrollen, sodass die Vermutung nahe liegt, dass in diesen Fällen die Infektion der Probe mit *Synchytrium* nicht ausreichend war. In diesen Proben wurden somit die genotypspezifischen Proteinprofile nach einer Infektion mit *Synchytrium* nicht detektiert. Die identifizierten Proteine wurden für eine statistische Auswertung genutzt. Es wurde in Abhängigkeit der paarweisen Vergleiche aller Proben zwischen 55 und 261 signifikant verschieden abundante Proteine identifiziert.

4.3.1.1 Analyse der Resistenzreaktion von Kartoffel gegen *S. endobioticum*

Zur Charakterisierung der Resistenzreaktion in der inkompatiblen Interaktion wurde in einem ersten Schritt der paarweise Vergleich zwischen 'Karolin' inokuliert (KI) und 'Karolin' Kontrolle (KK) durchgeführt. Ein *GO-Enrichment* jener 49 Proteine mit einer signifikanten Hochregulation in KI verglichen mit KK lieferte in drei verschiedenen Kategorien in der Probe KI überrepräsentierte *GO-Terms*. Diese waren im Wesentlichen verknüpft mit der Proteinbiosynthese und dem primären Metabolismus der Zelle. Es wurden keine *GO-Terms* mit direkter Assoziation zur Pathogenabwehr gefunden. Dennoch scheint die Proteinbiosynthese neben weiteren Faktoren, wie beispielsweise Salizylsäure, eine Voraussetzung für die Ausprägung einer hypersensitiven Reaktion mit programmiertem Zelltod zu sein (HEATH, 2000). Als Abwehrreaktion von Kartoffeln gegen Kartoffelkrebs wurden Nekrosen an den Infektionsstellen beschrieben (BALLVORA *et al.*, 2011). Dieses Phänomen ist als hypersensitive Reaktion (HR) bekannt und verhindert die Ausbreitung des Erregers. Bisher sind lediglich wenige Informationen über die beteiligten Gene der Kartoffel an der Ausbildung des programmierten Zelltods vorhanden (ALI *et al.*, 2014). Die hier identifizierten *GO-Terms* können somit dennoch mit einer Resistenzreaktion gegen *Synchytrium* in Verbindung stehen.

Eine differenzierte Betrachtung der verschieden abundanten Proteine in den jeweiligen Vergleichen soll im Folgenden zur Aufklärung der Resistenzreaktion vorgenommen werden:

Eine Analyse der fünf stärksten hochregulierten und herunterregulierten Proteine der Probe KI im Vergleich zu KK wurde durchgeführt, um die Resistenzreaktion der Kartoffel gegenüber *S. endobioticum* in der inkompatiblen Interaktion erstmals auf Proteomebene zu analysieren. Die fünf am stärksten hochregulierten Proteine waren: Pathogenesis-related Protein PR2-like Precursor, Glucan Endo-1,3-beta-Glucosidase (acid isoform PRQ-like Precursor), Histondeacetylase Komplex (Subunit SAP18), Acidic Endochitinase und Glycoprotein-like Protein. In dieser Proteingruppe waren einige Proteine mit Beteiligung an Reaktionen der Pathogenabwehr vorhanden. Hierbei handelte es sich zum einen um einen Pathogenesis-related Protein PR2-like Precursor. Eine BLAST-Suche der Aminosäuresequenz gegen die Referenz von *S. phureja* zeigte

eine Lokalisation auf Chromosom 01 des Kartoffelgenoms. Dieses Protein gehört zu einer Gruppe von Proteinen, die als induzierbare Proteine der Pathogenabwehr in vielen Arten nach einer Infektion mit Oomyzeten, Pilzen, Bakterien, Viren oder Insekten beschrieben wurden. Diese Pathogenensis-related Proteins (PRs) sind in verschiedenen Typen vorhanden und wurden daraufhin in 17 Familien eingeteilt (VAN LOON *et al.*, 2006). Viele dieser Proteine werden durch die Signalstoffe Salizylsäure, Jasmonsäure oder Ethylen aktiviert und entwickeln *in vitro* eine antimikrobielle Wirkung durch hydrolytische Vorgänge an Zellwänden, Toxizität bei Kontakt und einer Beteiligung an Abwehrreaktionen (VAN LOON *et al.*, 2006). Bei dem hier identifizierten Protein handelt es sich um ein PR-like Protein. Dieser Zusatz dient der Unterscheidung zwischen PR-Proteinen, die durch einen Pathogenbefall induziert werden, zu homologen Proteinen, die auch in gesunden Geweben ohne bekannte Induktion vorliegen (VAN LOON *et al.*, 1994). In diesem Fall war der Pathogenesis-related Protein PR2-like Precursor signifikant mehr in den inokulierten Proben vorhanden, was dennoch auf eine Induktion der Expression unter Pathogenbefall hinweist. Es wurde für einige PR-Proteine und PR-like Proteine beschrieben, dass eine konstitutive Expression vorliegt und eine Unterscheidung zwischen Resistenz und Anfälligkeit durch die Stärke der Expression und die zeitliche Änderung der Expression bestimmt werden (VAN LOON *et al.*, 2006). Diese Hypothese kann durch die Beobachtung bekräftigt werden, dass eine erhöhte Expression desselben Proteins in der anfälligen inokulierten Variante zu verzeichnen war (Vergleich 'Tomensa' inokuliert gegen 'Tomensa' Kontrolle). Hier war es unter den Top 5 der hochregulierten Gene im Vergleich zur Kontrolle zu finden. Allerdings war es im anfälligen Fall mit einer geringeren Änderung in der Expression zur Kontrolle vorhanden als im Vergleich der resistenten, inokulierten Sorte zur Kontrolle. Es könnte somit der Fall sein, dass auch im anfälligen Fall Abwehrproteine produziert werden, aber nicht in entsprechender Stärke und zeitlichen Nähe zur Infektion, sodass eine Resistenzreaktion nicht etabliert werden kann. Der Familie der PR-2 Proteine wird eine Wirkung als β -1,3-Glucanase zugeschrieben, für welche eine Rolle in der Abwehr von pilzlichen Pathogenen beschrieben wurde (VAN LOON *et al.*, 2006). Bei den Glucanasen sowie Chitinasen handelt es sich um Zellwand degradierende Proteine (VITERBO *et al.*, 2001). Die Zellwand von Pilzen bildet eine komplexe Struktur aus Chitin, 1,3- β - und 1,6- β -Glucan, Mannan und Proteinen (ADAMS, 2004). Eine Induktion des Pathogenesis-related Protein PR2-like Precursor im resistenten Genotyp nach Inokulation mit *S. endobioticum* lässt vermuten, dass ein Abbau der Zellwand des Erregers zu einer Eindämmung führen sollte. Ebenfalls war unter den Top 5 der hochregulierten Gene in KI eine Acidic Endochitinase vertreten, welche auf Chromosom 05 des Kartoffelgenoms lokalisiert war. Dieses Enzym trägt ebenfalls zur Eindämmung des Erregers durch Abbau der pilzlichen Zellwand bei. Für *Synchytrium endobioticum* wurde in wenigen Arbeiten beschrieben, dass die Zellwand der Dauersporen Chitin-ähnliche Strukturen aufweist und es Hinweise auf den Einbau von Uridin Diphospho-N-acetylglucosamin (UDP-GlcNAc), einem Chitin-Vorläufer, gibt (MURPHY *et al.*, 1982). Somit könnte die Expression von Chitinasen ein Teil der Abwehrreaktion der resistenten Kartoffel gegen Kartoffelkrebs sein. Ebenfalls am Zellwandabbau des Erregers beteiligt ist

wahrscheinlich die Glucan Endo-1,3-beta-Glucosidase, welche die gleiche Aktivität besitzt wie die β -1,3-Glucanase (LINTHORST *et al.*, 1990). Die Glucan Endo-1,3-beta-Glucosidase wurde, ebenfalls basierend auf Proteomdaten, als wichtiger Kandidat für die Ausbildung der Resistenzreaktion bestimmter Kartoffelsorten gegen *Phytophthora infestans* beschrieben (ALI *et al.*, 2014) und war auch unter den Top 5 der in KI höher abundanten Proteine vertreten. Das Gen der Glucan Endo-1,3-beta-Glucosidase ist auf Chromosom 10 lokalisiert.

Basierend auf den vorliegenden Daten scheint die Resistenzreaktion von Kartoffel gegen *Synchytrium endobioticum* auf dem Abbau der Zellwand des Erregers zu basieren. Im Falle einer erfolgreichen Abwehr des Pathogens wurde die Lyse des Erregers im Apoplasten der Pflanzenzelle beschrieben, dem Ort der ersten Interaktion zwischen Wirt und Pathogen (ALI *et al.*, 2012). Zu berücksichtigen ist aber, dass in der Proteomanalyse nur die am höchsten abundanten Proteine betrachtet werden. Somit ist es schwierig, eine Aussage über den Resistenzmechanismus nur anhand der stark exprimierten Proteine zu treffen. Wichtige Faktoren mit geringerer Abundanz gehen in dieser Art der Analyse verloren und werden nicht berücksichtigt. Die hier identifizierten Resistenzfaktoren sind nicht die hauptsächliche Quelle der Resistenz von Kartoffeln gegen Kartoffelkrebs, da in der Literatur eine Region auf Chromosom 11 (*Sen 1*) als Hauptlokus der Resistenz beschrieben wurde (BALLVORA *et al.*, 2011). Es handelt sich bei den hier identifizierten Proteinen vermutlich um zusätzliche Faktoren, die im Zusammenspiel eine Resistenzreaktion bedingen. Allerdings ist bei der Interpretation und dem Kreuzvergleich verschiedener „Omics“-Daten zu beachten, dass eine Korrelation zwischen den verschiedenen Ebenen der Regulation nicht immer gegeben ist. Die von BALLVORA *et al.* (2011) erlangten Erkenntnisse über den Bereich des Genoms, der den Hauptlokus der Resistenz beinhaltet, wurde anhand genomischer Daten ermittelt. Eine Aussage über die Genregulation wurde bisher nicht vorgenommen, da das eigentliche Resistenzgen noch nicht identifiziert wurde. In Arbeiten von ALI *et al.* (2014) wurden die kompatiblen und inkompatiblen Interaktionen von Kartoffel und *Phytophthora infestans* auf Proteom- und Transkriptomenebene untersucht. Hierbei wurde festgestellt, dass die Regulation auf transkriptioneller Ebene und Proteomebene lediglich zu 50 % übereinstimmte. Somit könnte es möglich sein, dass die entscheidenden Genprodukte der Gene des *Sen 1*-Lokus auf Chromosom 11 transkriptionell differentiell reguliert sind, diese allerdings auf Proteinebene zu dem untersuchten Zeitpunkt nicht mehr in Erscheinung treten. Dies könnte zum einen darin begründet sein, dass die Genprodukte bereits abgebaut sind oder aber in so geringer Menge vorliegen, dass sie durch die Proteomanalyse nicht erfasst werden können. Anhand der Proteomdaten dieses Vergleichs ist eine Aussage über den Resistenzmechanismus von Kartoffel gegen Kartoffelkrebs schwierig, da viele Faktoren in der Analyse verborgen bleiben, da sie aufgrund der geringeren Sensitivität der Methode nicht erfasst werden.

Um ein umfassenderes Bild der inkompatiblen Interaktion zu erhalten, wurden weitere Proteine betrachtet mit geringeren, aber signifikanten Unterschieden zwischen den untersuchten Proben.

Hierbei tauchte im Vergleich KI gegen KK das Pathogenesis-related Protein 10 (PR-10) auf. Es handelt sich hierbei um ein Protein, das zu einer Proteinklasse zählt, die in einer Vielzahl von Pflanzen identifiziert wurde. Die induzierte Expression von PR-10 durch Pathogenbefall wurde ebenfalls für viele Pflanzenarten beschrieben. Die biologische Rolle von einigen PR-10 Proteinen in der Pathogenabwehr liegt in der Ribonuclease-Aktivität dieser Proteine. Eine RNase-Aktivität schützt möglicherweise die Pflanzenzellen in Nähe der Infektionsstelle während des programmierten Zelltods. Aber auch eine direkte Wirkung auf die Pathogene ist denkbar (Liu & EKRAMODDOULLAH, 2006). Ebenfalls auffällig war, dass in der inokulierten Probe (KI) im Vergleich zur Kontrolle (KK) sieben Proteine aus Plastiden hochreguliert waren. In der Literatur wurde beschrieben, dass die Funktion und Integrität von Plastiden (Chloroplasten und Mitochondrien) wichtig für das Ergebnis der Wirt-Pathogen-Interaktion sind. Plastiden sind Quelle vieler Signalstoffe, welche die Antwort auf Pathogene modulieren (SHAH, 2003). In den Elektronentransportketten von Chloroplasten und Mitochondrien entstehen ständig reaktive Sauerstoffspezies (SHARMA *et al.*, 2012), welche dann in der Pathogenabwehr wirksam werden können. Eventuell löst der Befall mit *Synchytrium* eine erhöhte Aktivität der Plastiden aus, um den Gehalt an reaktivem Sauerstoff in der Zelle zu erhöhen und einen lokalen Zelltod zu fördern.

Dass es sich bei der Resistenzreaktion von Kartoffel gegen Kartoffelkrebs um einen äußerst komplexen Ablauf handelt, lässt sich aus dem Kreuzvergleich der beiden untersuchten Genotypen vermuten. Hier wurden sowohl die inokulierten Proben beider Genotypen miteinander verglichen als auch in einem weiteren Vergleich beide Kontrollen (Abbildung 40). Hierbei zeigte sich, dass lediglich ein kleines Set (1,6 %) der identifizierten Proteine in beiden Genotypen unter den signifikant verschieden abundanten Proteinen (jeweils Vergleich inokulierte Probe gegen Kontrolle) zu finden waren. Hierbei handelte es sich zum einen um das zuvor beschriebene Pathogenesis-related Protein PR2-like. Die verbleibenden Proteine waren zwischen den Genotypen verschieden, sodass in diesem Fall die Resistenz oder Anfälligkeit eines Genotyps gegenüber Kartoffelkrebs nicht allein abhängig wäre von der Expressionsstärke und einer zeitlichen Komponente der Expression, sondern von der Expression verschiedener Gene und deren Genprodukte. Es zeigte sich, dass im resistenten Genotyp vermehrt Kunitz-typ Serinprotease-Inhibitoren unter den Top 5 der signifikant verschieden abundanten Proteine in den paarweisen Vergleichen vorhanden waren. Dies war sowohl für den Vergleich der inokulierten Proben gegeneinander der Fall, als auch im Vergleich beider Kontrollen untereinander. Bei dieser Proteinklasse handelt es sich um eines der beiden meist vertretenen Proteine in der Kartoffelknolle. Dies sind Patatine und Kunitz-typ Serinprotease-Inhibitoren. Beispielsweise machten diese beiden Proteinklassen 90 % des isolierten Gesamtproteins aus Knollen der Kartoffelsorte 'Kuras' aus (HEGEMAN, 2011). Kunitz-typ Serinprotease-Inhibitoren werden in der Literatur beschrieben als eine Proteinklasse mit signifikanter Rolle in der natürlichen Pathogenabwehr der Kartoffel (VALUEVA *et al.*, 1998). Sie kommen allerdings in vielen

Pflanzenarten vor und werden als Antwort auf Verletzungen oder Angriffe von Insekten und Pathogenen induziert (RYAN, 1990). Proteine dieser Familie sind meist aktiv gegen Serinproteasen, können allerdings auch andere Proteasen inhibieren (LAING & MCMANUS, 2002; RITONJA *et al.*, 1990). Proteasen spielen eine wichtige Rolle in der Interaktion von Pflanzen und Pathogenen. Sie begünstigen die Infektion durch den Abbau von Pflanzenproteinen (KOIWA *et al.*, 1997). Hier steuern die Protease-Inhibitoren gegen.

Ein weiteres Protein, das im resistenten Genotyp `Karolin` sowohl in der inokulierten Probe als auch in der Kontrolle höher abundant war als in den Varianten des anfälligen Genotyps `Tomensa`, war die Linoleat-9S-Lipoxygenase 8. Die Aktivität von Lipoxygenasen wurde konsistent während Pathogen-induzierten Abwehrreaktionen identifiziert (KOLOMIETS *et al.*, 2000). Lipoxygenasen katalysieren die Hydroperoxidation von mehrfach ungesättigten Fettsäuren. In höheren Pflanzen ist Linolensäure das natürliche Substrat dieser Enzyme (SIEDOW, 1991). Es wurde bereits eine Beteiligung von Lipoxygenasen an verschiedenen physiologischen Vorgängen beschrieben. Hierbei handelte es sich um: Entwicklung und Wachstum der Pflanze, Seneszenz, sowie Wund- und Pathogen-induzierte Abwehrreaktionen (SIEDOW, 1991). Es wurde von RUSTERUCCI *et al.* (1999) beschrieben, dass eine Beteiligung von Lipoxygenasen an der hypersensitiven Reaktion vorhanden und diese somit in der Ausbildung eines aktiven Abwehrmechanismus involviert sind. Sie könnten auch im diesem Fall an der Ausbildung einer Resistenzreaktion von `Karolin` gegen *Synchytrium* beteiligt sein.

Die Ergebnisse der Vergleiche zwischen den inokulierten Proben (KI gegen TI) und den Kontrollen (KK gegen TK) zeigten, dass zwischen dem untersuchten resistenten und anfälligen Kartoffelgenotyp auch bereits vor einer Infektion Proteine der Pathogenabwehr exprimiert sind. Diese zeigten eine höhere Abundanz im resistenten Genotyp im Vergleich zum anfälligen. Es handelte sich hierbei ebenfalls um Kunitz-typ Serinprotease-Inhibitoren und Lipoxygenasen. Es ist beispielsweise ein Kartoffelgenotyp bekannt, der eine konstitutive Expression von Abwehrgenen zeigt und so eine Resistenz gegen *Phytophthora infestans* vermittelt wird. Es wurden im Fall dieses Genotyps keine Fitnesskosten festgestellt. Verglichen mit einem weiteren resistenten Genotyp wurde die konstitutive Expression der Abwehrgene in der Studie nicht bestätigt (ALI *et al.*, 2012). Dies zeigt, dass es genotypenabhängige Resistenzreaktionen gibt und diese nicht allgemeine Gültigkeit besitzen. Die Ausbildung von Resistenzen gegen bestimmte Erreger kann somit sehr vielfältig sein und folgt nicht immer einem klaren Muster. In wie weit die hier gefundenen Proteine der Pathogenabwehr auch in anderen Genotypen eine erfolgreiche Resistenzreaktion vermitteln, bleibt daher zu überprüfen.

Weitere interessante Proteine mit einer Hochregulation in `Karolin` nach einer Inokulation mit *Synchytrium* im Vergleich zur inokulierten Probe von `Tomensa` waren, neben den bereits zuvor beschriebenen Chitinasen, eine Gluthation S-Transferase. Dieses Protein ist beteiligt an Prozessen der Entgiftung und wird induziert nach einer Vielzahl von Stressreaktionen, wie beispielsweise Pathogenbefall (MARRS, 1996). Ebenfalls waren unter den differentiell abundanten Proteinen in

diesem Vergleich zwei Proteine mit Beteiligung an der Umwandlung von Zuckern vorhanden. Dies waren die Glucose-6-Phosphat Isomerase und die Sucrose-Synthase. Zucker dienen in der Zelle nicht nur als Energiequelle, sondern interagieren als Signalmolekül mit dem hormonalen Netzwerk, das an der Regulation der Abwehrreaktion in der Pflanze beteiligt ist (MORKUNAS & RATAJCZAK, 2014). Ein weiteres interessantes Protein war Ubiquitin-fold Modifier-conjugating Enzyme 1 (ufm1). Bei dem ufm1-System handelt es sich um ein in Pflanzen konserviertes System, das unter anderem im Proteinabbau wirksam wird (SASAKAWA *et al.*, 2006). Dieses Protein könnte somit eine Beteiligung an der Pathogenabwehr aufgrund von Proteinabbau haben. Diese Beobachtung passt zu der Hypothese, dass die proteolytische Maschinerie der Kartoffel eine wichtige Rolle in der Pathogenabwehr spielt (ALI *et al.*, 2014). Dass der proteolytische Abbau eine wichtige Rolle auch in der Abwehrreaktion gegen *Synchytrium* spielt, könnte ebenfalls dadurch bekräftigt werden, dass unter den in KI hochregulierten Proteinen Bestandteile des Proteasoms vorhanden waren. Das Proteasom ist ein Proteinkomplex, der den Proteinabbau ubiquitiniertes Proteine reguliert (BEDFORD *et al.*, 2010). Ebenfalls war eine Aspartic Protease in KI im Vergleich zu TI hochreguliert. Es handelt sich hierbei um ein Protein, welches zu einer der Hauptklassen der Proteasen zählt und an proteolytischen Vorgängen beteiligt ist (GUEVARA *et al.*, 2002). In Analysen von GUEVARA *et al.* (2002) wurde eine Induktion von Aspartic Proteasen in resistenten Kartoffeln nach einem Befall mit *Phytophthora infestans* festgestellt. Diesem Protein wurde eine antimikrobielle Wirkung zugeschrieben. Ein weiteres Protein, das in KI im Vergleich zu TI hochreguliert war, war das Pathogenesis-related Protein PR-1, einem typischen Marker der Pathogenabwehr (DANGL, 1998). Proteinen der PR-1 Familie werden eine fungizide Wirkung zugeschrieben (SELS *et al.*, 2008). In dem resistenten Genotyp sind somit viele Proteine der Pathogenabwehr aktiv, die in Summe eine effektive Abwehrreaktion in den Kartoffelknollen hervorrufen können.

Anhand der Vergleiche beider inokulierter Genotypen lässt sich zusammenfassen, dass bei Befall mit *Synchytrium* in der resistenten Sorte 'Karolin' bereits vor und dann während der Infektion Proteine der Pathogenabwehr in einem höheren Maß vorliegen als im anfälligen Genotyp 'Tomensa'. Hierbei handelt es sich um Protease-Inhibitoren, Glucanasen und Ribonucleasen; Proteine, die den sekretierten Proteinen des Pilzes entgegenwirken sollen. Die Proteolyse scheint, gegeben der hoch abundanten Proteine, zentraler Punkt der Pathogenabwehr gegen *Synchytrium* zu sein. Im resistenten Genotyp werden die Proteinbiosynthese und die Aktivität der Plastiden angeregt, um über eine erhöhte Stoffwechselaktivität reaktiven Sauerstoff vermehrt zu produzieren und einen lokalen Zelltod herbeizuführen. Es wurde in dem Vergleich beider inokulierter Genotypen festgestellt, dass ebenfalls Proteine der Zellabwehr in anfälligen Proben induziert wurden; diese aber nicht in einem Maß vorhanden waren, dass eine Infektion verhindert werden konnte. Ebenfalls wurden hier aktiv Komponenten des Abwehrsystems herunterreguliert.

4.3.1.2 Analyse der kompatiblen Interaktion zwischen *S. endobioticum* und Kartoffel

Die Proteindaten wurden ebenfalls genutzt, um die Interaktion zwischen der anfälligen Kartoffelsorte 'Tomensa' und *S. endobioticum* in Hinblick auf die Ausprägung einer Infektion zu analysieren. Hierfür wurden die Daten der inokulierten Knollen von 'Tomensa' mit den nichtinokulierten Kontrollen verglichen. Es wurden 55 signifikant differentiell abundante Proteine zwischen inokulierter Probe und nichtinokulierter Kontrolle identifiziert. Hiervon waren lediglich zehn Proteine in der inokulierten Probe hochreguliert. Bei diesen hochregulierten Proteinen handelte es sich um: Pathogenesis-related Protein PR2-like Precursor, Cell Division Cycle Protein 48 homolog, Importin Subunit beta-1-like, Eukaryotic Translation Initiation Factor 5B-like, Ubiquitin Carboxyl-terminal Hydrolase 12-like Isoform X4, ARF Guanine-Nucleotide Exchange Factor GNOM-like, Tubulin-Tyrosine Ligase-like Protein 12, Nucleolar Protein 6, Putative G3BP-like Protein und Importin Subunit alpha-2-like. Am häufigsten vertreten war hier das bereits zuvor beschriebene Pathogenesis-related Protein PR2-like. An zweiter Stelle war hier ein Protein des Zellzyklus vorzufinden, ein Cell Division Cycle Protein 48-Homolog (CDC48). Hierbei handelt es sich um ein Protein, dessen Funktionen noch nicht vollständig geklärt wurden. Es wurde zuerst in Säugern und Hefe identifiziert und charakterisiert und anschließend in Pflanzen entdeckt. CDC48 spielt eine wichtige Rolle in der Entwicklung und der Regulation des Zellzyklus, sowie dem Proteinumsatz (BÈGUE *et al.*, 2016). Die Identifikation von Proteinen mit einer Beteiligung am Zellzyklus kann durch die Ausbildung der Wucherungen nach einer Infektion mit *Synchytrium* erklärt werden. Hierbei kommt es zu einer vermehrten Zellaktivität. Ebenfalls wurde das cell division protein FtsZ in inokulierten Proben von 'Tomensa' hochreguliert. Dieses Protein scheint allerdings nicht mit der allgemeinen Regulation des Zellzyklus in Verbindung zu stehen, sondern mit der Vermehrung von Chloroplasten (FRAUENHOLZ *et al.*, 1998). Ebenso wurde in diesem Vergleich festgestellt, dass unter den 45 herunterregulierten Proteinen der infizierten Proben Expansin vorhanden war. Hierbei handelt es sich um ein Protein, das an der Zellstreckung beteiligt ist (SAMPEDRO & COSGROVE, 2005). Diese Beobachtung würde dafürsprechen, dass es bei der Ausbildung der Wucherungen zu einer vermehrten Zellteilung kommt und diese nicht durch Zellstreckung entstehen. Dies steht allerdings im Widerspruch zu Beschreibungen von BAAZEN *et al.* (2006), wo von hypertrophen Auswüchsen an der Knolle die Rede ist. Dies würde bedeuten, dass eine Zellstreckung die Ausbildung der Wucherungen bedingt.

Des Weiteren wurde in der inokulierten Probe im Vergleich zur Kontrolle die mitochondriale NADH-Dehydrogenase 1 herunterreguliert. Hierbei handelt es sich um ein wichtiges Enzym der Atmungskette (DUDKINA *et al.*, 2005). Nebenprodukte der mitochondrialen Atmungskette sind reaktive Sauerstoffspezies (KOWALTOWSKI *et al.*, 1998), die wichtiger Bestandteil der hypersensitiven Reaktion zur Eindämmung des Pathogens an Infektionsstellen sind. Eventuell soll eine gezielte Herunterregulation dieses Enzyms die Produktion von reaktivem Sauerstoff vermindern und so die Ausbildung einer Abwehrreaktion verhindern. Ebenso wurde eine GDSL

Esterase/Lipase in der inokulierten Probe herunterreguliert im Vergleich zur Kontrolle. Einige pflanzliche GDSL Esterasen/Lipasen wurden bereits isoliert und charakterisiert. Physiologisch wurden sie bisher beschrieben als Proteine mit Beteiligung an der Entwicklung, Synthese von Sekundärmetaboliten und Abwehrreaktionen (CHEPYSHKO *et al.*, 2012). Da auch hier eine Beteiligung an der Abwehrreaktion zu erwarten ist, kann eine Herunterregulation dieses Proteins ebenfalls zu einem Abschwächen der Immunantwort führen, sodass die Summe aller negativen Effekte auf die Immunantwort diese in einem Maß herabsetzt, dass eine Infektion erfolgen kann. Aber auch hier ist zu beachten, dass lediglich eine sehr geringe Anzahl von Proteinen identifiziert und somit viele Faktoren nicht erfasst wurden. Lediglich starke Effekte wurden erkannt. Ebenfalls war in der inokulierten Probe im Vergleich zur Kontrolle Importin hochreguliert. Dieses könnte eventuell an der Einschleusung von Effektorproteinen in den Zellkern beteiligt sein, um so die Genexpression im Wirt zu regulieren. Ebenfalls wurden weitere Proteine mit Wirkort im Zellkern identifiziert, die ebenfalls zur Änderung der Expression von Wirtsgenen nach einem Befall mit *Synchytrium* beitragen könnten und die Expression der Wirtspflanze zu Gunsten des Erregers verändern.

4.3.2. *S. endobioticum* – Möglichkeiten und Limitierungen in der Proteinidentifikation

Ebenfalls sollten die Proteomdaten genutzt werden, den Erreger näher zu charakterisieren.

Hier war es aber lediglich möglich, acht Proteine von *Synchytrium endobioticum* in vier biologischen Wiederholungen einer Gruppe nachzuweisen. Ohne Anwendung dieses Kriteriums wurden 53 Proteine detektiert. Es wurden keine Proteine der Effektorkandidaten identifiziert. Dies ist aufgrund der geringen Größe der Effektorkandidaten und ihrem geringen Anteil in der analysierten Mischprobe zu erwarten gewesen. Die Sensitivität der Proteomanalyse ist in diesem Fall zu gering, um diese Proteine neben den hochabundanten Kartoffelproteinen erfassen zu können. In der Literatur ist die Proteomik allerdings als ein effektives Werkzeug zur Analyse der Wirt-Pathogen-Interaktion beschrieben worden. Ebenfalls wurde hier von der Identifikation von Effektoren basierend auf einer Proteinanalyse berichtet (SELIN *et al.*, 2016). Eventuell würde die Reduktion der Komplexität der zu untersuchenden Probe die Auflösung der Massenspektrometrie für die Identifikation von Effektorkandidaten erhöhen. Eine Möglichkeit hierfür wäre die Fraktionierung der Proteine und nicht die Isolation von Gesamtprotein. Eine Isolation der apoplastischen Proteine würde die Komplexität der Probe reduzieren und eventuell die Identifikation von apoplastischen Effektoren erleichtern. Es würde zwar die Gruppe der zytoplasmatischen Effektoren in diesem Ansatz nicht beachtet werden, allerdings könnten diese in der gezielten Analyse des Zytoplasmas ergänzt werden.

Bei den 45 weiteren identifizierten Proteinen von *Synchytrium* handelte es sich größtenteils um Proteine des Energiehaushaltes und um ribosomale Proteine, somit Proteine mit einer hohen

Abundanz in der Zelle. Viele Proteine waren ohne bekannte Funktion. Die Proteine des Erregers waren in einem zu geringen Anteil in der Gesamtprobe vorhanden, sodass die Proteine die Detektionsschwelle der *shotgun* Analyse auch hier nicht überschritten. Die Identifikation von Proteinen des Erregers in Mischproben ist somit sehr schwierig und die Proteomanalyse ist nicht die Methode der Wahl zu Charakterisierung des Erregers. Aufgrund fehlender Sequenzinformationen von *S. endobioticum* und anderen Chytridiomyzetenarten war eine funktionale Zuordnung der Proteine nicht möglich. In vielen Fällen handelte es sich um Proteine, die keine Annotation besaßen. Auf Grundlage dieser Proteindaten ist es nicht möglich, die Vorgänge im Pilz bei Befall der Kartoffel aufzuklären.

Dennoch können die erhobenen Proteomdaten genutzt werden, um indirekt den Befallsmechanismus von *S. endobioticum*, beziehungsweise die Art, wie der Pilz die Zelle manipuliert, zu beleuchten. Dies ist möglich bei Betrachtung der induzierten Kartoffelproteine nach einem Befall, durch welche Rückschlüsse auf die sekretierten Proteine des Erregers gezogen werden können. Auch hier ist zu beachten, dass lediglich jene Proteine identifiziert werden können, die eine starke Antwort in der Kartoffel auslösen, sodass jene Kartoffelproteine in hoher Abundanz in der Zelle vorliegen. Es werden wahrscheinlich viele Prozesse während des Befalls ablaufen, die wichtig für das Verständnis des Befallsmechanismus sind, aber auf niedrigem Expressionsniveau stattfinden, sodass sie nicht in der Proteomanalyse erfasst werden können.

Die Tatsache, dass in der inkompatiblen Interaktion vermehrt Kunitz-typ Serinprotease-Inhibitoren in der Kartoffel aktiv sind, lässt vermuten, dass *Synchytrium* Proteasen zum Befall sekretiert. Hydrolytische Proteine wie Proteasen, Cellulasen, Pektinasen und Cutinasen werden von Pilzen sekretiert, um einen Zelleintritt zu ermöglichen (KNOGGE, 1996). In der kompatiblen Interaktion sind in der inokulierten Probe von 'Tomensa' einige Proteine im Vergleich zur Kontrolle herunterreguliert. Hierbei handelte es sich, wie zuvor beschrieben, um zum Beispiel eine NADH-Dehydrogenase und eine GDSL Esterase. Der Pilz reguliert in der kompatiblen Interaktion scheinbar aktiv die Komponenten des Abwehrsystems herunter und induziert zeitgleich eine vermehrte Zellteilung zur Ausbildung der charakteristischen Zellauswüchse. Diese dienen dann als Nahrungsquelle für den Pilz, um eine Infektion in der Wirtspflanze zu etablieren.

4.4. „Omics“ – Chancen und Grenzen in der Charakterisierung des Kartoffelkrebses

Ziel der vorliegenden Arbeit war es die Interaktion zwischen Kartoffeln und Kartoffelkrebs auf Grundlage von „Omics“-Daten hinsichtlich des Resistenzmechanismus der Kartoffel und der Pathogenese des Erregers zu charakterisieren. Es fanden die drei Hauptfelder der „Omics“-Methoden ihre Anwendung: *Genomic*, *Transcriptomic* und *Proteomic*. Hauptaugenmerk lag allerdings auf der Auswertung der Transkriptom- und Proteomdaten.

Die Auswertung der Transkriptomdaten erwies sich als sehr hilfreich und Methode der Wahl zur Identifikation von pilzlichen Sequenzen, die bisher nicht bekannt waren. Die Transkriptomik stellte somit eine sehr gute Möglichkeit dar, den Kartoffelkrebs zu erforschen, besonders auf Seite des Erregers. Da es sich um einen obligat biotrophen Erreger handelt, war lediglich die Analyse von Mischproben möglich. In diesen stellten die Sequenzen des Pilzes den geringsten Anteil dar, sodass die Nutzung einer normalisierten cDNA-Bibliothek für eine bessere Auflösung der gering repräsentierten Gene führte. Solch eine Normalisierung sollte auch in nachfolgenden Sequenzierungen genutzt werden, um den Informationsgehalt für Gene des Erregers weiter zu erhöhen. Eine Auswertung der vorhandenen Transkriptomdaten lieferte auf Seite des Wirts, also der Kartoffel, keine zuverlässigen Daten. Der Hauptgrund dafür ist in der Probenvorbereitung zu finden. Die Proben wurden nach der Glynn-Lemmerzahl-Methode, wie eingangs beschrieben, angefertigt. Diese Methode findet nicht unter sterilen Bedingungen statt, sodass Kontaminationen zu Änderungen in der Genexpression führen können. Auch wenn gleich behandelte Kontrollen zur Normalisierung parallel untersucht werden, kann es in den inokulierten Proben zu zusätzlichen Kontaminationen kommen. In den Kontrollen werden die Knollen bis zu dem Schritt, in dem die Wucherungen aufgelegt werden, parallel behandelt. Allerdings werden keine Kartoffelstücke (gesunder Knollen) auf die Kontrollen aufgelegt. Somit können an der Wucherung anhaftende Kontaminationen in die Probe eingebracht werden und zu einer Expressionsänderung in der Kartoffel führen, die in den Kontrollen nicht vorzufinden ist. Ein sehr ungleichmäßiger Befall und eine frühe Probennahme, können die Qualität der Transkriptomdaten negativ beeinflussen. Um den Anteil pilzlicher Sequenzen zu erhöhen und die Expressionsänderungen in der Kartoffel eindeutiger beurteilen zu können, sollten spätere Zeitpunkte als 14 dpi untersucht werden. Die Untersuchung des Erregers sowie die Reaktion der Kartoffel in frühen Stadien der Infektion sind aufgrund der Probenvorbereitung schwierig zu analysieren. Allerdings sind gerade die frühen Phasen der Interaktion interessant für das Verständnis des Befallsmechanismus oder der Resistenzreaktion, da es hier zum ersten Kontakt zwischen Wirt und Pathogen kommt. Ein weiteres Problem der frühen Probennahme, neben der zweifelhaften Beurteilung des Infektionserfolges, ist, dass der auskeimende Spross so klein ist, sodass sehr wenig Probenmaterial für Isolationen zur Verfügung steht. Hier könnte durch das Poolen vieler Proben entgegengewirkt werden, allerdings ist der Anteil infizierter Zellen in frühen Stadien so gering, dass die bis dahin nicht befallenen Kartoffelzellen die wenigen befallenen Zellen stark überlagern. Generell wäre aber ein Transkriptomansatz, bei optimaler Probenvorbereitung, zur Analyse der Wirtsreaktion auf eine Infektion in kompatiblen und inkompatiblen Interaktionen sehr geeignet. Wie eingangs erwähnt, handelt es sich bei der Kartoffel um einen sequenzierten Organismus, sodass Referenzsequenzen für bioinformatische Analysen vorhanden sind. Diese Tatsache erleichtert die Auswertung von Sequenzdaten enorm. Die Referenzdaten basieren auf *S. tuberosum* Gruppe Phureja (Massa *et al.*, 2011), einer Kartoffelwildart. Bei dem Abgleich der Daten gegen die Referenz und der Auswahl von Kandidatengen, auch auf Basis der Lokalisation im Genom, ist das Konzept

des pan-Genoms zu beachten. Dieses beinhaltet die Annahme, dass ein Genom aus einem Kerngenom besteht, das in Genomen einer Art übereinstimmt; und aus einem weiteren Genomteil, der zwischen den Organismen einer Art verschieden und für diese spezifisch ist (SAXENA *et al.*, 2014). Aus diesem Grund sollte immer auch eine *de novo* Assemblierung der generierten Sequenzdaten vorgenommen werden. Dieses sollte im Anschluss für einen Abgleich mit der Referenzsequenz genutzt werden, um Sequenzverschiebungen und Sequenzänderungen zu erkennen. Die Transkriptomik stellt somit eine vielversprechende Analysemethode dar, um den Kartoffelkrebs sowohl auf Seite des Erregers als auch auf Wirtsseite zu charakterisieren und zu verstehen.

Ebenfalls wurde eine Proteomanalyse durchgeführt. Hierfür wurde ein *shotgun* Ansatz verwendet. Dieser Ansatz ermöglicht im großen Maßstab die Proteinexpression und Charakterisierung in komplexen biologischen Proben (ZHU *et al.*, 2009). Es zeigte sich, dass zuverlässig über vier biologische Wiederholungen insgesamt 2.418 Proteine von Kartoffel und *Synchytrium* identifiziert wurden. Im Vergleich zu Transkriptomdaten ist der Informationsgehalt in Bezug auf die Anzahl detektierter Proteine/Gene geringer. Beispielsweise wurden in Transkriptomstudien zur Interaktion von Kartoffelknollen mit *Phytophthora infestans* aus dem Jahr 2013 von GAO *et al.* insgesamt fast 30.000 Kartoffelgene identifiziert. Gegeben der Kriterien der Datenverarbeitung wurden 1.102 differentiell exprimierte Gene zwischen der Kontrollvariante und den inokulierten Proben identifiziert. Dies ist verglichen mit den Anzahlen der signifikant verschieden abundanten Proteine in den Vergleichen der Proteomanalyse um ein Vielfaches höher. Um auch geringe Unterschiede zwischen Proben identifizieren zu können sollte auf einen Transkriptomansatz zurückgegriffen werden. Gerade in der Wirt-Pathogen-Interaktion spielen regulatorische Proteine eine entscheidende Rolle, die meist auf geringem Niveau exprimiert werden. Um diese zu erfassen und somit einen möglichst detaillierten Blick auf die Interaktion zu erlangen, sollte ein Proteomansatz alleine nicht genutzt werden; sondern eine wesentlich sensitivere Transkriptomanalyse (bei optimaler Probenvorbereitung).

Die Auswahl von Kandidatengen zur Aufklärung des Resistenzmechanismus der Kartoffel gegen Kartoffelkrebs auf Basis von Proteomdaten erwies sich als schwierig. In vielen Fällen werden Resistenzreaktionen von niedrig exprimierten *R*-Genen bedingt, deren Genprodukte aufgrund der geringeren Sensitivität der Proteomanalyse nicht erfasst werden können. Es können in der Proteomik somit Faktoren, die an der Resistenzreaktion beteiligt sind, identifiziert werden; ob allerdings das eigentliche resistenzvermittelnde Gen auf diese Weise identifiziert werden kann, bleibt fraglich. Zur Charakterisierung der Proteine des Erregers mit Beteiligung an der Kolonisation der Wirtspflanze ist ein Proteomansatz nicht geeignet, zumindest nicht bei der Analyse von Mischproben. Der Anteil des Erregers macht häufig einen geringen Teil der extrahierten Proteine aus und verbleibt damit unterhalb der Detektionsschwelle und wird von Proteinen des Wirts überlagert. Dennoch ist die Proteomik ein interessanter Ansatz, um einen Überblick über das

Proteinprofil von resistenten und anfälligen Kartoffelsorten bei Befall mit *S. endobioticum* zu erhalten.

Ein genereller Aspekt, der bei der Anwendung von „Omics“-Technologien in der Kartoffelforschung beachtet werden sollte, ist, dass aufgrund der genetisch komplexen Konstitution der Kartoffel als autotetraploider Organismus neben dem Genom auch das Transkriptom (Li, 2011) und das Proteom hoch komplex sind. Eine Reduktion der genetischen Komplexität von einem tetraploiden Niveau auf ein diploides Niveau würde die Analyse der „Omics“-Daten erleichtern. Bei der Kartoffel ist die Induktion dihaploider Nachkommenschaften durch eine sogenannte *prickled pollination* mit einigen bestimmten Induktoren von *Solanum phureja* möglich. Es handelt sich um einen parthenogenetischen Ansatz zur Erzeugung dihaploider Kartoffeln (HOUGAS & PELOQUIN, 1957; HUTTEN *et al.*, 1994). Hierbei ist eine Aufspaltung der Merkmale des Elters möglich, ohne die Integration von genetischem Material des Induktors (HERMSEN & VERDENIUS, 1973). Würde beispielsweise `Karolin´ als Kreuzungselter zur Induktion einer dihaploiden Nachkommenschaft genutzt werden, könnte nach phänotypischer Charakterisierung der Krebsresistenz die Interaktion mit *S. endobioticum* auf diploidem Niveau analysiert werden, um den Resistenzmechanismus weiter zu verstehen. Auf diese Weise könnten Kandidatengene für die Ausprägung der Resistenzreaktion auf allen Ebenen der „Omics“-Technologien identifiziert werden. Ebenfalls wäre eine Anwendung dieser Strategie mit `Tomensa´ als Kreuzungselter zur Charakterisierung des Befalls denkbar.

5. Fazit und Ausblick

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit war es möglich, eine weiterführende Charakterisierung der Interaktion von Kartoffel und Kartoffelkrebs vorzunehmen. Anhand von Transkriptomdaten wurden erstmals Sequenzen des Erregers generiert, welche bioinformatisch analysiert werden konnten. Hierbei war es möglich Effektorkandidaten zu identifizieren, welche dazu beitragen die Interaktion zwischen *S. endobioticum* und Kartoffel im Fall einer erfolgreichen Infektion näher zu beschreiben. Ebenso können die Sequenzen genutzt werden, um die korrespondierenden Resistenzgene der Kartoffel zu identifizieren und somit den Resistenzmechanismus weiter aufzuklären. Der hier durchgeführte molekularbiologische Nachweis der Effektorsequenzen fand auf cDNA-Ebene statt, somit auf Ebene der Transkription. Es wäre interessant die Effektorkandidaten auch auf Ebene der genomischen DNA zu untersuchen, um eventuelle Sequenzunterschiede auf dieser Ebene zu identifizieren. Diese Informationen können für die Entwicklung von Markern genutzt werden, um eine Unterscheidung von Pathotypen vornehmen zu können. Dies würde die Identifikation der Pathotypen in infiziertem Probenmaterial enorm erleichtern und beschleunigen. Auf diese Weise könnte unter optimalen Bedingungen der störanfällige und häufig uneindeutige Biotest, basierend auf der Glynne-Lemmerzähl-Methode unter Nutzung eines Differentialsortiments, ersetzt werden. Auf Basis der bisher beschriebenen Marker ist lediglich die Differenzierung zwischen Gruppen von Pathotypen und nicht zwischen einzelnen Pathotypen möglich (BUSSE *et al.*, 2017). Bisher wurden sensitive PCR-basierte Techniken genutzt, die allerdings teure Instrumente und Verbrauchsmaterialien voraussetzten oder inkonsistente Ergebnisse lieferten. Hierbei wurden PCR- und Real Time-PCR-Methoden, eine Microarray-basierte oder kolorimetrische Detektion getestet (BONANTS *et al.*, 2015; NIEPOLD & STACHEWICZ, 2004, VAN DEN BOOGERT *et al.*, 2005; VAN GENT-PELZER *et al.*, 2010; ABDULLAHI *et al.*, 2005; DUY *et al.*, 2015). Eine Weiterentwicklung der Methoden zur Diskriminierung der Pathotypen würde die Identifikation von Pathotypen in Befallsherden wesentlich effizienter und eindeutiger gestalten. Die hier generierten Sequenzen könnten einen Beitrag dazu leisten.

Die Untersuchung der Effektorkandidaten in transienten Expressionsanalysen zeigte die Funktionalität des Testsystems. Es wäre somit interessant, die verbleibenden Effektorkandidaten zu testen. Dies sollte getrennt, sowie in Kombinationen von Effektorkandidaten erfolgen, um weiter die Möglichkeit synergetischer Effekte zu untersuchen. Die Etablierung des Testsystems in Kartoffel wäre ein weiterer wichtiger Schritt in der Analyse der Effektorkandidaten, um diese im eigentlichen Wirt analysieren zu können. Hierbei wäre es eventuell möglich, spezifische Wirkungen der Effektoren zu identifizieren, die nur in der spezifischen Wirt-Pathogen-Interaktion auftreten.

Der Proteomansatz lieferte erste Einblicke in die inkompatible und kompatible Interaktion von *S. endobioticum* und Kartoffel. In der inkompatiblen Interaktion konnten Proteine mit einer

Beteiligung an Resistenzreaktionen identifiziert werden. Hierbei handelte es sich um PR-Proteine und Glucanasen, die an Abbaureaktionen zur Eindämmung des Erregers beteiligt waren. Allerdings handelte es sich hierbei um die hoch abundanten Proteine, viele regulatorische Proteine mit geringen Expressionsniveau bleiben unterhalb der Detektionsschwelle verborgen. Somit könnten weitere PR-Proteine oder Transkriptionsfaktoren die eigentliche Resistenzreaktion bedingen; diese können anhand der Proteomanalyse allerdings nicht identifiziert werden. Die Identifikation von Kandidatengen zur Ermittlung des resistenzvermittelnden Gens war anhand der Daten nicht möglich. Eine Möglichkeit, interessante Proteine anhand der vorhandenen Daten zu ermitteln, wäre eine Bestimmung von Interaktionspartnern mittels String. Für eine Einordnung der identifizierten Proteine in einen biologischen Kontext kann die STRING Datenbank genutzt werden (SNEL *et al.* (2000), VON MERING *et al.* (2003, 2005, 2007), JENSEN *et al.* (2009), SZKLARCZYK *et al.* (2011, 2015, 2017), FRANCESCHINI *et al.* (2013, 2015)). Auf diese Weise können Protein-Protein-Interaktionen vorhergesagt werden. Die vorhergesagten Interaktionen und Netzwerke basieren auf verschiedenen Annahmen. Zum einen werden jene Interaktionen angezeigt, welche bereits experimentell bestimmt wurden oder aufgrund von Informationen aus anderen Datenbanken (DIP, BioGRID, HPRD, IntAct, MINT, PDB) bekannt sind. Ebenso werden Interaktionen vorhergesagt auf Basis von Genfusionen und Homologien zu Proteinen oder aufgrund von Co-Expressionen. Auf diese Weise könnten interessante Proteine identifiziert werden, die gezielt im vorhandenen Datensatz verfolgt werden können. Oder aber diese Kandidaten könnten in Expressionsanalysen in PCR-basierten Techniken semi-quantitativ oder quantitativ analysiert werden.

Die fünf eingangs formulierten Arbeitshypothesen wurden in der vorliegenden Arbeit untersucht. Die Arbeitshypothesen (1) und (2), dass die Identifikation von Sequenzen des Erregers aus dem vorhandenen Probenmaterial möglich ist und eine bioinformatische Vorhersage von Effektorkandidaten vorgenommen werden kann, wurden bestätigt. Ebenso wurde die Hypothese (3) bestätigt, dass eine Expression der Effektorkandidaten eine Pathogenabwehr reduziert. Arbeitshypothese (4) konnte nicht bestätigt werden. Ein Nachweis der vorhergesagten Effektorproteine in der Proteomanalyse war aufgrund der zu geringen Sensitivität der Methode nicht möglich. Arbeitshypothese (5) konnte nur ansatzweise erfüllt werden. Die Aufklärung der Resistenz von Kartoffeln gegen Kartoffelkrebs auf Basis der Proteomdaten war lediglich in geringem Umfang möglich. Eine Beschreibung der Pathogenese des Erregers war anhand der erhobenen Daten ebenfalls schwierig.

Abschließend lässt sich festhalten, dass die angewendeten Methoden zur weiterführenden Charakterisierung des Kartoffelkrebses beigetragen haben, diese allerdings zur funktionalen Charakterisierung nur bedingt geeignet waren.

6. Quellenverzeichnis

6.1. Literaturverzeichnis

ABDULLAHI, I.; KOERBLER, M.; STACHEWICZ, H.; WINTER, S. (2005): The 18S rDNA sequence of *Synchytrium endobioticum* and its utility in microarrays for the simultaneous detection of fungal and viral pathogens of potato. *Applied Microbiology Biotechnology*, 68: 368-375.

ABRAMOVITCH, R. B., ANDERSON, J. C., AND MARTIN, G. B. (2006): Bacterial elicitation and evasion of plant innate immunity. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 7: 601-611.

ACQUAAH, G. (2012): Breeding potatoes. Principles of plant genetics and breeding, second edition, John Wiley & Sons, Ltd..

ADAMS, D. J. (2004): Fungal cell wall chitinases and glucanases. *Microbiology*, 150: 2029-2035.

ALFANO, J. R. (2009): Roadmap for future research on plant pathogen effectors. *Molecular Plant Pathology*, 10: 805-813.

ALI, A.; ALEXANDERSIN, E.; SANDIN, M.; RESJÖ, S.; LENMAN, M.; HEDLEY, P.; LEVANDER, F.; ANDREASSON, E. (2014): Quantitative proteomics and transcriptomics of potato in response to *Phytophthora infestans* in compatible and incompatible interactions. *BMC Genomics*, 15: 497.

ALI, A.; MOUSHIB, L. I.; LENMAN, M.; LEVANDER, F.; OLSSON, K.; CARLSON-NILSON, U.; ZOTEYEVA, N.; LILJEROTH, ANDREASSON, E. (2012): Paranoid Potato: *Phytophthora*-resistant genotype shows constitutively activated defense. *Plant Signaling & Behavior*, 7: 400-408.

ALTSCHUL, S. F.; MADDEN, T. L.; SCHÄFFER, A. A.; ZHANG, J.; ZHANG, Z.; MILLER, W.; LIPMAN, D. J. (1997): Gapped BLAST and PSI-BLAST: A new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research*, 25: 3389-3402.

AN, G.; EVERT, P. R.; MITRA, A.; HA, S. R. (1988): **In:** Plant Molecular Biology Manual. Kluwer Academic Publisher, Dordrecht, Netherlands: 1-19. GELVIN, S. R.; SCHILPEROOT, R. A. (eds).

ANON (2005): Pest quarantine database, ver 4.4 EPPO, Paris.

AUGUSTIN, L.; MILACH, S.; BISOGNIN, D.A.; SUZIN, M. (2012): Genotype x environment interaction of agronomic and processing quality traits in potato. *Horticultura Brasileira*, 30: 84 - 90.

AUSUBEL, F.M. (2005): Are innate immune signaling pathways in plants and animals conserved? *Nature Immunology*, 6: 973-979.

BAAYEN, R. P.; COCHIUS, G.; HENDRIKS, H.; MEFFERT, J. P.; BAKKER, J.; BEKKER, M.; VAN DEN BOOGERT; P. H. J. F.; STACHEWICZ, H.; VAN LEEUWEN, G. C. M. (2006): History of potato wart disease in Europe – a proposal for harmonisation in defining pathotypes. *European Journal of Plant Pathology*, 116: 21-31.

BAGISNKY, S. (2009): Plant Proteomics: concepts, applications, and novel strategies for data interpretation. *Mass Spectrometry Reviews*, 28: 93-120.

BALDWIN, T. K.; WINNENBURG R.; URBAN, M.; RAWLINGS, C.; KOEHLER, J.; HAMMOND-KOSACK, K. E. (2006): The Pathogen-Host-Interactions Database (PHI-base) Provides Insights into Generic and Novel Themes of Pathogenicity. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 19: 1451-1462.

BALLVORA, A.; FLATH, K.; LÜBECK, J.; STRAHWALD, J.; TACKE, E.; HOFFERBERT, H.-R.; GEBHARDT, C. (2011): Multiple alleles for resistance and susceptibility modulate the defense response in the interaction of tetraploid potato (*Solanum tuberosum*) with *Synchytrium endobioticum* pathotypes 1, 2, 6 and 18. *Theoretical and Applied Genetics*, 123: 1281-1292.

- BARR, D. J. S. (2001): Chytridiomycota. In: MCLAUGHLIN D.J., MCLAUGHLIN E.G., LEMKE P.A. (eds) Systematics and Evolution. The Mycota (A Comprehensive Treatise on Fungi as Experimental Systems for Basic and Applied Research), vol. 7A. Springer, Berlin, Heidelberg.
- BARRY, J. D.; GINGER, M. L.; BURTON, P.; MCCULLOCH, R. (2003): Why are parasite contingency genes often associated with telomeres? *International Journal for Parasitology*, 33: 29-45.
- BATES, D.; MAECHLER, M.; BOLKER, B. (2011): lme4: Linear mixed-effects models using S4 classes. R package version 0.999375-41. <http://CRAN.R-project.org/package=lme4>.
- BEDFORD, L.; PAINE, S.; SHEPPARD, P. W., MAYER, R. J.; ROELOFS, J. (2010): Assembly, Structure and Function of the 26S proteasome. *Trends in Cell Biology*, 20: 391-401.
- BÈGUE, H.; JEANDROZ, S.; BLANCHARD, C.; WENDEHENNE, D.; ROSNOBLET, C. (2016): Structure and functions of the chaperone-like p97/CDC48 in plants. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1861: 3053-3060.
- BELKHADIR, Y.; SUBRAMANIAM, R.; DANGL, J. L. (2004): Plant disease resistance protein signaling: NBS-LRR proteins and their partners. *Current Opinion in Plant Biology*, 7: 391-399.
- BENDAHMANE, A.; QUERCI, M.; KANYUKA, K.; BAULCOMBE, D.C. (2000): *Agrobacterium transient* expression system as a tool for the isolation of disease resistance genes: application to the Rx2 locus in potato. *The Plant Journal*, 21: 73-81.
- BERNOT, A. (2005): Genome, Transcriptome and Proteome Analysis. Chapter 6. John Wiley & Sons Ltd, England.
- BERNOUX, M.; ELLIS, J. G.; DODDS, P. N. (2011): New insights in plant immunity signaling activation. *Current Opinion in Plant Biology*, 14: 512-518.
- BERTANI, G. (1951): Studies on Lysogenesis. I. The Mode of Phage Liberation by Lysogenic *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 62: 293-300.
- BGB1. I S. 1006 (2001): Verordnung zur Neuregelung pflanzenschutzrechtlicher Vorschriften zur Bekämpfung von Schadorganismen der Kartoffel, Artikel 1: Verordnung zur Bekämpfung des Kartoffelkrebses und der Kartoffelnematoden, §2: Abgrenzung und Aufhebung der Sicherheitszone.
- BHASKAR, P. B.; VENKATESHWARAN, M.; WU, L.; ANÉ, J.-M.; JIANG, J. (2009): *Agrobacterium*-Mediated Transient Gene Expression and Silencing: A Rapid Tool for Functional Gene Assay in Potato. *PLoS ONE*, 4: 1-8.
- BIGEARD, J.; COLCOMBET, J.; HIRT, H. (2015): Signaling Mechanisms in Pattern-Triggered Immunity (PTI). *Molecular Plant*, 8: 521-539.
- BOLLER, T.; FELIX, G. (2009): A renaissance of elicitors: perception of microbe-associated molecular patterns and danger signals by pattern-recognition receptors. *Annual Review of Plant Biology*, 60: 379-406.
- BOLLER, T.; HE, S.Y. (2009): Innate Immunity in Plants: An Arms Race Between Pattern Recognition Receptors in Plants and Effectors in Microbial Pathogens. *Science*, 324: 742-743.
- BONANTS, P. J. M.; VAN GENT-PELZER, M. P. E.; VAN LEEUWEN, G. C. M.; VAN DER LEE, T. A. J. (2015): A real-time TaqMan PCR assay to discriminate between pathotype 1 (D1) and non-pathotype 1 (D1) isolates of *Synchytrium endobioticum*. *European Journal of Plant Pathology*, 143: 495-506.
- BORTESI, L.; FISCHER, R. (2015): The CRISPR-Cas9 system for plant genome editing and beyond. *Biotechnology Advances*, 33: 41-52.
- BOZKURT, T. O.; SCHORNACK, S.; BANFIELD, M. J.; KAMOUN, S. (2012): Oomycetes, effectors, and all that jazz. *Current Opinion in Plant Biology*, 15: 483-492.

- BRADEEN, J. M.; HAYNES, K. G. (2011): Introduction to potato. **In:** Genetics, Genomics and Breeding of Potato. Series on Genetics, Genomics and Breeding of Crop Plants, 2011. Chapter 1, Science Publishers, USA. BRADEEN, J. M., KOLE, C. (eds).
- BRADSHAW, J. E. (2007a): The Canon of Potato Science: 4. Tetrasomic Inheritance. *Potato Research*, 50: 219 - 222.
- BRADSHAW, J. E. (2007b): Breeding Potato as a Major Staple Crop. **In:** Breeding Major Food Staples, 2007. Chapter 10, Blackwell Publishing. KANG, M.S.; PRIYADARSHAN, P.M. (eds).
- BRADSHAW, J. E. (2007c): Potato-Breeding Strategy. **In:** Potato Biology and Biotechnology: Advances and Perspectives. Elsevier B.V., VREUGDENHIL, D. (Editor).
- BRADSHAW, J. E., BONIERBALE, M. (2010): Current Goals of Breeding. **In:** Root and Tuber Crops. Handbook of Plant breeding. Chapter 6, Springer Science + Business Media, New York. BRADSHAW, J. E. (Editor).
- BRADSHAW, J. E.; BRYAN, G. J.; RAMSAY, G. (2006): Genetic Resources (Including Wild and Cultivated *Solanum* Species) and Progress in their Utilisation in Potato Breeding. *Potato Research*, 49: 49-65.
- BRUGMANS, B.; HUTTEN, R.; ROOKMAKER, A.; VISSER, R.; VAN ECK, H. (2006): Exploitation of a marker dense linkage map of potato for positional cloning of a wart disease resistance gene. *Theoretical Applied Genetics*, 112: 269-277.
- BUSSE, F.; BARTKIEWICZ, A.; TEREFE-AYANA, D.; NIEPOLD, F.; SCHLEUSNER, Y.; FLATH, K.; SOMMERFELDT-IMPE, N.; LÜBECK, J.; STRAHWALD, J.; TACKE, E.; HOFFERBERT, H.-R.; LINDE, M.; PRZETAKIEWICZ, J.; DEBENER, T. (2017): Genomic and Transcriptomic Resources for Marker Development in *Synchytrium endobioticum*, an Elusive but Severe Potato Pathogen. *Phytopathology*, 107: 322-328.
- CAMADRO, E. L.; CARPUTO, D.; PELOQUIN, S. J. (2004): Substitutes for genome differentiation in tuber-bearing *Solanum*: interspecific pollen-pistil incompatibility, nuclear-cytoplasmic male sterility, and endosperm. *Theoretical Applied Genetics*, 109: 1369-1376.
- CAPLAN, J.; PADMANABHAN, M.; DINESH-KUMAR, S. P. (2008): Plant NB-LRR Immune Receptors: From Recognition to transcriptional reprogramming. *Cell Host & Microbe*, 3: 126-135.
- CARPUTO D.; FRUSCIANTE, L. (2011): Classical Genetics and Traditional Breeding. **In:** Genetics, Genomics and Breeding of Potato. Series on Genetics, Genomics and Breeding of Crop Plants, 2011. Chapter 1, Science Publishers, USA. BRADEEN, J. M.; KOLE, C. (eds).
- CARPUTO, D.; MONTI, L.; WERNER, J. E.; FRUSCIANTE, L. (1999): Uses and usefulness of endosperm balance number. *Theoretical Applied Genetics*, 98: 478-484.
- CATANZARITI, A.-M.; DODDS, P. N.; LAWRENCE G. J.; AYLIFFE, M. A.; ELLIS, J. G. (2006): Haustorially Expressed Secreted Proteins from Flax Rust Are Highly Enriched for Avirulence Elicitors. *The Plant Cell*, 18: 243-256.
- CERONI, A.; PASSERINI, A.; VULLO, A.; FRASCONI, P. (2006): DISULFIND: a disulfide bonding state and cysteine connectivity prediction server. *Nucleic Acids Research*, 34: 177-181.
- CHAVES, I.; PINHEIRO, C.; PAIVA, J. A. P.; PLANCHON, S.; SERGEANT, K.; RENAULT, J.; GRACA, J. A.; COSTA, G.; COELHO, A. V.; RICARDO, C. P. P. (2009): Proteomic evaluation of wound-healing processes in potato (*Solanum tuberosum* L.) tuber tissue. *Proteomics*, 9: 4154-4175.
- CHEPYSHKO, H.; LAI, C.-P.; HUANG, J.-M.; LIU, J.-H.; SHAW, J.F. (2012): Multifunctionality and diversity of GDSL esterase/lipase gene family in rice (*Oryza sativa* L. *japonica*) genome: new insights from bioinformatic analysis. *BMC Genomics*, 13: 309-328.
- COLDITZ, F.; NYAMSUREN, O.; NIEHAUS, K.; EUBEL, H.; BRAUN, H.-P.; KRAJINSKI, F. (2004): Proteomic approach: Identification of *Medicago truncatula* proteins induced in roots after infection with the pathogenic oomycete *Aphanomyces euteiches*. *Plant Molecular Biology*, 55:109-120.

- CONESA, A.; GÖTZ, S.; GARCÍA-GÓMEZ, J. M.; TEROL, J.; TALÓN, M.; ROBLES, M. (2005): Blast2GO: a universal tool for annotation, visualization and analysis in functional genomics research. *Bioinformatics*, 21: 3674-3676.
- CUI, H.; TSUDA, K.; PARKER, E. (2014): Effector-Triggered Immunity: From Pathogen Perception to Robust Defense. *Annual review of plant biology*, 9: 55.
- CURTIS, K. M. (1921): The Life-History and Cytology of *Synchytrium endobioticum* (Schilb.) Perc.; the Cause of Wart Disease in Potato. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Containing Papers of a Biological Character*, 210: 409-478.
- DANGL, J. (1998): Innate immunity: Plants just say NO to pathogens. *Nature*, 394: 525-527.
- DANGL, J. L.; HORVATH, D. M.; STASKAWICZ, B.J. (2013): Pivoting the Plant Immune System from Dissection to Development. *Science*, 341: 746 – 751.
- DANGL, J. L.; JONES, J. D. G. (2001): Plant Pathogens and integrated defence responses to infection. *Nature*, 411: 826-833.
- DE JONG, R.; BOLTON, M. D.; THOMMA, B.P.H.J. (2011): How filamentous pathogens co-opt plants: the ins and outs of fungal effectors. *Current Opinion in Plant Biology*, 14: 400-406.
- DETMER, K.; ARONOV, P. A.; HAMMOCK, B.D. (2007): Mass spectrometry-based metabolomics. *Mass Spectrometry Reviews*, 26: 51-78.
- DODDS, P. N.; RATHJEN, J. P. (2010): Plant immunity: towards an integrated view of plant-pathogen interactions. *Nature Reviews Genetics*, 11: 539-548.
- DOMON, B.; AEBERSOLD, R. (2006): Mass Spectrometry and Protein Analysis. *Science*, 312: 212-2017.
- DOU, D.; ZHOU, J.-M. (2012): Phytopathogen Effectors Subverting Host Immunity: Different Foes, Similar Battleground. *Cell Host & Microbe*, 12: 484-495.
- DU, J.; RIETMAN, H.; VLEESHOEWERS, V. G. A. A. (2014): Agroinfiltration and PVX Agroinfection in Potato and *Nicotiana benthamiana*. *Journal of Visualized Experiments*, 83: 1-7.
- DU, Z.; YI, Z.; LING, Y.; ZHANG, Z.; SU, Z. (2010): agriGO: a GO analysis toolkit for agricultural community. *Nucleic Acids Research Advance Access*, DOI 10.1093-nar/gkq310. *Nucleic Acids Research*, 38: W64-W70.
- DUDKINA, N. V.; EUBEL, H.; KEEGSTRA, W.; BOEKEMA, E. J.; BRAUN, H.-P. (2005): Structure of a mitochondrial supercomplex formed by respiratory-chain complexes I and III. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102: 3225-3229.
- DUPLESSIS, S.; COUMO, C. A.; LIN, Y. C.; AERTS, A.; TISSERANT, E.; VENEALTY-FOURREY, C. *et al.* (2011): Obligate biotrophy features unraveled by the genomic analysis of rust fungi. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108: 9166-9171.
- DUY, J.; SMITH, R. L.; COLLINS, S. D.; CONNELL, L. B. (2015): Rapid Colorimetric Detection of the Fungal Pathogen *Synchytrium endobioticum* Using Cyanine Dye-Indicated PNA Hybridization. *American Journal of Potato Research*, 92: 398-409.
- EL-BANNA, A.; TALLER, J. (2017): Functional characterization of the silenced potato cysteine proteinase inhibitor gene (*PCPI*) in *Phytophthora infestans* resistance. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 100: 23-29.
- EMANUELSSON, O.; NIELSEN, H.; BRUNAK, S.; VON HEIJNE, G. (2000): Predicting subcellular localization of proteins based on their N-terminal amino acid sequence. *Journal of Molecular Biology*, 300: 1005-1016.

- EPPO STANDARDS (2004): Diagnostic protocols for regulated pests. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin*, 34: 155–157.
- FAO STATISTICAL POCKETBOOK: World food and agriculture 2015. ISBN 978-92-5-108802-9
- FRANC, G. D. (2007): Potato Wart. In: *Online.APSnet Features*. Online verfügbar unter: <http://www.apsnet.org/publications/apsnetfeatures/pages/potatowart.aspx>, 03.10.2016
- FRANCESCHINI, A.; LIN, J.; VON MERING, C.; JENSEN, L. J. (2015): SVD-phy: improved prediction of protein functional associations through singular value decomposition of phylogenetic profiles. *Bioinformatics*, 32: 1085-1087.
- FRANCESCHINI, A.; SZKLARCZYK, D.; FRANKILD, S.; KUHN, M.; SIMONOVIC, M.; ROTH, A.; LIN, J.; MINGUEZ, P.; BORK, P.; VON MERING, C.; JENSEN, L. J. (2013): STRING v9.1: protein-protein interaction networks, with increased coverage and integration. *Nucleic Acids Research*, 41: D808-15.
- FRAUENHOLZ, M. J.; MOERSCHEL, E.; MAIER, U.-G. (1998): The chloroplast division protein FtsZ is encoded by a nucleomorph gene in cryptomonads. *Molecular and General Genetics*, 260: 207-2011.
- FROMM, S.; SENKLER, J.; EUBEL, H.; PETERHÄNSEL, C.; BRAUN, H.-P. (2016): Life without complex one: proteome analyses of an Arabidopsis mutant lacking the mitochondrial NADH dehydrogenase complex. *Journal of Experimental Botany*, 67: 3079-3093.
- GÁLVEZ, J. H.; TAI, H. H.; BARKLEY, N. A.; GARDNER, K.; ELLIS, D.; STRÖMVIK, M. V. (2017): Understanding potato with the help of genomics. *AIMS Agriculture and Food*, 2: 16-39.
- GAN, P.; IDEKA, K.; IRIEDA, H.; NARUSAKA, M.; O'CONNELL, R. J.; NARUSAKA, Y.; TAKANO, Y.; KUBO, Y.; SHIRASU, K. (2013): Comparative genomic and transcriptomic analyses reveal the hemibiotrophic targe shift of *Celleotrichum* fungi. *New Phytologist*, 197: 1236-1249.
- GAO, L.; TU, Z. J.; MILLETT, B. P.; BRADEEN, J. M. (2013): Insights into organ-specific pathogen defense responses in plants: RNA-seq analysis of potato tuber- *Phytophthora infestans* interactions. *BMC Genomics*, 14: 340.
- GAWEHNS, F.; CORNELISSEN, B. J. C.; TAKKEN, F. L. W. (2012): The potential of effector-target genes in breeding for plant innate immunity. *Microbial Biotechnology*, 6: 223-229.
- GLYNNE, M. D. (1925): Infection experiments with wart disease of potato. *Synchytrium endobioticum*. *Annals of Applied Biology*, 12: 34-60.
- GOODIN, M. M.; ZAITLIN, D.; NAIDU, R. A.; LOMMEL, S. A. (2008): *Nicotiana benthamiana*: Its History and Future as a Model for Plant-Pathogen Interactions. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 21: 1015-1026.
- GÖTZ, S.; GARCIA-GOMEZ, J. M.; TEROL, J.; WILLIAMS, T. D.; NAGARAJ, S. H.; NUEDA, M. J.; ROBELS, M.; TALON, M.; DOPAZO, J.; CONESA, A. (2008): high-throughput functional annotation and data mining with the Blast2GO suite. *Nucleic Acids Research*, 36: 3420-3435.
- GROTH, J.; SONG, Y.; KELLERMANN, A.; SCHWARZFISCHER, A. (2013): Molecular characterisation of resistance against potato wart races 1, 2, 6, and 18 in a tetraploid population of potato (*Solanum tuberosum* subsp. *tuberosum*). *Journal of Applied Genetics*, 5: 169-178.
- GUEVARA, M. G.; OLIVA, C. R.; HUARTE, M.; DALEO, G. R. (2002): An aspartic protease with antimicrobial activity is induced after infection and wounding in intercellular fluids of potato tubers. *European Journal of Plant Pathology*, 108: 131-137.
- GURR, S. J.; RUSHTON, P. J. (2005): Engineering plants with increased disease resistance: what are we going to express? *Trends in Biotechnology*, 23: 275-282.

- GUST, A. A.; BRUNNER, F.; NÜRNBERGER, T. (2010): Biotechnological concepts for improving plant innate immunity. *Current Opinion in Biotechnology*, 21: 204-210.
- HAAS, B. J.; KAMOUN, S.; ZODY, M. C.; JIANG, R. H. Y.; HANDSAKER, R. E.; CANO, L. M. *et al.* (2009): Genome sequence and analysis of the Irish potato famine pathogen *Phytophthora infestans*. *Nature*, 46: 393-398.
- HALL, T. A. (1999): BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*, 41: 95-98.
- HAMPSON, M.C. (1977): Screening systemic fungicides for potato wart disease. *Canadian Plant Disease Survey*, 57: 75-78.
- HEATH M.C. (2000): Hypersensitive response-related death. **In:** Programmed Cell Death in Higher Plants. pp.: 77-90. Springer, Dordrecht. LAM E., FUKUDA H., GREENBERG J. (eds).
- HEGEMAN, A.D. (2011): Proteomics and Metabolomics. **In:** Genetics, Genomics and Breeding of Potato. Series on Genetics, Genomics and Breeding of Crop Plants, 2011. Chapter 11, Science Publishers, USA. BRADEEN, JM. M., KOLE, C. (eds).
- HEHL, R.; FAURIE, E.; HESSELBACH, J.; SALAMANI, F.; WHITHAM, S.; BAKER, B.; GEBHARDT, C. (1999): TMV resistance gene *N* homologues are linked to *Synchytrium endobioticum* resistance in potato. *Theoretical and Applied Genetics*, 98: 379-386.
- HENIKOFF, S.; COMAI, L. (2003): Single-Nucleotide Mutations for Plant Functional Genomics. *Annual Review of Plant Biology*, 54: 375-401.
- HERMSEN, J. G. TH.; VERDENIUS, J. (1973): Selection from *Solanum tuberosum* group phureja of genotypes combining high-frequency haploid induction with homozygosity for embryo-spot. *Euphytica*, 22: 244-259.
- HOLLYWOOD, K.; BRISON, D.R.; GOODACRE, R. (2006): Metabolomics: current technologies and future trends. *Proteomics*, 6: 4716-4723.
- HOUGAS, R. W.; PELOQUIN, S. J. (1957): A haploid plant of the potato variety Katahdin. *Nature*, 180: 1209-1210.
- HURKMAN, W.J. UND TANAKA, C.K. (1986). Solubilization of plant membrane proteins for analysis by two-dimensional gel electrophoresis. *Plant Physiology*, 81: 802-806.
- HUTTEN, R. C. B., SCHOLBERG, E. J. M. M., HUIGEN, D. J., HERMSEN, J. G. TH.; JACOBSEN, E. (1994): Analysis of dihaploid induction and production ability and seed parent x pollinator interaction in potato. *Euphytica*, 72: 61-64.
- JANSKY, S. (2009): Breeding, Genetics, and Cultivar Development. **In:** Advance in potato chemistry and technology, chapter 2. Elsevier Inc, United States of America.
- JENSEN, L. J.; KUHN, M.; STARK, M.; CHAFFRON, S.; CREEVEY, C.; MULLER, J.; DOERKS, T.; JULIEN, P.; ROTH, A.; SOMONOVIC, M.; BORK, P.; VON MERING, C. (2009): String 8 – a global view on proteins and their functional interactions in 630 organisms. *Nucleic Acids Research*, 37: D412-416.
- JONES, J. D. G.; DANGL, J. (2006): The plant immune system. *Nature*, 444: 323-329.
- JORGENSEN, J. H. (1992): Discovery, characterization and exploitation of *Mlo* powdery mildew resistance in barley. *Euphytica*, 63: 953-955.
- KÄLL, L.; KROGH, A.; SONNHAMMER, E. L. L. (2007): Advantages of combined transmembrane topology and signal peptide prediction-the Phobius web server. *Nucleic Acids Research*, 35: 429-432.

- KAMOUN, S. (2006): A catalogue of the effector secretome of plant pathogenic oomycetes. *Annual Reviews of Phytopathology*, 44: 41-60.
- KATAGIRI, F.; TSUDA, K. (2010): Understanding the Plant Immune System. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 23: 1531-1536.
- KELL, D.B. (2006): System biology, metabolic modelling and metabolomics in drug discovery and development. *Drug Discovery Today*, 11: 1085-1092.
- KHIUTTI, A.; AFANASENKO, O.; ANTONOVA, O.; SHUVALOV, O.; NOVIKOVA, L.; KRYLOVA, E.; CHALAYA, N.; MIRONENKO, N.; SPOONER, D. M.; GAVRILENKO, T. (2012): Characterization of resistance to *Synchytrium endobioticum* in cultivated potato accessions from the collection of Vavilov Institute of Plant Industry. *Plant Breeding*, 131: 744-750.
- KLODMANN, J., SUNDERHAUS, S., NIMTZ, M., JÄNSCH, L. AND BRAUN, H.P. (2010): Internal architecture of mitochondrial complex I from *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Cell*, 22: 797–810.
- KNOGGE, W. (1996): Fungal Infection of Plants. *The Plant Cell*, 8: 1711-1722.
- KOIWA, H.; BRESSAN, R. A.; HASEGAWA, P. M. (1997): Regulation of protease inhibitors and plant defense. *Trends in plant science*, 2: 379-384.
- KOLOMIETS, M. V.; CHEN, H.; GLADON, R. J.; BRAUN, E. J.; HANNAPEL, D. J. (2000): A Leaf Lipoxygenase of Potato Induced Specifically by Pathogen Infection. *Plant Physiology*, 124: 1121-1130.
- KOWALTOWSKI, A. J.; COSTA, A. D. T.; VERCESI, A. E. (1998): Activation of the potato plant uncoupling mitochondrial protein inhibits reactive oxygen species generation by the respiratory chain. *FEBS Letters*, 425: 213-216.
- KROGH, A.; LARSSON, B.; VON HEIJNE, G.; SONNHAMMER, E.L. (2001): Predicting transmembrane protein topology with a hidden Markov model: application to complete genomes. *Journal of Molecular Biology*, 305: 567-580.
- LAIDLAW, W. M. R. (1985): A method for the detection of the resting sporangia of potato wart disease (*Synchytrium endobioticum*) in the soil of old outbreak sites. *Potato Research*, 28: 223-232.
- LAING, W. A.; MCMANUS, M. T. (2002): Proteinase Inhibitors. **In:** Protein Protein Interactions in Plants. Sheffield Academics Press, 7: 77-119. MCMANUS, M. T.; LAING, W. A.; ALLAN, A. C. (eds).
- LANGERFELD, E.; STACHEWICZ, H. (1994): Assessment of varietal reaction to potato wart (*Synchytrium endobioticum*) in Germany. *EPPO Bulletin*, 24: 793-798.
- LAWSON, C.; KANIEWSKI, W.; HALEY, L.; ROZMAN, R.; NEWELL, C.; SANDERS, P.; TUMER, N.E. (1990): ENGINEERING RESISTANCE TO MIXED VIRUS INFECTION IN A COMMERCIAL POTATO CULTIVAR: RESISTANCE TO POTATO VIRUS X AND POTATO VIRUS Y IN TRANSGENIC RUSSET BURBANK. *Nature Biotechnology*, 8: 127–134.
- LAY JR., J.O.; BORGMANN, S.; LIYANAGE, R.; WILKINS, C.L. (2006): Problems with the “omics”. *Trends in Analytical Chemistry*, 25: 1046-1056.
- LEHESRANTA, S. J.; DAVIES, H. V.; SHEPHERD, V. T.; NUNAN, N.; MCNICOL, J. W.; AURIOLA, S.; KOISTINEN, K. M.; SUOMALAINEN, S.; KOKKO, H. I.; KÄRENLAMPI, S. O. (2005): Comparison of Tuber Proteomes of Potato Varieties, Landraces, and Genetically Modified Lines. *Plant Physiology*, 138: 1690-1699.
- LEMMERZAHN, J. (1930): Neues vereinfachtes Infektionsverfahren zur Prüfung von Kartoffelsorten auf Krebsfestigkeit. *Züchter*, 2: 288–297.
- LI, X.-Q. (2011): Functional Genomics: Transcriptomics. **In:** Genetics, Genomics and Breeding of Potato. Series on Genetics, Genomics and Breeding of Crop Plants. Chapter 10, Science Publishers, USA. BRADEEN, JM. M., KOLE, C. (eds).

- LI, X. Q.; GRIFFITHS, R.; DE KOEYER, D.; ROTHWELL, C.; GUSTAFSON, V.; REGAN, S.; FLINN, B. (2007): Functional genomic resources for potato. *Canadian Journal of Plant Science*, 88: 573-581.
- LINTHORST, H. J. M.; MELCHERS, L. S.; MAYER, A.; VAN ROEKEL, J. S. C.; CORNELISSEN, B. J. C.; BOL, J. F. (1990): Analysis of gene families encoding acidic and basic β -1,3-glucanases of tobacco. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 87: 8756-8760.
- LIU, J.-J.; EKRAMODDOULLAH, A. K. M. (2006): The family 10 of plant pathogenesis-related proteins: Their structure, regulation and function in response to biotic and abiotic stresses. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 68: 3-13.
- LIU, Y.; SCHIFF, M.; MARATHE, R.; DINESH-KUMAR, S. P. (2002): Tobacco *Rar1*, *EDS1* and *NPR1/NIM1* like genes are required for *N*-mediated resistance to tobacco mosaic virus. *The plant journal*, 30: 415-429.
- LONGCORE, J. E.; PESSIER, A. P.; NICHOLS, D. K. (1999): *Batrachochytrium dendrobatidis* gen. Et sp. Nov., a Chytrid Pahtogenic to Amohibians. *Mycologia*, 91: 219-227.
- LU, R.; MALCUIT, I.; MOFFETT, P.; RUIZ, M. T.; PEART, J.; WU, A.-J., RATHJEN, J. P.; BENDAHMANE, A.; DAY, L.; BAULCOMBE, D. C. (2003): High throughput virus-induce gene silencing implicates heat shock protein 90 in plant disease resistance. *European Molecular Biology Organization*, 22: 5690-5699.
- MACFARLANE, S. A. (1999): Molecular biology of the tobnaviruses. *Journal of General Virology*, 80: 2799-2807.
- MAO, Y. B.; TAO, X. Y.; XUE, X. Y.; WANG, L. J.; CHEN, X. Y.; (2011): Cotton plants expressing CYP6AE14 double-stranded RNA show enhanced resistance to bollworm. *Transgenic Research*, 20: 665-673.
- MARCET-HOUBEN, M.; BALLESTER, A. R.; DE LA FUENTE, B.; HARRIES, E.; MARCOS, J. F.; GONZALEZ-CANDELAS, L.; GABALDON, T. (2012): Genome sequence of the necrotrophic fungus *Penicillium digitatum*, the main postharvest pathogen of citrus. *BMC Genomics*, 13: 646.
- MARRS, K. A. (1996): The functions and regulation of glutathion s-transferases in plants. *Annual Reviews of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 47: 127-158.
- MASSA, A. N.; CHILDS, K. L.; HAINING, L.; H.; BRYAN, G. J.; GIULIANO, G.; BUELL, C. R. (2011): The Transcriptome of the Reference Potato Genome *Solanum tuberosum* Group Phureja Clone DM1-3 516R44. *PLoS ONE*, 6: 1-8.
- MCCULLAGH, P., NELDER, J. A. (1989): *Generalized linear Models*, In: 2nd Edition, Monographs on Statistics and Applied Probability, 3: 7126-127. London New York, CHAPMAN & HALL (eds).
- MCGETTIGAN, P. A. (2012): Transcriptomics in the RNA-seq era. *Current Opinion in Chemical Biology*, 17: 1-18.
- MOORE, W.C. (1957): The breakdown of immunity from potato wart disease. *Outlook on Agriculture*, 1: 240-243.
- MORGAN, W.; KAMOUN, S. (2007): RXLR effectors of plant pathogenic oomycetes. *Current Opinion in Microbiology*, 10: 332-338.
- MORKUNAS, I.; RATAJCZAK, L. (2014): The role of sugar signaling in plant defense responses against fungal pathogens. *Acta Physiologiae Plantarum*, 36: 1607-1619.
- MULLINS, E.; MILBOURNE, D.; PETTI, C.; DOYLE-PRESTWICH, B. M.; MEADE, C. (2006): Potato in the age of biotechnology. *TRENDS in Plant Science*, 11: 254-260.
- MURPHY, A. M.; BAL, A. K.; HAMPSON, M. C. (1982): Incorporation of uridine diphospho-N-acetylglucosamine in the resting sporangium wall of *Synchytrium endobioticum*. *Experientia*, 38: 244-246.

- NICOT, N.; HAUMAN, J.-F.; HOFFMANN, L.; EVERS, D. (2005): Housekeeping gene selection for RT-PCR normalization in potato during biotic and abiotic stress. *Journal of Experimental Botany*, 56: 2907-2914.
- NIELSEN, H.; ENGELBRECHT, J.; BRUNAK, S.; VON HEIJNE, G. (1997): Identification of prokaryotic and eukaryotic signal peptides and prediction of their cleavage sites. *Protein Engineering*, 10: 1-6.
- NIEPOLD, F.; STACHEWICZ, H. (2004): PCR-detection of *Synchytrium endobioticum* (Schilb.) Perc. *Journal of Plant Diseases and Protection*, 111: 313-321.
- NOMURA, K.; MECEY, C.; LEE, Y.-N.; IMBODEN, L. A.; CHANG, J. H.; HE, S. Y. (2011): Effector-triggered immunity blocks pathogen degradation of an immunity-associated vesicle traffic regulator in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108: 10774-10779.
- NORDAHL PETERSEN, T.; BRUNAK, S.; VON HEIJNE, G.; NIELSEN, H. (2011): SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions. *Nature Methods*, 8: 785-786.
- NÜRNBERGER, T.; BRUNNER, F.; KEMMERLING, B.; PIATER, L. (2004): Innate immunity in plants and animals: striking similarities and obvious differences. *Immunological Reviews*, 198: 249-266.
- OBIDIEGWU, J. E.; FLATH, K.; GEBHARDT, C. (2014): Managing potato wart: a review of present research status and future perspective. *Theoretical and Applied Genetics*, 127: 763-780.
- OBIDIEGWU, J. E.; SANEMOTO, R.; FLATH, K.; TACKE, E.; HOFFERBERT, H.-R.; HOFMANN, A.; WALKEMEIER, B.; GEBHARDT, C. (2015): Genomic architecture of potato resistance to *Synchytrium endobioticum* disentangled using SSR markers and the 8.3k SolCAP SNP genotyping array. *BMC Genetics*, 16: 38-54.
- OH, H.-S.; COLLMER, A. (2005): Basal resistance against bacteria in *Nicotiana benthamiana* leaves is accompanied by reduced vascular staining and suppressed by multiple *Pseudomonas syringae* type III secretion system effector proteins. *The Plant Journal*, 44: 348-359.
- OKMEN, B.; DOEHLEMAN, G. (2014): Inside plant: biotrophic strategies to modulate host immunity and metabolism. *Current Opinion in Plant Biology*, 20: 19-25.
- OLIVEROS, J.C. (2007-2015): Venny. An interactive tool for comparing lists with Venn's diagrams. <http://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/index.html>
- OSHLACK, A.; ROBINSON, M. D.; YOUNG, M. D. (2010): From RNA-seq reads to differential expression results. *Genome Biology*, 11: 220-230.
- PANSTRUGA, R.; DODDS, P. N. (2009): Terrific protein traffic: The mystery of effector protein delivery by filamentous plant pathogens. *Science*, 324: 748-750.
- PATTERSON, S. D., AEBERSOLD, R.H. (2003): Proteomics: the first decade and beyond. *Nature Genetics*, 33: 311-323.
- PÉROMBELON, M. C. M. (2002): Potato diseases caused by soft rot erwinias: an overview of pathogenesis. *Plant Pathology*, 51: 1-12.
- PIÉTU, G.; MARIAGE-SAMSON, R.; FAYEIN, N.-A.; MATINGOU, C.; EVENO, E.; HOULGATTE, R.; DECRAENE, C.; VANDENBROUCK, Y.; TAHI, F.; DEVIGNES, M.-D.; WIRKNER, W.; ANSORGE, W.; COX, D.; NAGASE, T.; NOMURA, N.; AUFRAY, C. (1999): The Genexpress IMAGE Knowledge Base of the Human Brain Transcriptome: A Prototype Integrated Resource for Functional and Computational Genomics. *Genome Research*, 9: 195-209.
- PRESTI, L. L.; LANVER, D.; SCHWEIZER, G.; TANAKA, S.; LIANG, L.; TOLLOT, M.; ZUCCARO, A.; REISSMANN, S.; KAHMANN, R. (2015): Fungal Effectors and Plant Susceptibility. *Annual Review of Plant Biology*, 66: 513-545.

- PRUSS, G. J.; NESTER, E. W.; VANCE, V. (2008): Infiltration with *Agrobacterium tumefaciens* Induces Host Defense and Development-Dependent Responses in the Infiltrated Zone. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 21: 1528-1538.
- R DEVELOPMENT CORE TEAM (2011). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, URL <http://www.R-project.org/>.
- RATCLIFF, F.; MONTSERRAT MARTIN-HERNANDEZ, A.; BAULCOMBE, D. C. (2001): Technical Advance: Tobacco rattle virus as a vector for gene function by silencing. *The plant journal*, 25: 237-245.
- REPETTO, G.; DEL PESO, A.; ZURITA, J. (2008): Neutral red uptake assay for the estimation of cell viability/cytotoxicity. *Nature Protocols*, 3: 1125-1131.
- RITONJA, A.; KRIZAJ, I.; MESKO, P.; KOPITAR, M.; LUCOVNIK, P.; STRUKELJ, B.; PUNGERCAR, J.; BUTTLE, D. J.; BARRETT, A. J.; TURK, V. (1990): The amino acid sequence of a novel inhibitor of cathepsin D from potato. *FEBS Letters*, 267: 1-15.
- RUSTERUCCI, C.; MONTILLET, J. L.; AGNEL, J. P.; BATESTI, C.; ALONSO, B.; KNOLL, A.; BESSOULE, J. J.; ETIENNE, P.; SUTY, L.; BLEIN, J. P., TRICHANTAPHYLIDES, C. (1999): Involvement of lipoxygenase-dependent production of fatty acid hydroperoxides in the development of the hypersensitive cell death induced by cryptogein on tobacco leaves. *Journal of Biological Chemistry*, 274: 36446-36455.
- RYAN, C. A. (1990): Proteinase inhibitors in plants: genes for improving defense against insects and pathogens. *Annual review of phytopathology*, 28: 425-449.
- SALAMAN, R. N.; LESLY, J. W. (1923): Genetic studies in potatoes; inheritance of immunity to wart resistance. *Journal of Genetics*, 13: 177-186.
- SAMPEDRO, J.; COSGROVE, D. (2005): The expansin superfamily. *Genome Biology*, 6: 242-253.
- SANFORD, J. C.; KLEIN, T. M.; WOLF, E. D.; ALLEN, N. (1987): Delivery of substances into cells and tissues using a particle bombardment process. *Particulate Science and Technology*, 5: 27-37.
- SASAKAWA, H.; SAKATA, E.; YAMAGUCHI, Y.; KOMATSU, M.; TATSUMI, K.; KOMINAMI, K.; KATO, K. (2006): Solution structure and dynamics of Ufma1, a ubiquitin-fold modifier 1. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 343: 21-26.
- SAXENA, R. K.; EDWARDS, D.; VARSHNEY, R. K. (2014): Structural variations in plant genomes. *Briefing in functional Genomics*, 13: 296-307.
- SCHIELSKY, S.; GOWIK, U.; WEBER, A. P. M.; BRÄUTIGAM, A. (2012): RNA-seq assembly- are we there yet? *Frontiers in plant science*, 3: article 220.
- SCHMIDT, S. M.; PANSTRUGA R. (2011): Pathogenomics of fungal plant parasites: What have we learnt about pathogenesis? *Current Opinion in Plant Biology*, 14: 392-399.
- SCHULZE, W.X.; USADEL, B. (2010): Quantitation in mass-spectrometry-based proteomics. *Annual Review of Plant Biology*, 61: 491-516.
- SELIN, C.; DE KIEVIT, T. R.; BELMONTE, M. F.; FERNANDO, W. G. D. (2016): Elucidating the Role of Effectors in Plant-Fungal Interactions: Progress and Challenges. *Frontiers in Microbiology*, 7: 1-21.
- SELS, J.; MATHYS, J.; DE CONINCK, B. M. A.; CAMMUE, B. P. A.; DE BOLLE, M. F. C. (2008): Plant pathogenesis-related (PR) proteins: A focus on PR peptides. *Plant Physiology and Biochemistry*, 46: 941-950.
- SEZONOV, G.; JOSELEAU-PETIT, D.; D'ARI, R. (2007): *Escherichia coli* Physiology in Lauria-Bertani Broth. *Journal of Bacteriology*, 189: 8746-8749.
- SHAH, J. (2003): The salicylic acid loop in plant defense. *Current Opinion in Plant Biology*, 6: 365-371.

- SHARMA, S. K.; BOLSER, D.; DE BOER, J.; SØNDERKÆR, M.; AMOROS, W.; CARBONI, M. F. *et al.* (2013): Construction of Reference Chromosome-Scale Pseudomolecules for Potato: Integrating the Potato Genome with Genetic and Physical Maps. *Genes|Genome|Genetics*, 3: 2031-2047.
- Sharma, R.; Cammack, R. H. (1976): Spore germination and taxonomy of *Synchytrium endobioticum* and *S. succisae*. *Transactions of the British Mycological Society*, 66: 137-147.
- SHARMA, P.; JHA, A. B.; DUBEY, R. S.; PESSARAKLI, M. (2012): Reactive Oxygen Species, Oxidative Damage, and Antioxidative Defense Mechanism in Plants under Stressful Conditions. *Journal of Botany*, doi: 10.1155/2012/217037.
- SIEDOW, J. N. (1991): Plant lipoxygenase: structure and function. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 42: 145-188.
- SIMÃO, F. A.; WATERHOUSE, R.; IOANNIDIS, P.; KRIVENTSEVA, E. V.; ZDOBNOV, E. M. (2015): BUSCO: assessing genome assembly and annotation completeness with single-copy orthologs. *Bioinformatics*, 31: 3210-3212.
- SIMKO, I.; JANSKY, S.; STEPHENSON, S.; SPOONER, D. (2007): Genetics of Resistance to Pests and Disease. **In:** *Potato Biology and Biotechnology: Advances and Perspectives*. Chapter 7, 117 – 155, Elsevier B.V., VREUGFENHIL, D. (Editor).
- SMITH, I.M.; MCNAMARA, D.G.; HOLDERNESS, M.; BURGER, B. (1997): Quarantine pests for Europe. *Data Sheets on quarantine pests for European Union and Mediterranean Plant Protection Organisation*, 2nd. CAB International, Wallingford.
- SNEL, B.; LEHMANN, G.; BORK, P.; HUYNEN, M. A. (2000): STRING: a web-server to retrieve and display the repeatedly occurring neighborhood of a gene. *Nucleic Acids Research*, 28: 3442-3444.
- SPERSCHNEIDER, J.; DODDS, P.N.; GARDINER, D.M.; MANNERS, J.M.; SINGH, K.B.; TAYLOR, J.M. (2015): Advances and Challenges in Computational Prediction of Effectors from Plant Pathogenic Fungi. *POLS Pathogens*, 11: DOI:10.1371.
- SPERSCHNEIDER, J.; GARDINER, D.M.; DODDS, P.N.; TINI, F.; COVARELLI, L.; SINGH, K.B.; MANNERS, J.M.; TAYLOR, J.M. (2016) EffectorP: Predicting Fungal Effector Proteins from Secretomes Using Machine Learning. *New Phytologist*, doi:10.1111/nph.13794.
- SPIECKERMANN, A.; KOTHOFF, P. (1924) [Testing potatoes for wart resistance.]. *Deutsche Landwirtschaftliche Presse*, 51: 114–115.
- STACHEWICZ, H. (2002): Bedeutung und Bekämpfung des Kartoffelkrebses in Deutschland. **In:** *Pflanzenschutz im Ackerbau - Festschrift anlässlich des 80. Geburtstages von Herrn DR. SCHÜTTE*. Mitteilungen Biologische Bundesanstalt für Land- Forstwirtschaft, 388, zusammengestellt von Bärbel Schöber-Butin.
- STASKAWICZ, B. J.; DAHLBECK, D.; KEEN, N. T. (1984): Cloned avirulence gene of *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea* determines race-specific incompatibility on *Glycine max* (L.) Merr. *Proceedings of the National Academy Science USA*, 81: 6024-6028.
- STUIVER, M. H.; CUSTERS, J. H. H. V. (2001): Engineering disease resistance in plants. *Nature*, 411: 865-868.
- SUPEK F, BOŠNJAK M, ŠKUNCA N, ŠMUC T. (2011): *REVIGO summarizes and visualizes long lists of Gene Ontology terms*. *PLoS ONE*, doi:10.1371/journal.pone.0021800.
- SZKLARCZYK, D.; FRANCESCHINI, A.; KUHN, M.; SIMONOVIC, M.; ROTH, A.; MINGUEZ, P.; DOERKS, T.; STARK, M.; MULLER, J.; BORK, P.; JENSEN, L.J.; VON MERING, C. (2011): The STRING database in 2011: functional interaction networks of proteins, globally integrated and scored. *Nucleic Acids Research*, 39: D561-8.

- SZKLARCZYK, D.; FRANCESCHINI, A.; WYDER, S.; FORSLUND, K.; HELLER, D.; HUERTA-CEPAS, J.; SIMONOVIC, M.; ROTH, A.; SANTOS, A.; TSAFOU, K.P.; KUHN, M.; BORK, P.; JENSEN, L.J.; VON MERING, C. (2015): STRING v10: protein-protein interaction networks, integrated over the tree of life. *Nucleic Acids Research*, 43: D447-52.
- SZKLARCZYK, D.; MORRIS, J.H.; COOK, H.; KUHN, M.; WYDER, S.; SIMONOVIC, M.; SANTOS, A.; DONCHEVA, N.T.; ROTH, A.; BORK, P.; JENSEN, L.J.; VON MERING, C. (2017): The STRING database in 2017: quality-controlled protein-protein association networks, made broadly accessible. *Nucleic Acids Research*, 45: D362-68.
- THE POTATO GENOME SEQUENCING CONSORTIUM (2011): Genome sequence and analysis of the tuber crop potato. *Nature*, 475: 189-197.
- THOMMA, B.P.H.J.; NÜRNBERGER, T.; JOOSTEN, M.H.A.J. (2011): Of PAMPs and Effectors: The Blurred PTI-ETI Dichotomy. *The Plant Cell*, 23: 4-15.
- TIAN, T.; LUI, Y.; YAN, H.; YOU, Q.; YI, X.; DU, Z.; XU, W.; SU, Z. (2017): agriGO v2.0: a GO analysis toolkit for agricultural community, 2017 update. *Nucleic Acids Research*, DOI: 10.1093/nar/gkx382.
- TSUDA, K.; KATAGIRI, F. (2010): Comparing signaling mechanisms engaged in pattern-triggered and effector-triggered immunity. *Current Opinion in Plant Biology*, 13: 459-465.
- TYANOVA, S.; TEMU, T.; SINITYN, P.; CARLSON, A.; HEIN, M.Y. GEIGER, T.; MANN, M.; COX, J. (2016): The Perseus computational platform for comprehensive analysis of (prote) omics data. *Nature Methods*, 13: 731-740.
- UNTERGASSER, A.; NIJVEEN, H.; RAO, X.; BISSELING, T.; GEURTS, R.; LEUNISSEN, J.A.M. (2007): Primer3Plus, an enhanced web interface to Primer3. *Nucleic Acids Research*, 35: W71-W74.
- VALUEVA, T. A.; REVINA, T. A.; KLADNITSKAYA, G. V.; MOSOLOV, V. V. (1998): Kunitz- type proteinase inhibitors from intact and *Phytophthora*-infected potato tubers. *FEBS Letters*, 426: 131-134.
- VAN DEN BOOGERT; P. H. J. F.; VAN GENT-PELZER, M. P. E.; BONANTS, P. J. M.; DE BOER, S. H.; WANDER, J. G. N.; LÉVESQUE, C. A.; VAN LEEUWEN G. C. M.; BAAYEN, R. P. (2005): Development of PCR-based detection methods for the quarantine phytopathogen *Synchytrium endobioticum*, causal agent of potato wart disease. *European Journal of Plant Pathology*, 113: 47-57.
- VANDERSCHUREN, H.; LENTZ, E.; ZAINUDDIN, I.; GRUISSEM, W. (2013): Proteomics of model and crop plant species: Status, current limitations and strategic advance for crop improvement. *Journal of Proteomics*, 93: 5-19.
- VAN DE WOUW, A. P.; HOWLETT, B. J. (2011): Fungal pathogenicity genes in the age of 'omics'. *Molecular Plant Pathology*, 12: 507-514.
- VAN GENT-PELZER; M.; KRIJGER, M.; BONANTS, P. J. M. (2010): Improved real-time PCR assay for detection of the quarantine potato pathogen, *Synchytrium endobioticum*, causal agent of potato wart disease. *European Journal of Plant Pathology*, 126: 129-133.
- VAN LOON, L. C.; PIERPOINT, W. S.; BOLLER, TH.; CONEJERO, V. (1994): Recommendations for Naming Plant Pathogenesis-Related Proteins. *Plant Molecular Biology Reporter*, 12: 245-264.
- VAN LOON, L. C.; REP, M.; PIETERSE, C. M. J. (2006): Significance of Inducible Defense-related Proteins in Infected Plants. *Annual review of phytopathology*, 44: 135-162.
- VELCULESCU, V.E.; ZHANG, L.; ZHOU, W.; VOGELSTEIN, J.; BASRAI, M.; BASSETT JR., D.; HIETER, P.; VOGELSTEIN, B.; KINZLER, K.W. (1997): Characterization of the Yeast Transcriptome. *Cell*, 88: 243-251.
- VENABLES, W. N.; RIPLEY, B. D. (2002): *Statistics and Computing - Modern applied statistics with S*. 186-187, Springer-Verlag, New York.
- VITERBO, A.; HARAN, S.; FRIESEM, D.; RAMOT, O.; CHET, I. (2001): Antifungal activity of a novel endochitinase gene (chit36) from *Trichoderma harzianum Rifai* TM. *FEMS Microbiology Letters*, 200: 169-174.

- VLEESHOUWERS, V. G. A. A.; OLIVER, R. P. (2014): Effectors as Tool in Disease Resistance Breeding Against Biotrophic, Hemibiotrophic, and Necrotrophic Plant Pathogens. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 27: 196-206.
- VLEESHOUWERS, V. G. A. A.; RIETMAN, H.; KRENEK, P.; CHAMPOURET, N.; YOUNG, C.; OH, S.-K.; WANG, M.; BOUWMEESTER, K.; VOSMAN, B.; VISSER, R. G. F.; JACOBSEN, E.; GOVERS, F.; KAMOUN, S.; VAN DER VOSSEN, E. A. G. (2008): Effector Genomics Accelerates Discovery and Functional Profiling of Potato Disease Resistance and *Phytophthora Infestans* Avirulence Genes. *PLoS ONE*, 3: e2875.
- VON MALEK, B.; DEBENER, TH. (1998): Genetic analysis of resistance to blackspot (*Diplocarpon rosae*) in tetraploid roses. *Theoretical and Applied Genetics*, 96: 228-231.
- VON MERING, C.; HUYNEN, M.; JAEGGI, D.; SCHMIDT, S.; BORK, P.; SNEL, B. (2003): STRING: a database of predicted functional associations between proteins. *Nucleic Acids Research*, 31: 258-261.
- VON MERING, C.; JENSEN, L. J.; KUHN, M.; CHAFFRON, S.; DOERKS, T.; KRUEGER, B.; SNEL, B.; BORK, P. (2007): STRING 7-recent developments in the integration and prediction of protein interactions. *Nucleic Acids Research*, 35: D358-62.
- VON MERING, C.; JENSEN, L. J.; SNEL, B.; HOOPER, S. D.; KRUPP, M.; FOGIERINI, M.; JOUFFRE, N.; HUYNEN, M. A.; BORK P. (2005): STRING: known and predicted protein-protein associations, integrated and transferred across organisms. *Nucleic Acids Research*, 33: D433-7.
- WANG, Z.; GERSTEIN, M.; SNYDER, M. (2009): RNA-seq: a revolutionary tool for transcriptomics. *Nature Review Genetics*, 10: 57-63.
- WEBER, J. (1990): *Erwinia* – A review of Recent Research. In Proc. 11th Triennial Conference of the EAPR, 8-13 July 1990, p. 112-121.
- WEBSTER, J.; WEBER, R. (2007): Chytridiomycota. In: Introduction to Fungi. Chapter 6, 3rd Edition. University Press, Cambridge. WEBSTER, J.; WEBER, R. (eds.).
- WILLIAMS, J. G. K; KUBELIK, A. R; LIVAK, K. J; RAFALSKI, J. A; TINGEY, S. V (1990): DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research*, 18: 6531-6535.
- WISE, A. A.; LUI, Z.; BINNS, A. N. (2006a): Culture and Maintenance of *Agrobacterium* strains. In: Methods in Molecular Biology, Vol. 343: *Agrobacterium* Protocols; 2/e, Volume 1, Humana Press Inc., Totowa, NJ., KAN WANG (Editor).
- WISE, A. A.; LUI, Z.; BINNS, A. N. (2006b): Three Methods for the Introduction of foreign DNA into *Agrobacterium*. In: Methods in Molecular Biology, Vol. 343: *Agrobacterium* Protocols; 2/e, Volume 1, Humana Press Inc., Totowa, NJ., KAN WANG (Editor)
- WOLF, J. B. W. (2013): Principles of transcriptome analysis and gene expression quantification: an RNA-seq tutorial. *Molecular Ecology Resources*, 13: 559-572.
- WROBLEWSKI, T.; TOMCZAK, A.; MICHELMORE, R. (2005): Optimization of *Agrobacterium*-mediated transient assays of gene expression in lettuce, tomato and Arabidopsis. *Plant Biotechnology Journal*, 3: 259-273.
- WYDRO, M.; KOZUBEK, E.; LEHMANN, P. (2006): Optimization of transient *Agrobacterium*-mediated gene expression system in leaves of *Nicotiana benthamiana*, 53: 289-298.
- YAMAGUCHI, Y.; HUFFAKER, A. (2011): Endogenous peptide elicitors in higher plants. *Current. Opinion in Plant Biology*, 14: 351-357.
- YANG, Y.; QIANG, X.; OWSIANY, K.; ZHANG, S.; THANNHAUSER, T.W.; LI, L. (2011): Evaluation of Different Multidimensional LC-MS/MS Pipelines for Isobaric Tags for Relative and Absolute Quantitation (iTRAQ)-Based Proteomic Analysis of Potato Tubers in Response to Cold Storage. *Journal of Proteome Research*, 10: 4647-4660.

YASMIN, A.; DEBENER, TH. (2010): Transient gene expression in rose petals via *Agrobacterium* infiltration. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 102: 245-250.

YIN, C.; HULBERT, S. (2015): Host Induced Gene Silencing (HIGS), a Promising Strategy for Developing Disease Resistant Crops. *Gene Technology*, 4: 3-4.

YOSHIDA, K.; SCHUENEMANN, V. J.; CANO, L.M.; PAIS, M.; MISHRA, B.; SHARMA, R.; LANZ, C.; MARTIN, F. N.; KAMOUN, S.; KRAUSE, J.; THINNES, M.; WEIGEL, D.; BURBANO, H. A. (2013): The rise and fall of the *Phytophthora infestans* lineage that triggered the Irish potato famine. *eLife*, 2: e00731.

ZHANG, N.; LIU, B.; MA, C.; ZHANG, G.; CHANG, J.; SI, H.; WANG, D. (2014): Transcriptome characterization and sequencing-based identification of drought-responsive genes in potato. *Molecular Biology Reports*, 41: 505-517.

ZHU, S.; VOSSEN, J. H.; BERGERVOET, M.; NIJENHUIS, M.; KODDE, L.; KESSEL, G. J. T.; VLEESHOUWERS, V.; VISSER, R. G. F.; JACOBSEN, E. (2015): An updated conventional- and novel GM potato late blight *R* gene differential set for virulence monitoring of *Phytophthora infestans*. *Euphytica*, 202: 219-234.

ZHU, W.; SMITH, J. W.; HUANG, C.-M. (2009): Mass Spectrometry-Based Label-Free Quantitative Proteomics. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2010: 1-6.

Anmerkung:

Teile der Ergebnisse wurden in der Fachzeitschrift *Phytopathology* publiziert. Es handelt sich hierbei um Ergebnisse der Abschnitte 3.1.1 und 3.1.2. Diese Ergebnisse sind in folgender Veröffentlichung enthalten:

BUSSE, F.; BARTKIEWICZ, A.; TEREFE-AYANA, D.; NIEPOLD, F.; SCHLEUSNER, Y.; FLATH, K.; SOMMERFELDT-IMPE, N.; LÜBECK, J.; STRAHWALD, J.; TACKE, E.; HOFFERBERT, H.-R.; LINDE, M.; PRZETAKIEWICZ, J.; DEBENER, T. (2017): Genomic and Transcriptomic Resources for Marker Development in *Synchytrium endobioticum*, an Elusive but Severe Potato Pathogen. *Phytopathology*, 107: 322-328.

6.2. Onlinere Ressourcen

agriGO, <http://bioinfo.cau.edu.cn/agriGO/index.php>, 24.11.2017

Broad Institute, ftp://ftp.broadinstitute.org/pub/annotation/fungi/batrachochytrium/genomes/Bd_JEL423_v1/, 02.10.2017

BUSCO, <http://busco.ezlab.org/>, 19.10.2017

DISULFIND, <http://disulfind.dsi.unifi.it/>, 03.10.2017

EffectorP, <http://effectorp.csiro.au/>, 03.10.2017

ExpASy, <https://web.expasy.org/translate/>, 06.03.2018

FAO, http://www.fao.org/faostat/en/#rankings/commodities_by_country, 30.10.2017

FAOSTAT, <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC/visualize>, 23.01.2018

Heinz'1796, https://solgenomics.net/organism/Solanum_lycopersicum/genome, 18.10.2017

Phobius, <http://phobius.sbc.su.se/index.html>, 03.10.2017

PGSC, http://solanaceae.plantbiology.msu.edu/pgsc_download.shtml, 18.10.2017

Primer3Plus, <http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi/>, 03.10.2017

PS_Scan, http://www.hpa-bioinfotools.org.uk/cgi-bin/ps_scan/ps_scanCGI.pl, 03.10.2017

R, www.R-project.org, 06.03.2018

SignalP, <http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>, 03.10.2017

Splitter, <http://emboss.bioinformatics.nl/cgi-bin/emboss/splitter>, 10.02.2018

String, <https://string-db.org/>, 03.10.2017

TargetP, <http://www.cbs.dtu.dk/services/TargetP/>, 31.03.2018

<http://organicpotatostarch.eu/biokartoffelstarke/anwendungsweisen/>, 30.10.2017

<http://www.chemie.de/lexikon/St%C3%A4rke.html>, 30.10.2017

<https://home.ccr.cancer.gov/med/flowcore/Spectra/DsRedspec.htm>, 28.09.2017

A Anhang

A 1. Medien zur Bakterienkultur

Alle verwendeten Nährmedien wurden durch Autoklavieren (121 °C, 2x10³ hPa, 20 Minuten) sterilisiert. Bei Bedarf wurden selektive Antibiotika (sterilfiltriert) nach dem Autoklavieren zugefügt. Zur Herstellung von Festmedien wurde das Medium mit 15 g/L Bacto™ Agar (Becton, Dickinson and Company, USA) vor dem Autoklavieren versetzt.

A 1.1. Yeast Extract Peptone (YEP)-Medium zur Kultur von *A. tumefaciens*

Tabelle A 1: Das Yeast Extract Peptone (YEP)-Medium zur Kultur von *A. tumefaciens* (AN *et al.*, 1988).

Reagenz	Menge	Hersteller
Bacto™ Yeast Extract	10 g	Becton, Dickinson and Company, USA
Bacto™ Tryptone/Peptone	10 g	Becton, Dickinson and Company, USA
Natriumchlorid	5 g	Carl Roth GmbH + Co. KG, Deutschland
Gesamtvolumen	1L	pH 7,5

A 1.2. Lysogeny Broth (LB)-Medium zur Kultur von *E. coli*

Tabelle A 2: Zusammensetzung des Lysogeny Broth (LB)-Mediums für die Kultur von *E. coli* (BERTANI, 1951; SEZONOV *et al.*, 2007).

Reagenz	Menge	Hersteller
Bacto™ Yeast Extract	5 g	Becton, Dickinson and Company, USA
Bacto™ Tryptone/Peptone	10 g	Becton, Dickinson and Company, USA
Natriumchlorid	10 g	Carl Roth GmbH + Co. KG, Deutschland
Gesamtvolumen	1L	pH 7,0

A 1.3. FB-Medium zur mittelfristigen Lagerung bei -20 °C

Tabelle A 3: Zusammensetzung des FB-Mediums zur mittelfristigen Lagerung bei -20 °C.

Reagenz	Menge/ Konzentration	Hersteller
Bacto™ Tryptone oder Peptone	10 g/L	Becton, Dickinson and Company, USA
Bacto™ Yeast Extract	5 g/L	Becton, Dickinson and Company, USA
NaCl	5 g/L	Carl Roth GmbH + Co. KG, Deutschland
Tri-NaCitrat (dihydrat)	1,7 mM	Carl Roth GmbH + Co. KG, Deutschland
K ₂ HPO ₄	36 mM	AppliChem GmbH, Deutschland
KH ₂ PO ₄	13,2 mM	Carl Roth GmbH + Co. KG, Deutschland
MgSO ₄ x7H ₂ O	0,4 mM	Carl Roth GmbH + Co. KG, Deutschland
(NH ₄) ₂ SO ₄	6,8 mM	AppliChem GmbH, Deutschland
Glycerin	4,4 % [v/v]	Carl Roth GmbH + Co. KG, Deutschland
Gesamtvolumen	1L	

A 2. Puffer für molekularbiologische Anwendungen

A 2.1. Willams-Puffer für PCR-Reaktionen

Tabelle A 4: 1x Williams Puffers für PCR-Reaktionen (WILLIAMS *et al.*, 1990).

Reagenz	Endkonzentration	Hersteller
Tris-HCl, pH 8,3	100 mM	AppliChem GmbH, Deutschland
KCl	500 mM	DUCHEFA BIOCHEMIE B.V, Niederlande
MgCl ₂	20 mM	Carl Roth GmbH + Co. KG, Deutschland
Gelatine	0,01 %	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deutschland
H ₂ O	<i>ad</i> 10 mL	

A 3. Proteinanalysen

A 3.1. Zusammensetzung des Sammelgels mit 4 % [v/v] Acrylamid

Tabelle A 5: Zusammensetzung des Sammelgels mit 4 % [v/v] Acrylamid.

Sammelgel	1 Gel 16 ml	Hersteller
0.5 M Tris-HCl, pH 6.8	4 ml	Merck KGaA, Deutschland
10 % [w/v] SDS	160 µl	AppliChem GmbH, Deutschland
40 % [w/v] Acrylamid	1.6 ml	AppliChem GmbH, Deutschland
ddH ₂ O	10.2 ml	InHouse (Satorius)
10 % [w/v] Ammoniumperoxodisulfat (APS)	100 µl	AppliChem GmbH, Deutschland
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	20 µl	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deutschland

A 3.2. Zusammensetzung des Trenngels mit 14 % [v/v] Acrylamid

Tabelle A 6: Zusammensetzung des Trenngels mit 14 % [v/v] Acrylamid.

Trenngel	1 Gel 40 ml	Hersteller
1.5 M Tris-HCl, pH 8.8	10 ml	Merck KGaA, Deutschland
10 % [w/v] SDS	0,4 ml	AppliChem GmbH, Deutschland
40 % [w/v] Acrylamid	14 ml	AppliChem GmbH, Deutschland
ddH ₂ O	15.6 ml	InHouse (Satorius)
10 % [w/v] APS	171,5 µl	AppliChem GmbH, Deutschland
TEMED	17,1 µl	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deutschland

A 3.3. Zusammensetzung des Laufpuffers

Tabelle A 7: Zusammensetzung des 10x Tris-Glycin SDS-Puffers

Reagenz	Anteil/ Konzentration	Hersteller
Tris	0,248 M	Merck KGaA, Deutschland
Glycin	1,92 M	Merck KGaA, Deutschland
SDS	1 % [w/v]	AppliChem GmbH, Deutschland
H ₂ O	ad 1 L	

Der pH-Wert des Laufpuffers liegt zwischen pH 8,3 – 8,6.

A 3.4. Zusammensetzung des Probenpuffers

Tabelle A 8: Zusammensetzung des 2x Probenpuffers für die Proteinauftrennung.

Reagenz	Anteil/ Konzentration	Hersteller
SDS	4 % [w/v]	AppliChem GmbH, Deutschland
Tris-HCl, pH 6,8	125 mM	Merck KGaA, Deutschland
Glycerin	20 % [v/v]	AppliChem GmbH, Deutschland
β- Mercaptoethanol	5 % [v/v]	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deutschland
H ₂ O	ad 10 mL	

A 4. Primersequenzen

A 4.1. Primersequenzen zur Überprüfung der cDNA-Synthese mittels PCR

Tabelle A 9: Primersequenzen zur Überprüfung von cDNA.

Primer	Sequenz	Annealing-temperatur	Quelle
Actin_F	CGAGGAAGATCTGGCATCA	55 °C	
Actin_R	AGGAGCTGCTCTTGGCAGT	55 °C	
β-Tubulin_F	ATGTTCAAGCGCAAGGCTT	64 °C	NICOT <i>et al.</i> , 2005
β-Tubulin_R	TCTGCAACCGGGTCATTCAT	64 °C	NICOT <i>et al.</i> , 2005
<i>ef1α</i> _F	ATTGGAAACGGATATGCTCCA	64 °C	NICOT <i>et al.</i> , 2005
<i>ef1α</i> _R	TCCTTACCTGAACGCCTGTCA	64 °C	NICOT <i>et al.</i> , 2005

Die Primersequenzen für die Amplifikation von Actin sind der

Tabelle A 9 zu entnehmen und wurden so gewählt, dass ein Größenunterschied der Fragmente in gDNA (540 bp) und cDNA (460 bp) zu erkennen war.

A 4.2. Primersequenzen zum Nachweis persistierender Agrobakterien in Blattgeweben

Tabelle A 10: Sequenzen der Primer zum Test auf persistierende Agrobakterien.

Primernamen	Sequenz 5' → 3'
Agro_F	ATGCGGATGAGGCTCGTCTTCGAG
Agro_R	GACGCAACGCATCCTCGATCAGCT

Es wurde eine primerspezifische Annealingtemperatur von 63 °C ermittelt.

A 4.3. Amplifikation von Effektorkandidaten zur In-Fusion®-Klonierung

Tabelle A 11: Sequenzen der genspezifischen Primerteilstücke zur Effektoramplifikation. Genutzt wurden diese zur In-Fusion®-Klonierung (zur Ergänzung der In-Fusion®-Überhänge) und in der Test-PCR auf Expression der klonierten Fragmente.

Primer	Sequenz	GC [%]	Tm [°C]
E1_F	GGGCTGTTGTTGTTCTGTT	50	60
E1_R	TGGCAGTCACACATCAAAAA	40	58,7
E2_F	GAGCCCCGAACTGACTGATA	55	60,2
E2_R	GTCAACAGCGGGTTTCATTA	45	58,6
E8_F	GGATCCAGATGCCTACTCCA	55	60
E8_R	TTCTCCCAGGCTTGAGTGTT	50	59,8
E9_F	ATGTCTCGTTGCGCAAATTC	45	60,1
E9_R	TGAGTTCGAAGCCAGATCCT	50	60
E10_F	ACAGACGGCGGTCTAGGAA	50	61,5
E10_R	ATTAGCCAATGGCCTGAAGC	57,9	60,8
E11_F	GCTCCAAACTACAAGCAAGTCA	45	59,8
E11_R	CGAAAAAGGCGAATCAACTC	45,5	59,6
E12_F	GGCTGACTGAGCACCATCTT	55	60,4
E12_R	AGCAATTTTTGGCCCTACCT	45	60
E13_F	CGGTGATGTCATGGAAACTG	50	60
E13_R	AAACCCTTGCAGCAATTTGA	40	60,6
E14_F	CCCGTGGATGGCACTTAG	61,1	60,1
E14_R	TCGAAGGCAGCTAGAATGGT	50	60
E18_F	GCGTACACCGTCGCATAATA	50	60
E18_R	GGCATCTCACCCGAAACAA	50	60
E22_F	TGTGACTCTTGGTCCGGATG	55	62,1
E22_R	ACCACACAAGGAGGATCGAC	55	60,1
oH_11569_F	TCATAGTCTCCAGCCTCGTT	47,6	58,9
oH_11569_R	GCGGCACATATCTACACAGG	55	59,2
P18_12020_F	TCCTAGGAATGAAAGCCATGA	42,9	59,7
P18_12020_R	TGCTTTTGTGACAGTTTGCTG	42,9	60,1
P18_24410_F	CTTCGGGTTGCAACTCTGTC	55	60,8
P18_24410_R	CGATGCAAAGAACGGATCAT	45	61

A 4.4. Primer zur Verifizierung der Contigs von *S. endobioticum***Tabelle A 12: Primersequenzen zur Verifizierung der bioinformatisch bestimmten Contigs von *S. endobioticum*.**

Nr.	Contig / EST	Contig / EST Beschreibung	Forward / Reverse Primer	PCR-Produkt
1	4599	Translation initiation factor elf	5' GAATTGGCTTCCCAGATGAA 3'	552 bp
			5' AGCGGAAACCCCAAGATAGT 3'	
2	1693	Glutamin Synthetase	5' TCACTACTTCGGGGCCATAC 3'	1744 bp
			5' GAGTAGCTCGGCGTACTTGG 3'	
3	12661	Retinoblastoma-binding protein 5-like	5' TCGTTGTCTGCACCTACCTG 3'	1418 bp
			5' TGATTGGCAGTCACTTCAGC 3'	
4	1481	Cell cycle control Protein (Cwf4)	5' GGGAGGAGTCACAACCTGGAA 3'	944 bp
			5' TGAGTTCGAAGCCAGATCCT 3'	
5	13680	Ptk9 protein tyrosine kinase 9	5' CCACCCTGACCAAGGAATA 3'	840 bp
			5' TGAATGACGTTTGCTTTTGC 3'	
6	8109	Translationally-controlled tumor protein	5' GCAGTGAAGGACATTGACGA 3'	713 bp
			5' ACAACTGATGCACGCCATAC 3'	
7	5558	Cell division control protein	5' ATGAAGCAATTGGGAACCAG 3'	1000 bp
			5' TTTCACGGCTCTGTGTTGAG 3'	
8	1024	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	5' ATCGGATACCAGGCAAACAG 3'	939 bp
			5' GACCTGAGCTACTGCCTTGG 3'	
9	5523	Tumor susceptibility gene	5' AATCCACGTCACCATCCTTC 3'	363 bp
			5' GGGATTCCATTTTTGTGGTG 3'	
10	12394	Mitogen-activated protein kinase kinase	5' TGGAGCTGTCCATGCAGTAG 3'	806 bp
			5' TCCAATCGGCTATTTCAACC 3'	
11	9843	Cancer susceptibility candidate protein 1	5' ATGGTCCAACCTGCTGAGAGG 3'	617 bp
			5' GTCAGTTTCGAGACGCATCA 3'	
12	14451	Cell division cycle 123 homolog	5' AACCCATTCCGTGAATCAAC 3'	236 bp
			5' TCATCGATGGTCCTTCCTTC 3'	
13	17308	Activating signal cointegrator 1	5' CTGGGGAATGCTTCACTTGT 3'	413 bp
			5' CTTCGGCTCTTTCTGTTGG 3'	
14	5552	Sporulation protein RMD1	5' TCGACCCATCTCGTCTACC 3'	957 bp
			5' GGCCTGTTAGTGCCATTGTT 3'	
15	19475	Glucose-repressible alcohol dehydrogenase transcriptional effector	5' TTCTGCTCCTCATCAACGTG 3'	2000 bp
			5' CCTGCACCAGCAGACATAGA 3'	
16	1252	Pkinase-domain-containing protein	5' TCATACGTGGCATCCGTAAC 3'	816 bp
			5' GCGAAGTTTCTTGGAACGAG 3'	

Fortsetzung Tabelle A 12: Primersequenzen zur Verifizierung der bioinformatisch bestimmten Contigs von *S. endobioticum*.

Nr.	Contig / EST	Contig / EST Beschreibung	Forward / Reverse Primer	PCR-Produkt
17	30469	Endoplasmic reticulum auxin efflux carrier	5' CATCAAAGCGATGGGAAGAC 3'	850 bp
			5' CTCTCTTTCCCCGAAAAAC 3'	
18	4756	Yabby like transcription factor	5' ACGGACATTGAGCTCCTCAT 3'	368 bp
			5' GCCTAAGGTCGCTAAAGCTG 3'	
19	1644	S-adenosylmethionine synthase	5' ATCGATCGACTTTGGACCAG 3'	1458 bp
			5' GCTGGCTGCTATACAATGA 3'	
20	5806	Trehalose-phosphatase TPS2/ Glycosyl transferase	5' AAACGAGCGGAGCAGTATGT 3'	303 bp
			5' AAGACGGCCTTGTTGATTG 3'	
21	639	Cyclin B /cell division cycle protein	5' ATGAGCTTTCTGCGAAGAGG 3'	690 bp
			5' ATGATGGTGCGAACATGAAA 3'	
22	565	gtp-binding nuclear protein gsp1 ran	5' GCTTCAACACCTGGGACACT 3'	800 bp
			5' GGTGTACTGGGCAATCAGG 3'	
23	30149	Signal induced proliferation associated/Rap/Ran GTPase-activating	5' CACCTCGTATCCTTGCCATT 3'	886 bp
			5' GCACGAATCACAGGAGTTCA 3'	
24	24122	Multifunctional tryptophan biosynthesis protein	5' TGGGCGTGAGACATAACAAG 3'	168 bp
			5' CCTCAGGCAGAGTAATGGGTA 3'	
25	7067	GATA-binding transcription factor/ Cutinase palindrome-binding	5' ACTCGAGATTCTCCGCAA 3'	1023 bp
			5' TTGGCGAGACCACAGCTTAT 3'	
26	23722	Endonuclease/exonuclease/phosphatase family protein	5' GCGGGAGATCATTACGTTTG 3'	212 bp
			5' CCCTTTGTTCCCGACAAC 3'	
27	21536	Cell fusion protein/chitin biosynthesis protein	5' CTGCCGAATGGAGCTTTAAC 3'	205 bp
			5' GGCATAACAACAGGCTCGAT 3'	
28	5607	Symbiosis associated/microtubule/ autophagy	5' ACTTGAGAGAGCAGCGAGGA 3'	340 bp
			5' CTGGAGGCTGAGAGGATACG 3'	
29	20547	Block of proliferation 1	5' AGAGACTGCAACCAGGGGTA 3'	224 bp
			5' TCCGTCGCTACTGCAAGTAG 3'	
30	17092	Tryptophan biosynthesis protein	5' TATCGCCGTCCAAGTTTACC 3'	224 bp
			5' CACATCAACGACATCCCAAC 3'	
31	25285	Transforming growth factor beta regulator 1	5' CCGGACCTGATAAAGAACCA 3'	450 bp
			5' GGTAGTGGCCGAAATCTCAA 3'	
32	6501	Transforming growth factor-beta receptor-associated protein 1	5' TGTATCGACCACAGGACCA 3'	267 bp
			5' GCCGATATGAATGGAACCAG 3'	

Fortsetzung Tabelle A 12: Primersequenzen zur Verifizierung der bioinformatisch bestimmten Contigs von *S. endobioticum*.

Nr.	Contig / EST	Contig / EST Beschreibung	Forward / Reverse Primer	PCR-Produkt
33	9408	TMS membrane protein/tumor differentially expressed protein	5' GCTAACAAATGTGGCAAGCAA 3'	769 bp
			5' ATATCGCTCGGCTGGATCTT 3'	
34	14425	TMS membrane protein/tumor differentially expressed protein	5' GTGGCGAGACATATCCTGGT 3'	446 bp
			5' CAAGCTGCATGTCGATGTTT 3'	
35	6369	Ras oncogene	5' AAATGACGAATGACCGGTGT 3'	390 bp
			5' GATGGTTGGCAACAAGTGTG 3'	
36	19219	Ras oncogene family	5' GTGTCGTGACCAAGGACCA 3'	445 bp
			5' GCAAAAAGTACCCCCAAACA 3'	
37	22719	Ras oncogene family	5' CAACATTTTGGCGGATCTCT 3'	326 bp
			5' AAGTGCGGTACGAGATGGAG 3'	
38	14639	tRNA isopentenyltransferase	5' ATCCAAGCCATGAAGATTGC 3'	510 bp
			5' TAAGGTGTGCTTCCCATTC 3'	
39	340296	erg24 ergosterol biosynthesis protein	5' CACAAATACCAGGCCGACTT 3'	4615 bp
			5' CATAAGGCACACGGTTTGTG 3'	
40	4884	Serrate RNA effector molecule	5' TCGACATACAGCAGCCAAAG 3'	3619 bp
			5' CCGGTAACACTCGGTCAAT 3'	
41	669	Actin partial	5' CAGTAAGGTCACGACCAGCA 3'	350 bp
			5' CCAAGGCCAACAGAGAGAAG 3'	
42	855	Heat shock protein 90	5' CAAGTCCTTGACCGATCCAT 3'	600 bp
			5' AATGTCGCTTACGATTTCC 3'	
43	963	Mitochondrial processing peptidase subunit beta	5' TTGATCGATTTCCAAGGAG 3'	180 bp
			5' ATCCAAAGAGAATGGCATCG 3'	
44	1590	MCM-domain-containing protein	5' GAACCCATTAGACCTTCTCG 3'	400 bp
			5' ACGGTGGAGATGAAGCCATA 3'	
45	938	26S protease regulatory subunit6	5' CATACGACGGCTTCTTCAT 3'	248 bp
			5' TTTCCAAGCTGGTCAAATCC 3'	
46	8897	Ca ²⁺ -transporting atpase	5' ACACCATAATCTCGGCAAC 3'	238 bp
			5' TGTCATGTTGCCAACCAAGT 3'	
47	676	Actin partial	5' GCCAAGTCAAGACGGAGAAT 3'	400 bp
			5' GGAGCATCCTGTCCTCCTAA 3'	
48	92	26s protease regulatory subunit 7-like	5' GACGTAGCAATGCTGGATCA 3'	600 bp/ 350 bp
			5' GCTATTGGAGGTGCACGATT 3'	

Fortsetzung Tabelle A 12: Primersequenzen zur Verifizierung der bioinformatisch bestimmten Contigs von *S. endobioticum*.

Nr.	Contig / EST	Contig / EST Beschreibung	Forward / Reverse Primer	PCR-Produkt
49	253	Heat shock protein partial	5' TCATCCACTGCTCAGACCAC 3'	200 bp
			5' TGGAGCCACCAACAAGTACA 3'	
50	6373	duf887-domain-containing protein	5' TGCTTGCTGGACTACCTGTG 3'	324 bp
			5' CGGAGCAGCAAAGTACATCA 3'	
51	1379	ATP-dependent RNA helicase	5' AAATCCCGCTCGTACCTATCCTTTC 3'	465 bp
			5' GGTGGCGGATAGAAAGACAA 3'	
52	365018	AAA+ ATPase domain-containing protein	5' AAAGTGCAGCCCTTCAAACGTGAAGGT 3'	285 bp
			5' ACATACTTTGTTGAGCAACTCGGGTCCCTT 3'	
53	9476	ATP-binding cassette transporter 1 (ABC1)	5' GGGATCAAAGTCATCAAGCTTTATGCATGG 3'	766 bp
			5' CACCAATCTCAGTCAAATCACCCCGGCA 3'	
54	1644	Methionine adenosyltransferase	5' ATTTCAACAGACGCCAAACTCGACTACC 3'	790 bp
			5' CCACATACACTGACACGGGCTCTGCGAC 3'	
55	2773	RuvB-like 2	5' TGGAAACGAATCGGTGCTCATTACATATTC 3'	1235 bp
			5' GTAGACTCTCTTGATATCCTCTACATCCAC 3'	
56	913	14-3-3 family protein	5' AAGTACCTTCCCGCAACTTCCCATTACAGC 3'	1363 bp
			5' GCAACCTCTATCTGTTGCTACAAGAACG 3'	
57	2158	Diphosphomevalonate decarboxylase	5' GGATGCATGTATGCCATGAAAGCCACTCCA 3'	1413 bp
			5' GACACTTTCGTAACCACGTAACCACACCAA 3'	
58	9555	fthfs-domain-containing protein	5' TACTTTGCCCGTAGATTGCCGGCACTGGA 3'	1087 bp
			5' GAGTGATTGCCGATGCGACATGACAGGCAG 3'	
59	276	CK1/CK1/CK1-D protein kinase	5' AAAGCTCAACAAGACACAGAAGTTGGACGG 3'	742 bp
			5' GGACATACCCTAGGGATTCCAGATCATCAC 3'	
60	2816	H/ACA ribonucleoprotein complex subunit 4	5' GACAAACCAGCAAATCCATCATCACAGAA 3'	1100 bp
			5' TTTCTTTTTCGGTTCTCGCCGGAGGTGG 3'	
61	1917	agc_ndr_protein_kinase	5' ACCAGTCGATTCTTTGCCATACCCTTTT 3'	688 bp
			5' ATAAAGGTCATTGGAAAGGGTGCATTCGGC 3'	
62	5507	Clathrin_heavy_chain_1	5' GCTCAATGTTGTGAGAAAGCAGGCTTGAT 3'	853 bp
			5' GGTCTCTTTCAAAAAGGCTTCCGCATTAT 3'	
63	1747	wd repeat-containing protein slp1	5' CCTCTGACTTCTTCCACCAAGTCAGACGT 3'	733 bp
			5' GCGAGGGCACATATCCAGGGTAGGAGTAAT 3'	
64	14539	Pantothenate kinase	5' CGAAGGCCGGAACCATTACAGTATGAAGAC 3'	890 bp
			5' GTAGCTGCTCGTTGTTTGAATCTTCTTGA 3'	
65	1174	v-type atpase	5' CTGATAAGTGCCATAGGACAGTAACCCACC 3'	799 bp
			5' CACCAGGAATGGCCGTAGTACCACCTTGTGA 3'	
66	1360	Malate synthase	5' AAATCACAGGACCGGTAGACAGGAAGATGG 3'	1112 bp
			5' GCCATAACTGACTACGAGAAATCTCAGCGG 3'	
67	1104	Glycine-dehydrogenase	5' CTTTGCAATATCAATGGCAGCAATACCGGC 3'	557 bp
			5' GGTACCTATCCATCAACGTATGGTGTCTT 3'	
68	1124	Splicing factor 3B	5' GAATCGACATGAGAAAGTGCAAGAGAATTG 3'	758 bp
			5' CCTGACTGCCAATGTACAAAGAATTAAGA 3'	
69	3763	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase	5' GCGAGACATGCAACGACTAAACACGCTTTA 3'	1117 bp
			5' ATGTCATCTTGGTCGAGTTGTATCCGGCC 3'	

Fortsetzung Tabelle A 12: Primersequenzen zur Verifizierung der bioinformatisch bestimmten Contigs von *S. endobioticum*.

Nr.	Contig / EST	Contig / EST Beschreibung	Forward / Reverse Primer	PCR-Produkt
70	3140	Endosomal_integral_transmembrane	5' GTTGGACACAGGGAGGACGAGATGTTAGAG 3' 5' ATAGAATCCAGATGCTCCCGCCGCATAAA 3'	1058 bp
71	2854	Peptidase fungalysin domain-containing protein	5' CCCTCGCCAACTATTCGATACAAATACTA 3' 5' CCAATAAAAACAGTTGGTAATGGAACCGTC 3'	1283 bp
72	1039	t-complex-chaperonin containing TCP1	5' GGCATCGCTACTGCATAATCGCCTCAGGAT 3' 5' TGGCATTCTTGACTGCTCGTAAACCATCGC 3'	1284 bp
73	10688	ste-ste11-cdc15-protein-kinase	5' CTCTCGGGAGCCATCCAGTATGGACTGCCA 3' 5' ACTCGGTCATTGATGAATATGTGCTTGGAG 3'	1050 bp
74	3295	Fatty acid activator Faa4	5' CCCCAACTCGGCCACGTCATTCAAAGTCAT 3' 5' CAAAGCAGCCACGTGGCCGTAAGGCATCT 3'	790 bp
75	4647	Mitochondrial outer membrane translocase receptor	5' ATGTACACATTGGATCGACTTCTGTAGCC 3' 5' GATTCTGCCATGATGGACTTTGAAAAGGCC 3'	700 bp
76	2578	Trafficking protein	5' GGTTCATTGTTTTGTTTCGCTTCGTTTCAT 3' 5' CTTTGTGATTGTCGGACATAGGGACAATCC 3'	820 bp
77	442391	Beta-Casp domain-containing protein	5' AAGGGGCGGTAGATGTTTGATACCCGCCTT 3' 5' CATCTCGTTTGAATCACCATGAACCAAAAC 3'	757 bp
78	9123	map-kinase	5' GAAGATTTGTGATTTCCGGTCTAGCCCGAGG 3' 5' TGGCGCAGTTTCGGGTGTCGGGCTGCTAA 3'	613 bp
79	639	G2-M-B-type-cyclin-Cdc13	5' TCAGCAGCAGGAGGGCAACATTATTGTGAT 3' 5' TCTACCACATACTCTGAGACCATGACCGGA 3'	889 bp
80	7197	Phospholipid-transporting-atpase	5' CAACAATGGGCCCAAGCATATGCCAAAGCA 3' 5' CCATCACC AATGGCTAGAGTTACAGCTCGG 3'	659 bp
81	6970	ccaat-binding-factor	5' CTTGTTAAGAAAACACAAACAGGCTAGCGG 3' 5' CGGCCACAAATTCGAGCCATTCCGAGCACT 3'	615 bp
82	18118	Chitinsynthase	5' GCCATTGACCAACCAATGATTTGGGCCAA 3' 5' CTGCGGATCAAAGTTGCTCAATCCCTTGGT 3'	636 bp
83	3832	saps-domain-containing protein	5' CTGCAGGAATGCAAGGCCATAATGCTAAA 3' 5' TATCTCACTACAATACCTCCGAATGAGCTC 3'	765 bp
84	59	RNA-binding domain-containing protein	5' ACGATATTGGCTGCAAAAAGTTTGGTGGG 3' 5' CCTACCGATCGTGAAAGTGGCAGAGTCAAG 3'	753 bp
85	1210	Protein kinase	5' TGATTACAGCAGTACACAGGTGCTCGTGG 3' 5' CTCCAGCATCTGTTCCAAGCGCCAAGTAAA 3'	1186 bp
86	359	pka-protein kinase cAMP-dependent	5' GGAATAAATGGTGGATGGATTCTACCTTCA 3' 5' CGTCGAGAATCTGTCTTGTCTGGTAGAAGAT 3'	899 bp
87	303	T-complex protein 1 epsilon subunit1	5' GCATAGTGAAAAGCACCTCAAGTCTCAC 3' 5' TTTACCAACTGAGTAGCCAGCAAGAAGTGG 3'	1636 bp
88	10240	GMP-synthase	5' ATCTTGTCTGGTTCGCCGTTATCGGTCTAT 3' 5' CGGACAGCACCTATTCCATTCTATTGTAC 3'	1438 bp
89	999	d-3-phosphoglycerate dehydrogenase	5' ATAGCACCTTGGCATCGGACATTTGCTTC 3' 5' CTCCATTAGTAAGTCTCGCTCAGTTGCC 3'	823 bp
90	6204	Casein kinase1	5' ACAGAGATCCTAAAACCAAACAACACATTC 3' 5' ACAGAGATCCTAAAACCAAACAACACATTC 3'	974 bp
91	1737a	t-complex protein 1 subunit	5' CGTGACTTATCTGGTGGTTGGAGAATGAGG 3' 5' TATTTGCACAGCTTCAGTCTGGTGTGACGA 3'	804 bp

Fortsetzung Tabelle A 12: Primersequenzen zur Verifizierung der bioinformatisch bestimmten Contigs von *S. endobioticum*.

Nr.	Contig / EST	Contig / EST Beschreibung	Forward / Reverse Primer	PCR-Produkt
92	1975	Ribosome biogenesis abc transporter arb1	5' CGTGACTTATCTGGTGGTTGGAGAATGAGG 3'	722 bp
			5' TATTGACACAGCTTCAGTCTGGTGTGACGA 3'	
93	1583	Aminophospholipid-transporting P-type ATPase	5' GAAGATCCTCCCAAACATGGTGTGCGAGAA 3'	744 bp
			5' CACTGGTTTACGAGGCGGTAATCTCATTAG 3'	
94	1035	Arginine N-methyltransferase	5' CTCGGCATCCACGAAGAAATGCTCAAAGA 3'	502 bp
			5' TCTGGCCATACTGAATCCGTAAACGTTATC 3'	
95	465	H/ACA ribonucleoprotein complex subunit 4	5' GCTGCTCAAGAATTATGACAAGCTACATGT 3'	1042 bp
			5' GTACCTATCCAATTTCCCTTCCTTGACC 3'	
96	1304	Heat shock protein hsp60	5' AATGAAATTCGACCGGGTTTCATATCACC 3'	749 bp
			5' GCCTTGAGCAGTGCAGTCCGCCACCA 3'	

A 4.5. Nachweis von Effektorsequenzen in verschiedenen Pathotypen von *S. endobioticum***Tabelle A 13: Primersequenzen zum Nachweis der Effektorsequenzen in den Pathotypen 1, 2, 6 und 18 von *S. endobioticum*.**

Contig	Name	Tm	GC	Sequenz	Größe
P18_C_contig_158_Gesamtsequenz Effektor_94AS	P18C_158_F	60	50	GAATGCTGATGAGGCTGTCA	125
	P18C_158_R	60,5	45	TTGTTGAGCGATTGCGACTA	
P18_C_contig_820_Gesamtsequenz Effektor_112AS	P18C_820_F	60,1	45	CGATGATCGAATACGCCTTT	127
	P18C_820_R	60	50	GTTGCCAACAAATCAGGAGGT	
P18_C_contig_13241_Gesamtsequenz Effektor_154AS	P18C_13241_F	60	50	CGACAAAACACCCCTAGCAT	137
	P18C_13241_R	60,2	50	TCGCCATGTCTCTCATACCA	
P18_C_contig_4522_Gesamtsequenz Effektor_107 AS	P18C_4522_F	60,2	50	GTAGGGCATTGATGGGATTG	118
	P18C_4522_R	60,7	50	GCATTGTCGCTCTAAATGG	
P18_C_contig_20688_Gesamtsequenz Effektor_50 AS	P18C_20688_F	60,3	40	TGGGTTGCCAAATTTCTTGT	101
	P18C_20688_R	60,8	50	GTTGGGAACATGGTGCTGAT	
P18_C_contig_5544_Gesamtsequenz Effektor_341 AS	P18C_5544_F	60,1	50	CGTGTCTGCAGCAATCTTGT	115
	P18C_5544_R	61,2	60	GAGCTCAAGCTGTCCACCTG	
P18_C_contig_6038_Gesamtsequenz Effektor_118 AS	P18C_6038_F	60	55	GGAAGTCCATCTCTTGAGC	145
	P18C_6038_R	60,4	55	GGCTCTGGGAAGACAACCTCA	
P18_C_contig_13822_Gesamtsequenz Effektor_134 AS	P18C_13822_F	60,4	50	TCTTCAAGCGGTTGTTCTC	140
	P18C_13822_R	59,8	45	CAATTGCGAGACATTCTGGA	
P18_C_contig_20874_Gesamtsequenz Effektor_137 AS	P18C_20874_F	59,8	45	CCGTAATTGAAGTGCCATT	123
	P18C_20874_R	60	45	AAAAGCCAACGGCATAACAC	
P18_C_contig_3998_Gesamtsequenz Effektor_62 AS	P18C_3998_F	60,1	50	CACGCCATGTCAAACGATAG	109
	P18C_3998_R	59,8	50	ATCTGGCAGCAGGACTGATT	
P18_C_contig_17205_Gesamtsequenz Effektor_84 AS	P18C_17205_F	60	55	GAGGAAGCAGAGGTTGATGC	122
	P18C_17205_R	60	55	ACAACATCTCCCGTCTCAC	
P18_C_contig_15923_Gesamtsequenz Effektor_74 AS	P18C_15923_F	60,2	45	TGCACAGGTCAAGGAATCAA	101
	P18C_15923_R	60	55	GTACGCGAATCAGAGCCTTC	
P18_C_contig_17586_Gesamtsequenz Effektor_69 AS	P18C_17586_F	60,1	43	CCAGTTTTGGAGAACGTTGAA	110
	P18C_17586_R	59,9	55	GGAGCAAACCAACTCGTCTC	
P18_C_contig_17636_Gesamtsequenz Effektor_103 AS	P18C_17636_F	60	60	GCTCCTTGCCGTAGTAGTGC	108
	P18C_17636_R	60,1	55	GACGTCCGACATCACATCAG	
P18_C_contig_23258_Gesamtsequenz Effektor_271 AS	P18C_23258_F	59,9	50	TCACTATTTGGGGTGCTTC	109
	P18C_23258_R	59,9	50	GTTGACCAAACGTGGATGTG	
P18_C_contig_12058_Gesamtsequenz Effektor_72 AS	P18C_12058_F	60,4	60	TGACCTCTAGAGCCACGAC	121
	P18C_12058_R	60	55	ACCAACGACGCTGGTATAG	
P18_C_contig_21903_Gesamtsequenz Effektor_115 AS	P18C_21903_F	60	45	ATGCTGCTGCTTTGGTTTCT	132
	P18C_21903_R	60,2	55	TAGGGAGCTTTGGTCTCCT	
P18_C_contig_18768_Gesamtsequenz Effektor_107 AS	P18C_18768_F	59,5	50	TCATACTCGTTGCCATGTC	101
	P18C_18768_R	59,5	55	CAGCTTCAGGGCCTCTACAT	

Fortsetzung Tabelle A 13: Primersequenzen zum Nachweis der Effektorsequenzen in den Pathotypen 1, 2, 6 und 18 von *S. endobioticum*.

Contig	Name	Tm	GC	Sequenz	Größe
P18_C_contig_12020_Gesamtsequenz Effektor_223AS	P18C_12020_F	60	55	GCCAAAGCTGACTCCAGAAC	104
	P18C_12020_R	60,3	55	CGGCGAGTTGACCTCTGTAT	
P18_C_contig_7924_Gesamtsequenz Effektor_215AS	P18C_7924_F	60,1	40	TTCGTTTGAACATGTCGAT	101
	P18C_7924_r	60	50	GACAGATGCAGCAACTTCCA	
P18_C_contig_7931_Gesamtsequenz Effektor_180AS	P18C_7931_F	60	50	CTTGGCATCCATCGTTACCT	135
	P18C_7931_R	60	50	TCGTAGTACGGGCATTTTCC	
P18_C_contig_6477_Gesamtsequenz Effektor_173AS	P18C_6477_F	60,1	50	TTGTCCTGTTTCTCGTTCC	118
	P18C_6477_R	60,1	50	AAGACTGCCCTGAAAGGTT	
P18_C_contig_21259_Gesamtsequenz Effektor_161AS	P18C_21259_F	60	40	CGGAATAAATTCGCCTTTGA	128
	P18C_21259_R	60	55	ACAGGTCCTCCACAGAATGG	
P18_C_contig_11138_Gesamtsequenz Effektor_145AS	P18C_11138_F	59,9	50	ACTCAAGCCCAGCAACATCT	137
	P18C_11138_R	60	50	GTCCGCGGTATTTGACTT	
P18_C_contig_818_Gesamtsequenz Effektor_143AS	P18C_818_F	59,9	50	TTGACAGTGGCGACAAGTTC	128
	P18C_818_R	59,7	50	CCTTTTCTCACCGACACACA	
P18_C_contig_8695_Gesamtsequenz Effektor_123AS	P18C_8695_F	59,9	50	CCCTCATCGACCCAAGATAA	105
	P18C_8695_R	60,7	55	TGGAAGGAGAGCTCAGTTGC	
P18_C_contig_232_Gesamtsequenz Effektor_111AS	P18C_232_F	61	50	GTCCCGATCGACATGAAGAA	112
	P18C_232_R	60	60	GCGGATACTCGACTCTGAGG	
P18_C_contig_16314_Gesamtsequenz Effektor_105AS	P18C_16314_F	59,9	50	GGAGTTTCACTTGTGCGTCA	115
	P18C_16314_R	60,2	45	GAATTTTCTCGCTGGGATGA	
P18_C_contig_9561_Gesamtsequenz Effektor_101AS	P18C_9561_F	59,8	50	CGGTGACCCATTATCGAACT	127
	P18C_9561_R	60,1	50	ATATTTGGTCGAGCCACAGC	
P18_C_contig_16558_Gesamtsequenzen Effektor_100AS	P18C_16558_F	60,2	50	CTGCTATCCATCGCTTCAT	132
	P18C_16558_R	60	40	TGATGCCAGACATTCCAAAA	
P18_C_contig_14452_Gesamtsequenz Effektor_94AS	P18C_14452_F	59,9	55	GAGCGTATTGAGCGGGTTAG	101
	P18C_14452_R	60,1	50	AACGCCAGCATATCCTCATC	
P18_C_contig_18396_Gesamtsequenz Effektor_94AS	P18C_18396_F	60,1	55	TTACTTGTCCCCGGAGTCTG	149
	P18C_18396_R	60	50	AGCGTCGTCGAGTTGAATCT	
P18_C_contig_708_Gesamtsequenz Effektor_91AS	P18C_708_F	59,8	50	CCTTGGCGTATGGATCGTAT	124
	P18C_708_R	60	50	ACAGCTCCGAAACTGAAGGA	
P18_C_contig_9511_Gesamtsequenz Effektor_87AS	P18C_9511_F	60,5	55	CAGTCAACAGCAAGCACCCAC	132
	P18C_9511_R	60,4	50	GGTGATCCATGGGATGGTAA	
P18_C_contig_16505_Gesamtsequenz Effektor_79AS	P18C_16505_F	60,1	45	TTCCTCTGCTTCTCGATTT	126
	P18C_16505_R	60	40	GATTTGGAGGCGAAAATTGA	
P18_C_contig_23059_Gesamtsequenz Effektor_74AS	P18C_23059_F	59,9	50	CGACATTCCATCCACATCAG	125
	P18C_23059_R	60,2	50	ACTGCTCGTTTTGTCGCTCT	
P18_C_contig_13242_Gesamtsequenz Effektor_74AS	P18C_13242_F	59,8	50	CGGGTTTGTAAAGTGGTGGT	118
	P18C_13242_R	60,9	50	GCACACCTTGACAACAGCAA	

Fortsetzung Tabelle A 13: Primersequenzen zum Nachweis der Effektorsequenzen in den Pathotypen 1, 2, 6 und 18 von *S. endobioticum*.

Contig	Name	Tm	GC	Sequenz	Größe
P18_C_contig_59_Gesamtsequenz Effektor_73AS	P18C_59_F	60,3	60	GGTCTGCCACACCTGCTACT	103
	P18C_59_R	60	45	GACGCAAAATGCTGAGACAA	
P18_C_contig_2158_Gesamtsequenz Effektor_72AS	P18C_2158_F	59,4	35	TTTCAGCGAATGAATCGAAA	149
	P18C_2158_R	60	50	CCAAAAGGGTACCTCGTCAA	
P18_C_contig_12058_Gesamtsequenz Effektor_72 AS	P18C_12058_F	60,4	60	TGACCTCCTAGAGCCACGAC	121
	P18C_12058_R	60	55	ACCAACGACGCCTGGTATAG	
P18_C_contig_1590_Gesamtsequenz Effektor_71AS	P18C_1590_F	60	45	GCTTTGGAAATGGAGATGGA	131
	P18C_1590_R	60	55	CTTGAGGGTGGTGCTATGGT	
P18_C_contig_867_Gesamtsequenz Effektor_71AS	P18C_867_F	60,1	55	AGGGCCTGTCTAACGGTCTT	119
	P18C_867_R	59,8	50	AGGGCAAGTCTGTGGAAGAA	
P18_C_contig_7076_Gesamtsequenz Effektor_70AS	P18C_7076_F	59,5	55	CCACAGTCAGTGTCCCATA	101
	P18C_7076_R	59,8	45	AAGGATGCGGAACTCAAAGA	
P18_C_contig_10703_Gesamtsequenz Effektor_65AS	P18C_10703_F	59,8	55	AGGCCTAGGAAACGAAGGAG	105
	P18C_10703_R	59,9	50	TCTTGTACGATGCGGTTCTG	
P18_C_contig_3052_Gesamtsequenz Effektor_62AS	P18C_3052_F	60	60	CTGACTGTGCTGCTACTGC	102
	P18C_3052_R	58,8	40	GCAAATGCCTTTGAGAATGA	
P18_C_contig_15062_Gesamtsequenz Effektor_60AS	P18C_15062_F	60,2	50	TTCCGGTTCTTGTCTGGAG	122
	P18C_15062_R	60,1	50	CCAAGCCTGTCCCTTACAA	
P18_C_contig_7419_Gesamtsequenz Effektor_59AS	P18C_7419_F	59,9	50	TCGCTGTAACATGCCACTTC	149
	P18C_7419_R	59,1	50	AAAGCAGACATTGGGACCTC	
P18_C_contig_4838_Gesamtsequenz Effektor_56AS	P18C_4838_F	60,4	50	ATGTTGGTGGAGTGCAGGAT	136
	P18C_4838_R	59,9	50	TCTTGTCTGTTGGCTGTTGG	
P18_C_contig_4592_Gesamtsequenz Effektor_56AS	P18C_4592_F	59,9	50	GGTAAACGTCCCTTCAAACG	103
	P18C_4592_R	60,6	50	GGCTTTACCGAGCAAATCCT	
P18_C_contig_7174_Gesamtsequenz Effektor_55AS	P18C_7174_F	59,6	50	ACTCATCAAGTCAGCCAGCA	125
	P18C_7174_R	60,1	55	TCAGGCTCCCACCTATTACG	
P18_C_contig_8819_Gesamtsequenz Effektor_54AS	P18C_8819_F	59,8	40	TGGTTTTGTGGTTGGTTTGA	110
	P18C_8819_R	60,2	50	GCCTGACTTGCATGAAGGAT	
P18_C_contig_7431_Gesamtsequenz Effektor_54AS	P18C_7431_F	59,7	50	ATATGTCGGTGGCTGCTTCT	123
	P18C_7431_R	60,1	50	GATACGGCAGCACTGGAAT	
P18_C_contig_1644_Gesamtsequenz Effektor_52AS	P18C_1644_F	59,3	44	TTTACCAGTACCGTATGTGTCCA	100
	P18C_1644_R	59,6	50	TGCTGCTTCCCTGTGTAAGA	
P18_C_contig_9555_Gesamtsequenz Effektor_51AS	P18C_9555_F	59,9	55	TCCTCTCTCATCCGTCGT	113
	P18C_9555_R	59,1	50	GCAATGTCCTTGTCCAACAG	
P18_C_contig_5644_Gesamtsequenz Effektor_52AS	P18C_5644_F	58,7	50	GCTTCCTTGAGTTGGCTCT	122
	P18C_5644_R	60,5	45	TTGTGGACTTTCTGGGCAAT	
P18_C_contig_3147_Gesamtsequenz Effektor_50AS	P18C_3147_F	59,7	50	TTGGTGCAACTGTTCCAGAC	119
	P18C_3147_R	60	50	GAAGAAGTGGGTTGGTGCAT	

Fortsetzung Tabelle A 13: Primersequenzen zum Nachweis der Effektorsequenzen in den Pathotypen 1, 2, 6 und 18 von *S. endobioticum*.

Contig	Name	Tm	GC	Sequenz	Größe
P18_C_contig_8270_Gesamtsequenz Effektor_52AS	P18C_8270_F	59,3	45	TCTGGCAAATCATCTCTCCA	122
	P18C_8270_R	59,7	50	ATCGAATCATGGGTCTGTGTC	
P18_C_contig_404_Gesamtsequenz Effektor_51AS	P18C_404_F	58,4	44	CAGGAGGTATATGATCTTCAGCA	108
	P18C_404_R	59,9	55	GTCCCGGAGTTGTCTATCCA	
P18_C_contig_4632_Gesamtsequenz Effektor_101AS	P18C_4632_F	60,2	55	GTGCCCATGGTCATATCCTC	144
	P18C_4632_R	60,1	50	TGGTGGGATCACTGTCAAGA	
P18_C_contig_14425_Gesamtsequenz Effektor_94 AS	P18C_14425_F	59,9	55	GAGCGTATTGAGCGGGTTAG	101
	P18C_14425_R	60,1	50	AACGCCAGCATATCCTCATC	
P18_C_contig_17637_Gesamtsequenz Effektor_73AS	P18C_17637_F	59,7	55	GCCCCTGCTTGTGAACTAC	107
	P18C_17637_R	59,4	55	CCTGCAGTCTGTGGAAGATG	
P18_C_contig_4564_Gesamtsequenz Effektor_70AS	P18C_4564_F	59,3	45	ATGGTCCCATGCTCGTAAT	115
	P18C_4564_R	60,1	55	CGTAACTGGGCTGACCTGAT	
P18_C_contig_15704_Gesamtsequenz Effektor_51AS	P18C_15704_F	59,9	52	GCCTGTTCTGGTGTGCTTTAG	126
	P18C_15704_R	59,7	40	TCATGCAACCAAAAAGAACG	
P18_C_contig_13808_Gesamtsequenz Effektor_50AS	P18C_13808_F	60	45	ATGCTTCGTCAAAACCCAAC	108
	P18C_13808_R	60,3	45	ATATCCGTGGGCAAGCAATA	
P18_C_contig_9742_Gesamtsequenz Effektor_74AS	P18C_9742_F	60,1	50	GTGGTATTCCGGTTCCATTG	100
	P18C_9742_R	59	50	ACCCTCCTTGAATCGACAAC	

A 5. Vektorkarte des Expressionsvektors pRedU10-35S

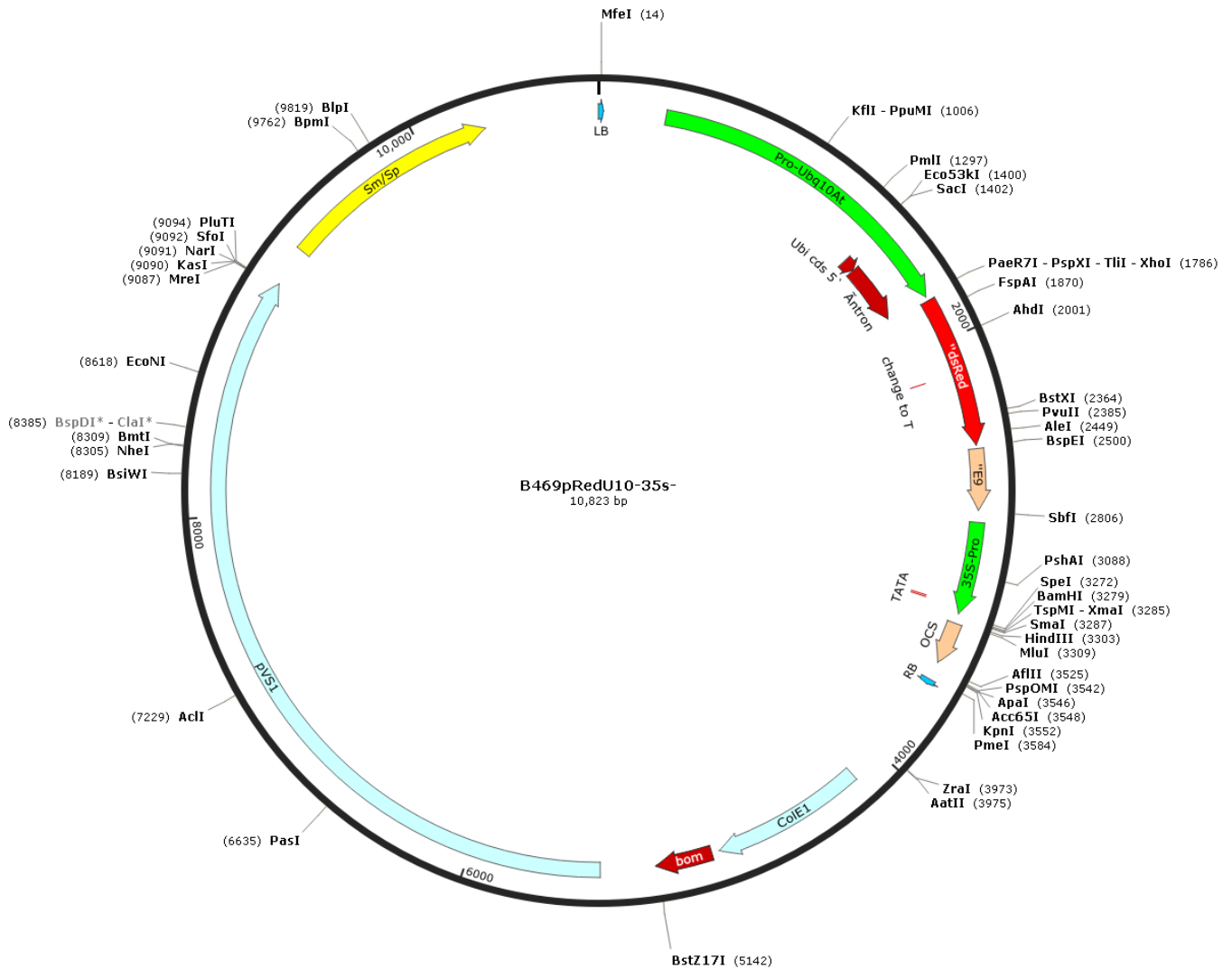


Abbildung A 1: Schematische Darstellung des Expressionsvektors zur transienten Transformation von Tabakblättern.

A 6. Spektren der Reportergene DsRed und GFP

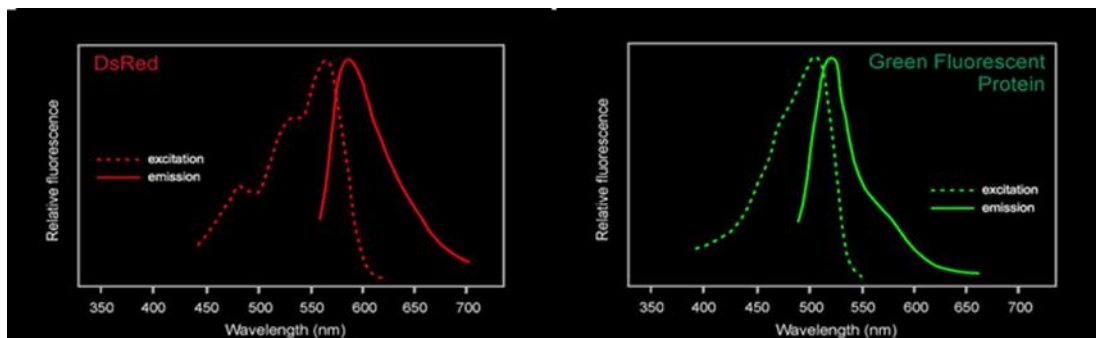


Abbildung A 2: Spektrale Eigenschaften der verwendeten Reportergene DsRed und GFP (<https://home.ccr.cancer.gov>).

A 7. Bioinformatische Vorhersage von Effektorkandidaten

A 7.1. Vorhersage der Zelllokalisation mittels TargetP

Tabelle A 14: Vorhersage der Beteiligung von Proteinen am sekretorischen Weg der Zelle. mTP: mitochondriales Transitpeptid, SP: Signalpeptid, Loc: *localization*, RC: *reliability class*.

Name	mTP	SP	other	Loc	RC
P18_C_contig_13241_Gesamtsequenz Effektor_154AS	0,036	0,822	0,101	S	2
P18_C_contig_158_Gesamtsequenz Effektor_131AS	0,151	0,724	0,062	S	3
P18_C_contig_4522_Gesamtsequenz Effektor_107AS	0,142	0,792	0,095	S	2
P18_C_contig_20688_Gesamtsequenz Effektor_50AS	0,275	0,099	0,570	_	4
P18_C_contig_5544_Gesamtsequenz Effektor_AS_341AS	0,462	0,169	0,099	M	4
P18_C_contig_6038_Gesamtsequenz Effektor_118AS	0,016	0,981	0,053	S	1
P18_C_contig_13822_Gesamtsequenz Effektor_134AS	0,109	0,393	0,225	S	5
P18_C_contig_20874_Gesamtsequenz Effektor_137AS	0,185	0,656	0,118	S	3
P18_C_contig_3998_Gesamtsequenz Effektor_62AS	0,055	0,842	0,206	S	2
P18_C_contig_17205_Gesamtsequenz Effektor_72AS	0,013	0,987	0,061	S	1
P18_C_Contig_15923_Gesamtsequenz Effektor_74AS	0,107	0,725	0,139	S	3
P18_C_contig_17586_Gesamtsequenz Effektor_69AS	0,064	0,907	0,141	S	2
P18_C_contig_17636_Gesamtsequenz Effektor_103AS	0,129	0,916	0,019	S	2
P18_C_contig_24410_Gesamtsequenz Effektor_136AS	0,041	0,920	0,083	S	1
P18_C_contig_23258_Gesamtsequenz Effektor_AS_271AS	0,034	0,962	0,088	S	1
P18_C_contig_18768_Gesamtsequenz Effektor_107AS	0,015	0,978	0,050	S	1
P18_C_contig_12058_Gesamtsequenz Effektor_72AS	0,035	0,896	0,092	S	1
P18_C_contig_21903_Gesamtsequenz Effektor_115AS	0,237	0,845	0,039	S	2
P18_C_contig_11376_Gesamtsequenz Effektor_106AS	0,010	0,992	0,040	S	1
P18_C_contig_14452_Gesamtsequenz Effektor_94AS	0,227	0,926	0,014	S	2
P18_C_contig_820_Gesamtsequenz Effektor_112AS	0,026	0,981	0,050	S	1
P18_C_contig_59_Gesamtsequenz Effektor_73AS	0,082	0,928	0,031	S	1
P18_C_contig_3147_Gesamtsequenz Effektor_50AS	0,020	0,984	0,039	S	1
P18_C_contig_404_Gesamtsequenz Effektor_51AS	0,024	0,961	0,133	S	1
P18_C_contig_2158_Gesamtsequenz Effektor_72AS	0,034	0,916	0,083	S	1
P18_C_contig_1644_Gesamtsequenz Effektor_52AS	0,042	0,899	0,110	S	2
P18_C_contig_232_Gesamtsequenz Effektor_111AS	0,858	0,271	0,012	M	3
P18_C_contig_4632_Gesamtsequenz Effektor_101AS	0,011	0,993	0,034	S	1
P18_C_contig_1590_Gesamtsequenz Effektor_71AS	0,168	0,818	0,050	S	2
P18_C_contig_9555_Gesamtsequenz Effektor_51AS	0,031	0,926	0,081	S	1
P18_C_contig_9742_Gesamtsequenz Effektor_74AS	0,215	0,783	0,085	S	3
P18_C_contig_3052_Gesamtsequenz Effektor_62AS	0,034	0,964	0,020	S	1
P18_C_contig_5644_Gesamtsequenz Effektor_52AS	0,146	0,723	0,073	S	3
P18_C_contig_4838_Gesamtsequenz Effektor_56AS	0,022	0,947	0,092	S	1
P18_C_contig_7924_Gesamtsequenz Effektor_215AS	0,020	0,962	0,050	S	1
P18_C_contig_12020_Gesamtsequenz Effektor_223 AS	0,698	0,137	0,067	S	3
P18_C_contig_7931_Gesamtsequenz Effektor_180AS	0,073	0,843	0,067	S	2
P18_C_contig_13242_Gesamtsequenz Effektor_74AS	0,012	0,980	0,080	S	1
P18_C_contig_21259_Gesamtsequenz Effektor_161AS	0,130	0,967	0,005	S	1
P18_C_contig_9561_Gesamtsequenz Effektor_101AS	0,106	0,905	0,021	S	2
P18_C_contig_708_Gesamtsequenz Effektor_91AS	0,873	0,361	0,008	M	3

Fortsetzung Tabelle A 14: Vorhersage der Beteiligung von Proteinen am sekretorischen Weg der Zelle. mTP: mitochondriales Transitpeptid, SP: Signalpeptid, Loc: *localization*, RC: *reliability class*.

Name	mTP	SP	other	Loc	RC
P18_C_contig_16505_Gesamtsequenz Effektor_79AS	0,019	0,978	0,052	S	1
P18_C_contig_4564_Gesamtsequenz Effektor_70AS	0,033	0,958	0,043	S	1
P18_C_contig_6477_Gesamtsequenz Effektor_173AS	0,027	0,988	0,031	S	1
P18_C_contig_7419_Gesamtsequenz Effektor_59AS	0,344	0,656	0,066	S	4
P18_C_contig_10703_Gesamtsequenz Effektor_65AS	0,079	0,710	0,117	S	3
P18_C_contig_11138_Gesamtsequenz Effektor_145AS	0,057	0,936	0,031	S	1
P18_C_contig_818_Gesamtsequenz Effektor_143AS	0,044	0,904	0,038	S	1
P18_C_contig_867_Gesamtsequenz Effektor_71AS	0,034	0,960	0,025	S	1
P18_C_contig_8819_Gesamtsequenz Effektor_54AS	0,225	0,596	0,056	S	4
P18_C_contig_15062_Gesamtsequenz Effektor_60AS	0,547	0,817	0,003	S	4
P18_C_contig_18396_Gesamtsequenz Effektor_94AS	0,057	0,915	0,092	S	1
P18_C_contig_13808_Gesamtsequenz Effektor_50AS	0,011	0,987	0,054	S	1
P18_C_contig_8695_Gesamtsequenz Effektor_123AS	0,053	0,883	0,075	S	1
P18_C_contig_7076_Gesamtsequenz Effektor_70AS	0,052	0,817	0,147	S	2
P18_C_contig_9511_Gesamtsequenz Effektor_87AS	0,087	0,951	0,020	S	1
P18_C_contig_7174_Gesamtsequenz Effektor_55AS	0,297	0,620	0,055	S	4
P18_C_contig_23059_Gesamtsequenz Effektor_77AS	0,113	0,796	0,103	S	2
P18_C_contig_16314_Gesamtsequenz_105AS	0,029	0,965	0,031	S	1
P18_C_contig_16558_Gesamtsequenzen Effektor_100AS	0,172	0,964	0,012	S	2
P18_C_contig_7431_Gesamtsequenz Effektor_54AS	0,702	0,781	0,003	S	5
P18_C_contig_8270_Gesamtsequenz Effektor_52AS	0,087	0,904	0,032	S	1
P18_C_contig_15704_Gesamtsequenz Effektor_51AS	0,941	0,087	0,023	M	1
P18_C_contig_17637_Gesamtsequenz Effektor_73AS	0,075	0,940	0,016	S	1
P18_C_contig_14425_Gesamtsequenz Effektor_94 AS	0,227	0,926	0,014	S	2
P18_C_contig_4592_Gesamtsequenz Effektor_56AS	0,023	0,954	0,039	S	1

A 7.2. Vorhersage von Signalpeptiden (SignalP/ Phobius), Disulfidbrücken (DISULFIND) und der Wirksamkeit als Effektor (EffectorP)

Tabelle A 15: Übersicht der cDNA-Contigs, deren abgeleitete Aminosäuren als Effektor vorhergesagt wurden. Dargestellt wurden die cDNA-Contigs von *S. endobioticum* P18. Zusammenfassende Darstellung der Ergebnisse aus SignalP, Phobius, EffectorP und DISULFIND. Angegeben wurden die Anzahl der Aminosäuren und Disulfidbrücken, sowie die Wahrscheinlichkeit, mit der die Sequenz als Effektor wirksam wurde. Y = Yes.

ID	SignalP	Phobius	EffectorP	Disulfidbrücken
P18_C_contig_5544_345_to_1_Frame_-2	Y	Y	0,994	0
P18_C_contig_23258_195_to_1_Frame_-2	Y	Y	0,521	0
P18_C_contig_12020_717_to_49_Frame_-3	Y	Y	0,878	0
P18_C_contig_7924_745_to_101_Frame_-3	Y	Y	0,863	0
P18_C_contig_7931_85_to_624_Frame_1	Y	Y	1,0	0
P18_C_contig_6477_584_to_66_Frame_-1	Y	Y	0,926	1
P18_C_contig_21259_119_to_601_Frame_2	Y	Y	0,569	3
P18_C_contig_13241_404_to_6_Frame_-1	Y	Y	0,993	3
P18_C_contig_11138_549_to_115_Frame_-2	Y	Y	0,994	0
P18_C_contig_818_37_to_465_Frame_1	Y	Y	0,998	0
P18_C_contig_24410_17_to_265_Frame_2	Y	Y	0,743	4
P18_C_contig_13822_407_to_6_Frame_-1	Y	Y	0,911	0
P18_C_contig_158_880_to_1161_Frame_1	Y	Y	0,818	1
P18_C_contig_8695_35_to_403_Frame_2	Y	Y	1,0	0
P18_C_contig_6038_339_to_1_Frame_-1	Y	Y	1,0	2
P18_C_contig_21903_31_to_213_Frame_1	Y	Y	0,965	2
P18_C_contig_820_1809_to_1474_Frame_-3	Y	Y	0,99	2
P18_C_contig_232_845_to_1177_Frame_2	Y	Y	0,969	1
P18_C_contig_4522_230_to_6_Frame_-3	Y	Y	0,95	2
P18_C_contig_18768_86_to_253_Frame_2	Y	Y	0,92	0
P18_C_contig_11376_188_to_6_Frame_-3	Y	Y	0,937	0
P18_C_contig_16314_21_to_335_Frame_3	Y	Y	0,641	1
P18_C_contig_17636_86_to_307_Frame_2	Y	Y	0,958	0
P18_C_contig_4632_40_to_342_Frame_1	Y	Y	0,988	0
P18_C_contig_9561_20_to_322_Frame_2	Y	Y	0,994	2
P18_C_contig_16558_319_to_20_Frame_-2	Y	Y	0,928	0
P18_C_contig_14452_492_to_211_Frame_-3	Y	Y	0,755	2
P18_C_contig_18396_92_to_373_Frame_2_	Y	Y	0,835	2
P18_C_contig_14425_175_to_5_Frame_-2	Y	Y	0,777	0
P18_C_contig_708_381_to_109_Frame_-3	Y	Y	0,666	1
P18_C_contig_9511_20_to_280_Frame_2	Y	Y	0,7	0
P18_C_contig_17205_221_to_6_Frame_-3	Y	Y	0,974	1
P18_C_contig_16505_40_to_276_Frame_1	Y	Y	0,64	1
P18_C_contig_23059_334_to_104_Frame_-1	Y	Y	0,53	2
P18_C_contig_9742_433_to_212_Frame_-2	Y	Y	1,0	4
P18_C_contig_13242_443_to_222_Frame_-2	Y	Y	1,0	1
P18_C_contig_15923_213_to_1_Frame_-3	Y	Y	0,984	1
P18_C_contig_59_514_to_732_Frame_1	Y	Y	0,999	1
P18_C_contig_17637_41_to_259_Frame_2	Y	Y	0,59	0
P18_C_contig_2158_869_to_654_Frame_-2	Y	Y	0,952	3

Fortsetzung Tabelle A 15: Übersicht der cDNA-Contigs, deren abgeleitete Aminosäuren als Effektor vorhergesagt wurden.

ID	SignalP	Phobius	EffectorP	Disulfidbrücken
P18_C_contig_12058_48_to_239_Frame_3	Y	Y	0,91	0
P18_C_contig_1590_166_to_378_Frame_1	Y	Y	1,0	2
P18_C_contig_867_324_to_112_Frame_-2	Y	Y	0,954	0
P18_C_contig_4564_334_to_125_Frame_-1	Y	Y	0,589	2
P18_C_contig_7076_28_to_237_Frame_1	Y	Y	0,991	2
P18_C_contig_17586_164_to_316_Frame_2	Y	Y	0,955	0
P18_C_contig_10703_518_to_324_Frame_-1	Y	Y	0,947	0
P18_C_contig_3052_311_to_126_Frame_-3	Y	Y	0,984	2
P18_C_contig_3998_332_to_499_Frame_2	Y	Y	0,825	0
P18_C_contig_15062_300_to_479_Frame_3	Y	Y	1,0	4
P18_C_contig_7419_373_to_549_Frame_1	Y	Y	1,0	4
P18_C_contig_20874_181_to_5_Frame_-2	Y	Y	0,759	0
P18_C_contig_4838_590_to_423_Frame_-1	Y	Y	1,0	2
P18_C_contig_4592_399_to_566_Frame_3	Y	Y	0,863	1
P18_C_contig_7174_128_to_292_Frame_2	Y	Y	0,659	1
P18_C_contig_8819_150_to_311_Frame_3	Y	Y	0,836	1
P18_C_contig_7431_109_to_270_Frame_1	Y	Y	1,0	3
P18_C_contig_1644_257_to_412_Frame_2	Y	Y	0,845	0
P18_C_contig_5644_416_to_261_Frame_-3	Y	Y	0,984	1
P18_C_contig_8270_47_to_202_Frame_2	Y	Y	0,834	bis zu 5
P18_C_contig_404_332_to_484_Frame_2	Y	Y	0,601	0
P18_C_contig_9555_36_to_188_Frame_3	Y	Y	1,0	2
P18_C_contig_15704_163_to_11_Frame_-2	Y	Y	1,0	3
P18_C_contig_3147_650_to_799_Frame_2	Y	Y	1,0	0
P18_C_contig_20688_482_to_6_Frame_-3_	Y	Y	0,707	2
P18_C_contig_13808_345_to_196_Frame_-2	Y	Y	0,966	0

A 7.3. Identifizierte Proteine von *S. endobioticum* aus der Proteomanalyse infizierter Kartoffelknollen

Tabelle A 16: Zusammenfassung der weiteren 45 Proteine von *S. endobioticum* mit Sequenzähnlichkeit zu *B. dendrobatidis*. Proteine wurden in weniger als vier biologischen Wiederholungen identifiziert.

Protein	Referenz <i>B. dendrobatidis</i>
conserved hypothetical protein (446 AS)	BDET_00451
Tubulin beta-2 chain (441 AS)	BDET_05635
hypothetical protein similar to GTPase (664 AS)	BDET_00703
predicted protein (555 AS)	BDET_00796
Calnexin precursor (535 AS)	BDET_00940
Heat shock 70 kDa protein (648 AS)	BDET_01124
predicted protein (259 AS)	BDET_01391
hypothetical protein (317 AS)	BDET_01414
predicted protein (184 AS)	BDET_02069
conserved hypothetical protein (1060 AS)	BDET_02260
hypothetical protein similar to pre-mRNA splicing factor (674 AS)	BDET_02270
Histone H3.3 (128 AS)	BDET_02578
Ciliary dynein heavy chain 5 (4522 AS)	BDET_02782
conserved hypothetical protein (259 AS)	BDET_02819
UTP-glucose-1-phosphate uridylyltransferase 2 (505 AS)	BDET_02883
predicted protein (664 AS)	BDET_03005
aspartyl-tRNA synthetase (571 AS)	BDET_03133
hypothetical protein (1055 AS)	BDET_03366
predicted protein (924 AS)	BDET_03504
conserved hypothetical protein (515 AS)	BDET_03987
conserved hypothetical protein (4706 AS)	BDET_04061
NADH dehydrogenase iron-sulfur protein 2, mitochondrial precursor (484 AS)	BDET_04071
Ubiquitin-activating enzyme E1 1 (1840 AS)	BDET_04460
conserved hypothetical protein (525 AS)	BDET_04574
conserved hypothetical protein (1890 AS)	BDET_04731
GTP-binding protein lepA (693 AS)	BDET_05139
predicted protein (1586 AS)	BDET_05302
conserved hypothetical protein (3404 AS)	BDET_05746
Histone H4 (107 AS)	BDET_05771
conserved hypothetical protein (1669 AS)	BDET_06051
predicted protein (402 AS)	BDET_06227
conserved hypothetical protein (1010 AS)	BDET_06480
40S ribosomal protein S3-1 (241 AS)	BDET_06672
ATP-citrate synthase (1195 AS)	BDET_06741
predicted protein (686 AS)	BDET_06854
Aspartate aminotransferase, mitochondrial precursor (446 AS)	BDET_06936
conserved hypothetical protein (483 AS)	BDET_07062

Fortsetzung Tabelle A 16: Zusammenfassung der weiteren 45 Proteine von *S. endobioticum* mit Sequenzähnlichkeit zu *B. dendrobatidis*.

Protein	Referenz <i>B. dendrobatidis</i>
hypothetical protein (116 AS)	BDET_07694
predicted protein (329 AS)	BDET_07978
predicted protein (162 AS)	BDET_08738
Uridylate kinase (914 AS)	BDET_08145
conserved hypothetical protein (1175 AS)	BDET_08307
conserved hypothetical protein (219 AS)	BDET_08365
predicted protein (777 AS)	BDET_08468
Threonyl-tRNA synthetase (707 AS)	BDET_00393

D Dateien elektronisch auf Datenträger

D 1. Dateien

Bei den nachfolgenden Dateien handelt es sich um zusätzlich zur Dissertation bereitgestellte Sequenzdaten, welche nicht veröffentlicht werden.

D 1.1. Effektorsequenzen – Nukleinsäuresequenzen

D 1.1.1. Gesamtsequenz der Effektoren aus dem Sequenzpool von *S. endobioticum*

→ Dateiname: D1.1.1_Gesamtsequenz_Effektoren_mit Hit

Hierbei handelt es sich um die Nukleinsäuresequenzen der 66 Effektorkandidaten aus dem Sequenzpool von *Synchytrium endobioticum*.

D 1.1.2. Effektorkandidaten aus dem Sequenzpool ohne Homologien zu bekannten Taxa

→ Dateiname: D1.1.2_Effektorkandidaten_ohne_Hit

Hierbei handelt es sich um die Nukleinsäuresequenzen der 45 Effektorkandidaten aus dem Sequenzpool ohne Homologien zu bekannten Taxa.

D 1.1.3. Klonierte Effektoren

→ Dateiname: D.1.1.3_klonierte_Effektoren

Nukleinsäuresequenzen der 14 klonierten Effektorkandidaten aus dem Sequenzpool von *Synchytrium endobioticum* und dem Sequenzpool ohne Homologien zu bekannten Taxa.

D 1.2. Effektorsequenzen – Aminosäuresequenzen

D 1.2.1. AS-Sequenzen der Effektoren aus dem Sequenzpool von *S. endobioticum*

→ Dateiname: D1.2.1 AS_SequenzEffektoren_mitHit

FASTA-Datei der Aminosäuresequenzen der Effektorkandidaten aus dem Sequenzpool von *Synchytrium endobioticum*.

D 1.2.2. AS-Sequenzen Effektoren aus dem Sequenzpool ohne Homologien zu bekannten Taxa

→ Dateiname: D1.2.2 AS-SequenzEffektoren_ohne Hit

Datei der Aminosäuresequenzen der Effektorkandidaten aus dem Sequenzpool ohne Homologien zu bekannten Taxa.

D 1.3. Nukleinsäuresequenzen von *S. endobioticum* aus einer nicht-normalisierten und einer normalisierten cDNA-Bibliothek inokulierter Kartoffelknollen

D 1.3.1. Nukleinsäuresequenzen von *S. endobioticum* aus der Sequenzierung einer nicht-normalisierten cDNA-Bibliothek

→ Dateiname: 5448_wart_mRNA_wart_characterized_all_including_TSA_GenBanksubmitted

Hierbei handelt es sich um die Nukleinsäuresequenzen der 5.448 ESTs, die *S. endobioticum* über eine Mapping-Strategie zugeordnet werden konnten.

D 1.3.2. Nukleinsäuresequenzen von *S. endobioticum* aus der Sequenzierung einer normalisierten cDNA-Bibliothek

→ Dateiname: 3512_P18_2_and_P18_C_non-solanaceae_assembly_150_Blast_hit_chytrids

Hierbei handelt es sich um die zusätzlichen 3.512 ESTs, die *S. endobioticum* über eine Mapping-Strategie basierend auf der Sequenzierung der normalisierten cDNA-Bibliothek zugeordnet werden konnten.

D 1.4. Vektorsequenzen

D 1.4.1. Sequenz des Expressionsvektors pRedU10-35S

→ Dateiname: D 1.4.1_B469pRedU10-35s_Klonierungsvektor

Sequenz des Expressionsvektors pRedU10-35S zur Klonierung der Effektorkandidaten (Dateiformat: .dna).

D 1.4.2. Sequenzen der Bestandteile von TRV

→ Dateinamen: D 1.4.2_Tobacco rattle virus RNA2-based VIGS vector pTRV2.fasta

D 1.4.2_Tobacco rattle virus segment RNA1.fasta

D 1.4.2_RNA2_CoatProtein_SEQ.fasta

D 1.4.2_pTRV sequences.fasta

D 1.4.2_enhancer GFP.SEQ.fasta

Öffentliche Sequenzen der Bestandteile des TRV zur Infiltration von Tabakblättern.

Lebenslauf

PERSÖNLICHE DATEN

Name	Friederike Chilla
Geburtsname	Busse
Geburtsdatum	29.04.1987
Geburtsort	Nienburg/ Weser

BERUFLICHER WERDEGANG

Seit Mai 2018	Wissenschaftliche Mitarbeiterin im Julius Kühn-Institut, Kleinmachnow
Juli 2013 - September 2017	Wissenschaftliche Mitarbeiterin an der Leibniz Universität Hannover, Abt. Molekulare Pflanzenzüchtung, im Forschungsprojekt „DiRK- Diagnostik für eine Ressourcenschonende Kartoffelproduktion“
März 2013 - Juni 2013	Wissenschaftliche Mitarbeiterin an der Leibniz Universität Hannover, Abt. Molekulare Pflanzenzüchtung
Dezember 2012	Wissenschaftliche Hilfskraft an der Leibniz Universität Hannover, Abt. Molekulare Pflanzenzüchtung

AKADEMISCHE AUSBILDUNG

Dezember 2012 – Juli 2018	Promotionsstudium, Forschungsprojekt „DiRK- Diagnostik für eine Ressourcenschonende Kartoffelproduktion“
November 2013 - Oktober 2016	Promotionsbegleitende Teilnahme als assoziiertes Mitglied im Graduiertenkolleg „GRK1798 – <i>Signaling at the Plant-Soil-Interface</i> “
WS 2009/10 - WS 2011/2012	Master of Science Pflanzenbiotechnologie, Leibniz Universität Hannover Abschlussarbeit: „Versuche zur Optimierung der Transformations-effizienz bei Rosen“, Abt. Molekulare Pflanzenzüchtung
WS 2006/07 - WS 2009/10	Bachelor of Science Pflanzenbiotechnologie, Leibniz Universität Hannover Abschlussarbeit: „ <i>Agrobacterium tumefaciens</i> -vermittelter Gentransfer mit Hilfe von GFP (<i>Green Fluorescent Protein</i>) bei <i>Kalanchoe blossfeldiana</i> “, Abt. Zierpflanzenbau

SCHULISCHE AUSBILDUNG

1999 - 2006	Gymnasium Stolzenau, Erwerb der allgemeinen Hochschulreife
1997 - 1999	Orientierungsstufe Stolzenau
1993 - 1997	Grund- und Hauptschule Landesbergen

PRAKTIKUM

Januar 2013 – Februar 2013	SaKa Pflanzenzucht GmbH & Co. KG
----------------------------	----------------------------------

Publikationen & Posterbeiträge

PUBLIKATIONEN

Busse, F.; Bartkiewicz, A.; Terefe-Ayana, D.; Niepold, F.; Schleusner, Y.; Flath, K.; Sommerfeldt-Impe, N.; Lübeck, J.; Strahwald, J.; Tacke, E.; Hofferbert, H.-R.; Linde, M.; Przetakiewicz, J.; Debener, Th.

Genomic and transcriptomic resources for marker development in *Synchytrium endobioticum*, an elusive but severe potato pathogen. In: *Phytopathology* 107 (2017), Nr. 3, S. 322-328.

Bartkiewicz, A.; **Chilla, F.;** Terefe-Ayana, D.; Lübeck, J.; Strahwald, J.; Tacke, E.; Hofferbert, H.-R.; Linde, M.; Debener, Th.

Maximization of Markers Linked in Coupling for Tetraploid Potatoes via Monoparental Haploids. In: *Frontiers in Plant Science*, 9: Artikel: 620.

POSTERBEITRÄGE

2014 GPZ Haupttagung, Kiel

Transcriptomic analysis of the resistance of potatoes against potato wart disease

2015 GRK1798 Conference, Goslar

Transcriptomic analysis of the resistance of potato against potato wart disease

2016 GRK1798 Conference, Bad Salzdetfurth

Prediction of putative effector candidates of *Synchytrium endobioticum*

2016 Plant and Animal Genome, San Diego

Transcriptomic analysis of the resistance of potatoes against potato wart disease

Danksagung

Ich bedanke mich herzlich bei Herrn Prof. Dr. Thomas Debener für die Vergabe des Themas und die sehr gute Betreuung während der Zeit meiner Promotion. Vielen Dank für die vielen hilfreichen Gespräche und die Unterstützung.

Vielen Dank an Herrn Prof. Dr. Helge Küster und Herrn Prof. Dr. Edgar Maiß für die Übernahme des Korreferats beziehungsweise des Prüfungsvorsitzes.

Ich bedanke mich bei allen Kooperationspartnern des Projekts „Diagnostik für eine Ressourcenschonende Kartoffelstärkeproduktion“ (DiRK), welches von der Fachagentur Nachwachsende Rohstoffe e. V. gefördert wurde, für die Zusammenarbeit. Zu nennen sind hier: Dr. Kerstin Flath, Dr. Jens Lübeck, Dr. Eckard Tacke, Dr. Joseph Strahwald, Dr. Hans-Reinhard Hofferbert; besonderer Dank gilt Dr. Diro Terefe-Ayana und Dr. Marcus Linde für die vielfältige Hilfe bei der Planung und Durchführung der Versuche.

Ich bedanke mich bei der Arbeitsgruppe Pflanzenproteomik für die Durchführung und Hilfe bei der Proteomanalyse; mein besonderer Dank gilt hier Dr. Holger Eubel.

Ich danke allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Molekulare Pflanzenzüchtung für die schöne Zeit. Vielen Dank für die Unterstützung im Laboralltag und darüber hinaus. Ich bedanke mich bei meinen „Mit-Doktoranden“, dass sie die Doktorandenzeit für mich unvergesslich gemacht haben. Vielen Dank für die tollen Stunden im Büro oder im Park; und ein immer offenes Ohr bei allen Höhen und Tiefen während unserer gemeinsamen Zeit. Ein „Danke“ von Herzen an: Annette, Enzo, Ina, Juliane, Vini und Helena.

Ich danke allen Mitgliedern des Graduiertenkollegs „GRK1798 - *Signaling at the Plant-Soil-Interface*“ für die vielen interessanten Gespräche in den wöchentlichen Seminaren, aber auch für die schönen Abende außerhalb der Uni.

Ich bedanke mich bei Max Menssen für die Unterstützung bei der statistischen Auswertung der Versuchsdaten.

Ich danke Frank besonders für den unermüdlichen Zuspruch und den Rückhalt während aller Phasen der Promotion. Danke für jede wortlose Umarmung.

Ich danke meiner Familie für die stetige Motivation und den Glauben an mich. Vielen Dank, dass ihr immer für mich da seid!