

4. Diskussion

Mit den durchgeführten hochauflösenden Kartierungsarbeiten und der molekularen Analyse der *RPBI*-Region wurde der Resistenzlocus auf eine Region von ca. 71 kb eingegrenzt. In diesem Chromosomenabschnitt liegen, der Sequenz des anfälligen *Arabidopsis*-Ökotyps Col entsprechend, 13 codierende Sequenzen, die als Kandidatengene eingestuft wurden und deren Allele im resistenten Ökotyp Tsu möglicherweise eine Resistenzgenfunktion übernehmen könnten. Zwei dieser 13 Gene wurden aufgrund von vergleichenden PCR-Analysen als hochpolymorphe oder Col-spezifische Sequenzabschnitte eingeordnet. Zwei weitere Gene liegen dupliziert mit einer Sequenzhomologie von 97 % bzw. 100 % auf Chromosom 5. Bei der Durchmusterung der Tsu-Cosmidbibliothek konnte ein Cosmidklon identifiziert werden, in dem drei der 13 Gene kloniert sind. Ein Vergleich der erstellten hochauflösenden genetischen Karte mit den physikalischen Daten der *RPBI*-Region weist auf einige Besonderheiten in diesem Chromosomenabschnitt hin. Es konnte eine ungleichmäßige Verteilung von meiotischen Rekombinationsereignissen festgestellt werden, und in einem sehr großen Bereich von mindestens 29 kb wurden mehrere Marker cosegregierend mit *RPBI* kartiert. Diese Ergebnisse zeigten, dass in der *RPBI*-Region eine positive Interferenz vorliegt und der unmittelbare Bereich um den Resistenzlocus als Rekombinations-cold-spot eingeordnet werden kann. Des Weiteren wurden Expressionsanalysen in den Ökotypen Tsu und Cvi für alle 13 codierenden Sequenzen durchgeführt, die bei einigen Genen eine unterschiedliche Expression in den beiden Ökotypen bzw. in infizierten und nicht infizierten Pflanzen zeigten. Drei Gene konnten nach der Sequenzierung des entsprechenden Bereichs im Ökotyp Tsu bezüglich ihrer Sequenz direkt verglichen werden. Aufgrund der großen Anzahl von Einzelnukleotidpolymorphismen und kleineren Deletionen bzw. Insertionen, die in den verglichenen Ökotypen Col und Tsu detektiert wurden, konnten über diese Sequenzvergleiche aber keine Hinweise auf eine funktionelle Veränderung dieser Gene oder der Promotorregionen erhalten werden.

4.1 Auswertung der Kartierungsdaten im Hinblick auf Interferenzen und Rekombinations-cold-spots in der *RPBI*-Region

In der *RPBI*-Region wurden zahlreiche eng gekoppelte Marker kartiert (siehe 3.5.3). Das Verhältnis von genetischem zu physikalischem Abstand auf Chromosom 1 von *Arabidopsis* wird mit ca. 230 kb/cM angegeben (Theologis *et al.* 2000). Die Genauigkeit des berechneten genetischen Abstands ist abhängig von der Größe der Kartierungspopulation. Wie groß diese Kartierungspopulation sein muss, um sehr eng gekoppelte Marker noch kartieren zu können, ist wiederum abhängig von der Rekombinationsfrequenz in der untersuchten Region. Da Rekombinationsereignisse nicht an allen Stellen eines Chromosoms mit gleicher Wahrscheinlichkeit stattfinden und man zur Umrechnung der genetischen Distanzen in physikalische Distanzen aber nur den durchschnittlichen Faktor von 230 kb/cM verwenden kann, kommt es hier häufig zu Fehleinschätzungen der physikalischen Abstände der Marker.

Schmidt *et al.* (1995) haben eine physikalische Karte des *Arabidopsis*-Chromosoms 4 erstellt und mit der genetischen Karte verglichen. Sie konnten zeigen, dass über das Chromosom verteilt als "hot spots" und "cold spots" bezeichnete Regionen auftreten. Das durchschnittliche Verhältnis von physikalischer zu genetischer Distanz wird hier für Chromosom 4 mit 185 kb/cM angegeben. Im Bereich der "cold spots" ergeben sich Werte von mehr als 550 kb/cM, in "hot spot Regionen" dagegen Werte von nur 30 - 50 kb/cM. Es konnte keine Verbindung zwischen einer erhöhten Rekombinationsfrequenz und bestimmten Bereichen des Chromosoms festgestellt werden. Die "hot spots" und "cold spots" sind über das gesamte Chromosom verteilt, wobei die "cold spots" in Centromer-Nähe und auch in anderen Bereichen des Chromosoms zu finden waren. Im Fall der in der *RPBI*-Region kartierten Marker konnten die errechneten genetischen Distanzen auf definierte physikalische Abstände bezogen werden, da im letzten Abschnitt dieser Arbeit die vollständige Sequenz des *Arabidopsis*-Genoms verfügbar war. Außerdem konnte der *RPBI*-Locus im Bereich von 11,4 – 11,5 Mb auf Chromosom 1 genau lokalisiert werden. Da es sich um ein metacentrisches Chromosom handelt, entspricht dies bei einer Chromosomengröße von 29,1 Mb einem Abstand von ca. 13,4 cM zum Centromer. Der Resistenzlocus liegt demnach nicht in unmittelbarer Centromernähe.

Gill *et al.* (1996a,b) und Faris *et al.* (2000) zeigten, dass bei einem Vergleich physikalischer und genetischer Karten im Weizen in Gen-reichen Regionen häufiger Rekombinationen stattfinden als in Gen-armen Regionen. Im Genom von Tomate und Kartoffel wurde eine Unterdrückung von Rekombinationen in der Nähe des Centromers nachgewiesen (Tanksley *et al.* 1992). Dass Rekombinationen an bestimmten Stellen der Chromosomen bevorzugt stattfinden, wurde auch in anderen eukaryontischen Organismen gezeigt (Shiroishi *et al.* 1993, Lichten und Goldman 1995, Petes 2001). In Untersuchungen an der Hefe wurde beobachtet, dass Doppelstrangbrüche bevorzugt an Stellen stattfinden, wo die Chromatin-Struktur die DNA zugänglich für z. B. Nukleasen macht, z. B. in Nukleosomen-freien Regionen (Ohta *et al.* 1994, Wu und Lichten 1995, Fan und Petes 1996).

Die absoluten Größen der BAC-Klone T12O21 und F9D2 betragen 75298 bp bzw. 107867 bp. Berechnet man das Verhältnis von genetischer zu physikalischer Distanz in der *RPBI*-Region mit den Kartierungsdaten der Enden dieser beiden BAC-Klone T12O21 (0,024 + 0,024 cM) und F9D2 (0,11 + 0,024 cM), ergeben sich Werte von 1568 kb/cM für T12O21 und 805 kb/cM für F9D2. Diese Werte weichen erheblich von dem Durchschnittswert von 230 kb/cM ab und sind der Grund dafür, dass eine sehr große Kartierungspopulation von 4230 Pflanzen erstellt werden musste, um eng gekoppelte Marker in dieser Region kartieren zu können. Entsprechend den zuvor genannten Daten von Schmidt *et al.* (1995) ist diese Region demzufolge als "cold spot" einzuordnen, und die Rekombinationsfrequenz im Bereich um den *RPBI*-Locus kann als sehr gering eingestuft werden. Es ergeben sich für diesen Bereich Rekombinationsfrequenzen von 1 Rekombination/21,5 kb (F9D2) bzw. 1 Rekombination/37,6 kb (T12O21) (siehe auch 3.5.3). Diese Werte beziehen sich auf den Abschnitt zwischen den beiden kartierten Enden jeweils eines BACs. Die 15 Gene im BAC T12O21 liegen in einem Abschnitt von 75 kb. Die durchschnittliche Gen-Dichte auf Chromosom 1 beträgt

1 Gen/4 kb. Es handelt sich demnach bei der *RPBI*-Region nicht um einen Gen-armen Abschnitt. Trotzdem könnte eine Korrelation zwischen der Gen-Dichte und Rekombinationsfrequenz, wie sie im Weizen nachgewiesen wurde, auch hier postuliert werden, allerdings nur in Bezug auf einen sehr kleinen Chromosomenabschnitt. In dem ca. 29 kb überspannenden cosegregierenden Abschnitt um den *RPBI*-Locus liegen zwei größere nichtcodierende Abschnitte von 8,5 kb und 25,4 kb, in denen ein bzw. zwei als Pseudogene eingestufte Sequenzen lokalisiert sind. Die Gen-Dichte ist dadurch in diesem Bereich etwas verringert (siehe Abb. 4-1). Die Rekombinationen haben hier verstärkt in den angrenzenden Abschnitten stattgefunden, was auch deutlich wird, wenn man die Region zwischen den beiden jeweils linken Enden der BACs F9D2 und T12O21 betrachtet (siehe Abb. 3-4). In diesem Abschnitt von ca. 27 kb haben sich drei Rekombinationen ereignet. Im Vergleich dazu existiert dagegen zwischen den beiden Enden des BACs T12O21 ein Bereich von mindestens 29 kb, in dem mehrere Marker cosegregierend mit *RPBI* kartiert wurden (siehe Tab. 3-7 und Abb. 4-1) und wo dementsprechend keine Rekombinationen stattgefunden haben. Diese Kartierungsdaten zeigen, dass die Rekombinationsereignisse in der Region um den *RPBI*-Locus sehr ungleichmäßig verteilt stattgefunden haben. Es liegt hier eine positive Interferenz vor, d. h., dass die große Anzahl an Rekombinationsereignissen links von *RPBI* die Rekombinationsfrequenz in der benachbarten Region, näher am Resistenzlocus, unterdrückt. Die Rekombinationsfrequenz (1 Rekombination/21,5 bzw. 37,6 kb) ist daher nur als Durchschnittswert anzusehen. Die unterschiedlichen Rekombinationsfrequenzen haben die Kartierung von neuen, eng gekoppelten Markern links vom Resistenzlocus sehr erschwert. Dort konnte zum einen aufgrund des vorliegenden "cold spots", aber auch aufgrund von Sequenz-Duplikationen bzw. starken Sequenzhomologien zu Bereichen auf anderen Chromosomen (siehe 3.5.3) lange Zeit kein eng gekoppelter Marker identifiziert werden. Erst mit der Kartierung des linken Endes des BACs T12O21 (T12O21EEFF) konnte der *RPBI*-Locus schließlich auch links eingegrenzt werden.

Hierbei ist es wichtig anzumerken, dass sich alle physikalischen Abstände, mit denen gerechnet wurde, auf die Größenverhältnisse im Ökotyp Col beziehen. Die Kartierungsdaten beziehen sich jedoch auf Daten der Ökotypen Tsu bzw. Cvi. Da, wie unter 3.7.1 beschrieben, vermutet wird, dass in der untersuchten Region einige Abschnitte spezifisch nur im Ökotyp Col vorkommen (siehe 3.7.1), wäre es möglich, dass die untersuchte Region um den Resistenzlocus im Ökotyp Tsu bzw. Cvi aufgrund fehlender Abschnitte von der physikalischen Karte des Ökotyps Col abweicht und geringere physikalische Distanzen vorliegen, so dass die Marker im cosegregierenden Bereich näher beieinander liegen. Aber auch im Fall einer Verkürzung der Abstände um mehrere Kilobasen wäre die Region mit cosegregierenden Markern weiterhin als "cold spot" mit verminderter Rekombinationshäufigkeit einzustufen.

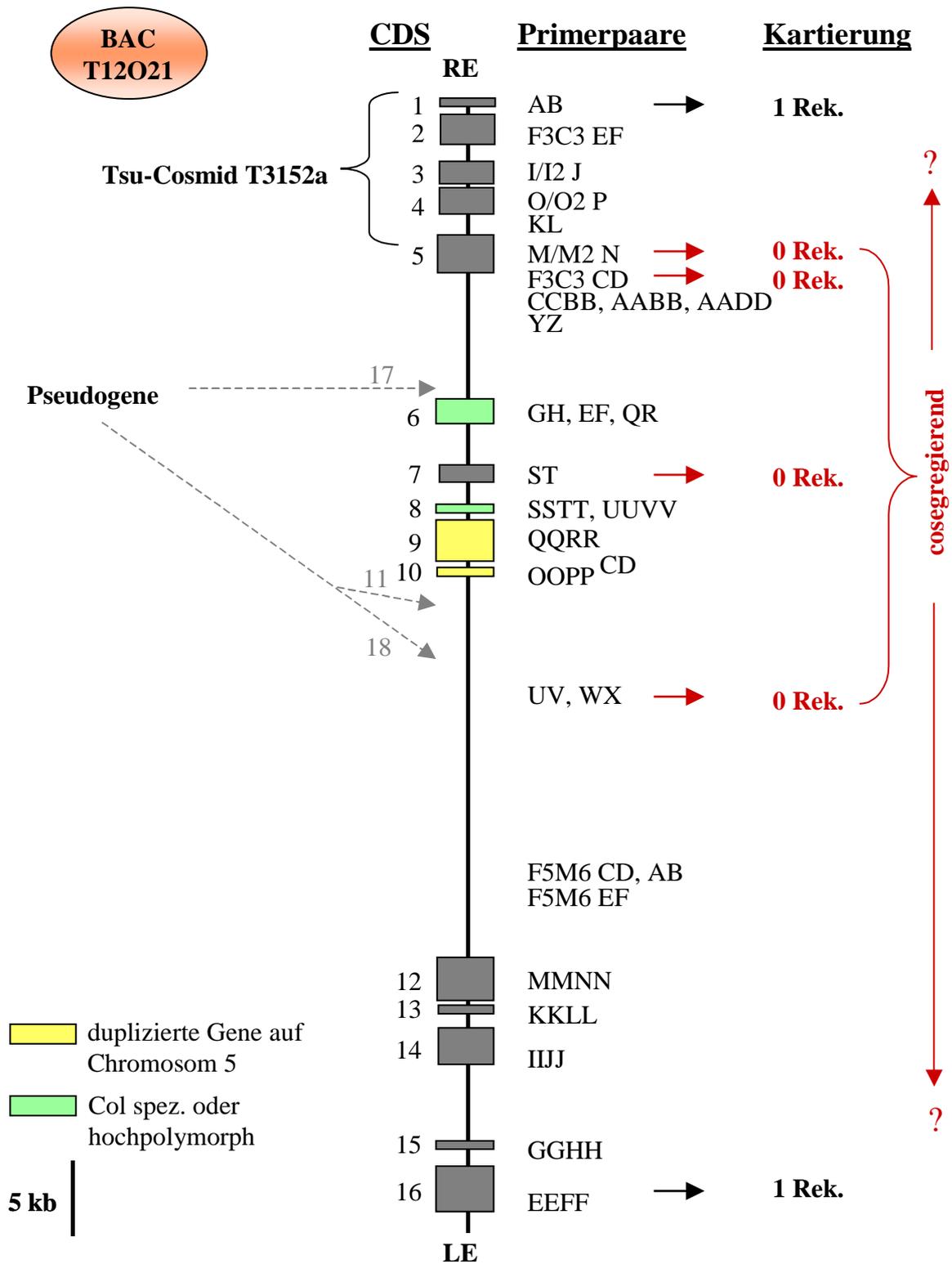


Abb. 4-1: Hochauflösend kartierter Bereich um den *RPBI*-Locus. Dargestellt sind die 15 auf dem BAC T12O21 lokalisierten Gene und nichtcodierenden Abschnitte mit den Positionen aller für die Kartierung und die cDNA-Analyse verwendeten Primerpaare.

4.2 Abgleich der Daten der charakterisierten BACs mit publizierten Ergebnissen

Erstes Ziel zu Beginn dieser Arbeit war die Erstellung eines BAC-Contigs (siehe Abb. 3-3), das den Resistenzlocus überspannt. Die in der *RPBI*-Region identifizierten BAC-Klone mussten genauer analysiert werden, damit ein Contig erstellt werden konnte (siehe 3.1). Ein Teil der ermittelten Ergebnisse, wie die Größe der BACs, Sequenzen der BAC-Enden und die Größe der überlappenden Bereiche einiger Klone, konnte später mit den veröffentlichten Daten des *Arabidopsis*-Sequenzierungsprojekts (<http://www.arabidopsis.org/agi.html>) verglichen werden. Es standen aber nur für einen Teil der untersuchten BACs publizierte Daten zum Vergleich zur Verfügung. Einerseits konnten die Positionen der einzelnen BAC-Klone im selbst erstellten Contig durch diesen Vergleich bestätigt und genaue physikalische Abstände bestimmt werden, andererseits mussten einige veröffentlichte Daten aber auch korrigiert werden. So stellte sich heraus, dass aufgrund von Sequenzierungs- und Kartierungsergebnissen die Größe des BAC-Klons F3C3 korrigiert werden musste, da dieser Klon am linken Ende (T7-Ende) um 8162 bp länger ist, als in der veröffentlichten Gesamtsequenz. Eine zweite Korrektur wurde bezüglich der Enden des BACs F9D2 vorgenommen, indem das sequenzierte und isolierte T7-Ende im Contig als das rechte Ende dieses Klons kartiert wurde. Die veröffentlichten Ergebnisse weisen es dagegen als linkes Ende aus. Folglich war dort auch das Sp6-Ende falsch zugeordnet, das im eigenen Contig als linkes Ende kartiert wurde. Die mittels PFGE bestimmte Größe der BAC-Inserts stimmte mit den tatsächlichen Größen in Basenpaaren relativ gut überein, so dass gezeigt werden konnte, dass mit dieser durch das Auflösungsvermögen des Gels begrenzten Methode die Größe der BACs gut abzuschätzen war. Auch die Größe der überlappenden Abschnitte einzelner BAC-Klone konnte mit der durchgeführten Restriktionsanalyse gut bestimmt werden. Ein Vergleich der Daten wird in Tab. 4-1 vorgenommen.

Viele im Rahmen des *Arabidopsis*-Sequenzierungsprojekts ermittelten Ergebnisse hätten die Kartierungsarbeiten erleichtert bzw. beschleunigt, wenn sie früher zur Verfügung gestanden hätten. Allerdings hätten auch durch die publizierten Daten nicht alle durchgeführten Arbeiten zur Erstellung des BAC-Contigs ersetzt werden können, da die in den physikalischen Karten vorhandenen Marker den Resistenzlocus nicht so eng eingrenzen, dass man die wirklich relevanten BACs sofort aus dem veröffentlichten Contig hätte auswählen können. Ein für die *RPBI*-Region spezifisches Contig mit verschiedenen kartierten BAC-Enden hätte demnach in jedem Fall erstellt werden müssen, um den Klon T12O21 schließlich als kleinsten den Resistenzlocus überspannenden BAC-Klon zu identifizieren.

Tab. 4-1: Vergleich der selbst ermittelten BAC-Insert-Größen und überlappenden Abschnitte einiger BAC-Klone des Contigs mit den aus veröffentlichten Sequenzdaten abgeleiteten Werten.

| BAC | Insert-Größe [kb] | |
|------------------------------|---------------------|--------------|
| | PFGE | Sequenzdaten |
| F3C3 | 103 | 90,132 |
| F9D2 | 126 | 107,867 |
| F12P22 | 122 | 93,278 |
| F7F2 | 120 | 118,004 |
| F14M12 | 110 | 98,275 |
| überlappender Abschnitt [kb] | | |
| BAC/BAC | Restriktionsanalyse | Sequenzdaten |
| F7F2/F3C3 | 41,2 | 38,537 |
| F3C3/F9D2 = F3C3/F12P22 | 13,3 | 18,305 |
| F9D2/F14M12 | 55,7 | 63,087 |
| F12P22/F14M12 | 43,0 | 47,848 |

4.3 Eingrenzung des *RPBI*-Locus und Identifizierung entsprechender Kandidatengene im Ökotyp Col

Mit der Kartierung der beiden Enden des BAC-Klons T12O21, den beiden rechts und links von *RPBI* mit dem geringsten Abstand kartierten Markern, konnte die Region um den Resistenzlocus auf ca. 71 kb eingegrenzt werden. Zwischen den mit je einer Rekombinanten rechts und links kartierten Endfragmenten liegen im Ökotyp Col 13 codierende Sequenzen (siehe Tab. 3-8 und Abb. 4-1), von denen sechs (CDS 5/(6)/7/(8)/9/10) im als cosegregierend eingestuften Bereich lokalisiert sind (siehe 3.5.3). Der Bereich zwischen den mit 0 Rekombinanten kartierten Markern umfasst ca. 29 kb (siehe Abb. 4-1). Bei zwei der sechs in diesem Abschnitt lokalisierten Gene (CDS6 und CDS8) handelt es sich um hochpolymorphe Sequenzabschnitte (im Vergleich mit den anderen drei Ökotypen Tsu, Cvi und RLD) oder möglicherweise auch um nur im Ökotyp Col vorhandene Gene (Insertionen) (siehe 3.7.1). Dass derartige Insertionen größerer Abschnitte vorliegen können, wurde am Beispiel des Ökotyps Tsu gezeigt. Hier konnte anhand der Sequenzdaten des Tsu-Cosmidklons T3152a (siehe 3.4) ein 1128 bp großes Tsu-spezifisches DNA-Fragment identifiziert und auch kartiert werden. Des weiteren zeigten Sequenzvergleiche mit Datenbanken, dass die beiden Gene CDS9 und CDS10 in duplizierter Form mit Sequenzhomologien von 97 % und 100 % auf Chromosom 5 vorliegen. Es ist eher unwahrscheinlich, dass die Allele dieser beiden Gene als Resistenzgene in Frage kommen. Würden diese Gene auch im Ökotyp Tsu dupliziert und auf beiden Chromosomen funktionsfähig vorliegen, dann wäre es nicht möglich gewesen, die *RPBI*-Resistenz monogen auf Chromosom 1 zu kartieren. Mutationen könnten aber auch dazu führen, dass eins der duplizierten Gene zum Pseudogen, d. h. funktionslos, wird oder ein Gen mit einer neuen Funktion entsteht (Walsh 1995, Wagner 1998).

Da nicht ausgeschlossen werden kann, dass auch die CDS 2/3/4 und CDS 12/13/14/15 eine Cosegregation mit *RPBI* zeigen, müssen somit auch diese 7 Gene, wenn auch mit geringerer Wahrscheinlichkeit, als Kandidatengene eingestuft werden. Eine Übersicht aller codierenden Sequenzen mit den zugehörigen Kartierungsdaten und physikalischen Distanzen gibt Abb. 4-1.

Neben der Möglichkeit, dass es sich beim *RPBI*-Gen um ein resistenzvermittelndes Allel der entsprechenden, im Ökotyp Col identifizierten Kandidatengene handelt, könnte im resistenten Ökotyp Tsu aber auch ein zusätzliches Gen vorhanden sein, das für die Resistenz gegenüber *P. brassicae* verantwortlich ist. Die größeren nichtcodierenden Sequenzbereiche, in denen im Ökotyp Col sog. Pseudogene liegen (siehe Abb. 4-1), könnten als "verdächtige" Bereiche für ein zusätzliches Gen im resistenten Ökotyp Tsu eingestuft werden.

Mit der Sequenzierung eines größeren, die CDS 3/4/5 umfassenden Tsu-Abschnitts (siehe 3.7.2), konnten eine große Anzahl von Einzelnukleotidpolymorphismen zwischen den beiden Ökotypen Tsu und Col und kleinere polymorphe Abschnitte zwischen 10 und 60 bp identifiziert werden. Größere Insertionen oder Deletionen liegen in diesem Abschnitt aber nicht vor. Für die cosegregierende Region, in der die CDS 5-10 lokalisiert sind, liegen keine entsprechenden Sequenzdaten des resistenten Ökotyps Tsu vor. Da der cosegregierend kartierte Abschnitt mit einer Länge von mindestens 29 kb sehr groß ist und mehrere Gene einschließt, kann auch nicht ausgeschlossen werden, dass möglicherweise mehrere eng gekoppelte Gene gemeinsam an der Resistenzausprägung beteiligt sind und einen sog. Gen-Cluster bilden. Wenn diese Gene sehr eng gekoppelt vorliegen, würden sie in genetischen Analysen, dem *RPBI*-Gen entsprechend, auch als ein Resistenzlocus kartiert werden. Viele *R*-Gene treten in Form von Gen-Familien auf. Entweder existieren mehrere homologe Gene an verschiedenen Orten im Genom oder die Gene sind als Cluster, d. h. eng gekoppelt, organisiert und bilden einen komplexen Locus. Beispiele für solche *R*-Gen-Cluster sind die *Pto*-Gen-Familie (Martin *et al.* 1993, 1994, Salmeron *et al.* 1996), die *Cf*-Gene aus Tomate (Dixon *et al.* 1996, Thomas *et al.* 1998, Parniske *et al.* 1999), die Gene *RPP1* und *RPP5* aus *Arabidopsis* (Botella *et al.* 1998, Parker *et al.* 1997) und der *M*-Locus aus Flachs (Anderson *et al.* 1997). Diese in einem Cluster liegenden Gene vermitteln entweder Resistenzen gegen verschiedene Rassen eines Pathogens, wie im Fall der Gene *RPP1* und *RPP5*, oder es handelt sich um Gene mit völlig unterschiedlichen Funktionen, wie die Gene *Pto* und *Fen* aus der *Pto*-Gen-Familie, die eine Resistenz gegen *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* und eine Sensitivität gegenüber dem Insektizid Fenthion vermitteln (Loh und Martin 1995). Innerhalb eines Clusters können auch Gene liegen, die nur gemeinsam zur Ausbildung eines bestimmten Merkmals führen. Ein Beispiel ist das *Prf*-Gen, das ebenfalls zur *Pto*-Gen-Familie gehört und sowohl für die *Pto*- als auch für die *Fen*-spezifische Antwort benötigt wird (Salmeron *et al.* 1994). Bei der *Pseudomonas*-Resistenz in Tomate erkennt das *Prf*-Protein die Interaktion des Produkts des *Pto*-Gens der Tomate mit dem Produkt des *avr-Pto*-Gens des Pathogens, was schließlich zur Aktivierung der Abwehrreaktion führt (Salmeron *et al.* 1994).

4.4 Untersuchungen zur Expression der Kandidatengene in den Ökotypen Tsu und Cvi

Eine Expressionsanalyse der im Ökotyp Col identifizierten codierenden Sequenzen (Kandidatengene) wurde im Verlauf dieser Arbeit bereits begonnen. Mit Ausnahme der drei Gene CDS6, CDS8 und CDS10 konnte für alle auf dem BAC T12O21 als codierende Sequenzen eingestuft DNA-Abschnitte gezeigt werden, dass sie auch exprimiert werden, indem entsprechende cDNA-Sequenzabschnitte mittels PCR identifiziert wurden. In diesen Analysen wurde cDNA der Ökotypen Tsu (resistent) und Cvi (anfällig) eingesetzt. Für einige, aber nicht alle dieser Sequenzen wurden bereits entsprechende ESTs in Datenbanken identifiziert, womit eine Expression im Ökotyp Col belegt wurde (siehe Tab. 3-8). Zwei der untersuchten Gene wurden nur in einem der beiden Ökotypen, Tsu oder Cvi, exprimiert, und für sieben Gene wurde eine Expression nur in den infizierten Pflanzen nachgewiesen. Eine quantitative Aussage über die Expression der einzelnen Gene konnte mit diesen Analysen nicht gemacht werden. Hierfür müssten Northern-Blot- oder Real-Time-PCR-Analysen (z. B. Taqman-PCR) durchgeführt werden, zwei Methoden, mit denen die Menge an vorhandenen Transkripten erfasst und dann beispielsweise in infizierten und nicht-infizierten Pflanzen oder im zeitlichen Verlauf der Infektion verglichen werden kann. Auf diese Weise könnte ein Gen, das im resistenten Ökotyp Tsu im Verlauf der Infektion überexprimiert wird, identifiziert werden. Für das Gen CDS9 konnte im Rahmen dieser Expressionsstudien nur im Ökotyp Tsu eine Expression gezeigt werden, dort aber sowohl in infizierten Pflanzen zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Infektion, als auch in nicht infizierten Pflanzen (siehe 3.6). Es könnte sich hier um ein spezifisch im resistenten Ökotyp exprimiertes Gen handeln, dessen Expression allerdings nicht abhängig von einer Infektion ist. Im Fall des resistenzvermittelnden Gens würde es sich demnach um ein Gen handeln, das bei Vorliegen einer Infektion nicht erst induziert werden muss und dessen Genprodukt eine Schutz- oder Signalfunktion im Resistenzmechanismus übernimmt. Eine Aussage darüber, ob dieses Gen in infizierten Pflanzen stärker exprimiert wird, konnte nicht gemacht werden.

Auffällig ist, dass die Expression vieler Gene (CDS 2/3/4/7/13/15) nur in infizierten Pflanzen nachgewiesen werden konnte. Es könnte sich hier um Gene handeln, die sowohl im resistenten als auch im anfälligen Ökotyp durch die Infektion bzw. das Pathogen induziert werden, aber nicht mit der Resistenzantwort gekoppelt sind. Da das Pathogen zunächst auch in resistente Pflanzen eindringt und erst später an seiner Ausbreitung gehindert wird (Kobelt *et al.* 2000), könnte es sich hier um im ersten Stadium der Infektion in der Pflanze induzierte Vorgänge handeln. Mit den durchgeführten PCR-Analysen konnte die Expression von Genen, die im Ökotyp Col identifiziert wurden, in den Ökotypen Tsu und Cvi überprüft werden. Diese Expressionsergebnisse beziehen sich natürlich immer auf ganz definierte Bedingungen (Expression in Wurzeln, in einem bestimmten Entwicklungszustand der Pflanze, mit oder ohne Infektion). Unter anderen Bedingungen kann das Expressionsmuster auch anders aussehen. Dementsprechend kann nicht ausgeschlossen werden, dass es vielleicht unter anderen Bedingungen zu einer Expression des Gens CDS10 kommt.

Sollte im Ökotyp Tsu ein zusätzliches Gen vorhanden sein, das an der Resistenzreaktion

beteiligt ist, wird es mit den beschriebenen PCR-Analysen nicht identifiziert. Hierfür müssten die entsprechenden Sequenzen des Tsu-spezifischen DNA-Abschnitts bekannt sein, damit Primer abgeleitet und dann für die Analyse der cDNA eingesetzt werden könnten.

4.5 Die *RPBI*-vermittelte Resistenz: Eine bekannte Abwehrreaktion, aber keine Hinweise auf einen typischen Resistenzmechanismus

Die nach der Infektion mit dem Pathogen *P. brassicae* in *A. thaliana* ausgelöste Resistenzantwort ist in allen resistenten *Arabidopsis*-Ökotypen durch eine hypersensitive Reaktion (HR) charakterisiert. Im Bereich der gebildeten Nekrosen findet eine chemische Veränderung der Zellwände statt, indem es zur Einlagerung von Lignin oder ligninähnlichen Substanzen kommt (Fuchs und Sacristán 1996). Das Pathogen wird in diesen nekrotischen Arealen abgestorbener Zellen eingeschlossen, von der Nährstoffzufuhr abgeschlossen und an der weiteren Ausbreitung im Wurzelgewebe gehindert (Kobelt *et al.* 2000). Bei diesem Resistenzmechanismus handelt es sich um eine für Pflanzen sehr typische und schnell eintretende Abwehrreaktion, die auch für viele andere Wirt-Pathogen-Interaktionen beschrieben wurde (Gilchrist 1998). Ob es im vorliegenden Pathosystem möglicherweise auch zur Freisetzung antimikrobieller Substanzen in der Zelle kommt, ist nicht bekannt. Vermutungen einer solchen plasmatischen Abwehrreaktion ergaben sich im Fall von Kohlhernie-resistenten *Brassica*-Arten (*B. rapa*, *B. napus*, *B. nigra*, *B. oleracea*), bei denen keine HR beobachtet werden konnte. Das Pathogen wurde hier in frühen Entwicklungsstadien noch beobachtet, war aber später nicht mehr nachweisbar (Morgner 1995). Dekhuijzen (1979) dagegen beobachtete bei einer anderen resistenten Varietät von *B. rapa* nekrotische Gewebebereiche. Ein weiteres Beispiel dafür, dass die Ursache für eine Resistenz gegenüber *P. brassicae* nicht zwangsläufig eine HR sein muss, sind resistente Radieschen, in denen ebenfalls keine HR auftrat (Kroll *et al.* 1983). Einzelheiten über die während der Resistenzreaktion gegenüber *P. brassicae*, d. h. im Zeitraum von der Infektion der Pflanze bis zur Resistenzantwort, in der Pflanze ablaufenden Prozesse oder freigesetzten Substanzen sind nicht bekannt. Von Yu *et al.* (1998) wird eine *Arabidopsis*-Mutante beschrieben, in der, aufgrund einer Mutation im *DND1*-Locus, die während einer Infektion mit dem Pathogen *Pseudomonas syringae* typische hypersensitive Reaktion unterbunden wird. Es wurden in diesen Pflanzen aber trotzdem alle charakteristischen Resistenzantworten, wie die Induktion der Expression von PR-Genen und ein stark eingeschränktes Wachstum des Pathogens, nachgewiesen. In *Arabidopsis* wird eine große Anzahl von Genen beschrieben, die antimikrobielle Proteine codieren und durch Salicyl- oder Jasmonsäure aktiviert werden (Thomma *et al.* 1998). Kreuzungsexperimente des resistenten Ökotyps Tsu mit verschiedenen *Arabidopsis*-Mutantenlinien, die insensitiv gegenüber Salicylsäure bzw. Ethylen sind, lieferten keine Hinweise, dass diese Verbindungen, die in vielen bekannten Resistenzreaktionen eine wichtige Rolle spielen (siehe 1.1), in der *RPBI*-vermittelten Resistenz eine wichtige Funktion übernehmen. Da die Pflanzen der F₂-Generation dieser Kreuzungen keine erhöhte Anfälligkeit gegenüber *P. brassicae* zeigten, kann eine Beteiligung von SA und Ethylen an der Resistenzantwort ausgeschlossen werden (J. Siemens, persönliche

Mitteilung). Außerdem ist es auch unwahrscheinlich, dass das Phytoalexin Camalexin an der *RPBI*-vermittelten Resistenz beteiligt ist, da *Arabidopsis*-Mutantenlinien mit einem reduzierten Camalexingehalt keine verstärkte Anfälligkeit gegenüber dem Pathogen zeigten (J. Siemens, persönliche Mitteilung). Obwohl es sich bei der während der *RPBI*-vermittelten Resistenz auftretenden HR um einen bekannten Abwehrmechanismus handelt, deutet nach den durchgeführten Kartierungsarbeiten und beschriebenen Kreuzungen mit Mutantenlinien nichts darauf hin, dass es sich beim *RPBI*-Gen um ein typisches Resistenzgen bzw. einen typischen Resistenzmechanismus handelt. Keines der durch die hochauflösende Kartierung eingegrenzten Kandidatengene im Ökotyp Col zeigt Homologien zu bekannten Resistenzgenen bzw. Resistenzgen-Motiven (LRR, NBS, LZ oder TIR siehe 1.2). Sollte also im Ökotyp Tsu kein zusätzliches resistenzvermittelndes Gen vorliegen, was derzeit nicht ausgeschlossen werden kann, dann muss das *RPBI*-Gen eine für Resistenzgene bisher nicht typische bzw. nicht bekannte Struktur aufweisen.

4.6 Bedeutung der Isolierung des *RPBI*-Gens für die Resistenzzüchtung

Mit der Kartierung des Resistenzgens *RPBI* im Modellpathosystem *Arabidopsis* stellt sich natürlich die Frage der Praxisnähe, d. h. des angewandten Nutzens dieser Arbeit. Eine wirtschaftliche Relevanz hat die Identifizierung eines Resistenzgens auf den ersten Blick nur in Kulturformen der Gattung *Brassica*, in denen ein Befall mit dem Pathogen *P. brassicae* einen Schaden verursacht. Bei der Isolierung von Genen bietet die Modellpflanze *Arabidopsis* jedoch erhebliche Vorteile im Vergleich zum sehr viel komplexeren Genom der Kultur-Brassicaceen, in dem die Kartierung von Genen vor allem durch zahlreiche Duplikationen und chromosomale Umstrukturierungen wie Translokationen und Inversionen erheblich erschwert wird. Aufgrund der nahen Verwandtschaft von *Arabidopsis* und den *Brassica*-Kulturarten wird von einer großen Syntenie zwischen diesen Arten ausgegangen. Datenbankvergleiche zeigten, dass die codierenden Sequenzen bereits identifizierter homologer Gene in *A. thaliana* und *B. napus* im Durchschnitt zu 87 % konserviert sind (Cavell *et al.* 1998). Untersuchungen zur Colinearität größerer Chromosomenabschnitte in *Arabidopsis* und *Brassica* wurden in verschiedenen Arbeitsgruppen durchgeführt. In vergleichenden genetischen Kartierungen wurden von Lagercrantz *et al.* (1996) drei duplizierte Bereiche im *B. nigra*-Genom identifiziert, die Colinearität zu einem 7,5 cM (1,5Mb) großen Abschnitt auf Chromosom 5 von *Arabidopsis* zeigten. Scheffler *et al.* (1997) untersuchten einen 30 cM großen Abschnitt auf Chromosom 3 von *Arabidopsis* und fanden sechs duplizierte colineare Bereiche in *B. napus*. Ein ebenfalls 30 cM großer Bereich des *Arabidopsis*-Chromosoms 4 wurde von Cavell *et al.* (1998) analysiert, und es wurden sechs colineare Bereiche im Genom von *B. napus* identifiziert. Es wurde gezeigt, dass Sequenzen, die in *Arabidopsis* in einer Kopie vorliegen, im Durchschnitt mit 2 - 8 Kopien im Genom von *B. napus* vertreten sind. Sequenzen mit mehreren Kopien im *Arabidopsis*-Genom wurden mit mehr als 10 Kopien im *B. napus*-Genom identifiziert. Untersuchungen dieser Art wurden auch bezüglich eines *Arabidopsis*-Resistenzgens bzw. Genen, die Ähnlichkeiten zu bekannten Resistenzgenen aufweisen, durchgeführt. Einem colinearen Abschnitt auf Chromosom 4, der sechs Gene, u. a.

das Resistenzgen *RPS2*, trägt, wurden 17 Abschnitte im Genom von *B. nigra* zugeordnet. Das einzige Gen, das in *B. nigra* nur in einer Kopie vorliegt, ist das *RPS2*-Gen (Sadowski und Quiros 1998). Sillito *et al.* (2000) kartierten 44 *Arabidopsis*-ESTs mit Homologien zu klonierten Resistenzgenen (R-ESTs) sowohl in *Arabidopsis* als auch in *B. napus*, um Gene mit R-Gen-Charakter in *B. napus* zu identifizieren, und untersuchen somit gleichzeitig die intergenomische Colinearität. Da die ESTs größtenteils sehr verstreut auf 18 der 19 Kopplungsgruppen des *B. napus*-Genoms kartiert wurden, konnten nur einige colineare Regionen auf den Kopplungsgruppen N5, N7 und N8 detektiert werden. In diesen Regionen konnte eine konservierte Gen-Anzahl und Reihenfolge festgestellt werden. Die größte Anzahl von R-ESTs wurde auf Chromosom 1 von *Arabidopsis* kartiert, und diese DNA-Abschnitte konnten den Kopplungsgruppen N5, N6 und N15 von *B. napus* zugeordnet werden.

Aufgrund der in diesen Arbeiten angedeuteten Colinearitäten großer Chromosomenabschnitte zwischen *Arabidopsis* und Kulturformen der Brassicaceen und der Konserviertheit vieler Sequenzen bietet es sich an, vergleichende Kartierungsarbeiten durchzuführen mit dem Ziel, homologe Gene mit einem wirtschaftlichen Nutzen zu isolieren. Da bereits funktionell identische Gene in unterschiedlichen Arten identifiziert werden konnten (Gebhard *et al.* 1991, Fatokun *et al.* 1992, Kurata *et al.* 1994) und in den verschiedenen Arten auch homologe Resistenzmechanismen vermutet werden, wäre es möglich, dass ein zu *RPBI* homologes Gen in anderen Brassicaceen existiert und mit Hilfe der verfügbaren Daten des *RPBI*-Genlocus identifiziert werden kann. Ein Nachteil ist, dass die Colinearität chromosomaler Abschnitte durch die häufig auftretenden chromosomalen Umstrukturierungen im *Brassica*-Genom oftmals auch eingeschränkt sein kann (Kowalski *et al.* 1994, Osborn *et al.* 1997), wodurch vergleichende Kartierungsarbeiten erschwert werden. Grant *et al.* (1998) zeigten, dass im *B. napus*-Genom sechs Bereiche mit Homologien zum *Arabidopsis*-Resistenzgen *RPM1* existieren und dass in vier dieser sechs Regionen die *RPM1*-Gen-Kopie verloren gegangen ist. Eine zweite Möglichkeit wäre die direkte Übertragung des *RPBI*-Gens in Kulturformen der Brassicaceen. Eine erfolgreiche Übertragung von Resistenzgenen in eine andere Art beschreiben Thilmony *et al.* (1995) und Whitham *et al.* (1996). Hier wurde das *Pto*-Gen der Tomate auf Tabak und das *N*-Gen aus Tabak auf Tomate übertragen. In beiden Fällen waren die Gene auch im artfremden genetischen Hintergrund funktionsfähig.

4.7 Ausblick auf weiterführende Arbeiten

Nachdem der Resistenzlocus mittels hochauflösender Kartierungsarbeiten auf eine Region von ca. 71 kb eingegrenzt wurde, in der entsprechend der Col Sequenz 13 codierende Sequenzen lokalisiert sind, ergeben sich mehrere Möglichkeiten, nach denen weiter vorgegangen werden könnte, um das *RPBI*-Gen zu isolieren.

- Die codierenden Sequenzen in der *RPBI*-Region sind teilweise sehr eng gekoppelt und nur wenige 100 Basenpaare voneinander entfernt (siehe Abb. 4.1). Ob eine weitere Eingrenzung des Resistenzlocus auf ein einzelnes Gen bei der vorliegenden Gen-Dichte durchführbar wäre, ist fraglich. Die Kartierungspopulation müsste in sehr großem Ausmaß, d. h. um ein Vielfaches der jetzigen Größe von 4230 Pflanzen, erweitert werden, um Pflanzen mit Rekombinationsereignissen in direkter Nachbarschaft zu diesem Gen identifizieren zu können. Ob solche Pflanzen bei der festgestellten sehr niedrigen Rekombinationsfrequenz in der Nähe des *RPBI*-Locus (siehe 4.1) überhaupt identifiziert werden könnten, ist ungewiss. Das Resistenzgen mittels einer fortgeführten Feinkartierung mit molekularen Markern auf einen einzigen Genlocus weiter einzugrenzen, ist daher mit vertretbarem Aufwand nicht möglich.
- Eine weitere Möglichkeit wäre eine fortgeführte molekulare Analyse des eingegrenzten, cosegregierenden Bereichs im resistenten Ökotyp Tsu. Ein Teil der entsprechenden Region wurde bereits auf diese Weise analysiert (Sequenzierung von CDS 3/4/5). Um die Sequenzdaten der Allele bzw. der gesamten Region vergleichen zu können, müsste ein weiterer ca. 56 kb großer Abschnitt im Ökotyp Tsu sequenziert werden. Da sich aber nach den bereits durchgeführten Sequenzvergleichen gezeigt hat, dass eine Identifizierung von veränderten relevanten Sequenzabschnitten aufgrund des hohen Polymorphiegrads zwischen den beiden Ökotypen Tsu und Col (siehe 3.7.2) nicht möglich ist, könnte ein Sequenzvergleich nur dazu genutzt werden, auf diese Weise ein zusätzliches Gen im Ökotyp Tsu zu identifizieren. Es müsste dann eine größere Insertion vorliegen, die einen codierenden Sequenzbereich enthält. Ob eine mit einem hohen finanziellen Aufwand verbundene Sequenzierung neue Erkenntnisse bezüglich des *RPBI*-Gens liefern würde, ist daher nicht sicher.
- Als letzter Schritt müsste in jedem Fall eine Komplementation (biologischer Test), d. h. eine Transformation anfälliger Pflanzen durchgeführt werden, um den Beweis zu erbringen, dass es sich bei dem identifizierten DNA-Fragment, auf dem der *RPBI*-Locus lokalisiert wurde, um das resistenzvermittelnde Gen handelt.
Es wäre daher auch eine Möglichkeit, im jetzigen Stadium der Arbeiten mit der Durchführung biologischer Tests zu beginnen und das *RPBI*-Gen auf diese Weise direkt, ohne eine weitere Eingrenzung der *RPBI*-Region, zu isolieren. Für solche Transformationsexperimente müsste der gesamte Bereich, der die 13 Kandidatengene überspannt, aus dem resistenten Ökotyp Tsu in Form von klonierten DNA-Fragmenten zur Verfügung stehen,

um dann mittels *Agrobacterium* in anfällige Pflanzen eingeschleust zu werden. Es könnten hierfür entweder entsprechende Klone aus der Tsu-Cosmidbibliothek zur Transformation eingesetzt werden, oder die entsprechenden Tsu-Fragmente müssten mittels PCR isoliert und dann kloniert werden. Auf diese Art könnten entweder einzelne oder auch mehrere der zu untersuchenden Gene gemeinsam hinsichtlich ihrer Funktion als Resistenzgen überprüft werden, so dass nach dem Ausschlussverfahren letztlich ein Gen übrig bleiben würde, das im transformierten anfälligen Ökotyp zu einer Resistenzausprägung führt.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte aus der hergestellten Tsu-Cosmidbibliothek nur ein Cosmidklon (T3152a) isoliert werden, in dem drei der Kandidatengene (CDS 2/3/4) vollständig kloniert sind. Diese drei Gene liegen zwischen dem rechten Ende des BACs T12O21 (wurde rechts von *RPBI* kartiert) und dem cosegregierend kartierten linken Cosmidende (T12O21MN), d. h. in einem Abschnitt, von dem man nicht genau weiß, ob er noch als cosegregierend eingestuft werden muss (siehe 4.3). Es ist daher eher unwahrscheinlich, dass dieser Cosmidklon das Resistenzgen enthält. In Transformationsexperimenten mit diesem Cosmid könnten drei der 13 Kandidatengene bezüglich ihrer Beteiligung an der Resistenzausprägung untersucht und gegebenenfalls als Resistenzgene schon ausgeschlossen werden, wenn die transformierten Pflanzen keine Resistenz gegenüber *P. brassicae* zeigen.

Um Komplementationsversuche für alle Gene in der *RPBI*-Region durchführen zu können, müssten mehrere überlappende Cosmide, die als Contig die gesamte *RPBI*-Region überspannen, für Transformationsexperimente zur Verfügung stehen. Hierfür müsste die Tsu-Cosmidbibliothek vergrößert und mit den entsprechenden Sonden aus der *RPBI*-Region durchmustert werden. Anstelle einer Vergrößerung der Cosmidbibliothek könnte jedoch auch versucht werden, gezielt nur diejenigen Tsu-Sequenzabschnitte zu klonieren, in denen die Kandidatengene mit den jeweils zugehörigen Regulationselementen lokalisiert sind. Ein Vorteil im Vergleich zur Isolierung von Klonen aus einer Cosmidbibliothek wäre, dass auf diese Weise gezielt ausgewählte Abschnitte, z. B. einzelne Gene, untersucht werden könnten. Da die an der Regulation der einzelnen Gene beteiligten Bereiche nicht bekannt sind, sollte versucht werden, eine codierende Sequenz möglichst mit dem gesamten nichtcodierenden Abschnitt vor dem Start- und hinter dem Stopcodon, d. h. bis zum Beginn der jeweils nächsten codierenden Sequenzen, zu klonieren. Die entsprechenden DNA-Abschnitte müssten hierfür mittels PCR im Ökotyp Tsu amplifiziert und dann in einem Binärvektor kloniert werden. Hierfür sollte eine Polymerase mit sehr kleiner Fehlerrate, d. h. mit Proofreading-Aktivität, verwendet werden.

Neben der bevorzugten Methode der *Agrobacterium*-vermittelten Transformation könnten die gewünschten DNA-Fragmente auch mittels eines direkten Gentransfers (Protoplasten-Transformation, biolistische Transformation) in die Pflanzen eingeschleust werden. Auch in diesem Fall müssten die entsprechenden Sequenzabschnitte erst mittels PCR amplifiziert und in einem Vektor kloniert werden.

Eine weitere Möglichkeit wäre, aus einer cDNA-Bibliothek des resistenten Ökotyps Tsu cDNA-Klone zu isolieren, die exprimierte Gene aus der *RPBI*-Region enthalten. Für Komplementationsversuche müssten diese cDNAs (vorausgesetzt es handelt sich um "full length-cDNAs") dann in einen Vektor umkloniert werden, in dem sie unter der Kontrolle eines Promotors stehen, mit dem sie in der Pflanze konstitutiv oder auch erst nach Induktion exprimiert werden.

Sollte es sich beim *RPBI*-Locus um einen *R*-Gen-Cluster handeln, was, wie bereits beschrieben, nicht ganz ausgeschlossen werden kann (siehe 4.3), dann würde dies die Transformationsexperimente erheblich erschweren. Es kann dann nur zur Resistenz-
ausprägung kommen, wenn alle Gene des Clusters gemeinsam in die anfällige Pflanze übertragen werden.