

1. Einleitung

Die Bekämpfung von Pflanzenkrankheiten ist ein Schwerpunkt sowohl in der klassischen Pflanzenzüchtung als auch in der molekularen Analyse pflanzlicher Eigenschaften. Diese Krankheiten werden durch eine Vielzahl von Schädlingen, vor allem Mikroorganismen (Bakterien, Viren, Pilze), verursacht und können weltweit hohe Ernteverluste bei Kulturpflanzen verursachen.

Der obligat biotrophe Endoparasit *Plasmodiophora brassicae* verursacht eine der häufigsten Infektionen in der Familie der Brassicaceae, die Kohlhernie.

Die Modellpflanze *Arabidopsis thaliana* zählt zum Wirtspflanzenkreis von *Plasmodiophora brassicae* und zeigt alle typischen Kennzeichen des Krankheitsverlaufes. In *Arabidopsis* konnte das dominante Resistenzgen *RPBI* identifiziert werden, welches Resistenz gegen ein Isolat von *P. brassicae* vermittelt (Fuchs und Sacristán 1996). Die Isolierung dieses Resistenzgens soll einerseits neue Erkenntnisse zum Verständnis von Resistenzmechanismen und der Struktur und Funktion von Resistenzgenen im Allgemeinen liefern. Zum anderen sind möglicherweise Hinweise zum Mechanismus der spezifischen Abwehrreaktion gegen den Erreger *P. brassicae* zu erwarten. Das Resistenzgen könnte außerdem zum Aufspüren natürlicher Resistenzen in Kultur-Brassicaceen genutzt werden oder direkt in solche übertragen werden.

Der den Protisten zugeordnete Krankheitserreger *Plasmodiophora brassicae* ist weltweit, vor allem in den gemäßigten Klimazonen, verbreitet und führt zu Ernteverlusten bei wirtschaftlich relevanten Kulturformen der Brassicaceae wie z. B. *Brassica rapa* (Rübsen, Chinakohl), *B. oleracea* (Kohl, Kohlrabi, Grünkohl), *B. napus* (Raps) und *B. nigra* (Schwarzer Senf). Die Bekämpfung des Erregers gestaltet sich aufgrund der extrem widerstandsfähigen und bis zu 15 Jahre infektiösen Dauersporen sehr schwierig. Da es keine ökonomisch und ökologisch vertretbaren Fungizide gibt, kann die Infektionsrate lediglich durch Maßnahmen wie z. B. weitgestellte, kreuzblütlerarme Fruchtfolgen und eine Erhöhung des Boden-pH-Wertes gesenkt werden. Die einzige Möglichkeit, das Problem eines Befalls zu lösen, ist daher der Anbau resistenter Sorten. Das Interesse, im Genpool der Brassicaceae vorkommende Resistenzen zu identifizieren und züchterisch zu nutzen, ist daher sehr groß. Die Mechanismen, die Resistenzen gegen *P. brassicae* zugrunde liegen, konnten bisher nicht aufgeklärt werden.

1.1 Abwehrmechanismen bei Pflanzen

Die Resistenz einer Pflanze ist gekoppelt an die Aktivierung einer Vielzahl unterschiedlichster Abwehrmechanismen. Hierzu zählen die transkriptionelle Aktivierung von zahlreichen an der Abwehrreaktion beteiligten Genen, die Öffnung von Ionenkanälen und die Modifizierung von Proteinen (z.B. Phosphorylierung). Außerdem kommt es zur Bildung von sekundären Botenstoffen, um eine zeitlich und räumlich koordinierte Resistenzantwort zu erzielen.

Bei der **hypersensitiven Reaktion (HR)** handelt es sich um einen schnellen Zelltod am Ort der Infektion. Eine solche Reaktion kann schon einige Stunden nach dem Kontakt zwischen Wirt und Pathogen eintreten. Das Pathogen wird in diesem Bereich abgestorbener Zellen (Nekrosen) von der Nährstoff-Zufuhr abgeschnitten und an einer weiteren Verbreitung im Wirt gehindert. Es handelt sich hierbei um eine Art programmierten Zelltod, oder die Freisetzung von giftigen Substanzen oder freien Radikalen führt zum Absterben der Zellen. Pathogene, die eine HR induzieren, aktivieren in der Pflanze eine **systemisch erworbene Resistenz (SAR)**. Als Folge zeigt die Pflanze bei weiteren Infektionen eine erhöhte Resistenz, und Abwehrreaktionen können auch in anderen Bereichen der Pflanze auftreten (Hunt *et al.* 1996, Delaney 1997, Cao *et al.* 1998). Während dieser SAR steigt in der Pflanze der Gehalt von **Salicylsäure (SA)** an und Abwehr-Gene, wie z. B. an der Pathogenese beteiligte (**PR** - pathogenesis related) Gene, werden exprimiert (Glazebrook 1999). Die Salicylsäure verbreitet sich vom Ort der HR in andere Bereiche der Pflanze. Dass bei einigen inkompatiblen Interaktionen SA von absoluter Notwendigkeit ist, zeigen Versuche mit Mutanten, die ein SA-abbauendes Enzym (*nahG*) tragen. Es wird von einer Beteiligung der SA an vielen Resistenzreaktionen ausgegangen.

Allerdings ist nicht an allen inkompatiblen Interaktionen eine HR beteiligt. Zum Schutz gegen eine Infektion kann auch eine Art physikalische Barriere dienen. Hierzu zählen **Zellwandverstärkungen**, bei denen es zur Akkumulation von phenolischen Substanzen (z. B. Lignin) oder Kallose kommt. Kalloseeinlagerungen in Plasmodesmata können die Virusverbreitung von Zelle zu Zelle verhindern. Des Weiteren sind extrazelluläre hydroxyprolinreiche Glycoproteine (HRGPs) an der Stärkung von Zellwänden beteiligt. Eine andere Klasse extrazellulärer Proteine sind die Polygalacturonase-inhibierenden Proteine (PGIPs), die zellwandabbauende Enzyme einiger Pathogene inaktivieren.

Zu einer besonders schnell ausgelösten Reaktion der Pflanze, die in weniger als fünf Minuten eintritt, zählt die Bildung **reaktiver Sauerstoffverbindungen (ROS** - reactive oxygen species) wie $O_2^{\bullet -}$ (Superoxid) und H_2O_2 (Wasserstoffperoxid) (Doke *et al.* 1996). H_2O_2 selbst wirkt toxisch, und in Anwesenheit von Eisen (Fe) entsteht ein extrem reaktives Wasserstoffradikal OH^{\bullet} . Außerdem ist H_2O_2 an der Stärkung der Zellwände beteiligt, indem es verschiedene Hydroxyproline und prolinreiche-Glycoproteine mit der Polysaccharid-Matrix verknüpft und Lignin-Polymere bildet. Dem H_2O_2 wird auch eine Rolle bei der Aktivierung bestimmter Gene und Enzyme zugeschrieben.

Eine weitere wichtige Funktion im Zusammenspiel der verschiedenen Abwehrmechanismen bei Pflanzen übernimmt das **Stickstoffmonoxyd (NO)**, ein Signalmolekül, das bei Säugetieren verschiedenste biologische Prozesse des Immun-, Nerven- und Vaskulärsystems reguliert. Bei der Aktivierung von pflanzeigenen Abwehrmechanismen scheint NO zusammen mit den reaktiven Sauerstoffen eine wichtige synergistische Rolle zu spielen. NO inhibiert die H_2O_2 -entgiftenden Enzyme Katalase und Ascorbat-Peroxidase und kann somit die fördernde Wirkung von H_2O_2 bei der Induzierung von Zelltod (HR) unterstützen. Das NO muss aber noch eine weitere, bisher ungeklärte Rolle während der Abwehrreaktion spielen, da es bei erhöhtem NO-Vorkommen zur Akkumulation von mRNAs vieler Gene kommt, die an

Zellschutz- und Abwehrreaktionen beteiligt sind. Eine Funktion als Signalmolekül übernehmen auch die Phytohormone **Jasmonsäure (JA)** und **Ethylen** (Penninckx *et al.* 1998). Der JA-Gehalt steigt nach einem Pathogenbefall sowohl lokal als auch systemisch an. Für einige Resistenzgene von *Arabidopsis* konnte eine JA-abhängige, SA-unabhängige Signaltransduktion nachgewiesen werden (Penninckx *et al.* 1996, Thomma *et al.* 1998). Ethylen wird während der inkompatiblen und kompatiblen Interaktion gleichmäßig synthetisiert. Es wirkt häufig in Kombination mit JA, so z. B. bei der Aktivierung von Proteinase-Inhibitor-Genen, bestimmten PR- und Chitinase-Genen.

Es konnte eine Reihe von Genen bzw. Proteinen identifiziert werden, die im Verlauf einer Infektion bzw. einer Resistenzantwort eine wichtige Rolle spielen müssen, da Transkripte dieser Gene innerhalb kürzester Zeit nach der Infektion verstärkt auftreten. Zu diesen an der Pathogenese und Abwehr beteiligten Proteinen gehören vor allem zellwandabbauende Proteine (Chitinasen, Glucanasen), Proteine mit antimikrobieller Wirkung und Proteine, die eine Funktion bei der Signaltransduktion übernehmen. Es konnte gezeigt werden, dass es eine synergistische Wirkung von Ethylen und SA bei der Expression vieler PR-Gene gibt. PR-Proteine wie die Lipoxygenase sind an der Bildung wichtiger Signalmoleküle wie z. B. JA und verschiedenen Sekundärmetaboliten mit antimikrobieller Wirkung beteiligt. Wichtig ist, dass die transkriptionelle Aktivierung all dieser Gene zeitlich und räumlich koordiniert erfolgt. Hier können DNA-bindende, regulatorisch wirksame Proteine (z. B. Transkriptionsfaktoren) beteiligt sein. Ebenso zu den Sekundärmetaboliten mit antimikrobieller Wirkung zählen die **Phytoalexine**. Ein gut untersuchtes Beispiel ist das *Arabidopsis*-Phytoalexin Camalexin. Am Biosyntheseweg dieser Verbindungen ist eine Vielzahl anderer Gene beteiligt, deren Aktivierung z. B. über eine bestimmte DNA-Region im Promotorbereich dieser Gene reguliert wird.

1.2 Strukturmerkmale und Funktionen von Resistenzgenen

Mehr als 20 Resistenzgene (*R*-Gene) konnten bisher in 8 Pflanzen-Spezies, sowohl Mono- als auch Dikotyledonen, identifiziert und charakterisiert werden. Sie vermitteln Resistenzen gegen Bakterien, Pilze, Viren, Nematoden und Blattläuse.

Diese *R*-Gene lassen sich nach den jeweiligen Strukturmerkmalen der Proteine, die sie codieren, in 6 Klassen einordnen:

- Intrazelluläre LRR-(leucine-rich repeats)-Proteine mit Nukleotid-bindenden Domänen (NBS)
- Intrazelluläre LRR-Proteine mit NBS-Domänen und einer Leucin-Zipper (LZ) Region
- Intrazelluläre NBS-LRR-Proteine mit einer Region, die Ähnlichkeit zu Toll- und Interleukin-1-Rezeptor-Proteinen (TIR) haben
- Intrazelluläre Protein-Kinasen
- Rezeptorähnliche Protein-Kinasen mit einer extrazellulären LRR-Domäne
- Membrangebundene extrazelluläre LRR-Proteine

Den *R*-Genen werden zwei Hauptfunktionen zugeordnet. Die Erkennung (Rezeptor-Funktion) der pathogenspezifischen *avr*-Gen-Produkte und die Aktivierung von Signaltransduktionsketten, die zu den komplexen Resistenzantworten führen (Hutcheson 1998). Für die spezifische Erkennungsfunktion wird entweder eine Proteinkinase-Domäne oder eine Leucinreiche-Wiederholungs-Region (LRR) verantwortlich gemacht. Die Mehrheit der *R*-Gene codiert intrazelluläre Proteine mit LRR- und NBS-Domänen. Es wurden aber auch extrazelluläre, rezeptor-ähnliche Proteine identifiziert.

Bei den **LRR**-Domänen handelt es sich um Regionen mit seriellen Wiederholungen einer 24 Aminosäuren langen Sequenz, die in regelmäßigen Abständen Leucine oder andere hydrophobe Aminosäuren enthält. Solche Abschnitte sind bekannt für ihre Beteiligung an Protein-Protein-Interaktionen. Diese Bereiche könnten somit als Bindungsstelle für einen pathogenspezifischen Liganden dienen oder über Wechselwirkungen mit Effektor-Proteinen an Signaltransduktionsketten beteiligt sein. Die meisten LRR *R*-Proteine besitzen eine zentrale Nukleotid-Bindestelle (**NBS**), deren Funktion bei der Induktion von Resistenzen noch unbekannt ist. Diskutiert werden hier die Bindung von ATP und GTP oder eine Funktion als Adapter-Region, die die C-terminale LRR-Domäne mit verschiedenen N-terminalen Effektoren verbindet. Bei den NBS-LRR *R*-Proteinen können noch zwei Unterklassen unterschieden werden, nämlich solche mit einem sog. **Leucin-Zipper** (Reißverschluss) oder mit einer großen N-terminalen **TIR**-Domäne. Leucin-Zipper spielen eine Rolle in der Homo- und Hetero-Dimerisierung von eukaryotischen Transkriptionsfaktoren und bei der Erleichterung der Interaktion zwischen Proteinen anderer Funktion. Über ihre Rolle bei der Aktivierung von Resistenzen ist nichts Genaueres bekannt. Die TIR-Domänen haben Ähnlichkeit mit der cytoplasmatischen Signaldomäne des *Drosophila*-Toll-Proteins und dem Interleukin-1-Rezeptor (IL-1R) des Menschen. Beide Proteine aktivieren auf ein Signal hin Transkriptionsfaktoren. Der TIR-Domäne im *R*-Protein wird eine Rolle bei der Signaltransduktion zugeordnet, nicht dagegen bei der Liganden-Bindung.

Zu den *R*-Proteinen mit **Protein-Kinase-Domänen** zählen die intrazellulären Serin/Threonin-Proteinkinasen (z. B. *Pto*-Gen/Tomate) und die intrazellulären Serin/Threonin-Proteinkinasen, die über eine transmembrane Region mit einer extrazellulären LRR-Region verbunden sind (z. B. *Xa21*-Gen/Reis). Serin/Threonin-Proteinkinasen wird eine Rolle bei der Signal-erkennung und Signaltransduktion zugeordnet (Hunter 1991, Fantl *et al.* 1993). Es wurden außerdem *R*-Proteine identifiziert, die nur eine transmembrane Region besitzen, an die eine extrazelluläre LRR-Domäne geknüpft ist (z. B. *Cf*-Gene/Tomate).

Es wurden verschiedene Modelle für das Zusammenwirken von *R*-Genen und *avr*-Genen und die Beteiligung weiterer Proteine an Signalketten, die zur Aktivierung einer Resistenzantwort führen, entworfen. Die *Pto*-vermittelte Resistenz der Tomate gegen das Bakterium *Pseudomonas syringae* ist eine der am intensivsten untersuchten Resistenzen (Scofield *et al.* 1996, Oldroyd und Staskawicz 1998, Tang *et al.* 1999). Das *Pto*-Gen benötigt zwei weitere Gene, das *avrPto*-Gen und das *Prf*-Gen, zur Aktivierung der Resistenzantwort. *Pto* und *Prf*

liegen beide innerhalb einer Gen-Familie, die weitere Gene enthält, denen eine Beteiligung an der Signaltransduktion zugeordnet wird. Es würde an dieser Stelle aber zu weit gehen, auf dieses System und andere Modelle genauer einzugehen. Einen guten Überblick zu diesem Thema geben die folgenden Artikel: Staskawicz *et al.* 1995, Bent 1996, Hammond-Kosack und Jones 1996, 2000, Aarts *et al.* 1998, Martin 1999, Ellis *et al.* 2000.

1.3 Isolierung von Genen

Je nachdem welche Informationen über das zu isolierende Gen vorliegen, werden verschiedene Methoden zur Klonierung von Genen angewendet. Im Besonderen wird hier auf das kartengestützte Klonieren ("map-based cloning") eingegangen, da diese Methode im Rahmen der vorliegenden Arbeit angewendet wurde.

Bei der Insertionsmutagenese mittels T-DNA oder Transposons wird das gesuchte Gen durch Integration einer bekannten DNA-Sequenz (Insert) im codierenden Bereich inaktiviert und gleichzeitig markiert. Mittels "inverser PCR" (Ochman *et al.* 1988), "vectorette PCR" (Riley *et al.* 1990) oder "plasmid rescue" (Gibson und Somerville 1992) können dann dieses Insert flankierende, genomische DNA-Sequenzen isoliert und zur Durchmusterung einer cDNA-Bank eingesetzt werden.

Die Methode der genomischen Subtraktion (Sun *et al.* 1992) beruht auf der Abwesenheit eines DNA-Fragments in einer Deletionsmutante im Vergleich zum Wildtyp. Über die unterschiedliche Expression von Genen in verschiedenen Pflanzengewebe oder unter verschiedenen Umweltbedingungen (z. B. Infektion mit Pathogenen) kann auch über das spezifische Auftreten von mRNAs oder Proteinen eine Aussage gemacht werden ("differential display", Liang und Pardee 1992).

Bereits bekannte und sequenzierte Gene können mit sog. ESTs ("expressed sequence tags", ansequenzierte cDNAs) verglichen werden, die in öffentlichen Datenbanken zugänglich sind. So kann einem exprimierten Gen eine mögliche Funktion zugeordnet werden. Sequenzmotive bekannter Gene können außerdem zur Ableitung spezifischer PCR-Primer genutzt werden, die Bereiche verwandter Gene amplifizieren und zur Durchsichtung von genomischen Banken eingesetzt werden können.

1.3.1 Kartengestütztes Klonieren

Man unterscheidet hier zwei Arten der Genkartierung, die genetische und die physikalische. Die genetische Kartierung von Genen erfolgt über die Analyse der gemeinsamen Vererbung (Kopplungsanalyse) von Markern, die mit einem bestimmten Phänotyp (z. B. Resistenz) gekoppelt sind und deren Position im Genom bekannt ist. Zur Erstellung genetischer Karten werden sowohl phänotypische als auch molekulare Marker eingesetzt. Diese Kopplungsanalysen werden häufig zuerst mit gleichmäßig über das Genom verteilten phänotypischen Markern durchgeführt, um das zu kartierende Gen einer Kopplungsgruppe (Chromosom) zuordnen zu können. Der genetische Abstand wird anhand der Häufigkeit von Rekombinationsereignissen zwischen dem untersuchten Merkmal und den Markern bestimmt.

Er wird in centi Morgan (cM) angegeben, wobei 1 cM einer Rekombinationsfrequenz von 1 % entspricht. Zur Kartierung eines Merkmals wird eine Kartierungspopulation (i. d. R. eine F₂- oder erste Rückkreuzungs-(BC₁)-Generation) hergestellt, wobei es von Vorteil ist, wenn zwischen den Eltern möglichst viele Polymorphismen auftreten. Diese Kartierungspopulation wird dann zuerst mit phänotypischen Markern untersucht, um die Position des Merkmalslocus grob zu bestimmen. Dann werden molekulare Marker verwendet, um die Position des Gens genauer zu bestimmen. Für diese Feinkartierung werden teilweise bereits in dieser Region kartierte molekulare Marker eingesetzt. Häufig müssen aber auch neue Marker in der untersuchten Region kartiert werden. Es gibt verschiedene Markersysteme, mit denen Polymorphismen auf DNA-Ebene zwischen den Eltern detektiert werden können:

- RFLP (restriction fragment length polymorphism)
- RAPD (random amplified polymorphic DNA)
- CAPS (cleaved amplified polymorphic sequences)
- Mikrosatelliten/SSLP (simple sequence length polymorphism) / STMS (sequence tagged microsatellites) / SSR (simple sequence repeats)
- AFLP (amplified fragment length polymorphism)
- SNP (single nucleotide polymorphism)
- SCAR (sequence characterized amplified regions)
- SSCP (single-strand conformation polymorphism)

Für *Arabidopsis thaliana* steht eine große Anzahl solcher genetischen Marker (phänotypische und molekulare) öffentlich zur Verfügung (Chang *et al.* 1988, Nam *et al.* 1989, Schmidt *et al.* 1992, Hauge *et al.* 1993, Lister und Dean 1993, Jarvis *et al.* 1994, Koornneef 1994, Meyerowitz 1994, Liu *et al.* 1996).

In der vorliegenden Arbeit wurden vorrangig RFLP-Marker verwendet. Grundlage dieses Markertyps sind polymorphe Restriktionsschnittstellen in den beiden Eltern. Die Detektion dieser Restriktions-Fragment-Polymorphismen erfolgt über die Hybridisierung mit markierten DNA-Sonden (z. B. PCR-Fragmente, Plasmid- oder Phagenklone). Als zweites Markersystem wurden PCR-Marker (RAPD-Marker, allelspezifische PCR-Marker) eingesetzt. Die allelspezifischen PCR-Marker werden den SNP-Markern zugeordnet, da hier Nukleotidpolymorphismen zwischen den *Arabidopsis*-Ökotypen zur Ableitung von spezifischen, nur in einem Ökotyp bzw. Allel bindenden, Primern genutzt wurden.

Die physikalische Kartierung liefert absolute Distanzen zwischen bestimmten Markern im Genom. Zur Erstellung dieser Karten werden genomische DNA-Bänke verwendet, die mit Hilfe künstlicher Vektoren wie YACs (yeast artificial chromosomes), BACs (bacterial artificial chromosomes), PACs (phage P1 artificial chromosomes) oder Cosmiden hergestellt werden. Die Positionierung der genomischen Klone erfolgt durch Erstellung von Contigs (contiguous sequence), in denen diese Klone in linearer Ordnung und überlappend entsprechend der Lage auf dem Chromosom angeordnet sind. Die Position und die Überlappungen der Klone werden durch Restriktionsanalysen der Klone und

Hybridisierungen mit bereits kartierten DNA-Fragmenten, anderen Klonen oder Klon-Enden ermittelt. Außerdem können Sequenzinformationen der Klone z. B. für spezifische PCR-Marker genutzt werden, so dass überlappende Bereiche auch anhand von PCR-Analysen detektiert werden können. Auch hier steht für *A. thaliana* eine größere Anzahl solcher genomischen Bänke zur Verfügung (Ecker 1990, Ward und Jen 1990, Grill und Somerville 1991, Choi *et al.* 1995, Creusot *et al.* 1995, Liu *et al.* 1995, Mozo *et al.* 1998). Kann das gesuchte Gen auf einem Klon lokalisiert werden, wird dieser als Sonde zur Durchmusterung einer cDNA-Bank oder zur Transformation eingesetzt. Es steht außerdem eine große Anzahl an in Datenbanken gesammelten "expressed sequence tags" (ESTs) von *A. thaliana* (Newman *et al.* 1994, Höfte *et al.* 1993, Cooke *et al.* 1996, Delseny *et al.* 1997) zur Verfügung. Vergleiche mit diesen ESTs können eine Aussage über exprimierte Bereiche auf dem Klon machen.

Letzter Schritt der Klonierung jedes Gens ist immer die Komplementation. Dies geschieht häufig durch eine *Agrobacterium tumefaciens* vermittelte Transformation, wobei Pflanzen, die das untersuchte Gen nicht exprimieren, mit dem zuvor identifizierten DNA-Fragment transformiert werden.

1.4 Arabidopsis thaliana

Das einjährige, zur Familie der Brassicaceae zählende Wildkraut *Arabidopsis thaliana* ist besonders geeignet für klassische und molekulare genetische Studien. Mit der Identifizierung und Charakterisierung von Genen dieser Modellpflanze sollen neue Kenntnisse über verschiedenste Stoffwechselprozesse, morphologische Merkmale, Anpassungen an verschiedene Umweltbedingungen, Genregulations- und DNA-Reparaturprozesse und Abwehrreaktionen gegenüber Krankheitserregern in höheren Pflanzen gewonnen werden. *Arabidopsis* ist fast ausschließlich autogam, so dass reine Linien leicht hergestellt werden können. Das aus nur 5 Chromosomen bestehende kleine Genom hat einen geringen Anteil an repetitiven Sequenzen. Von großer Wichtigkeit für genetische Studien sind aber auch die hohe Reproduktionsrate (bis zu 10.000 Samen pro Pflanze), das schnelle Reifen der Samen (Samenreife nach 4 - 6 Wochen) und der geringe Platzbedarf. Verschiedene *in vitro* und *in planta* Transformationsmethoden für *Arabidopsis* sind etabliert. Für die Erzeugung von Mutanten zur gezielten Untersuchung bestimmter Phänotypen werden sowohl die physikalische und chemische Mutagenese als auch die Insertionsmutagenese und der Einsatz von Transposonsystemen angewendet.

Seit 1996 wurde im Rahmen der 'Arabidopsis Genome Initiative' (AGI) an der ersten Entschlüsselung des gesamten Genoms einer höheren Pflanze gearbeitet. Die vollständige Sequenzierung des Genoms von *A. thaliana* wurde im Dezember 2000 als Ergebnis der Kooperationsarbeit von über 40 Laboratorien in Europa, den USA und Japan erfolgreich abgeschlossen. Grundlage der Sequenzierungsarbeiten war eine aus BAC-Klonen erstellte physikalische Karte des gesamten *Arabidopsis*-Genoms (Mozo *et al.* 1999, Marra *et al.* 1999). Die Sequenzierung der Chromosomen 2 und 4 wurde bereits 1999 abgeschlossen. Das Genom hat eine Größe von 125 Mb, wovon 115,4 Mb sequenziert wurden. Die nichtsequenzierten

Centromer- und rDNA-Regionen wurden auf ca. 10 Mb geschätzt. Von den 5 sequenzierten Chromosomen ist Chromosom 1 mit 29,1 Mb das größte. Insgesamt konnten 25.498 Gene identifiziert werden, die Proteine aus 11.000 Proteinfamilien codieren. Der Anteil an Duplikationen einzelner Gene oder größerer Segmente (≥ 100 kb) ist mit ca. 60 % sehr groß im Vergleich zum Genom von *Drosophila melanogaster* und *Caenorhabditis elegans*, zwei weiteren vollständig sequenzierten, eukaryotischen Genomen. Einen sehr guten Überblick über alle Daten und eine Charakterisierung des gesamten Genoms und speziell zu Chromosom 1 von *A. thaliana* geben die folgenden Artikel: "Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*" ('The Arabidopsis Genome Initiative' 2000) und "Sequence and analysis of chromosome 1 of the plant *Arabidopsis thaliana*" (Theologis *et al.* 2000).

Es ist hier wichtig anzumerken, dass der Hauptteil der im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Kartierungsarbeiten zu einem Zeitpunkt erfolgte, an dem die Daten des Sequenzierungs-Projektes für Chromosom 1 noch nicht zugänglich waren. Erst im letzten Abschnitt der Arbeit konnten diese Daten für eine ganz gezielte Untersuchung der Region um das *RPBI*-Gen auf Sequenzebene eingesetzt werden. Da es sich bei den veröffentlichten Daten aber um Sequenzen des *Arabidopsis*-Ökotyps Columbia (anfällig gegenüber *P. brassicae*) handelt und es teilweise eine große Variation zwischen den verschiedenen Ökotypen gibt (King *et al.* 1993, Hardtke *et al.* 1996, Breyne *et al.* 1999, Erschadi *et al.* 2000), konnte die *RPBI*-Region nicht direkt aus der vorhandenen Sequenzen abgeleitet werden. Es waren deshalb vergleichende Untersuchungen am resistenten Ökotyp Tsu-0 notwendig.

1.5 Genetik der Wirt-Pathogen-Interaktion

Die differentielle Interaktion zwischen Wirt und Pathogen wird mit der Gen-für-Gen-Hypothese (Flor 1956) beschrieben. Danach kommt es dann zur Inkompatibilitätsreaktion (Resistenz), wenn der Wirt über ein bestimmtes Resistenzgen (*R*-Gen) und der Erreger über das entsprechende Avirulenzgen (*avr*-Gen) verfügt. Trägt der Erreger jedoch ein geeignetes, mit dem Resistenzgen korrespondierendes Virulenzgen, kommt es zur kompatiblen Interaktion und die Krankheit bricht aus. Diesem Resistenztyp wird die rassenspezifische Resistenz zugeordnet. Diese Gen-für-Gen-Interaktion wird mit dem Elicitor-Rezeptor-Modell (Gabriel und Rolfe 1990) erklärt. Nach diesem Modell codiert das Resistenzgen einen Rezeptor, der einen vom komplementären Avirulenzgen direkt oder indirekt gebildeten Elicitor bindet. Diese Rezeptor-Ligand-Interaktion ist sehr spezifisch, so dass Mutationen in *avr*-Genen die Erkennung des Pathogens in der Pflanze modifizieren oder inaktivieren können. Der Rezeptor-Elicitor-Komplex aktiviert dann eine Signaltransduktionskette, die schließlich zur Induktion der Resistenzreaktion führt. Hierbei können von verschiedenen *R*-Genen gebildete Rezeptoren über eine oder mehrere Signaltransduktionsketten die gleichen zur Resistenzreaktion führenden Gene aktivieren. Die *Arabidopsis*-Gene *RPS2* und *RPM1* vermitteln beide eine Resistenz gegen *Pseudomonas syringae* (Ritter und Dangl 1996). Beide

Gene aktivieren über einen gemeinsamen Signalweg eine Salicylsäure-abhängige Resistenzantwort. Die Gen-für-Gen-Hypothese ist allerdings nicht als strenge Interaktion zweier spezifischer Gene zu verstehen. So kann es zu einem *R*-Gen mehrere komplementäre *avr*-Gene geben, wie im Fall des *RPM1*-Gens, dessen Genprodukt mit den Produkten der *avr*-Gene *avrRPM1* und *avrB* interagieren kann (Reuber und Ausubel 1996, Leister *et al.* 1996).

Plasmodiophora brassicae tritt in Form unterschiedlicher physiologischer Rassen (Pathotypen) auf, die morphologisch nicht unterscheidbar sind. Diese Pathotypen interagieren differentiell mit den verschiedenen Wirtsgenotypen. In verschiedenen *Brassica*-Arten konnten bisher mehrere dominante, monogene Resistenzen und eine polygen bedingte Resistenz beschrieben werden. Es handelt sich hierbei um drei dominante, nicht gekoppelte Resistenzgene A, B und C in *B. rapa* (Wit und van de Weg 1964, James und Williams 1980). Die Resistenz von *B. napus* wird durch mehrere dominante Gene begründet, die gegen bestimmte Pathotypen von *P. brassicae* wirksam sind (Johnston 1968, Ayers und Lelacheur 1972, Diederichsen 1992). In *B. nigra* wurde ein dominantes Resistenzgen genetisch identifiziert (Sacristán *et al.* 1989, Wagenblatt 1992). Den monogenen Resistenzen der Wirtspflanzen werden postulierte korrespondierende Virulenzfaktoren des Pathogens zugeordnet (Diederichsen und Sacristán 1996). Bei der monogen und dominant vererbten Resistenz handelt es sich um eine rassenspezifische Resistenz, die nur Schutz gegen bestimmte Pathotypen des Erregers verleiht. Die rassenspezifische Resistenz dagegen wird meist polygen vererbt und wird durch abiotische Faktoren und den jeweiligen genetischen Hintergrund des Wirts beeinflusst. *Brassica oleracea* verfügt über eine solche rezessive, polygen bedingte Resistenz mit einer additiven Wirkung der Gene (Weisaeth 1961, Dixon 1981, Laurens und Thomas 1993, Voorrips *et al.* 1997)

1.6 Das Krankheitsbild von *Plasmodiophora brassicae*

Bei anfälligen Pflanzen zeigen sich die Krankheitssymptome in Form von gallenartigen Wucherungen an den Wurzeln und am Hypokotyl, die als Hernien ("clubs") bezeichnet werden. Im Bereich der Gallen kommt es zu einer Zellvermehrung (Hyperplasie) und Zellvergrößerung (Hypertrophie). Die Pflanzen sind sichtbar geschädigt, und in späteren Infektionsstadien verfaulen die Wurzeln meist und die Pflanzen sterben ab. Die Infektion mit *P. brassicae* führt in der Wirtspflanze zu einer generellen Veränderung des Stoffwechsels (Ludwig-Müller 1999). Durch die ungehinderte Vermehrung des Pathogens in den Wurzeln des Wirts (Gallenbildung) wird die Wasser- und Nährstoffversorgung empfindlich gestört, was zu Welkeerscheinungen und auch zum Absterben der Pflanze führen kann. Die Menge an Nuklein- und Aminosäuren und der Gehalt an Stärke und Proteinen ist in infizierten Wurzeln erhöht. Außerdem kommt es nach einer Infektion im Bereich der Gallen zu einem Anstieg der Auxin- und Cytokininkonzentration (Dekhuijzen und Overeem 1971, Ludwig-Müller 1993).

Die zwei wichtigsten an der Gallenbildung beteiligten Phytohormone sind das Auxin Indol-3-essigsäure (IES) und das Cytokinin Zeatin. Es konnte gezeigt werden, dass das Pathogen in der Lage ist, Zeatin zu synthetisieren (Müller und Hilgenberg 1986). Der erhöhte Auxingehalt muss dagegen durch die Neusynthese in der Pflanze erreicht werden. In infizierten Wurzeln konnte außerdem eine erhöhte Jasmonsäure (JA)-Konzentration (Grsic *et al.* 1998) und eine erhöhte Nitrilase-Konzentration (Rausch *et al.* 1981, Grsic *et al.* 1997) nachgewiesen werden. In der IES-Biosynthesekette fungieren die für Brassicaceen typischen Indolglucosinolate als Intermediate und können auch als Speicher für IES dienen. Das Phytohormon JA bewirkt die Induktion der IES- und Indolglucosinolat-Synthese. IES kann über mehrere Syntheseketten gebildet werden, wobei die Nitrilase die letzte Reaktion in einer dieser Syntheseketten katalysiert.

1.7 Die Interaktion von *Plasmodiophora brassicae* und *Arabidopsis thaliana*

Erste Untersuchungen zur Interaktion von *Arabidopsis thaliana* und dem Pathogen *Plasmodiophora brassicae* wurden von Koch *et al.* (1991) durchgeführt. Fuchs und Sacristán (1996) konnten erstmals resistente Ökotypen gegen *P. brassicae* identifizieren. Sie untersuchten die Interaktion von 30 *Arabidopsis*-Ökotypen mit vier *P. brassicae*-Isolaten. Es konnte eine Resistenz der Ökotypen Tsu-0 und Ze-0 gegenüber dem Isolat e des Pathogens nachgewiesen werden. In späteren Untersuchungen konnten dann weitere Resistenzen gegenüber diesem Isolat in den Ökotypen Ta-0 (Kobelt *et al.* 2000) und RLD (Arbeiter *et al.* 2001) identifiziert werden.

Anfällige Pflanzen zeigen alle typischen oben genannten Krankheitssymptome. Die inkompatible Interaktion zwischen den resistenten Wirts-Ökotypen und dem Pathogen ist gekennzeichnet durch die Ausbildung von bräunlichen Arealen (Nekrosen) an den Wurzeln und am Hypokotyl. Diese als hypersensitive Reaktion bezeichnete Abwehrreaktion des Wirts hindert den Erreger an der Ausbreitung in der Pflanze. Bei resistenten Pflanzen ist die Anzahl der Seitenwurzeln leicht reduziert und es kann vereinzelt auch zu leichten Schwellungen der Seitenwurzeln kommen. Mikroskopische Untersuchungen zeigten, dass im Bereich von Nekrosen die Zellwände verdickt sind und ligninartige Substanzen eingelagert werden. Diese Nekrosen sind scharf vom gesunden Gewebe abgegrenzt und sind bevorzugt in der Wurzelrinde zu finden (Fuchs und Sacristán 1996). Genauere Untersuchungen zum Infektionsverlauf auf histologischer Ebene wurden von Kobelt (2000) und Kobelt *et al.* (2000) durchgeführt.

1.8 Identifizierung und Kartierung des Resistenzgens *RPBI*

In genetischen Analysen zur Vererbung der Resistenz der Ökotypen Tsu-0 und Ze-0 gegenüber dem *P. brassicae* Isolat e konnte das dominante Resistenzgen *RPBI* (reaction to *Plasmodiophora brassicae*) auf Chromosom 1 identifiziert werden (Fuchs und Sacristán 1996). Auch für die Ökotypen Ta-0 und RLD konnte in späteren genetischen Analysen eine monogen und dominant vererbte Resistenz gezeigt werden. Diese erwies sich als allelisch zu *RPBI* (Kobelt *et al.* 2000, Arbeiter *et al.* 2001). Mit Hilfe morphologischer Marker konnte die Position des Resistenzgens *RPBI* auf Chromosom 1 zunächst nahe dem Marker *dis2* und zwischen den Markern *th1* und *tt1* festgelegt werden (Köhn 1997). In bereits veröffentlichten genetischen Karten von Chromosom 1 konnten diesem Bereich molekulare Marker zugeordnet werden. Auf der Basis einer kartengestützten Klonierung ("map-based cloning") wurde dann mit Hilfe dieser RFLP-Marker der Bereich um das Resistenzgen weiter eingegrenzt, um enger gekoppelte Marker zu identifizieren. Für diese Arbeiten wurde eine Kartierungspopulation unter Verwendung der *Arabidopsis*-Ökotypen Tsu-0 (resistent) und Cvi-0 (anfällig) erstellt. Die Vorselektion auf Rekombinationsereignisse nahe dem Resistenzlocus wurde mit Hilfe von zwei RAPD-Markern durchgeführt. Diese Vorselektionsmarker wurden mit Abständen von 9,1 cM (L4) und 3,6 cM (S12) zu *RPBI* kartiert (Köhn 1997).

Der kartierte Bereich um den *RPBI*-Locus konnte mit RFLP-Markern auf ca. 3,3 cM eingegrenzt werden, wobei der Marker rpHS-1 Cosegregation mit dem Resistenzgen zeigte und die links und rechts kartierenden Marker m253 (0,9 cM) und AIG1 (2,4 cM) den *RPBI*-Locus eingrenzten (Köhn 1997). Ausgehend von einem Verhältnis von ca. 200 kb cM⁻¹ (physikalische/ genetische Distanz) in *Arabidopsis* entsprach der Abstand zwischen den zwei Markern m253 und AIG1 zu diesem Zeitpunkt der Kartierung ca. 660 kb (180 kb + 480 kb). Anhand der kartierten Marker konnten dann aus einer mit YAC-Klonen erstellten physikalischen Karte Klone selektiert werden, die zu einem den Resistenzlocus überspannenden Contig (siehe Abb. 1-1) angeordnet wurden (Köhn 1997, Arbeiter 1997). Es konnte ein 800 kb großer YAC-Klon identifiziert werden, dessen Enden rechts und links mit gleichem Abstand zum Resistenzlocus kartiert wurden (Arbeiter 1997). Da das rechte YAC-Ende mit etwa gleichem Abstand zu *RPBI* wie der zuvor beschriebene Marker AIG1 kartiert werden konnte, war der Resistenzlocus weiterhin auf einen Bereich von ca. 660 kb eingegrenzt.

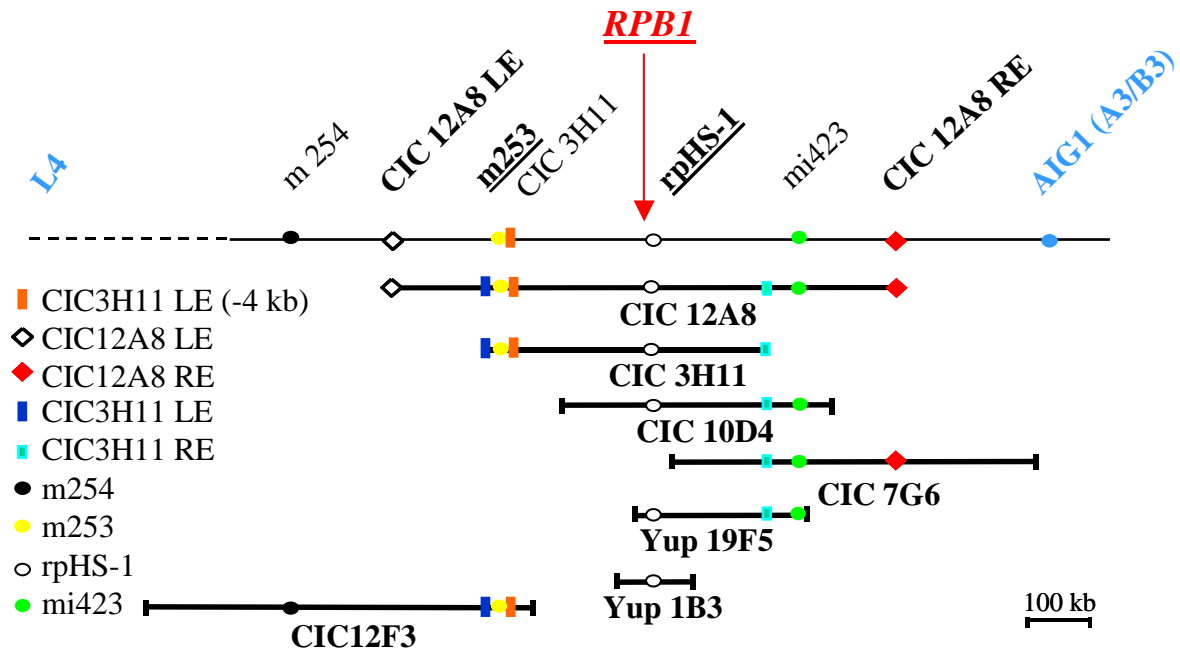


Abb. 1-1: Physikalische Karte (YAC-Contig) für den Bereich um das *RPBI*-Gen auf Chromosom 1 von *Arabidopsis thaliana*. Die verschiedenen Symbole stellen die kartierten Marker bzw. Hybridisierungen mit diesen Markern oder YAC-Enden dar.

1.9 Zielsetzung der Arbeit

Das monogen und dominant vererbte Resistenzgen *RPBI* aus *Arabidopsis thaliana* konnte von Fuchs und Sacristán (1996) identifiziert und mit Hilfe morphologischer Marker auf Chromosom 1 lokalisiert werden. Erste Kartierungsarbeiten im Rahmen einer kartengestützten Klonierung ("positional cloning") dieses Gens wurden von Köhn (1997) durchgeführt. Die Position des Resistenzgens konnte hier unter Verwendung von morphologischen Markern, RAPD-Markern und veröffentlichten RFLP-Markern auf einen Bereich von ca. 660 kb eingegrenzt werden. Mit einer Kartierungspopulation von 900 Pflanzen wurde eine erste physikalische Karte für die *RPBI*-Region in Form eines YAC-Contigs erstellt (Köhn 1997, Arbeiter 1997). Ziel der vorliegenden Arbeit sollte es sein, diese Kartierungsarbeiten, die letztlich zur Klonierung des Resistenzgens *RPBI* führen sollen, fortzusetzen und die *RPBI*-Region auf molekularer Ebene genauer zu analysieren. *Arabidopsis*-Gene sind im Durchschnitt wenige Kilobasen groß, und nach Angaben von Meyerowitz (1994) wurde die durchschnittliche Genfrequenz auf ein Gen alle 2 - 7 kb geschätzt. Um das *RPBI*-Gen klonieren zu können, musste daher der Bereich um den *RPBI*-Locus weiter eingegrenzt werden, damit der DNA-Abschnitt, dem das *RPBI*-Gen später zugeordnet wird, möglichst nur ein bis wenige Gene enthält. Diese Gene müssen im Anschluss mittels der Transformation eines anfälligen *Arabidopsis*-Ökotyps bezüglich ihrer Funktion als Resistenzgen überprüft werden.

- Vorrangiges Ziel dieser Arbeit war es daher, zuerst die Kartierungspopulation in einem Ausmaß zu vergrößern, dass eine Kartierung weiterer, enger gekoppelter Marker möglich wird. Es wurde davon ausgegangen, dass die bestehende Population um das 2 – 4-fache vergrößert werden muss, was von der Rekombinationsfrequenz in der untersuchten Region abhängig war. Hierzu sollten neue, näher am *RPBI*-Locus gelegene Vorselektionsmarker etabliert werden, so dass schnell möglichst viele Pflanzen mit Rekombinationsereignissen sehr nahe am Resistenzlocus selektiert werden können, denn nur diese Pflanzen ermöglichen die Kartierung neuer, enger gekoppelter Marker. Diese Marker sollten keine RFLP-Marker, sondern mittels PCR schnell zu untersuchende Marker sein.
- Als weiterer Schritt sollte im Anschluss an das bereits erstellte YAC-Contig eine physikalische Karte aus BAC-Klonen zur weiteren Eingrenzung des Resistenzlocus erstellt werden. Fragmente dieser BACs sollten als neue Marker dienen. Es war hier wichtig, die Kartierungsdaten auch auf physikalische Distanzen (Größe der YAC-/ BAC-Klone) beziehen zu können, da die genetischen Distanzen der kartierten Marker von der jeweiligen Rekombinationsfrequenz in der untersuchten Region abhängig sind, so dass genetische Distanzen teilweise zu einer Fehleinschätzung der physikalischen Abstände in Basenpaaren führen.
- Da die durchschnittliche Insert-Größe der BAC-Klone etwa 100 kb beträgt und zur Herstellung aller verfügbaren BAC-Bibliotheken DNA des anfälligen *Arabidopsis*-Ökotyps Columbia verwendet wurde, musste der nächste Schritt im Rahmen der Klonierungsarbeiten eine weitere Eingrenzung des relevanten DNA-Abschnitts auf Cosmidgröße (ca. 15 - 20 kb) sein. Diese Cosmide sollten DNA des resistenten Ökotyps Tsu-0 enthalten. Da eine solche Tsu-Cosmidbibliothek nicht verfügbar war, musste diese erst hergestellt werden. Um anschließende Transformationsarbeiten zu erleichtern, sollte zur Herstellung der Bibliothek ein Binärvektor verwendet werden.
- Mit Hilfe der neu kartierten Marker sollten schließlich ein oder mehrere Cosmide aus dieser Bibliothek isoliert werden, die den resistenzvermittelnden DNA-Abschnitt enthalten und zur Transformation anfälliger Pflanzen eingesetzt werden können. Wenn ein DNA-Abschnitt identifiziert wurde, der möglichst nur ein Gen enthält und der zur Komplementation einer anfälligen Pflanze führt, kann daran anschließend eine Charakterisierung des Resistenzgens und der Signaltransduktion erfolgen.