

3. Ergebnisse

In der vorliegenden Arbeit wurde die Region um den Resistenzlocus *RPBI* durch eine hochauflösende Kartierung auf einen Bereich von ca. 71 kb eingegrenzt und molekular analysiert. 17 Marker wurden in einem Bereich von etwa 200 kb genetisch lokalisiert (siehe 3.5), und ein diese Region überspannendes BAC-Contig wurde erstellt (siehe 3.1). Zwei BAC-Klone dieses Contigs überspannen den *RPBI*-Locus. Aufgrund von später veröffentlichten Sequenzdaten dieser Region wurde ein weiterer den Resistenzlocus überspannender BAC-Klon identifiziert (siehe 3.2), und die in der Arbeit etablierten Marker konnten physikalisch lokalisiert werden. Im Rahmen der Kartierungsarbeiten wurde eine Cosmidbibliothek des resistenten *Arabidopsis*-Ökotyps Tsu erstellt (siehe 3.3). Es wurden Cosmidklone isoliert, die im BAC-Contig eingeordnet werden konnten (siehe 3.4), es konnte aber kein Cosmidklon identifiziert werden, der das Resistenzgen überspannt. Im Abschnitt zwischen den beiden rechts und links von *RPBI* am engsten gekoppelten Markern liegen im Ökotyp Col 13 codierende Sequenzen (siehe 3.6). Für diese 13 codierenden Sequenzen wurden mittels PCR Expressionsanalysen in den beiden Ökotypen Tsu (resistent) und Cvi (anfällig) durchgeführt. Aus PCR-Analysen und Sequenzvergleichen konnte abgeleitet werden, dass in der *RPBI*-Region große molekulare Unterschiede zwischen dem Ökotyp Col und den Ökotypen Tsu, Cvi und RLD bestehen (siehe 3.7). Sechs der 13 Gene des eingegrenzten Bereichs liegen innerhalb eines ca. 29 kb großen Abschnitts, in dem fünf Marker cosegregierend mit *RPBI* kartiert wurden. Von diesen sechs Genen liegen zwei in hochpolymorphen Sequenzabschnitten, und es handelt sich hier wahrscheinlich um Col-spezifische Gene.

3.1 Identifizierung und Charakterisierung von BACs in der *RPBI*-Region zur Erstellung eines BAC-Contigs

Zur weiteren Eingrenzung des Bereichs um den Resistenzlocus sollte ein Contig aus BAC-Klonen erstellt werden. Ein den Resistenzlocus überspannendes YAC-Contig wurde bereits im Rahmen der vorangehenden Arbeiten erstellt. Im ersten Schritt wurden mit dem am engsten mit *RPBI* gekoppelten Marker rpHS-1 BAC-Klone aus einer BAC-Bibliothek des *Arabidopsis*-Ökotyps Col-0 (Mozo *et al.* 1998) isoliert. Mit Endfragmenten von diesen BAC-Klonen wurden dann weitere BACs aus dieser Bibliothek isoliert. Es konnten außerdem mittels aktuell veröffentlichter Daten aus dem Internet (Arbeitsgruppe T. Altmann / IGF) weitere in diesem Bereich liegende BAC-Klone in die Untersuchungen mit einbezogen werden. Die so identifizierten BACs konnten mittels PCR- und Hybridisierungsexperimenten zu einem Bereich überlappender Klone (Contig) angeordnet werden. Hierfür wurden die Insert-Enden einiger BACs sequenziert und aus diesen Sequenzen wurden spezifische PCR-Primer abgeleitet, die DNA-Fragmente von 300 - 600 bp amplifizieren (siehe 2.2.22.2). So konnten mittels PCR überlappende BAC-Enden schnell identifiziert werden. Zur Erstellung des Contigs wurden die BACs außerdem mit drei weiteren, links und rechts vom Resistenzlocus kartierten Markern untersucht, indem Hybridisierungen mit den Markern

m253 und rpHS-1 und PCR-Analysen mit den Primern S3/S4 (Vorselektionsmarker, siehe 2.2.12.2) durchgeführt wurden. Die PCR- und Hybridisierungsergebnisse sind in Tab. 3-4 zusammengefasst. Es konnten außerdem einige relevante BAC-Enden kartiert werden (siehe 3.5.3), die dann als neue, sehr eng gekoppelte RFLP-Marker eingesetzt wurden. In den folgenden Kapiteln werden die einzelnen Teilerperimente beschrieben, die in ihrer Gesamtheit die Ergebnisse geliefert haben, die zur Erstellung des BAC-Contigs (siehe Abb. 3-3) nötig waren. Alle diese Arbeiten wurden durchgeführt, bevor die im Rahmen des *Arabidopsis*-Sequenzierungsprojekts erstellten BAC-Contigs und BAC-Sequenzen zur Verfügung standen, und die Ergebnisse konnten später verifiziert werden.

3.1.1 Durchmusterung einer BAC-Bibliothek zur Identifizierung von BAC-Klonen in der RPBI-Region

Die Durchmusterung der IGF-BAC-Bibliothek erfolgte im ersten Schritt mit dem Marker rpHS-1. Dieser Marker war zu diesem Zeitpunkt der am engsten mit dem Resistenzlocus gekoppelte Marker und wurde als radioaktiv markierte Sonde zur Hybridisierung eines BAC-Bibliothek-Filters (3x3 Duplikat Filter, siehe Abb. 2-3) eingesetzt. In dieser ersten Hybridisierung waren nur sehr schwache Hybridisierungssignale zu erkennen. Es konnten 6 Klone (siehe Tab. 3-2) identifiziert werden, von denen zunächst nur mit zwei Klonen (F11O20, F23G7) weitergearbeitet wurde. Nachdem mittels inverser PCR Endfragmente dieser zwei Klone isoliert werden konnten (siehe 2.2.22.1), wurde zuerst das Sp6-Ende des Klons F11O20 als Hybridisierungssonde zur Identifizierung weiterer mit F11O20 überlappender BAC-Klone eingesetzt. Es konnten drei weitere Klone (F5D14, F5P17, F11F17) identifiziert werden. Das Sp6-Ende des Klons F11O20 konnte später rechts von rpHS-1 kartiert werden. Es konnte anhand von Sequenzierungsdaten gezeigt werden, dass dieses Ende homolog zum T7-Ende des Klons F23G7 ist. Auch das Sp6-Ende des Klons F23G7 wurde kartiert und erwies sich als cosegregierend mit dem Marker rpHS-1, d. h. näher am Resistenzlocus liegend als das zuvor kartierte BAC-Ende. Deshalb wurde dieses BAC-Ende (F23G7/Sp6) als dritte Hybridisierungssonde eingesetzt und es konnte ein weiterer Klon (F3C3) identifiziert werden. In den beschriebenen Hybridisierungen mit den zwei BAC-Enden konnte außerdem bestätigt werden, dass die anfangs mit dem Marker rpHS-1 identifizierten Klone, die nur schwache Hybridisierungssignale aufwiesen, den entsprechenden DNA-Abschnitt mit dem Marker rpHS-1 enthalten.

Der BAC-Klon F3C3 lag nach den vorliegenden Hybridisierungsdaten am weitesten links und somit dem Resistenzlocus am nächsten. Es konnten dann aus veröffentlichten Daten der Arbeitsgruppe T. Altmann/IGF weitere überlappende BAC-Klone identifiziert werden, die links vom Klon F3C3 lokalisiert wurden. Vier weitere BACs wurden in die Untersuchungen mit einbezogen. Es handelte sich hierbei um die zwei Klone F9D2 und F12P22 (überlappend mit dem linken Ende von F3C3), den Klon F14M12 (überlappend mit dem linken Ende von F9D2) und die zwei Klone F25A9 und F22P6 (überlappend mit dem linken Ende von F14M12).

3.1.2 Isolierung von BAC-Endfragmenten mittels inverser PCR

Diese Methode wurde nur zur Isolierung der Enden von den BAC-Klonen F11O20 und F23G7 eingesetzt. Es handelte sich hierbei um die ersten zwei mit dem Marker rpHS-1 identifizierten BACs. Es wurde dann aber dazu übergegangen, die Endfragmente der BAC-Klone zu sequenzieren und mittels spezifischer Primer zu isolieren. Die iPCR wurde wie unter 2.2.22.1 beschrieben durchgeführt. Es konnten von beiden BAC-Klonen mit verschiedenen Enzymen das Sp6- und T7-Ende isoliert werden (siehe Tab. 3-1). Die Sp6-Enden (mit *CfoI* isolierte Fragmente) beider Klone wurden dann als RFLP-Marker kartiert (siehe 3.5.3). Außerdem wurden beide Sp6-Enden als Hybridisierungs sonden zur Identifizierung weiterer BAC-Klone aus der IGF-Bibliothek verwendet (siehe Tab. 3-2).

Tab. 3-1: Isolierung von BAC-Endfragmenten mittels inverser PCR.

BAC-Ende	Enzym	Fragment [bp]
F11O20 Sp6	<i>CfoI/HaeIII</i>	2700/800
F11O20 T7	<i>SacI</i>	250
F23G7 Sp6	<i>CfoI/HaeIII/ClaI</i>	500/2300/1700
F23G7 T7	<i>SacI</i>	250

3.1.3 Bestimmung der Insertgröße der BAC-Klone

Die Insertgröße der BAC-Klone wurde bestimmt, indem das Insert zuerst durch einen Verdau mit dem Restriktionsenzym *NotI* (schneidet GC'GGCC'GC) aus dem Vektor herausgeschnitten wurde (siehe 2.2.20). In den BACs wurden Fragmente mit einer durchschnittlichen Größe von 100 kb kloniert (Mozo *et al.* 1998). Die Auftrennung der Restriktionsfragmente musste durch eine Pulsed-Field-Gelelektrophorese (PFGE) erfolgen, da Fragmente in dieser Größenordnung mit einer konventionellen Gelelektrophorese nicht so aufgetrennt werden können, dass eine Fragmentgrößenbestimmung möglich ist. Die Auftrennung der Restriktionsfragmente erfolgte unter den in 2.2.20 beschriebenen Bedingungen. Es wurde erwartet, dass das Insert entweder in einem Stück aus dem Vektor herausgeschnitten würde oder aufgrund einer oder weniger Schnittstellen im Insert nur zwei oder wenige Fragmente entstünden. Der BAC-Vektor selbst hat eine Größe von 8774 bp. *NotI* schneidet im Vektor flankierend zur Klonierungsstelle (*EcoRI*) mit einem Abstand von 300 bp (Sp6-Ende) bzw. 336 bp (T7-Ende). Die Größe der mittels PFGE aufgetrennten DNA-Fragmente wurde anhand hochmolekularer Marker (Lambda Ladder PFG Marker, High Molecular Weight Marker) bestimmt. Die so geschätzten Insertgrößen der 15 BACs sind in Tab. 3-2 aufgeführt. Abbildung 3-1 zeigt die Größenbestimmung (PFGE) einiger BACs. Nur bei drei der 15 Klone existierte eine *NotI*-Schnittstelle im Insert, d. h. es entstanden zwei Insert-Fragmente. Bei allen anderen BACs wurde das Insert in einem Stück herausgeschnitten. Als zusätzliche Bande war jeweils der Vektor (8774 - 300-336 = 8138 bp) zu erkennen.

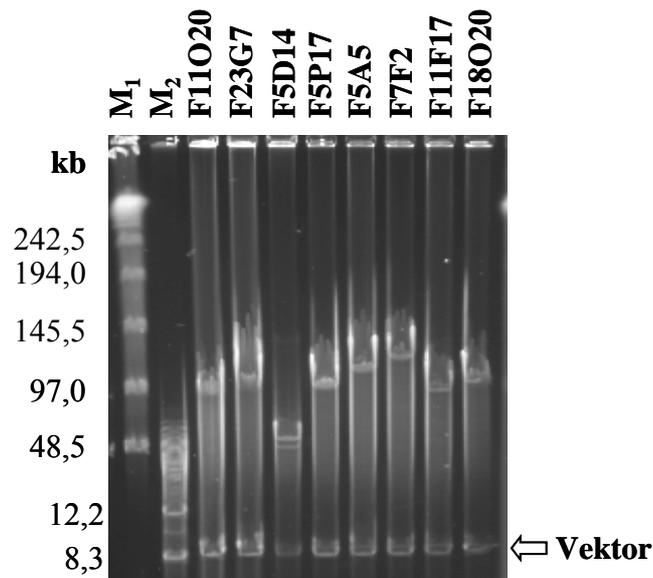


Abb. 3-1: Größenbestimmung der BAC-Inserts mittels PFGE
 M₁: Lambda Ladder PFG Marker
 M₂: High Molecular Weight Marker

Tab. 3-2: Identifizierung von BAC-Klonen in der *RPB1*-Region. Angegeben sind die Hybridisierungssonden, mit denen die BACs identifiziert (oder nach veröffentlichten Daten ausgewählt) wurden, und die mittels PFGE geschätzte Insertgröße der Klone (* bezeichnet einen Klon, der erst in späteren Kontrollen mit rpHS-1 hybridisierte).

BAC	identifiziert mit ...	Insert [kb]
F11O20	rpHS-1	98
F23G7	rpHS-1	108
F7F2	F11O20 Sp6, F23G7 Sp6, (rpHS-1)	120
F5D14	F11O20 Sp6*	52+46
F5P17	F11O20 Sp6	104
F11F17	F11O20 Sp6	98
F5A5	F11O20 Sp6, F23G7 Sp6, (rpHS-1)	117
F18O20	F11O20 Sp6, F23G7 Sp6, (rpHS-1)	106
F3C3	F23G7 Sp6	97+6
F23H22	F23G7 Sp6, (rpHS-1)	122
F9D2	Internet	100+26
F14M12	Internet	110
F22P12	Internet	95+27
F25A9	Internet	130
F22P6	Internet	115

3.1.4 Restriktionsanalyse der BAC-Klone

Um zu ermitteln, in welchen Klonen identische Abschnitte kloniert wurden bzw. wie groß diese überlappenden Bereiche sind, wurden die einzelnen BAC-Klone mit einem Restriktionsenzym (*EcoRI* oder *HindIII*) geschnitten und die Bandenmuster der Restriktionsfragmente verglichen. Alle Fragmente von jeweils zwei BAC-Klonen, die im Gel optisch die gleiche Größe hatten (mit Ausnahme der Vektorfragmente), wurden addiert und ergaben die Gesamtgröße des identischen Abschnitts in diesen zwei Klonen. Beim *EcoRI*-Verdau entsteht ein Vektorfragment von 8774 bp und beim *HindIII*-Verdau ein Vektorfragment von 1510 bp und zwei Insertfragmente (x) mit Vektoranteil ($52 + x$ bp, $7212 + x$ bp). Es ist hier zu bedenken, dass Fragmente gleicher Größe nicht zwangsläufig homologe Abschnitte sein müssen und dass das Auftrennungsvermögen der Fragmente im Gel begrenzt ist, so dass unterschiedlich große Fragmente möglicherweise nicht mehr aufgetrennt werden. Mit dieser Methode konnte die Größe des überlappenden Bereichs also nur geschätzt werden. Von den weiter rechts im Contig liegenden sehr ähnlichen BACs wurden nur die zwei Klone F7F2 und F23H22 in die Analyse mit einbezogen. In Abb. 3-2 wird beispielhaft die Restriktionsanalyse einiger BACs gezeigt. In Tab. 3-3 sind die Größen der homologen Bereiche angegeben. Die Werte in der Tabelle entsprechen teilweise den durchschnittlichen Werten des *EcoRI*- und *HindIII*-Verdaus, teilweise beziehen sie sich auch nur auf den *EcoRI*-Verdau, je nachdem, wie gut die Einzelbanden auswertbar waren.

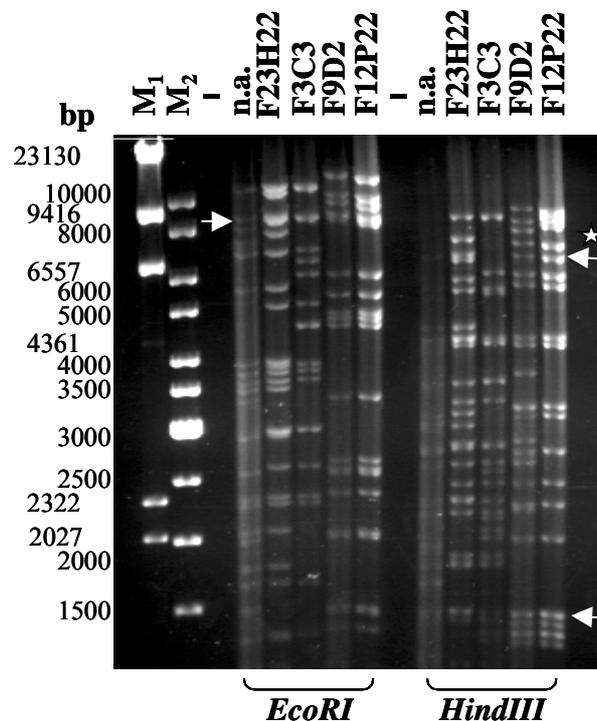


Abb. 3-2: Restriktionsanalyse von BACs zur Bestimmung überlappender Bereiche.

- ▶ Vektorfragment,
- ▶* Vektorfragment 7212 bp + x bp Insert
- n. a.: nicht analysiert
- M₁: Lambda DNA *HindIII* Marker
- M₂: 1 kb Marker

Tab. 3-3: Restriktionsanalyse der BAC-Klone. Angegeben sind die homologen Abschnitte (Summe der Einzelbanden [kb]) von jeweils zwei BACs.

BAC	F22P6	F25A9	F14M12	F9D2	F12P22	F3C3	F23H22	F7F2
F22P6		45,8	57,7	-	-	-	-	-
F25A9	45,8		25,7	-	-	-	-	-
F14M12	57,7	25,7		55,7	43,0	-	-	-
F9D2	-	-	55,7		65,3	13,3	-	-
F12P22	-	-	43,0	65,3		13,3	-	-
F3C3	-	-	-	13,3	13,3		44,0	41,2
F23H22	-	-	-	-	-	44,0		55,4
F7F2	-	-	-	-	-	41,2	55,4	

3.1.5 Ableitung spezifischer Primer von ausgewählten BAC-Enden

Nachdem durch Hybridisierungsexperimente BAC-Klone identifiziert wurden, die mit dem Marker rpHS-1 hybridisierten, und zusätzliche Klone identifiziert werden konnten, die mit diesen Klonen überlappen, wurden die Enden einiger dieser Klone (F11O20Sp6, F23G7T7, F3C3Sp6/T7, F9D2Sp6/T7, F14M12Sp6/T7, F12P22Sp6/T7, F7F2Sp6/T7) mit zwei im BAC-Vektor bindenden Primern (BAC-2, BAC-3, siehe Abb. 2-4) sequenziert. Es zeigte sich, dass die Endfragmente einiger dieser BAC-Klone identisch sind. Das Sp6-Ende von F11O20 ist homolog zum T7-Ende von F23G7 und das Sp6-Ende von F12P22 ist homolog zum T7-Ende von F9D2. Alle diese vier Enden entsprechen im Contig den rechten Enden der jeweiligen Klone (siehe Abb. 3-3). Von allen Sequenzen (ca. 600 bp) wurden dann Primer abgeleitet, die ein spezifisches Fragment des jeweiligen BAC-Endes amplifizieren. Durch einen Vergleich der Sequenzen mit öffentlichen Datenbanken (NCBI BLAST: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>) wurde kontrolliert, ob es sich möglicherweise um repetitive oder duplizierte Sequenzabschnitte handelt, die dann nicht mehr spezifisch für das BAC-Ende wären. Die Primerpositionen wurden so gewählt, dass möglichst ein DNA-Fragment von mindestens 300 bp entstand, damit diese Fragmente später auch als Hybridisierungssonden eingesetzt werden konnten. Um festzustellen, welches BAC-Ende mit welchem BAC-Klon überlappt, d. h. ob in den einzelnen BAC-Klonen gleiche Sequenzabschnitte kloniert sind, sollten mit diesen Primern in den verschiedenen Klonen homologe Bereiche identifiziert werden. Als Kontrolle wurde bei allen PCR-Reaktionen (siehe 2.2.22.2) immer der jeweilige BAC-Klon, von dem die Primer abgeleitet wurden, eingesetzt. Es wurden von den Enden von 8 BACs Primer abgeleitet, die spezifische Fragmente amplifizieren. In Tab. 2-3 sind diese Primer mit den zugehörigen Daten und PCR-Fragmentgrößen aufgelistet, und in Tab. 3-4 sind die PCR-Ergebnisse zusammengefasst. Zusätzlich wurden auch alle YAC-Klone des zuvor erstellten YAC-Contigs in die PCR-Analysen mit einbezogen, um die Lage der BACs auch in Bezug auf das YAC-Contig zu ermitteln. Anhand dieser PCR-Ergebnisse und unter Einbeziehung der Daten der Hybridisierungen und Restriktionsanalysen der BAC-Klone war es möglich, die Klone in einem Contig (siehe Abb. 3-3) anzuordnen.

Tab. 3-4: Ergebnisse der PCR- und Hybridisierungsexperimente, die zur Erstellung des BAC-Contigs durchgeführt wurden. Die PCR wurde mit den spezifischen Primern (hier nicht angegeben) für das jeweilige BAC-Ende (z. B. F14M12 Sp6) bzw. dem Primerpaar S3/S4 durchgeführt.

<u>BAC/YAC</u>	PCR (S3/S4)	Hybr. mit m253	PCR F14M12 Sp6	PCR F25A9 Sp6	PCR F9D2 Sp6	PCR F12P22 T7	PCR F14M12 T7	PCR F3C3 T7	PCR F9D2 T7	PCR F12P22 Sp6	PCR F7F2 Sp6	PCR F3C3 Sp6	Hybr. mit rpHS-1	PCR F7F2 T7
F25A9	+	+	+	+	-	-	-							
F22P6	+	+	+	+	-	-	-							
F14M12	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
F9D2	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
F12P22	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-
F3C3	-	-	?	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-
F7F2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
F23H22	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-
F5A5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-
F18O20	-	-	?	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-
F23G7	-	-	?	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-
F11O20	-	-	?	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-
F5D14	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
F11F17	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
F5P17	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CIC12F4	+	-	(+)	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
CIC12F3	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
CIC12A8	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
CIC3H11	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
CIC10D4	-	-	-	?	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
Yup1B3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-
Yup19F5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
CIC7G6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

+ : BAC-End-spezifisches PCR-Produkt [(+) schwaches Produkt] bzw. Hybridisierungssignal

- : kein PCR-Produkt bzw. kein Hybridisierungssignal

? : Ergebnisse nicht eindeutig auswertbar

□ : nicht durchgeführt

3.1.6 Anordnung der BAC-Klone zu einem Contig

Es wurden 15 BAC-Klone identifiziert, die genomische DNA der *RPBI*-Region enthalten. Anhand von PCR- und Hybridisierungsexperimenten konnten einige bereits kartierte Marker (S3/S4, m253, rpHS-1) auf diesen BAC-Klonen nachgewiesen werden. Außerdem wurde die Größe der in diesen BACs klonierten Fragmente und die Größe der überlappenden Bereiche der einzelnen Klone bestimmt. Spezifische Primer für die verschiedenen BAC-Enden wurden eingesetzt, um zu überprüfen, ob die DNA-Abschnitte, an denen sie binden, auch in anderen BAC-Klonen vorhanden sind. So konnten überlappende BACs identifiziert werden. Des Weiteren konnten 8 BAC-Enden auch als sehr eng gekoppelte Marker kartiert werden (siehe 3.5.3). Aus der Gesamtheit aller Ergebnisse konnte schließlich das in Abb. 3-3 dargestellte BAC-Contig erstellt werden. Das Contig ist lückenlos und überspannt den Resistenzlocus, was durch Hybridisierungen mit Markern rechts und links von *RPBI* und die Kartierung der Enden des BACs F9D2 rechts und links von *RPBI* bestätigt wurde.

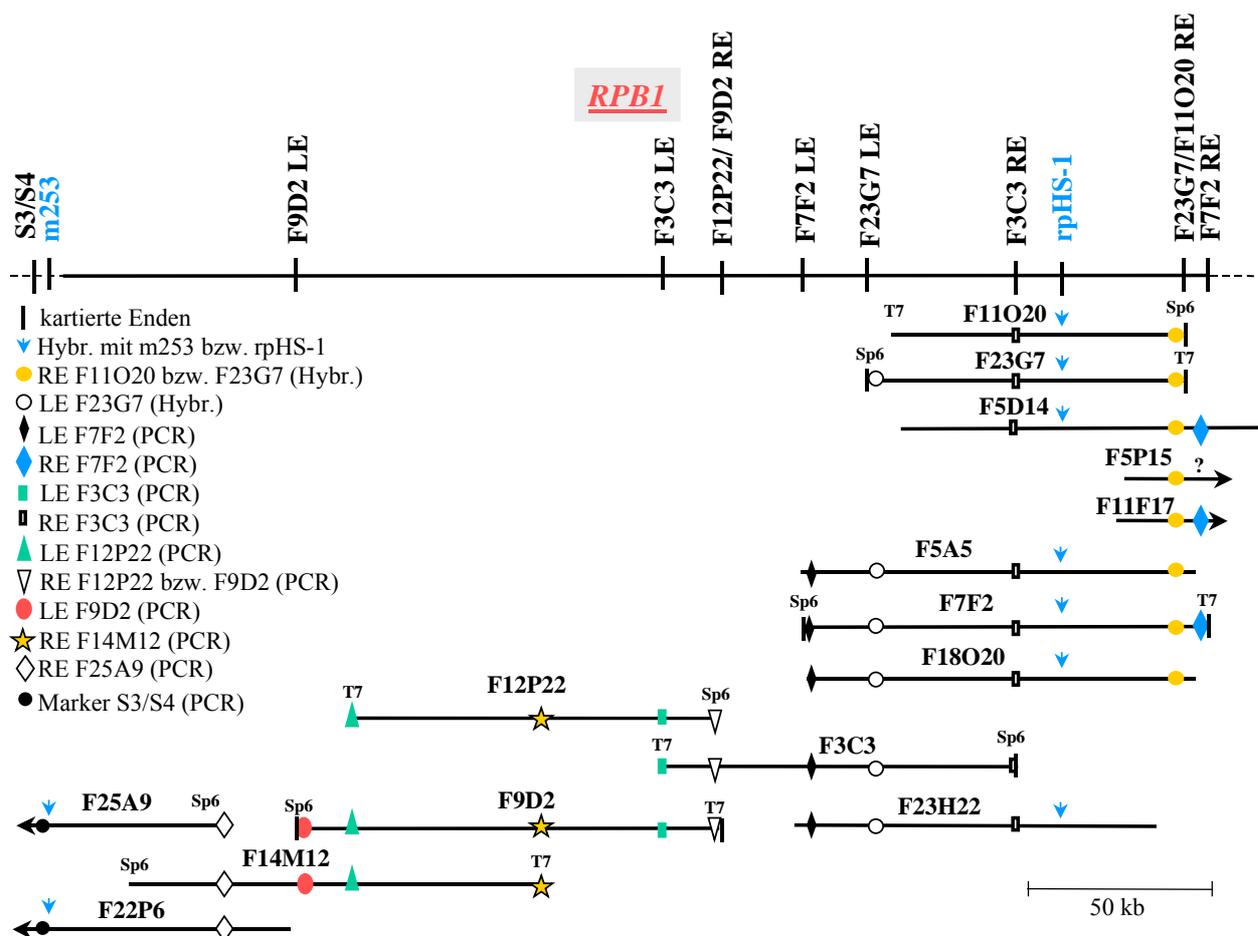


Abb. 3-3: Physikalische Karte (BAC-Contig) für die Region um das Resistenzgen *RPBI* auf Chromosom 1 von *Arabidopsis thaliana*.

3.1.7 Subklonierung des BACs F3C3

Um für das Screening der Cosmidbibliotheken auch größere DNA-Sonden einsetzen zu können, wurde der BAC-Klon F3C3 subkloniert (siehe 2.2.24.2), so dass auch interne Fragmente dieses BACs zur Suche nach Cosmiden in dieser Region eingesetzt werden konnten. Nach den zu diesem Zeitpunkt vorliegenden Kartierungsdaten bestand die Möglichkeit, dass dieser Klon den Resistenzlocus überspannt. Es konnten 19 Subklone mit unterschiedlichen Insertgrößen zwischen 300 bis 6000 bp hergestellt werden. Die Insertgrößen wurden mittels PCR bzw. durch Herausschneiden des Inserts aus dem Vektor (siehe 2.2.24.2) bestimmt. Da keiner dieser Subklone mit dem BAC F9D2 hybridisierte, wurden folglich keine DNA-Fragmente aus dem überlappenden Bereich mit diesem weiter links im Contig liegenden BAC kloniert.

3.2 Molekulare Analyse in der *RPBI*-Region anhand veröffentlichter BAC-Sequenzen

Aufgrund der fortschreitenden Arbeiten im *Arabidopsis*-Sequenzierungsprojekt (AGI) wurden immer mehr Sequenzen von BAC-Enden oder auch vollständigen BAC-Klonen öffentlich zugänglich gemacht (<http://www.arabidopsis.org/home.html>). So konnten die im Rahmen dieser Arbeit erhaltenen Sequenzdaten und Hybridisierungsergebnisse teilweise mit veröffentlichten Daten verglichen werden.

Einer der vollständig sequenzierten BACs ist der Klon F3C3 aus der IGF-BAC-Bibliothek, der Teil des für die *RPBI*-Region erstellten BAC-Contigs ist (siehe Abb. 3-3). Anfangs standen nur die Endsequenzen dieses Klons zur Verfügung, später dann die vollständige Sequenz (EMBL: AC084165). Bei einem Vergleich der veröffentlichten Sequenzen mit den eigenen Sequenzdaten der Enden konnte festgestellt werden, dass die Sequenzen der Sp6-Enden (rechtes Ende im Contig) übereinstimmten. Die Sequenz des im Rahmen dieser Arbeit isolierten linken BAC-Endes (T7-Ende) stimmte dagegen nicht mit der veröffentlichten Endsequenz überein. Da das mittels PCR isolierte BAC-Ende anhand von PCR- und Kartierungsdaten im Contig fixiert werden konnte, wurde ausgeschlossen, dass es sich um einen chimären Klon oder die Sequenzierung einer falschen DNA-Probe handelte. Anhand der veröffentlichten Sequenzdaten des BACs T12O21 (siehe unten) stellte sich dann später heraus, dass der Klon F3C3 am T7-Ende (linkes Ende im Contig) um 8162 bp länger ist als in der veröffentlichten Sequenz (siehe Abb. 3-4).

Außerdem konnte ein zweiter vollständig sequenzierter BAC-Klon, T12O21, einer anderen BAC-Bibliothek (TAMU BAC library, Choi *et al.* 1995) anhand veröffentlichter Sequenzen identifiziert werden. Dieser Klon hat im Contig die gleiche Position wie der IGF-Klon F9D2, ist jedoch etwas kleiner. In der Sequenz dieses BACs T12O21 konnten die zuvor erwähnten unterschiedlichen T7-Enden des Klons F3C3 lokalisiert werden (siehe Abb. 3-4). Da der Klon F9D2 den Resistenzlocus überspannt, konnte davon ausgegangen werden, dass die vorliegende Sequenz des Klons T12O21 den Resistenzlocus ebenfalls überspannt. Um diese Annahme abzusichern, sollten die Enden und gegebenenfalls auch interne Fragmente dieses

BAC-Klons kartiert werden. Hierfür wurden von der vollständig veröffentlichten Sequenz (EMBL: AC074309) spezifische Primer an den gewünschten Positionen im BAC abgeleitet und zur Amplifikation der spezifischen Fragmente aus genomischer DNA eingesetzt. Zuerst konnte das rechte BAC-Ende (T12O21AB) mit einer Rekombinanten rechts von *RPBI* kartiert werden. Zwei interne Fragmente (T12O21ST, T12O21WX) wurden als RFLP-Marker cosegregierend (0 Rekombinanten) mit *RPBI* kartiert. Auch das interne Fragment T12O21UV wurde als allelspezifischer PCR-Marker (siehe 3.5.3) cosegregierend mit *RPBI* kartiert. Das linke BAC-Ende wurde - mit gleichem Abstand (0,024 cM) zum Resistenzlocus wie das rechte BAC-Ende - links vom Resistenzlocus als RFLP-Marker kartiert (1 Rekombinante).

Neben den Primern der beschriebenen kartierten BAC-Fragmente wurden noch weitere Primerpaare von der Sequenz des Klons T12O21 abgeleitet, die, über den gesamten Klon verteilt, Fragmente von einigen hundert Basenpaaren amplifizieren. Einige mit diesen Primern amplifizierte Fragmente konnten aufgrund von Homologien zu anderen Bereichen im *Arabidopsis*-Genom nicht kartiert werden (siehe 3.5.3). Andere Primerpaare haben nicht in allen untersuchten *Arabidopsis*-Ökotypen (Tsu, Cvi, RLD, Col) bzw. nur im Ökotyp Col das erwartete PCR-Produkt amplifiziert, was ein Hinweis auf Nukleotid-Polymorphismen zwischen den verschiedenen Ökotypen bzw. Deletionen/Insertionen ganzer Abschnitte war (siehe 3.7.1). Ein Teil der Primerpaare, die in codierenden Sequenzbereichen auf diesem BAC binden, wurden in Analysen bezüglich der Expression dieser codierenden Bereiche eingesetzt (siehe 3.6).

Die Sequenzen und Annealingtemperaturen aller Primer und die Größen der PCR-Produkte sind in Tab. 2-4 aufgelistet. Die Kartierungsdaten sind in Tab. 3-7 und die Einzelergebnisse für die untersuchten Pflanzen der Kartierungspopulation in Tab. 6-1 (Anhang) zusammengefasst.

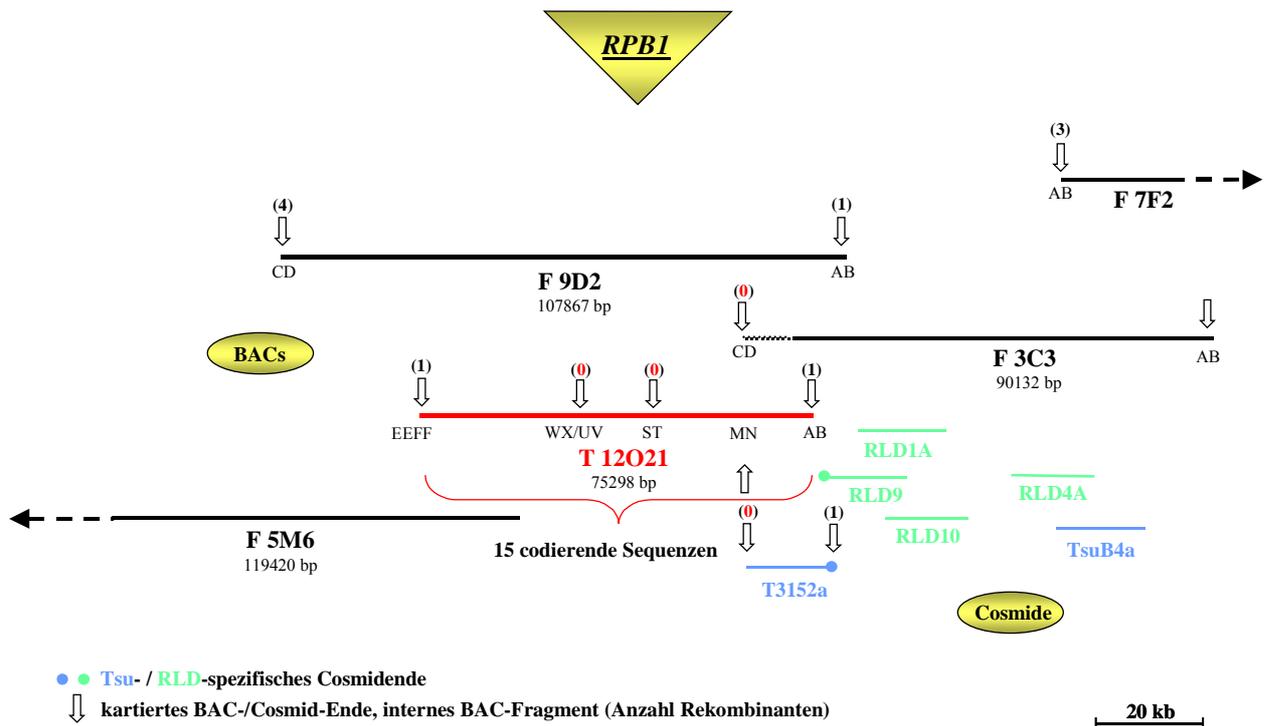


Abb. 3-4: Hochauflösende physikalische Karte (BAC-Contig) der *RPBI*-Region. Die Buchstaben unterhalb der kartierten Fragmente bezeichnen die Primerpaare des jeweiligen BACs, die das kartierte Fragment amplifizieren. Die in Klammern angegebenen Zahlen entsprechen der Anzahl an Rekombinanten für den jeweiligen Marker, bezogen auf die gesamte Kartierungspopulation. Von den drei BAC-Klonen F3C3, T12O21 und F5M6 stehen die vollständigen Sequenzen zur Verfügung. Die im unteren Bildabschnitt dargestellten Cosmide wurden aus zwei Cosmidbibliotheken (Tsu-/RLD-) isoliert und konnten anhand von Kartierungs- bzw. Sequenzdaten im Contig positioniert werden.

3.3 Herstellung einer Cosmidbibliothek des *Arabidopsis*-Ökotyps Tsu

Die für die Kartierung verwendeten YAC- und BAC-Klone enthalten DNA-Fragmente des *Arabidopsis*-Ökotyps Col. Da dieser Ökotyp anfällig gegenüber *P. brassicae* ist und somit nicht das Resistenzgen bzw. das Allel für die Resistenzausprägung trägt, wurde eine Cosmidbibliothek des resistenten Ökotyps Tsu erstellt. Zur Herstellung der Bibliothek wurde ein Binärvektor verwendet, der später direkt zur Transformation von Pflanzen mittels *Agrobacterium tumefaciens* eingesetzt werden kann. Der Vektor enthält zwei Markergene zur Selektion, ein Kanamycinresistenzgen in der T-DNA und ein Tetracyclinresistenzgen im Cosmidvektor. Mit diesem Vektor konnten DNA-Fragmente einer Größe von 9 bis 23 kb kloniert werden. Die Herstellung der Bibliothek erfolgte wie unter 2.2.25 beschrieben.

Die erstellte Cosmidbibliothek enthält ca. 13000 unabhängige Klone, was bei einer Genomgröße von etwa 130 Mb einer ca. 1,7-fachen Repräsentation des *Arabidopsis*-Genoms entspricht. Es wurden sowohl von der Gesamtbibliothek als auch von den einzelnen Fraktionen dieser Bibliothek (Spülung von je einer Petrischale) Glycerindauerkulturen (siehe 2.2.30) angefertigt. Die durch Restriktionsanalysen (siehe 2.2.25) ermittelte durchschnittliche Insertgröße der Cosmidklone beträgt 16,7 kb. Es wurde von 64 zufällig ausgewählten Klonen die Insertgröße ermittelt und der durchschnittliche Wert berechnet. In Abb. 3-5 ist beispielhaft die Restriktionsanalyse einiger Klone dargestellt. Die Bibliothek wurde mittels PCR auf das Vorhandensein spezifischer DNA-Bereiche aus dem für die Kartierung relevanten Bereich auf Chromosom 1 getestet. So konnte in ersten Untersuchungen gezeigt werden, dass ein dem kartierten Marker AIG1 entsprechender DNA-Abschnitt in der Bibliothek vorhanden ist. Später wurden dann auch spezifische BAC-End-Primer zur Durchmusterung der Bibliothek eingesetzt (siehe 3.4).

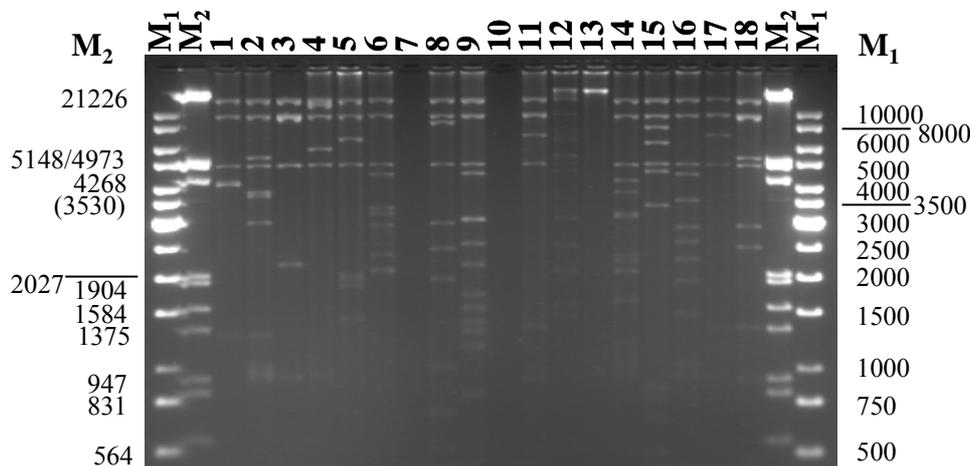


Abb. 3-5: Restriktionsanalyse (*EcoRV* + *XbaI*) der Tsu-Cosmidklone
M₁: 1 kb Marker
M₂: Lambda *EcoRI/HindIII* Marker

3.4 Durchmusterung von Cosmidbibliotheken mit BAC-Fragmenten

Nachdem ein BAC-Contig für die *RPBI*-Region erstellt wurde (siehe 3.1.6), sollten aus der selbst hergestellten Tsu-Cosmidbibliothek (siehe 3.3) und auch aus einer weiteren, von E. Grill (TU München) zur Verfügung gestellten, Cosmidbibliothek des Ökotyps RLD Klone isoliert werden, die DNA-Fragmente aus dem am engsten mit dem Resistenzlocus gekoppelten Bereich enthalten. Diese Klone sollten wenn möglich zu einem Contig angeordnet bzw. kartiert werden, um die *RPBI*-Region weiter einzugrenzen. Der *Arabidopsis*-Ökotyp RLD hatte sich aufgrund neuester Resistenztests als resistent gegenüber *P. brassicae* erwiesen (Arbeiter *et al.* 2001). Für die Identifizierung von Cosmidklonen wurden verschiedene BAC-Endfragmente, eine Mischung unterschiedlicher Subklone des BACs F3C3 (6 Klone mit unterschiedlicher Insertgröße, siehe Tab. 3-5) und später auch das

Endfragment eines isolierten Cosmidklons als Sonden eingesetzt. Die Durchmusterung der Bibliotheken mit den unterschiedlichen Sonden erfolgte zu verschiedenen Zeitpunkten der fortschreitenden Kartierungsarbeiten, so dass auch Klone isoliert wurden, die dann aufgrund neuerer Kartierungsergebnisse für spätere Transformationsexperimente nicht mehr relevant waren. Im ersten Teil dieser Arbeiten wurden beide Cosmidbibliotheken durchmusterung (Sonden: F3C3RE und unterschiedliche F3C3-Subklone). Nachdem neue Kartierungsdaten zur Verfügung standen, wurde mit den weiteren näher am Resistenzlocus kartierten Markern im zweiten Teil dieser Arbeiten nur noch die Tsu-Cosmidbibliothek durchmusterung. Bevor mit der Durchmusterung der Bibliotheken begonnen wurde, wurden die Gesamtbänke bzw. einzelne Cosmidfraktionen zuerst mittels PCR mit den spezifischen BAC-End-Primern auf das Vorhandensein der entsprechenden DNA-Fragmente untersucht. Später wurden dann nur diejenigen Bakteriensuspensionen ausplattiert, die zuvor positive PCR-Ergebnisse geliefert haben. Einzelklone konnten i. d. R. bereits nach dem ersten Rescreening (siehe 2.2.26 und Abb. 3-6) isoliert werden. In Abb. 3-6 sind beispielhaft die Autoradiogramme eines ersten Screenings (Masterfilter) und ersten Rescreenings dargestellt.

Nach der Isolierung von Einzelklonen wurde eine Kontrollhybridisierung mit den zuvor eingesetzten Sonden durchgeführt, um sicherzustellen, dass Signale auf dem Röntgenfilm nicht falsch interpretiert oder einem falschen Klon zugeordnet wurden, und die isolierten Klone auch den gewünschten DNA-Abschnitt enthielten. Die Insertgröße der Klone und die Größe identischer, d. h. überlappender Abschnitte der isolierten Klone wurde mittels einer Restriktionsanalyse (siehe 2.2.25) bestimmt. Außerdem konnten so auch identische Klone identifiziert werden.

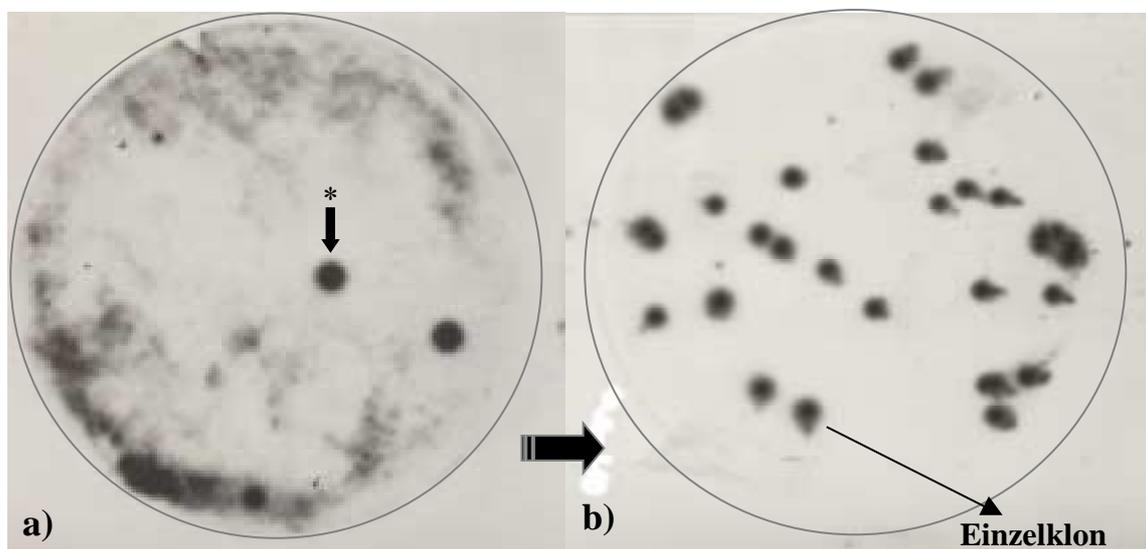


Abb. 3-6: Autoradiogramme eines Cosmidbankscreenings. Als Sonde wurde das rechte Ende des BACs T12O21 eingesetzt, und isoliert wurde der Cosmidklon T3152a.

- a) erstes Screening (*Bereich um das Signal konnte noch keinem Einzelklon zugeordnet werden)
- b) Rescreening

Es konnten im ersten Teil (Durchmusterung beider Bibliotheken) dieser Arbeiten sechs RLD-Klone und zwei Tsu-Klone isoliert werden. Fünf dieser Klone wurden von beiden Seiten ansequenziert, um gegebenenfalls Primer abzuleiten und Vergleiche mit *Arabidopsis*-Datenbanken vornehmen zu können. Drei Klone, die nur mit dem rechten Ende des BACs F3C3 hybridisierten, wurden nicht ansequenziert, da dieses BAC-Ende nach neuesten Kartierungsdaten nicht mehr der am engsten gekoppelte Marker war. Das linke Ende des BACs F7F2 wurde als neuer, rechts vom Resistenzlocus noch enger gekoppelter Marker kartiert. Es wurde deshalb auch kontrolliert, welche der isolierten Cosmidklone mit diesem BAC-Ende hybridisierten (siehe Tab. 3-5). Alle fünf ansequenzierten Cosmidklone konnten anhand eines Vergleichs mit der Gesamtsequenz des BACs F3C3 im BAC-Contig positioniert werden (siehe Abb. 3-4). Ein Ende des am weitesten links liegenden Klons RLD9 zeigte keinerlei Sequenz-Homologien zu Sequenzen der Datenbanken, und es wurde davon ausgegangen, dass es sich um einen Ökotyp-, d. h. RLD-spezifischen DNA-Abschnitt handelt.

Im Anschluss an diese Arbeiten konnte dann ein weiterer, noch enger gekoppelter Marker rechts von *RPB1* kartiert werden. Es handelte sich hierbei um das rechte Ende des BACs F9D2. Somit waren die isolierten Cosmidklone für anschließende Transformationsexperimente nicht mehr relevant, da sie rechts von diesem neu kartierten BAC-Ende lagen und somit keine resistenzvermittelnden DNA-Fragmente enthalten konnten.

Nachdem aktualisierte Kartierungsdaten vorlagen, wurde die Tsu-Cosmidbibliothek erneut nach Cosmidklonen durchmustert. Als Sonden wurden drei neu kartierte, sehr eng gekoppelte BAC-Enden (F3C3LE, F9D2RE, T12O21RE) eingesetzt. Mit den Sonden F3C3LE und F9D2RE konnten keine Cosmide in der Tsu-Bibliothek identifiziert werden. Es wurden jeweils 5 Masterfilter gescreent. Auf jedem Filter waren ca. 10000 Klone, so dass davon ausgegangen wurde, dass die Bibliothek, die ca. 13000 unabhängige Klone enthält, ausreichend getestet wurde und keine entsprechenden Cosmide in der Bibliothek enthalten sind. Mit der Sonde T12O21RE konnte ein Cosmidklon (T3152a) identifiziert werden. Beide Enden dieses Klons wurden sequenziert, und ein Ende konnte aufgrund der Sequenzdaten im Contig auf dem BAC T12O21 positioniert werden. Es wurden dann spezifische Primer (T12O21M+N) für dieses Cosmidende abgeleitet und das PCR-Fragment wurde kartiert und zeigte Cosegregation mit dem Resistenzlocus (0 Rekombinanten). Die Sequenz des anderen Cosmidendes erwies sich als ein Tsu-spezifischer DNA-Abschnitt, der dann als allelspezifischer PCR-Marker rechts vom Resistenzlocus (1 Rekombinante) kartiert werden konnte (siehe 3.5.3). Sequenzvergleiche dieses Tsu-spezifischen Cosmidendes mit dem zuvor genannten RLD-spezifischen Cosmidende des Klons RLD9 zeigten Homologien in einem 350 bp großen Abschnitt, so dass eine Überlappung dieser Enden (ca. 850 bp) gezeigt werden konnte. Diese Sequenzhomologien sind ein weiterer Hinweis auf Ähnlichkeiten dieser zwei resistenten Ökotypen. Die Position des Cosmidklons T3152a (geschätzte Größe ca. 16,6 kb) konnte anhand der Sequenz- und Kartierungsdaten im BAC-Contig fixiert werden (siehe Abb. 3-4).

Um weitere Cosmidklone zu isolieren, die Abschnitte des cosegregierenden Bereichs enthalten, wurde die Tsu-Cosmidbibliothek im Anschluss mit der Sonde T12O21MN (linkes Ende des Cosmids T3152a) durchmustert. Es konnten keine neuen Cosmide identifiziert werden.

Die verwendeten Sonden und damit isolierten Cosmidklone sind in Tab. 3-5 zusammengefasst, und die Positionen aller beschriebenen Cosmidklone sind in Abb. 3-4 dargestellt. Die Reihenfolge der Auflistung der entsprechenden Sonden in Tab. 3-5 entspricht dem zeitlichen Verlauf der durchgeführten Experimente.

Tab. 3-5: Isolierte Cosmidklone (Tsu-/RLD-Bibliothek), die anhand der Hybridisierungs- und Sequenzierungsdaten der *RPBI*-Region zugeordnet werden konnten.

Cosmid	Größe [kb]	identifiziert mit Sonde...	Hybr. mit ...		Sequ.
			F3C3RE	F7F2LE	
Tsu1.2	ca. 14,5	F3C3RE	ja	nein	nein
RLD1A	ca. 14,8	F3C3-Subklon-Mix ₁	nein	nein	ja
RLD4A	ca. 15,4	F3C3-Subklon-Mix ₁	nein	ja	ja
RLD2A	ca. 16,8	F3C3-Subklon-Mix ₁	ja	nein	nein
RLD5A	ca. 16,4	F3C3-Subklon-Mix ₁	ja	nein	nein
RLD9	ca. 16,0	F3C3-Subklon L10.25	-	nein	ja
RLD10	ca. 13,0	F3C3-Subklon L10.25	-	nein	ja
TsuB4A	ca. 15,5	F3C3-Subklon-Mix ₂	-	ja	ja
T3152a	ca. 16,6	T12O21RE	-	-	ja

Subklon-Mix₁: Subklone L6.1 (1600bp), L8.7 (4500bp), L10.13 (1800bp), L10.25 (1200bp)

Subklon-Mix₂: Subklone L10.13 (1800bp), L10.25 (1200bp), L10.27 (2700bp)

- : es wurde keine Hybridisierungsanalyse durchgeführt

Um erste Hinweise zu erhalten, ob für andere DNA-Abschnitte des BACs T12O21 entsprechende Cosmidklone in der Tsu-Bibliothek vorhanden sind, wurde die Bibliothek mittels PCR durchmustert. Hierfür wurden die Primer verwendet, die aus den 15 auf diesem BAC liegenden codierenden Sequenzabschnitten (CDS) abgeleitet wurden (siehe 3.2). Die ersten vier codierenden Sequenzen und ein Teil von CDS5 liegen auf dem bereits isolierten Cosmidklon T3152a. Es wurden jeweils zwei verschiedene Bakteriensuspensionen der Tsu-Gesamtbibliothek (siehe 2.2.25) mit den entsprechenden Primern untersucht. Mit diesem mittels PCR durchgeführten Screening konnten keine Klone in der Bibliothek nachgewiesen werden, die DNA-Abschnitte der anderen 10 CDS enthalten.

Ein Grund, weshalb keine weiteren Klone aus der *RPBI*-Region in der Tsu-Cosmidbibliothek identifiziert werden konnten, ist möglicherweise die geringe Größe dieser Cosmidbank. Diese Bibliothek repräsentiert das *Arabidopsis*-Genom nur in etwa 1,7-fachem Ausmaß, weshalb vielleicht nicht alle Abschnitte des Genoms in dieser Bibliothek vertreten sind.

Mit den isolierten Cosmiden konnte kein Contig erstellt werden, das die *RPBI*-Region überspannt. Der Cosmidklon T3152a enthält ein DNA-Fragment des resistenten Ökotyps Tsu, auf dem, entsprechend der Col-Sequenz, vier vollständige codierende Sequenzen (CDS1 - CDS4) und ein Teil von CDS5 liegen. CDS1 liegt direkt am rechten Ende des BACs T12O21, das mit einer Rekombinanten rechts von *RPBI* kartiert wurde. Die anderen drei codierenden Sequenzen liegen im als cosegregierend eingestuften Bereich (siehe 3.2). Das rechte Ende dieses Cosmidklons wurde bis zu einer Länge von 1530 bp sequenziert, wovon 1128 bp keinerlei Homologien zum Ökotyp Col zeigten (Tsu- bzw. RLD-spezifisches Fragment). Vom linken Ende aus wurde ein 8650 bp langer Abschnitt dieses Klons sequenziert. In diesem sequenzierten Abschnitt liegen das Teilstück von CDS5 und die vollständigen Abschnitte von CDS4 und CDS3. Zusätzlich wurde noch ein 1013 bp langes Fragment von CDS1 sequenziert, ausgehend vom Primer T12O21A (T12O21RE), was als Bestätigung diente, dass dieser Cosmidklon dieses BAC-Ende überspannt. Die Sequenzdaten sollten dem Vergleich der beiden Ökotypen Col und Tsu im mit *RPBI* cosegregierenden Bereich des Cosmids dienen. Um auch das nicht vollständig in diesem Cosmid klonierte Gen CDS5 vergleichen zu können, wurde ein 3441 bp großes Fragment, das diese codierende Sequenz vollständig enthält, im Ökotyp Tsu amplifiziert, kloniert ("pGEM T Vector System", siehe 2.2.24.1) und sequenziert. Somit war für die drei als cosegregierend eingestuften Gene CDS 3/4/5 ein Sequenzvergleich möglich, und es konnten Angaben über die Anzahl von Nukleotidunterschieden und fehlende bzw. zusätzliche größere Abschnitte gemacht werden. Die Ergebnisse sind in Kap. 3.7.2 beschrieben.

3. 5 Hochauflösende Kartierung in der *RPBI*-Region

In den vorangehenden Arbeiten (Köhn 1997) wurden 13 RFLP-Marker in einem Bereich von ca. 14,5 cM um den Resistenzlocus kartiert. Im Verlauf der vorliegenden Arbeit wurden zusätzlich 13 weitere RFLP-Marker und 4 PCR-Marker in einem Bereich von ca. 4,7 cM um den Resistenzlocus kartiert (YAC-/ BAC-/ Cosmid-Enden, interne BAC-Fragmente). Von diesen 17 neuen Markern liegen 13 Marker in unmittelbarer Nähe des Resistenzlocus in einem Abschnitt von ca. 0,2 cM (entspricht ca. 200 kb), so dass mit dieser hochauflösenden Kartierung die *RPBI*-Region erheblich eingegrenzt werden konnte. Die bereits zuvor kartierten Marker rPHS-1, AIG1 und m253 wurden weiterhin für die Untersuchung der Kartierungspopulation eingesetzt und deren Kartierungsdaten wurden aktualisiert. Der RFLP-Marker AIG1 konnte erfolgreich in einen allelspezifischen PCR-Marker für die Vorselektion umgewandelt werden. Ein zweiter allelspezifischer PCR-Marker (S3/S4) für die Vorselektion konnte von der Sequenz eines kartierten YAC-Endes abgeleitet werden. Ein Endfragment eines in der *RPBI*-Region identifizierten Cosmids (T3152a RE) und ein internes BAC-Fragment (T12O21UV) konnten ebenfalls als allelspezifische PCR-Marker kartiert werden. In den folgenden Kapiteln werden diese verschiedenen Marker detaillierter beschrieben. Die Anordnung der Marker und die aktuellen Kartierungsdaten sind in Abb. 3-3/3-4 und in Tab. 3-7 dargestellt. Die Einzelergebnisse aller Marker für die untersuchten Pflanzen der Kartierungspopulation sind im Anhang in Tab. 6-1 zu finden.

3.5.1 Etablierung neuer Marker für die Vorselektion auf Rekombinationsereignisse

Um eine hochauflösende Kartierung in unmittelbarer Nähe des Resistenzlocus durchführen zu können, mussten weitere Pflanzen mit Rekombinationsereignissen (im Folgenden als "rekombinante Pflanzen" bezeichnet) nahe dem Resistenzlocus identifiziert werden. Alle im folgenden Text mit einem Stern* gekennzeichneten Daten beziehen sich auf den Stand von 1997. Damit die Vorselektion solcher rekombinanten Pflanzen effektiver gestaltet und der Arbeitsaufwand herabgesetzt wird, wurden die RAPD-Marker L4 und S12 (9,1 cM* und 3,6 cM* Abstand zu *RPBI*) durch zwei näher am Resistenzlocus gelegene PCR-Marker ersetzt. Beide PCR-Marker liefern nur bei Vorliegen von DNA-Bereichen des resistenten Ökotyps Tsu ein Amplifikationsprodukt, so dass sehr schnell eine Bestimmung der DNA-Herkunft in diesem Abschnitt erfolgen kann. Als Ersatz für S12 wurde der bereits kartierte RFLP-Marker AIG1 (2,4 cM*) in einen allelspezifischen PCR-Marker (A3/B3) umgewandelt (siehe 2.2.12.1), indem nach Vergleich der Sequenzen der beide Ökotypen Tsu und Cvi ein Primer mit einer Nukleotidfehlpaarung am 3'-Ende abgeleitet wurde, so dass dieser Primer nur an der DNA des Ökotypen Tsu vollständig bindet. Der links vom Resistenzlocus lokalisierte Vorselektionsmarker L4 konnte durch den allelspezifischen PCR-Marker S3/S4 ersetzt werden, der vom linken Ende des YACs CIC3H11 abgeleitet wurde. Das links von *RPBI* kartierte YAC-Ende (siehe Abb. 1-1) lag mit einem Abstand von ca. 0,5 cM* (eng gekoppelt mit dem Marker m253) sehr viel näher am Resistenzlocus als der zuvor eingesetzte Marker L4 (9,1 cM*). Ein von diesem YAC-Ende abgeleitetes Primerpaar, das ein Amplifikationsprodukt von 1317 bp liefert, erwies sich als allelspezifisch (siehe 2.2.12.2). Der Einsatz solcher allelspezifischen Marker ist hier deshalb möglich, weil es sich bei den untersuchten Pflanzen um eine BC₁-Generation handelt, in der unter den resistenten Pflanzen nur heterozygote (Rr) Individuen auftreten können. Würde eine F₂-Generation als Kartierungspopulation verwendet, dann könnten mit diesen Markern Rekombinationsereignisse bei homozygot resistenten (RR) Pflanzen nicht nachgewiesen werden. Mit Hilfe dieser neuen Marker wurde der Bereich, in dem mittels Vorselektion nach Rekombinationsereignissen gesucht wird, von ca. 12,7* cM (L4 - S12) auf ca. 2,9 cM* (S3/S4 - A3/B3) eingegrenzt. So konnte eine größere Anzahl an BC₁-Pflanzen schneller untersucht werden, und es mussten weniger rekombinante Pflanzen einem zeit- und arbeitsaufwändigen Resistenztest unterzogen werden.

3.5.2 Vergrößerung der Kartierungspopulation

Die bereits bestehende Kartierungspopulation von 900 Pflanzen (Stand 1997*) wurde im Verlauf der vorliegenden Arbeit auf 4230 Pflanzen vergrößert. Da aufgrund der fortschreitenden Feinkartierung nur noch Pflanzen mit Rekombinationsereignissen sehr nahe am Resistenzlocus für die Kartierung von Interesse waren, wurden nacheinander die beiden unter 3.5.1 beschriebenen neuen allelspezifischen PCR-Marker A3/B3 und S3/S4 für die Vorselektion eingesetzt. Die Vorselektion erfolgte zunächst mit dem RAPD-Marker L4 und dem neuen allelspezifischen PCR-Marker A3/B3 (siehe Abb. 3-7) und später mit den beiden allelspezifischen Markern A3/B3 und S3/S4. Der Bereich, in dem Rekombinationsereignisse erfasst wurden, wurde so immer weiter eingegrenzt. Der zuvor als cosegregierend* mit *RPBI* kartierte Marker rpHS-1 konnte gleich zu Beginn der Kartierungsarbeiten mit einem Abstand von 0,1 cM rechts vom Resistenzlocus kartiert werden. Die nach der Vorselektion identifizierten rekombinanten Pflanzen wurden deshalb in einem zweiten Selektionsschritt mit dem RFLP-Marker rpHS-1 untersucht, um den Bereich mit Rekombinationsereignissen weiter einzugrenzen. Es wurden schließlich nur diejenigen Pflanzen einem Resistenztest unterzogen, die ein Rekombinationsereignis zwischen dem Vorselektionsmarker S3/S4 und dem Marker rpHS-1 aufwiesen. Der Resistenztest war notwendig, um zuordnen zu können, ob die Rekombination links oder rechts von *RPBI* stattgefunden hatte. Nach der Lokalisation des Rekombinationsortes konnten diese Pflanzen dann für die Kartierung weiterer neuer Marker in diesem Bereich eingesetzt werden. Die berechneten genetischen Distanzen dieser drei Marker sind in Tab. 3-7 und die mittels dieser Marker selektierten Pflanzen der Kartierungspopulation in Tab. 6-1 (Anhang) zu finden.

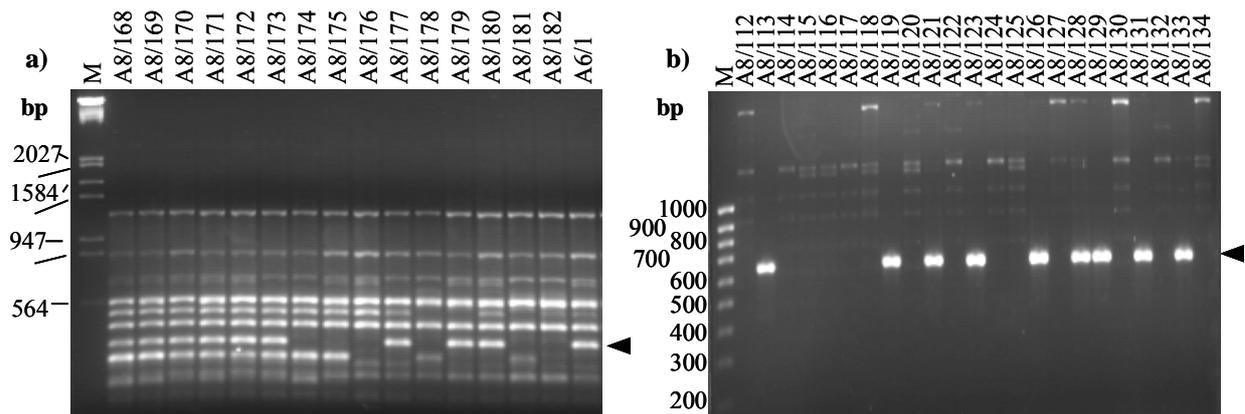


Abb. 3-7: Zur Vorselektion eingesetzte PCR-Marker.
 a) Bandenmuster der Amplifikationsprodukte des RAPD-Markers L4
 b) Amplifikationsprodukt des allelspezifischen Markers A3/B3
 ► polymorphe Bande (Tsu-spezifisch)

3.5.3 Kartierung neuer RFLP- und PCR-Marker

Es konnten 10 BAC-Enden in RFLP-Marker umgewandelt und kartiert werden. Auch die beiden Endfragmente eines Cosmidklons (siehe 3.4) konnten kartiert werden. Das linke Cosmidende wurde als RFLP-Marker kartiert. Das rechte Ende ist eine für den *Arabidopsis*-Ökotypen Tsu spezifische DNA-Sequenz (1128 bp), die keine Homologien zu anderen in der *Arabidopsis*-Datenbank registrierten Sequenzen zeigt. Es wurden spezifische Primer für dieses Tsu-spezifische Endfragment abgeleitet. Dieses Cosmidende konnte dann, vergleichbar mit den allelspezifischen Markern A3/B3 und S3/S4, mittels PCR rechts von *RPBI* kartiert werden. Alle weiteren neu kartierten Marker wurden von internen Bereichen des BACs T12O21 abgeleitet, indem von der im Internet zugänglichen Sequenz dieses BAC-Klons (EMBL: AC074309) spezifische Primer abgeleitet wurden, mit denen DNA-Fragmente von 400 – 1000 bp amplifiziert werden konnten (siehe 3.1.5). Die von diesen Primern amplifizierten DNA-Fragmente wurden dann als Sonden für die Hybridisierung eingesetzt, um einen RFLP zwischen den beiden Ökotypen Tsu und Cvi zu identifizieren. In Tab. 3-6 sind diejenigen Restriktionsenzyme aufgelistet, die zur Kartierung der RFLP-Marker eingesetzt wurden. Alle anderen Restriktionsenzyme, mit denen weitere Polymorphismen identifiziert werden konnten, wurden hier nicht aufgelistet. In Abb. 3-8 werden beispielhaft Kartierungsergebnisse (Autoradiogramme) einiger RFLP-Marker gezeigt. Mit Ausnahme des Fragments T12O21UV wurden alle internen BAC-Fragmente als RFLP-Marker kartiert. Neben den Pflanzen mit Rekombinationsereignissen sehr nahe am Resistenzlocus, die für eine Kartierung des neuen Markers untersucht werden mussten, wurden zusätzlich auch immer Kontrollpflanzen mit dem neu zu kartierenden Marker untersucht, damit ausgeschlossen werden konnte, dass der untersuchte Marker Homologien zu anderen Bereichen im Genom zeigt (z. B. bei repetitiven Elementen oder einer Duplikation). Ohne diese Kontrollen würden fehlerhafte Kartierungsergebnisse möglicherweise unerkannt bleiben. Zwei BAC-Fragmente konnten aufgrund solcher Probleme nicht kartiert werden. Sequenzvergleiche mit den Datenbanken zeigten, dass das rechte Ende des BACs F5M6 (712 bp) aufgrund von Homologien größerer Abschnitte zu Bereichen auf den Chromosomen 2 und 3 nicht kartiert werden konnte. Ein internes Fragment des BACs T12O21 (T12O21CD, 553 bp) konnte ebenfalls aufgrund von starken Homologien großer Abschnitte zu einem Bereich auf Chromosom 5 nicht kartiert werden.

F5M6 RE (712 bp): 82 % Homologie (von Position 28-259) zu Chromosom 2
84 % Homologie (von Position 9-209) zu Chromosom 3
78 % Homologie (von Position 240-404) zu Chromosom 3
Homologien kleinerer Abschnitte von 20-30 bp zu Bereichen auf allen 5 Chromosomen

T12O21CD (553 bp): 96% Homologie (von Position 123-553) zu Chromosom 5
100% Homologie (von Position 1-114) zu Chromosom 5

Tab. 3-6: In der *RPB1*-Region kartierte RFLP-Marker und die zugehörigen Restriktionsenzyme, die zur Detektion des Polymorphismus zwischen den *Arabidopsis*-Ökotypen Tsu und Cvi verwendet wurden.

RFLP-Marker	Restriktionsenzym
m253	<i>XbaI</i>
rpHS-1	<i>Xba I</i>
AIG1	<i>HindIII</i>
YAC CIC12A8 RE	<i>AccI</i>
YAC CIC12A8 LE	<i>BglII</i>
BAC F23G7 LE	<i>PvuII, ScaI</i>
BAC F11O20 RE	<i>BanII</i>
BAC F7F2 LE	<i>XbaI, DraI</i>
BAC F7F2 RE	<i>EcoRI</i>
BAC F3C3 LE	<i>EcoRI</i>
BAC F3C3 RE	<i>XbaI, ClaI</i>
BAC F9D2 LE	<i>EcoRV</i>
BAC F9D2 RE	<i>XbaI</i>
BAC T12O21 RE	<i>ScaI</i>
BAC T12O21 LE	<i>SacI</i>
BAC T12O21 MN	<i>EcoRI</i>
BAC T12O21 ST	<i>EcoRI, DraI</i>
BAC T12O21 WX	<i>BamHI</i>

Ein internes BAC-Fragment, T12O21UV, konnte als allelspezifischer PCR-Marker kartiert werden. Bei der Amplifikation dieses BAC-Fragments mit den Primern T12O21 U+V zeigte sich, dass beim Ökotyp Cvi kein PCR-Produkt bzw. nur eine geringe Menge an PCR-Produkt amplifiziert wurde (sehr schwache DNA-Bande erkennbar). Beim Ökotyp Tsu und Col wurde das erwartete PCR-Produkt von 716 bp in hoher Konzentration gebildet. Es ist anzunehmen, dass ein bzw. beide Primer hier aufgrund einzelner Nukleotidpolymorphismen im Ökotyp Cvi nicht bzw. nur sehr schlecht binden, so dass kein oder teilweise nur ein ganz schwaches PCR-Produkt geliefert wird. Es wurde eine große Anzahl an Kontrollpflanzen in die Kartierung dieses Markers mit einbezogen und es zeigte sich, dass es möglich war, auch den Marker T12O21UV mittels PCR als allelspezifischen PCR-Marker zu kartieren. Die spezifischen Primer und PCR-Bedingungen sind unter 2.2.23 beschrieben. T12O21UV wurde mit absoluter Kopplung (0 Rekombinanten) zum Resistenzlocus kartiert (Kartierungsdaten siehe Tab. 3-7 und Tab. 6-1 im Anhang).

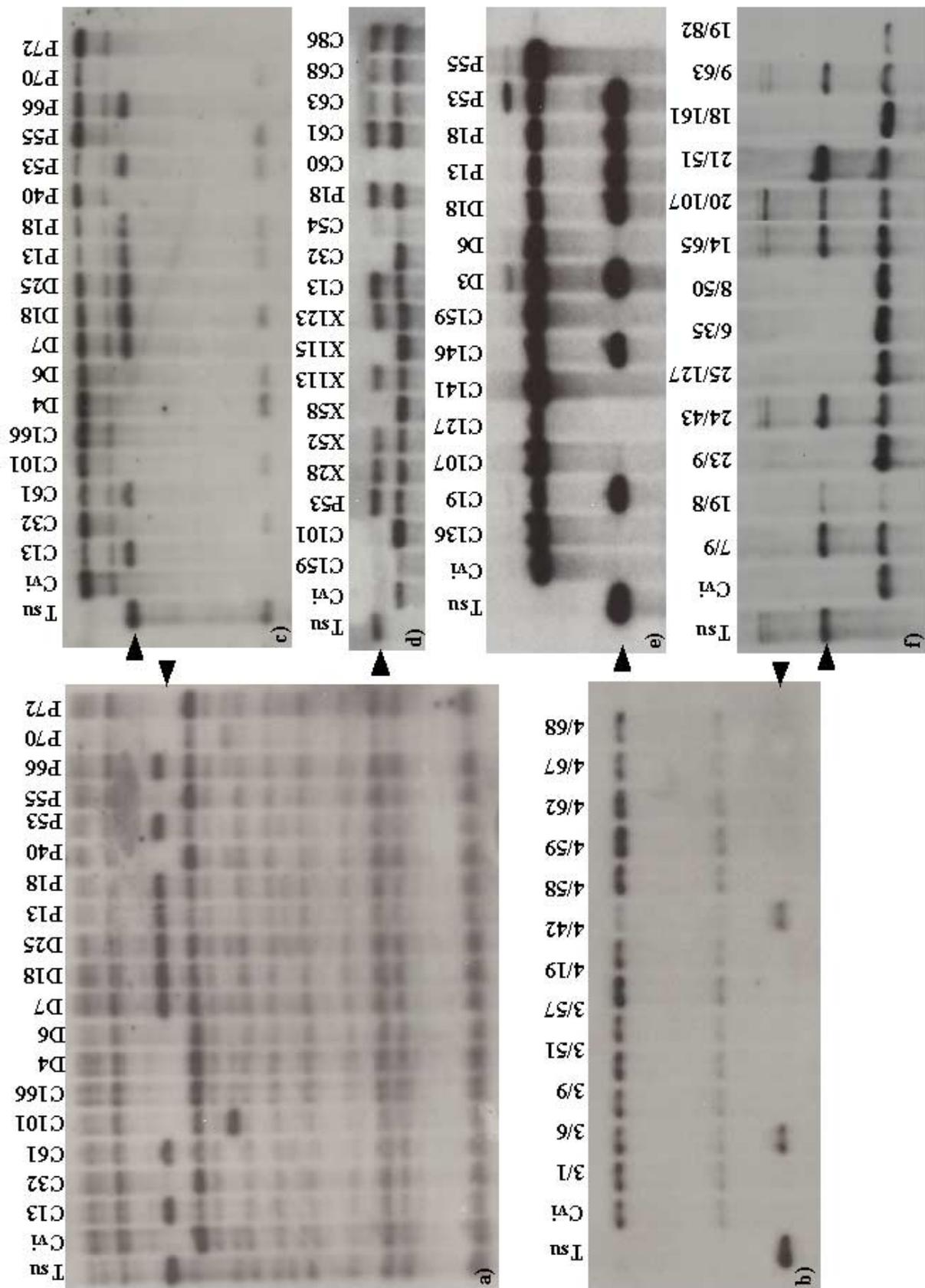


Abb. 3-8: Autoradiogramme verschiedener RFLP-Marker
 a) rpHS-1 b) BAC F3C3 LE c) BAC F9D2 RE
 d) BACF23G7 LE e) AIG1 f) BACT12O21 LE
 ► polymorphe, Tsu-spezifische Bande

Es wurden insgesamt fünf Marker mit absoluter Kopplung zum Resistenzlocus (cosegregierend) und zwei den *RPBI*-Locus überspannende BAC-Klone (F9D2 und T12O21) identifiziert. Die Enden des BAC-Klons F9D2 kartieren mit einer Rekombinanten rechts und vier Rekombinanten links von *RPBI*. Die Enden des BAC-Klons T12O21 kartieren beidseitig mit je einer Rekombinanten. Die beiden Enden des Cosmidklons T3152a aus der Tsu-Cosmidbibliothek (siehe 3.4) wurden ebenfalls kartiert, so dass die Position des Cosmids im BAC-Contig festgelegt werden konnte. Das rechte Ende dieses Klons wurde mit einer Rekombinanten rechts von *RPBI* kartiert, das linke Cosmidende zeigte Cosegregation mit *RPBI*. Folglich überspannt dieser Klon den Resistenzlocus nicht. Die Insertgröße dieses Cosmidklons wurde mittels einer Restriktionsanalyse auf ca. 16,6 kb geschätzt. Auf der rechten Seite von *RPBI* wurden neben dem Tsu-spezifischen rechten Cosmidende (T3152aRE) auch zwei BAC-Enden (F9D2RE, T12O21RE) mit je einer Rekombinanten kartiert. Das rechte Cosmidende liegt zwischen den beiden BAC-Enden, die 6352 bp voneinander entfernt sind.

Mit Hilfe der Kartierungsdaten der BAC-Enden und der Größe der beiden den Resistenzlocus überspannenden BAC-Klone konnte die Rekombinationshäufigkeit in der *RPBI*-Region berechnet werden. Die absoluten Größen der BAC-Klone betragen 75298 bp (T12O21) und 107867 bp (F9D2). Die Sequenz des Klons T12O21 wurde vollständig veröffentlicht (EMBL-Datenbank: AC074309), und die Größe des Klons F9D2 konnte anhand der Position der BAC-End-Sequenzen in den veröffentlichten BAC-Sequenzen ermittelt werden. Daraus ergibt sich eine Rekombinationsfrequenz von 1 Rekombination / 37,6 kb bzw. 1 Rekombination / 21,5 kb. Die vier Marker, die Cosegregation mit dem Resistenzlocus zeigen, überspannen einen Bereich von 29 kb.

Die Kartierungsdaten aller Marker für die Einzelpflanzen der Kartierungspopulation sind im Anhang (Tab. 6-1) zusammengefasst und in Abb. 3-3/3-4 sind die Positionen der Marker in der *RPBI*-Region zur besseren Orientierung graphisch dargestellt.

Die Berechnung der genetischen Abstände der kartierten Marker zum Resistenzlocus (siehe Tab. 3-7) erfolgte nach der Kosambi-Funktion [$cM = 25 \times \ln \left[\frac{(100 + 2R)}{(100 - 2R)} \right]$]. Für die zwei Marker BAC F7F2RE und F11O20RE wurden keine genetischen Abstände berechnet, da hier nur eine kleine Anzahl von Pflanzen der Kartierungspopulation untersucht wurde.

Tab. 3-7: Hochauflösende Kartierung von RFLP- und PCR-Markern in der *RPBI*-Region. Die Berechnung der genetischen Abstände [cM] der Marker zum Resistenzlocus erfolgte nach Kosambi (1944). Die Anzahl der jeweils getesteten Pflanzen der Kartierungspopulation ist in Klammern angegeben.

Marker	Abstand zu <i>RPBI</i> [cM]	Anzahl Rekombinanten
S3/S4 (Vorselektion)	1,49	63 (von 4232)
m253	0,69	10 (von 1450)
BAC F9D2 LE	0,11	4 (von 3682)
BAC T12O21 LE	0,024	1 (von 4232)
BAC T12O21 WX	cosegregierend	keine Rekombinanten
BAC T12O21 UV	cosegregierend	keine Rekombinanten
BAC T12O21 ST	cosegregierend	keine Rekombinanten
BAC F3C3 LE	cosegregierend	keine Rekombinanten
Cosmid T3152a LE	cosegregierend	keine Rekombinanten
BAC T12O21 RE	0,024	1 (von 4232)
Cosmid T3152a RE	0,024	1 (von 4232)
BAC F9D2 RE	0,024	1 (von 4232)
BAC F7F2 LE	0,071	3 (von 4232)
BAC F23G7 LE	0,090	1 (von 1175)
BAC F3C3 RE	0,10	2 (von 2006)
rpHS-1	0,38	15 (von 3985)
AIG1(A3/B3) (Vorselektion)	3,27	138 (von 4232)

3.6 PCR-Analysen zur Expression von Genen in der *RPBI*-Region

Um eine Aussage darüber machen zu können, ob die als codierende Sequenzen (CDS) eingestuft DNA-Bereiche auf dem BAC-Klon T12O21 exprimiert werden, wurde cDNA der beiden Ökotypen Tsu und Cvi (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von J. Siemens, Institut für Angewandte Genetik, FU Berlin) mittels PCR hinsichtlich des Vorkommens entsprechender exprimierter DNA-Abschnitte untersucht. Die verwendete cDNA wurde unter Verwendung des "SMART cDNA Library Construction Kit" (Clontech Laboratories, Heidelberg) aus den Wurzeln der Pflanzen präpariert. Die cDNA wurde sowohl aus Wurzeln präpariert, die 21 Tage zuvor mit *P. brassicae* infiziert worden waren (21dpi), als auch aus nicht infizierten Wurzeln von Pflanzen im gleichen Entwicklungsstadium, d.h. 35 Tage nach der Keimung (35 dpg). Das im BAC T12O21 klonierte DNA-Fragment enthält 15 Sequenzabschnitte, die als codierende Sequenzen eingestuft wurden, und drei als Pseudogene bezeichnete Abschnitte (siehe Tab. 3-8 und Abb. 3-9). Bei allen 15 codierenden Sequenzen handelt es sich nach den Angaben der MATDB-Datenbank (MIPS *Arabidopsis thaliana* database: <http://www.mips.gsf.de/proj/thal/db/index.htm>) und der EMBL-Datenbank (European Molecular Biology Laboratory: <http://www.embl.de>) um unbekannte oder hypothetische Proteine, denen teilweise entsprechende ESTs aus *Arabidopsis*-Datenbanken zugeordnet werden konnten (siehe Tab. 3-8). Einige Genprodukte weisen Ähnlichkeiten zu bekannten *Arabidopsis*-Proteinen auf. Als hypothetische Proteine werden alle Genprodukte bezeichnet, für die keine entsprechenden ESTs identifiziert werden konnten und die keinerlei Ähnlichkeiten zu bekannten Proteinen zeigen.

Tab. 3-8: Übersicht aller codierenden Sequenzen auf dem BAC-Klon T12O21.
Die Angaben wurden zwei Datenbanken (MATDB, EMBL) entnommen.

Gen (Code)	Länge (Start-Stop) / AS	Produkt	<i>Arabidopsis</i> -ESTs	Ähnlichkeiten zu <i>Arabidopsis</i> -Proteinen
T12O21.1 (*AAG50793.1)	584 bp / 165 AS	hypothetisches Protein	-	-
T12O21.2 (At1g32080)	2184 bp / 512 AS	unbekanntes Protein	-	Transmembran-Protein
T12O21.3 (At1g32070)	1538 bp / 230 AS	unbekanntes Protein	1	-
T12O21.4 (At1g32060)	1738 bp / 395 AS	unbekanntes Protein	44	Phosphoribulokinase-Precursor
T12O21.5 (At1g32050)	2358 bp / 264 AS	unbekanntes Protein	7	Sekretorisches Carrier-Membran-Protein
T12O21.17	Pseudogen			
T12O21.6 (At1g320040)	1652 bp / 408 AS	hypothetisches Protein	-	-
T12O21.7 (At1g32030)	1001 bp / 333 AS	hypothetisches Protein	-	-
T12O21.8 (At1g32020)	516 bp / 171 AS	unbekanntes Protein	-	Hitzeschock-Transkriptionsfaktor HSF30
T12O21.9 (At1g32010)	2700 bp / 835 AS	hypothetisches Protein	-	(Myosin)
T12O21.10 (At1g32000)	625 bp / 181 AS	hypothetisches Protein	-	-
T12O21.11 T12O21.18	Pseudogen Pseudogen			
T12O21.12 (At1g31970)	2787 bp / 537 AS	unbekanntes Protein	6	RNA-Helikase
T12O21.13 (At1g31960)	522 bp / 173 AS	hypothetisches Protein	-	-
T12O21.14 (At1g31950)	2388 bp / 608 AS	unbekanntes Protein	-	Terpene-Synthase Protein Familie
T12O21.15 (At1g31940)	526 bp / 142 AS	unbekanntes Protein	2	-
T12O21.16 (At1g31930)	3130 bp / 848 AS	unbekanntes Protein	2	G-Protein alpha Untereinheit

*Protein-Code der EMBL-Datenbank (alle anderen Protein-Codes beziehen sich auf die MATDB-Datenbank)

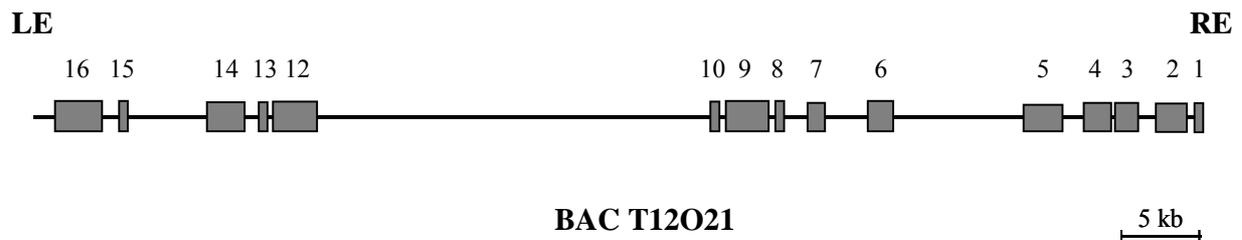


Abb. 3-9: Codierende Sequenzabschnitte (CDS) auf dem BAC-Klon T12O21. Die Bezeichnungen "linkes Ende" und "rechtes Ende" (LE, RE) beziehen sich auf die Position im BAC-Contig.

Die codierenden Sequenzabschnitte werden im Folgenden, entsprechend den Angaben in Tab. 3-8, nur noch als CDS1-CDS16 bezeichnet. Es wurden für alle auf dem BAC T12O21 liegenden codierenden Sequenzabschnitte spezifische Primer abgeleitet, die Fragmente von mindestens 500 bp amplifizieren (siehe Tab. 2-3/2-4). Ein Teil der bereits zur Kartierung von BAC-Fragmenten verwendeten Primer lag bereits in solchen codierenden Sequenzabschnitten. Drei dieser Primer binden in DNA-Abschnitten, die in der Datenbank als Intronbereiche in der Col-Sequenz eingestuft wurden, so dass hier neue Primer abgeleitet werden mussten, die in Exonabschnitten binden. Die Ergebnisse aller PCR-Reaktionen mit diesen Primern sind in Tab. 3-9 zusammengefasst.

Alle Primer wurden zunächst bezüglich ihrer Bindung an genomischer DNA aller vier *Arabidopsis*-Ökotypen (Tsu, Cvi, RLD, Col) getestet. Mit Ausnahme der zwei codierenden Sequenzabschnitte CDS6 und CDS8, in denen mehrere Primer abgeleitet und auch in Kombination miteinander getestet wurden, konnten in allen anderen codierenden Bereichen Primer abgeleitet werden, die entsprechende spezifische Fragmente in allen vier Ökotypen amplifizieren. Bei den zwei Genen CDS6 und CDS8 handelt es sich wahrscheinlich um Col-spezifische oder hochpolymorphe Sequenzabschnitte (siehe folgendes Kap. 3.7). In zwei Fällen (CDS10 und CDS16) wurde im Ökotyp Tsu das PCR-Produkt nur in sehr geringer Konzentration gebildet (siehe Tab. 3-9). Hier binden die Primer vermutlich aufgrund eines Nukleotid-Polymorphismus in der Tsu-Sequenz sehr schlecht. Das PCR-Produkt der Primer T12O21 S+T (CDS7) ist in den drei Ökotypen Tsu, Cvi und RLD ca. 120 bp kleiner als im Ökotyp Col.

Die PCR-Reaktionen wurden dann unter den zuvor getesteten Bedingungen mit der jeweiligen cDNA und genomischer DNA als Kontrolle durchgeführt (siehe 2.2.22.2). In Abb. 3-10 sind einige cDNA-PCR-Ergebnisse beispielhaft dargestellt. Die gebildeten PCR-Fragmente hatten entweder die gleiche Größe wie die aus genomischer DNA amplifizierten Fragmente, oder es wurde ein kleineres Fragment gebildet. Einige der zwischen den jeweiligen Primern liegenden genomischen DNA-Abschnitte enthalten Introns, so dass die aus der cDNA amplifizierten Fragmente aufgrund von Splicing-Vorgängen kleiner sind. Die Größe und Lage der Introns kann den Datenbank-Angaben zum jeweiligen Gen entnommen werden (siehe auch Tab. 3-9). Es wurden Gene identifiziert, die sowohl in den infizierten als auch in den nicht infizierten Pflanzen, oder auch nur in den infizierten Pflanzen, exprimiert werden. In einem Fall (CDS16) wurden drei Fragmente bei Einsatz der Tsu-cDNA aus infizierten Wurzeln

amplifiziert (siehe Tab. 3-9). Mit den in der CDS10 bindenden Primern konnte bei keinem der beiden Ökotypen, weder bei infizierten noch bei nicht infizierten Wurzeln, ein Fragment aus der cDNA amplifiziert werden. Hier waren teilweise (cDNA inf.) nur einige unspezifische schwache Banden unterschiedlicher Größe im Gel zu erkennen. Es ist aber nicht auszuschließen, dass diese CDS vielleicht in anderen Bereichen der Pflanze oder unter anderen Bedingungen exprimiert wird.

Im Fall der CDS14 konnte nur bei der cDNA des infizierten Ökotyps Cvi ein entsprechendes Fragment amplifiziert werden. Die codierenden Sequenzen CDS 2/3/4/7/13/15 erwiesen sich als nur in den infizierten Wurzeln beider Ökotypen exprimierte Bereiche. Die codierenden Sequenzen CDS 1/5/12/16 werden sowohl in infizierten als auch in nicht infizierten Wurzeln beider Ökotypen exprimiert. Mit den Primern T12O21 QQ+RR (CDS9) wurde nur bei Einsatz der cDNA des Ökotyps Tsu (infizierte und nicht infizierte Wurzeln) ein Fragment amplifiziert.

Die PCR-Analysen bezüglich der Expression der CDS9 wurden später zusätzlich mit cDNA durchgeführt, die zu anderen Zeitpunkten aus den Wurzeln beider Ökotypen isoliert wurde. Es wurde hierfür cDNA eingesetzt, die aus infizierten Wurzeln 10 bzw. 15 Tage nach der Infektion mit *P. brassicae* (10 dpi bzw. 15 dpi) bzw. aus nicht infizierten Wurzeln von Pflanzen im gleichen Entwicklungsstadium (24 dpj bzw. 29 dpj) isoliert wurde. Auch hier konnte eine Expression von CDS9 nur im Ökotyp Tsu nachgewiesen werden.

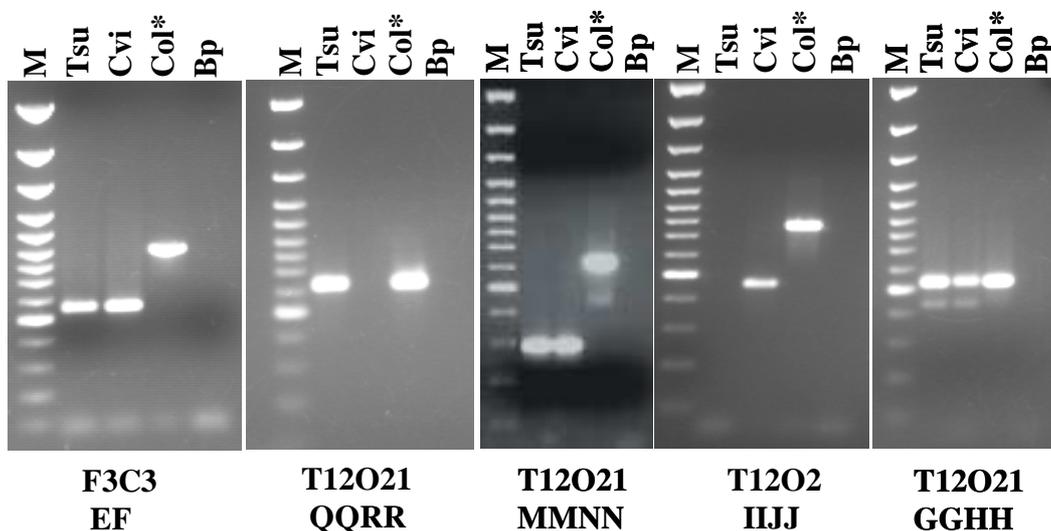


Abb. 3-10: PCR-Analysen zur Expression der codierenden Sequenzen im BAC T12O21 am Beispiel von CDS2, CDS9, CDS12, CDS14 und CDS15. Die PCR erfolgte unter Einsatz von cDNA aus infizierten Wurzeln der Ökotypen Tsu und Cvi (21 dpi) und den angegebenen Primerpaaren. Als Kontrolle erfolgte eine PCR mit genomischer DNA des Ökotyps Col (*).
Bp: Blindprobe
M: 100 bp plus Marker (3000, 2000, 1500, 1200, 1031, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 200, 100 bp)

Tab. 3-9: PCR-Analysen zur Expression der codierenden Sequenzabschnitte im BAC T12O21. Die verwendete cDNA wurde aus inf. Wurzeln (21dpi) bzw. nicht inf. Wurzeln (35 dpg) isoliert.

Primer T12O21=T F3C3=F	PCR- Prod. [bp]*	Intron- Anteil [bp]	lokal. in CDS	genomische DNA				cDNA			
				Tsu	Cvi	RLD	Col	Tsu inf.	Tsu nicht inf.	Cvi inf.	Cvi nicht inf.
T A+B	588	87	1	+	+	+	+	500	500	500	500
F E+F	899	351	2	+	+	+	+	570	-	570	-
T I ₂ +J	1083	647	3	+	+	+	+	610	-	610	-
T O ₂ +P	1099	555	4	+	+	+	+	540	-	540	-
T M ₂ +N	705	543	5	+	+	+	+	160	160	160	160
T E+F	638	214	6	-	-	-	+	/	/	/	/
T G+H	787	214	6	-	-	-	+	/	/	/	/
T Q+R	852	191	6	-	-	-	+	/	/	/	/
T S+T	573	0	7	+ ₁	+ ₁	+ ₁	+	450	-	450	-
T SS+TT	515	0	8	-	-	-	+	/	/	/	/
T UU+VV	493	0	8	-	-	-	+	/	/	/	/
T QQ+RR	623	0	9	+	+	+	+	623	623	-	-
T OO+PP	616	80	10	(+)	+	+	+	-	-	-	-
T MM+NN	631	341	12	+	+	+	+	290	290	290	290
T KK+LL	513	0	13	+	+	+	+	513	-	513	-
T II+JJ	783	188	14	+	+	+	+	-	-	480	-
T GG+HH	524	98	15	+	+	+	+	524	-	524	-
T EE+FF	1004	94	16	(+)	+	+	+	910 750 590	(910)	910	910

Bei den Primern I₂, O₂ und M₂ handelt es sich um die neuen, im Exonbereich abgeleiteten, Primer.

- *: PCR-Prod.-Größe bezogen auf Col-Sequenz
- + : PCR-Produkt mit entsprechender Größe wird gebildet
- : es wurde kein PCR-Produkt gebildet
- ₁ : PCR-Produkt von ca. 450 bp (Tsu, Cvi, RLD) statt 573 bp (Col)
- () : wenig PCR-Produkt (schwache Bande im Gel)
- / : keine PCR mit cDNA durchgeführt

Mit den durchgeführten PCR-Analysen konnte, mit Ausnahme von CDS6, CDS8 und CDS10, für alle codierenden Sequenzen, für die noch keine ESTs identifiziert werden konnten (siehe Tab. 3-8), erstmals eine Expression gezeigt werden.

3.7 Untersuchungen zur genetischen Diversität zwischen den *Arabidopsis*-Ökotypen

Da in veröffentlichten Arbeiten oftmals große Unterschiede auf genetischer Ebene zwischen den verschiedenen *Arabidopsis*-Ökotypen festgestellt werden konnten, war es auch im Rahmen dieser Arbeit wichtig, eine Aussage über Polymorphismen auf DNA-Ebene machen zu können. Die publizierten Daten über die genetische Diversität zwischen den Ökotypen basieren auf Untersuchungen mit RFLP-, AFLP- und CAPS-Markern (King *et al.* 1993, Hardtke *et al.* 1996, Ullrich *et al.* 1997, Breyne *et al.* 1999, Erschadi *et al.* 2000). In der vorliegenden Arbeit lieferten vor allem die Ergebnisse der zahlreichen PCR-Reaktionen mit Primern aus der *RPBI*-Region viele Hinweise auf solche Polymorphismen. Aber auch die

Sequenzierung kleinerer und größerer zusammenhängender DNA-Abschnitte des Ökotyps Tsu und der Vergleich mit den vorliegenden Col-Sequenzen konnte zur Identifizierung von solchen Polymorphismen genutzt werden.

3.7.1 Identifizierung von DNA-Polymorphismen mittels PCR und Hybridisierung

Wie bereits zuvor beschrieben, wurde bei allen aus den BAC-End-Sequenzen und veröffentlichten Sequenzen abgeleiteten Primern zunächst überprüft, ob sie an genomischer Col-DNA binden und das erwartete PCR-Produkt liefern. Außerdem wurde auch genomische DNA der Ökotypen Tsu, Cvi und RLD eingesetzt, um auch hier das Binden der Primer zu überprüfen. Da die Ökotypen Tsu und RLD resistent und Cvi und Col anfällig gegenüber *P. brassicae* sind, konnten die Ergebnisse der PCR auch hinsichtlich einer möglichen Kopplung mit der Resistenz verglichen werden. In Tab. 3-10 sind alle Primerpaare und deren PCR-Ergebnisse aufgeführt, die in einigen Ökotypen kein bzw. nur im Ökotyp Col das entsprechende PCR-Produkt amplifizierten. Hier müssen Unterschiede bezüglich der DNA-Sequenzen vorliegen. Wenn keine Fragmente amplifiziert werden, binden ein oder beide Primer aufgrund von Nukleotidunterschieden nicht, oder aber ein ganzer DNA-Abschnitt fehlt. In einigen Fällen hatten die PCR-Produkte auch unterschiedliche Größen, so dass in den Ökotypen in den untersuchten DNA-Abschnitten Insertionen bzw. Deletionen vorliegen müssen. Hier war in zwei Fällen (siehe Tab. 3-10) das amplifizierte Fragment in Col größer als in den anderen drei Ökotypen, so dass eine Insertion in Col vermutet werden kann. Des Weiteren zeigten die PCR-Analysen, dass einige Primer entweder bei Cvi und RLD oder nur beim Ökotyp Tsu kein PCR-Produkt bildeten oder dass PCR-Produkte, wahrscheinlich aufgrund schlecht bindender Primer, nur in geringer Menge gebildet wurden (schwache Bande im Gel).

Die Reihenfolge der Primer in der Tabelle entspricht ihrer Abfolge in der BAC-Sequenz (T12O21) von rechts nach links. Die Zahlen in den Zwischenzeilen geben den Abstand zwischen den Regionen an, in denen die Primer binden. Die PCR-Produkte innerhalb einer umrandeten Region überlappen und die verschiedenen Primer wurden in diesem Abschnitt auch in unterschiedlichen Kombinationen getestet (in Tab. nicht angegeben).

Anhand dieser PCR-Ergebnisse konnten mehrere Sequenzabschnitte (in der Tabelle grau unterlegt) identifiziert werden, mit denen nur im Ökotyp Col ein PCR-Produkt amplifiziert werden konnte, in den anderen drei Ökotypen aber nicht. Diese Sequenzabschnitte sind möglicherweise Col-spezifisch oder es handelt sich um Bereiche, in denen sehr viele Nukleotid-Polymorphismen zwischen den Ökotypen vorliegen. In diesen Sequenzabschnitten sind zwei codierende Sequenzen (CDS6 und CDS8, siehe 3.6) lokalisiert. Von der Sequenz CDS6 wurden sechs Primer und von CDS8 vier Primer abgeleitet und in Kombination miteinander getestet. In allen Fällen wurde immer nur im Ökotyp Col ein PCR-Produkt gebildet.

Tab. 3-10: Vergleichende PCR-Analysen in verschiedenen *Arabidopsis*-Ökotypen.

Primer	PCR-Prod. [bp]	Tsu	Cvi	RLD	Col
T12O21 K+L	571	-	+	+	+
4904 bp					
T12O21 CC+BB	2660	-	-	-	+*
T12O21 AA+BB	794	+ ₁	+ ₁	+ ₁	+*
T12O21 AA+DD	1550	-	-	-	+
405 bp					
T12O21 Y+Z	736	-	-	-	+
3689 bp					
T12O21 E+F	638	-	-	-	+
T12O21 G+H	787	-	-	-	+
T12O21 Q+R	852	-	-	-	+
3228 bp					
T12O21 S+T	573	+ ₂	+ ₂	+ ₂	+
1647 bp					
T12O21 UU+VV	493	-	-	-	+
T12O21 SS+TT	515	-	-	-	+
2713 bp					
T12O21 C+D	553	+	+	(+)	+
377 bp					
T12O21 OO+PP	616	(+)	+	+	+
6647 bp					
T12O21 U+V	716	+ ₃	-	-	+
11831 bp					
F5M6 C+D	712	-	-	-	+
F5M6 A+B	566	-	-	-	+
2599 bp					
F5M6 E+F	518	-	-	-	+
18390 bp					
T12O21 EE+FF	1004	(+)	+	+	+

- + : PCR-Produkt wird gebildet - : kein PCR-Produkt
 () : es wurde nur wenig PCR-Produkt gebildet (schwächere Bande im Gel)
 * : zusätzliche PCR-Produkte anderer Größe (schwächere Banden im Gel)
 1 : ca. 860 bp (Tsu, Cvi, RLD) statt 794 bp (Col)
 2 : ca. 450 bp (Tsu, Cvi, RLD) statt 573 bp (Col)
 3 : ca. 550 bp (Tsu) statt 716 bp (Col)

Um Hinweise auf eine mögliche Insertion im Ökotyp Col bzw. eine Deletion in allen anderen Ökotypen zu erhalten, wurde versucht, mittels Standard-PCR (Taq-DNA-Polymerase) oder "Long Distance PCR" ("Expand™ Long Template PCR System" System 2 + 3) vergleichende PCR-Analysen für zwei dieser Sequenzabschnitte durchzuführen. Es wurden hierfür Primer verwendet, die den zu untersuchenden Bereich flankieren und deren Bindung in allen Ökotypen aufgrund der vorherigen Versuche abgesichert war.

▪ Long-Distance-PCR: Primer T12O21 N+T → flankieren CDS6 → 14632 bp PCR-Produkt
Der PCR-Ansatz enthielt die nach Herstellerangaben empfohlenen Komponenten und die PCR wurde unter den folgenden Bedingungen durchgeführt:

1. 2 min 92 - 94°C
2. 25 bzw. 30 x (10 s 93°C, 30 s 61°C, 15 min 68°C)
3. 7 min. 68°C

▪ Standard-PCR (nach Herstellerangaben PCR-Produkte bis zu 7 kb):

Primer T12O21 S+RR → flankieren CDS8 → 4094 bp PCR-Produkt

Die PCR wurde wie unter 2.2.22.2 beschrieben durchgeführt, wobei Elongationszeiten von 1 min 30s, 3 min oder 4 min bei 72°C verwendet wurden.

Die angegebenen PCR-Produkt-Größen beziehen sich auf die Col-Sequenz. Da das Binden und die Orientierung der Primer in der Col-Sequenz durch vorherige Ergebnisse abgesichert waren, wurde erwartet, dass ein Col-DNA-Fragment der angegebenen Größe entsteht (Positiv-Kontrolle). Beim zweiten getesteten Ökotyp Tsu müsste ein deutlich kleineres PCR-Fragment gebildet werden, wenn es sich hier um eine Deletion eines größeren DNA-Fragments handeln sollte. Es konnten, trotz wiederholter Versuche, in keinem der beiden Ökotypen entsprechende DNA-Fragmente amplifiziert werden. Somit konnten keine Aussagen bezüglich größerer fehlender DNA-Abschnitte gemacht werden.

Es konnte anhand dieser Ergebnisse das Vorhandensein zahlreicher DNA-Polymorphismen zwischen den einzelnen Ökotypen nachgewiesen werden, wobei der Ökotyp Col die größten Unterschiede zu den anderen drei Ökotypen zeigte. Genaue Aussagen über einzelne Nukleotid-Polymorphismen, größere polymorphe Bereiche oder fehlende Abschnitte können anhand dieser Ergebnisse nicht gemacht werden. Hierfür müssten diese Abschnitte in den anderen Ökotypen sequenziert und mit der Col-Sequenz verglichen werden.

Als zweite Möglichkeit, die *Arabidopsis*-Ökotypen hinsichtlich bestehender Polymorphismen auf DNA-Ebene zu untersuchen, wurde folgendes Experiment durchgeführt. Genomische DNA aller vier Ökotypen und DNA des BAC-Klons F9D2 (überspannt den *RPBI*-Locus und enthält Col-DNA) wurden mit dem Restriktionsenzym *EcoRI* vollständig verdaut. Die Fragmente wurden in einem Agarosegel (0,8 % TBE) aufgetrennt und mittels Southern-Blot auf eine Nylonmembran übertragen. Anschließend erfolgte eine Hybridisierung mit DIG-markierter DNA des BACs F9D2. Die Hybridisierungsmuster der vier Ökotypen und des BACs wurden dann miteinander verglichen. Das Bandenmuster des BACs F9D2 und der genomischen Col-DNA war fast vollständig übereinstimmend, was auch erwartet wurde, da es sich um DNA des gleichen Ökotyps handelt. Nur die beiden Endfragmente des BACs könnten mit größeren Fragmenten der genomischen DNA hybridisieren, da bei der Herstellung der BAC-Bibliothek ein unvollständiger Verdau mit dem Enzym *EcoRI* durchgeführt wurde. Die Hybridisierungssignale in den einzelnen Spuren waren teilweise sehr undeutlich und nicht gleichmäßig stark, so dass eine Auswertung der einzelnen polymorphen Banden nicht möglich war. Es war allerdings eindeutig zu erkennen, dass die Bandenmuster aller Ökotypen

unterschiedlich zueinander waren. Dies bedeutet, dass eine größere Anzahl polymorpher Restriktionsschnittstellen und möglicherweise auch deletierte/insertierte Abschnitte in den verschiedenen Ökotypen existieren. Wie bereits beschrieben wurde, wird aufgrund der in Tab. 3-10 gezeigten PCR-Ergebnisse vermutet, dass es in der untersuchten Region um den Resistenzlocus möglicherweise Abschnitte gibt, die nur im Ökotyp Col vorliegen oder aber hochpolymorph sind. Besonders dort, wo die Primer T12O21 CC/AA/BB/DD/Y/Z/E/F/G/H/Q/R (siehe Tab. 3-10) abgeleitet wurden, könnte eine größere Col-spezifische Region von mehr als 8 kb vorliegen, da in dieser Region keine PCR-Produkte in den anderen drei Ökotypen amplifiziert werden konnten. Eine Aussage über solche Col-spezifischen Abschnitte konnte aber anhand dieses Hybridisierungsexperiments nicht gemacht werden, weil die Restriktionsmuster so viele unterschiedliche Banden zeigten, dass keine einzelnen zusätzlichen bzw. fehlenden Banden detektiert werden konnten.

Es konnte weder im Rahmen der vorliegenden Arbeit noch in veröffentlichten Studien eine Korrelation zwischen der Resistenzeigenschaft und dem Polymorphiegrad festgestellt werden. Weder die beiden resistenten Ökotypen Tsu und RLD noch die beiden anfälligen Ökotypen Cvi und Col sind sich untereinander in genetischer Hinsicht ähnlicher als im Vergleich zu den anderen Ökotypen.

3.7.2 Vergleich der Sequenzdaten der Ökotypen Tsu und Col

Für einen Vergleich der Sequenzen der beiden Ökotypen Tsu und Col stand eine mehr als 10 kb lange zusammenhängende Sequenz eines Teilstücks des Tsu-Cosmidklons T3152a (CDS3 und CDS4) und eines angrenzenden klonierten Tsu-Fragments (CDS5) zur Verfügung (siehe 3.6). Diese Sequenzdaten zeigten, dass die Anzahl von Einzelnukleotidpolymorphismen zwischen den beiden Ökotypen sehr groß und ungleichmäßig verteilt ist. Es gibt sowohl mehrere 100 bp lange Abschnitte, in denen beide Sequenzen eine 100%ige Homologie zeigen, als auch Abschnitte, in denen mehrere solcher Einzelnukleotidpolymorphismen innerhalb eines 50 bp-Abschnitts auftreten. Des Weiteren wurden auch Bereiche mit kleineren (weniger als 10 bp) und größeren (bis ca. 60 bp) Deletionen/Insertionen identifiziert. Zu bedenken ist bei den Sequenzvergleichen natürlich, dass hier auch Sequenzierungsfehler, sowohl in der Tsu- als auch in der veröffentlichten Col-Sequenz, vorliegen können. Für die Sequenzdaten des Ökotyps Tsu wurde die Genauigkeit der Sequenzen auf etwa 99,8 %, d. h. 2 Fehler/1000 bp (persönliche Mitteilung M. Meixner) geschätzt, die Genauigkeit der veröffentlichten Sequenzdaten wurde mit 1 Fehler/25000 bp angegeben (Theologis *et al.* 2000).

Es konnte anhand dieser Sequenzvergleiche gezeigt werden, dass im Ökotyp Tsu in der untersuchten Region (CDS 3/4/5) keine Insertionen größerer Fragmente, z. B. ein zusätzliches Gen, vorliegen bzw. kein größerer Abschnitt oder ganzes Gen deletiert ist. Aufgrund des hohen Polymorphiegrads zwischen den beiden Ökotypen konnten die Sequenzdaten nicht dazu genutzt werden, aus den Sequenzunterschieden Rückschlüsse auf eine mögliche Veränderung eines Gens im Ökotyp Tsu im Vergleich zum Ökotyp Col zu ziehen.